

**Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской Академии Наук**

*На правах рукописи*

**Миронова Надежда Львовна**

**Механизмы подавления прогрессии экспериментальных опухолей под  
действием дендритных клеток и природных нуклеаз**

**03.01.04 – биохимия**

**Диссертация на соискание ученой степени  
доктора биологических наук**

**Научный консультант:  
д.б.н., профессор Зенкова Марина Аркадьевна**

**Новосибирск-2018**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ .....	6
ВВЕДЕНИЕ .....	10
Актуальность темы исследования .....	10
Цели и задачи исследования .....	12
Научная новизна полученных результатов .....	13
Практическая значимость .....	14
Основные положения, выносимые на защиту .....	14
Апробация работы и публикации .....	15
Личный вклад автора .....	15
Объем и структура диссертации .....	16
ГЛАВА 1. Природные нуклеазы, проявляющие противоопухолевую активность, и механизмы их действия (литературный обзор) .....	17
1.1. Введение .....	18
1.2. Опухоль-ассоциированные внеклеточные нуклеиновые кислоты и их роль в канцерогенезе .....	18
1.2.1. Опухоль-ассоциированные вДНК .....	18
1.2.2. Участие вДНК опухолевого происхождения в злокачественной трансформации здоровых клеток .....	21
1.2.3. Опухоль-ассоциированные вРНК .....	24
1.2.4. Участие опухоль-ассоциированных вРНК в злокачественной трансформации здоровых клеток .....	29
1.2.5. Заключение .....	31
1.3. Роль эндогенных РНКаз и ДНКаз млекопитающих в контроле внутриклеточных событий и сигнальных путей, ответственных за онкотрансформацию .....	32
1.3.1. Введение .....	32
1.3.2. РНКазы, участвующие в событиях обычной деградации мРНК: CCR4b, PARN и XRN1 .....	33
1.3.3. РНКазы, активирующиеся в клетке под действием специфических сигналов: РНКазы L, IRE1 и PMR1 .....	37
1.3.4. РНКазы, участвующие в биогенезе миРНК: DROSHA, DICER и AGO2 .....	41
1.3.5. Многофункциональные ДНКазы с РНКазной активностью и РНКазы ядра/цитоплазмы: ангиогенин, G3BP, APE1 и FEN1 .....	44
1.3.6. Заключение .....	51
1.4. Экзогенные противоопухолевые нуклеазы и механизм их действия .....	53

1.4.1. Введение .....	53
1.4.2. Бычья панкреатическая РНКазы А и панкреатическая РНКазы 1 человека .....	54
1.4.3. Онконаза/ранпирназа (из ооцитов лягушки <i>Rana pipiens</i> ) .....	56
1.4.4. BS-РНКазы (из семенников быка) .....	57
1.4.5. Микробные рибонуклеазы .....	59
1.4.6. Возможные механизмы цитотоксического действия РНКаз .....	60
1.4.7. Панкреатическая бычья ДНКазы I .....	67
1.5. Заключение .....	69
ГЛАВА 2. Экспериментальная часть (материалы и методы) .....	71
2.1. Материалы .....	72
2.1.1. Реактивы и препараты .....	72
2.1.2. Оборудование .....	73
2.1.3. Плазмиды .....	74
2.1.4. Буферы и растворы .....	74
2.1.5. Олигонуклеотиды .....	75
2.1.6. Клеточные культуры .....	77
2.1.7. Лабораторные животные и опухолевые модели .....	78
2.1.8. Липосомы .....	78
2.2 Методы .....	79
2.2.1. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот .....	79
2.2.2. Введение [ <sup>32</sup> P]-метки по 5'-концу РНК и ДНК .....	79
2.2.3. Получение первичных культур клеток .....	80
2.2.4. Получение биологического материала .....	81
2.2.5. Выделение нуклеиновых кислот .....	82
2.2.6. Работа с опухолевыми моделями мыши .....	83
2.2.7. Исследование противоопухолевой активности вакцин на основе дендритных клеток .....	86
2.2.8. Получение лимфосаркомы с фенотипом МЛУ .....	92
2.2.9. Исследование противоопухолевого и антиметастатического потенциала бычьей панкреатической РНКазы А, бычьей панкреатической ДНКазы I и рибонуклеазы <i>Bacillus intermedius</i> (биназы) .....	94
2.2.10. Исследование активации иммунной системы под действием нуклеаз и дендритных клеток .....	98
2.2.11. Исследование противоопухолевого механизма действия бычьей панкреатической РНКазы А .....	100

2.2.12. Исследование противоопухолевого механизма действия ДНКазы I.....	107
2.2.13. Статистический анализ .....	111
ГЛАВЫ 3 – 7. Подавление опухолевой прогрессии путем инактивации опухоле- ассоциированных нуклеиновых кислот и индукции специфического иммунного ответа (результаты и обсуждение).....	112
ГЛАВА 3. Противоопухолевые вакцины на основе модифицированных дендритных клеток, способных эффективно экспрессировать и презентировать опухолеспецифические антигены и запускать цитотоксический Т-клеточный ответ.....	113
3.1. Выбор поликатионных липосом, эффективно доставляющих нуклеиновые кислоты в ДК.....	114
3.2. Исследование противоопухолевого потенциала ДК, нагруженных комплексами опухолевой РНК и катионных липосом .....	127
3.3. Эффективность профилактических и терапевтических дендритно-клеточных вакцин в подавлении прогрессии экспериментальных опухолей.....	135
3.4. Заключение.....	140
ГЛАВА 4. Исследование противоопухолевого и антиметастатического потенциала бычьей панкреатической РНКазы А, бычьей панкреатической ДНКазы I и микробной рибонуклеазы <i>Bacillus intermedius</i> (биназы) .....	142
4.1. Разработка лекарственно-устойчивой модели лимфосаркомы мыши .....	143
4.2. Исследование противоопухолевой и антиметастатической активности РНКазы А и ДНКазы I <i>in vivo</i> .....	147
4.3. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия биназы <i>in vivo</i>	161
4.4. Заключение.....	167
ГЛАВА 5. Иммуномодулирующее действие ДК-вакцин, РНКазы А, ДНКазы I и биназы	170
5.1. Иммуномодулирующее действие ДК-вакцин.....	170
5.2. Иммуномодулирующее действие природных нуклеаз РНКазы А, ДНКазы I и биназы	183
5.3. Заключение.....	189
ГЛАВА 6. Исследование механизма противоопухолевого и антиметастатического действия РНКазы А: поиск молекулярных мишеней среди регуляторных и кодирующих РНК .....	191
6.1. Влияние РНКазы А на концентрацию вРНК и суммарную РНКазную активность в плазме крови мышей с LLC и НА-1.....	191
6.2. Дизайн эксперимента .....	193
6.3. Анализ данных секвенирования миРНК из опухолевой ткани и сыворотки крови мышей с LLC после воздействия РНКазы А .....	194
6.4. Валидация данных секвенирования с помощью qПЦР. ....	195
6.5. Влияние РНКазы А на уровень миРНК и генов, участвующих в процессинге миРНК, в клетках LLC при воздействии <i>in vitro</i> .....	202

6.6. Анализ данных секвенирования полного транскриптома опухоли мышей с LLC после воздействия РНКазы А .....	206
6.7. Интегрирование данных секвенирования полного транскриптома в метаболические процессы, обеспечивающие жизнедеятельность опухолевых клеток, и регуляторные пути, задействованные в опухолевой прогрессии.....	207
6.8. Валидация экспрессии генов – ключевых участников сигнальных путей, изменившихся после воздействия РНКазы А.....	217
6.9. Механизм противоопухолевого действия РНКазы А на основании данных секвенирования регуляторных и кодирующих РНК.....	219
6.10. Заключение.....	226
ГЛАВА 7. Исследование механизма противоопухолевого и антиметастатического действия ДНКазы I: поиск молекулярных мишеней среди внеклеточных опухоль-ассоциированных ДНК.....	227
7.1. Определение концентрации вДНК и суммарной ДНКазной активности в плазме крови мышей с LLC и HA-1 до и после введения ДНКазы I .....	227
7.2. Дизайн эксперимента .....	228
7.3. Анализ данных секвенирования вДНК сыворотки крови мышей с LLC после воздействия ДНКазы I.....	230
7.4. Исследование уровня SINE и LINE элементов в крови мышей с LLC и метастатической меланомой B16 и их изменения под действием ДНКазы I.....	237
7.5. Механизм противоопухолевого действия ДНКазы I на основании данных секвенирования циркулирующих вДНК .....	238
7.6. Заключение.....	242
ВЫВОДЫ .....	243
БЛАГОДАРНОСТИ .....	245
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	246
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 .....	286
ПРИЛОЖЕНИЕ 2(Список научных трудов, вошедших в диссертацию) .....	311
Статьи в научных журналах .....	311
Тезисы конференций .....	312

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

- A2 – аннексин A2
- ABE – ангиогенин-связывающий элемент
- AGO – аргонавт
- APe1 – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1
- ARE – AU-богатые элементы
- B/Akt – серин/треониновая киназа АКТ
- BAK – про-апоптотический белок BAK
- BAX – BCL2-ассоциированный X белок
- BC – карцинома молочной железы
- BCCL - клеточные линии, полученные из карциномы молочной железы
- BCL2 – регулятор апоптоза BCL2
- BER – эксцизионная репарация оснований
- BL – лимфома Беркетта
- BMP – костный морфогенетический белок
- BRCA1 – белок восприимчивости к раку молочной железы
- CEA – карциноэмбрионический антиген
- CC – аденокарцинома толстого кишечника
- CGN – cis-Golgi сеть.
- CK-19 – цитокератин-19
- CSCC - цервикальная плоскоклеточная карцинома
- CUG-BP - CUG РНК-связывающий белок
- DHT – дигидротестостерон
- DMEM – среда Игла, модифицированная Дульбекко
- dNTP – дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
- DROSHA – рибонуклеаза III (Drosha)
- ECM – внеклеточный матрикс
- EGFP – зеленый флуоресцирующий белок
- ER, ЭР – эндоплазматический ретикулум
- ESSC – плоскоклеточная карцинома пищеварительного тракта
- FBS – эмбрионическая телячья сыворотка
- FITC – флуоресцеин изотиоцианат
- fold change – кратность изменения между библиотеками
- G3BP – RasGAP-ассоциированная эндорибонуклеаза G3BP
- GC – карцинома желудка
- HCC – гепатоцеллюлярная карцинома
- HNPC - наследственный неполипозный рак толстой кишки
- hnRNP – гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины
- HNSCC – плоскоклеточный рак головы и шеи
- HPC – наследственный рак предстательной железы

hTERT – обратная транскриптаза теломеразы  
hTR – РНК компонент теломеразы  
IMDM – Iscove's modified Dulbecco's medium, среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков  
KSRP – KH-type splicing regulatory protein, регуляторный белок сплайсинга KH-типа  
LC - аденокарцинома легких  
LCL - клеточные линии лейкемического происхождения  
LF – Lipofectamine 2000, липофектамин  
LLC – Lewis lung carcinoma, карцинома легких Льюис  
LM - леймиома  
LR – липидный рафт  
LS – лимфосаркома  
LSM – lymphocyte separation medium, среда для отделения лимфоцитов  
MAGE-3 – меланома-ассоциированный антиген 3  
MC - мукоэпидермоидная карцинома  
Mdm2 – протоонкоген MDM2  
MDR – multiple drug resistant, лекарственно-устойчивый  
MFI – mean fluorescence intensity, средняя интенсивность флуоресценции  
MG - злокачественная глиома  
MHC – молекулы главного комплекса гистосовместимости  
ML – миелома  
MN – меланома  
MUC18 – меланома-ассоциированная молекула кеточной адгезии  
NSCLC – немелкоклеточный рак легкого  
N/P соотношение – соотношение количества аминогрупп в поликатионных липидах к количеству фосфатных групп в нуклеиновой кислоте  
ncРНК – некодирующие РНК  
NET – neutrophilic extracellular traps, нейтрофильные внеклеточные ловушки  
OC – серозная карцинома яичника  
OSC – остеосаркома  
PanC – анкреатическая аденокарцинома  
PBS – фосфатно-солевой буфер  
PC – аденокарцинома простаты  
P.D.I. – polydispersity index, индекс полидисперсности  
PI – индекс пролиферации  
PE – фикоэритрин  
PNPMA – поли[N-(2-гидроксипропил)метакриламид]  
PKC $\beta$ 2 – протеинкиназа C  $\beta$ 2  
PLN – плазмин  
PLSCR1 – фосфолипид скрамблаза 1  
PLSG – плазминоген

PMR1 – полисомальная рибонуклеаза 1  
 pre-миРНК – предшественник миРНК  
 pre-pРНК – предшественник рРНК  
 pri-миРНК – первичная миРНК  
 PSMA – простат-специфичный мембранный антиген  
 RBP – РНК-связывающие белки  
 RFU – relative fluorescent unit, относительная флуоресцентная единица  
 RIN, RNA integrity number - целостность РНК в составе фракций  
 RLS, RLS<sub>40</sub> – резистентная лимфосаркома  
 RNH1 – плацентарный рибонуклеазный ингибитор человека  
 RNP – рибонуклеопротеиновый комплекс  
 RPKM – reads per kilobase per million reads in library, количество фрагмент-специфичных прочтений на 1000 нк на млн прочтений в библиотеке  
 RPM – reads per million reads in library, количество фрагмент-специфичных прочтений на млн прочтений в библиотеке  
 S100 – calpactin S100-A10, кальпактин S100-A10  
 SAPK/JNK – стресс-ассоциированная протеин киназа/N--концевая киназа C-Jun  
 Score – номер миРНК в порядке убывания представленности последовательностей (величинам RPKM) в библиотеке  
 SCLC – мелкоклеточный рак легкого  
 snoРНК – малые некодирующие РНК  
 5T4 – онкофетальный антиген 5T4  
 ТА – тироидная аденома  
 TAN – опухоль-ассоциированные нейтрофилы  
 TE – эффективность трансфекции  
 TGN – trans-Golgi network  
 Th1 – Т-хелперные клетки 1 типа  
 Th17 – Т-хелперные клетки 17 типа  
 Th2 – Т-хелперные клетки 2 типа  
 TIA – Т-клеточный внутренний антиген  
 TIC – комплекс инициации трансляции  
 tiРНК или tRF - малые РНК, образование которых из rРНК индуцируется под действием стресса  
 Total fold (TF) – сумма fold change  
 UCE – вышележащий коровый элемент  
 uPA – активатор плазминогена  
 uPAR – рецептор активатора плазминогена  
 USP – убиквитин-специфичные протеазы  
 VT – vitronectin, витронектин  
 VEGF – фактор роста эндотелия сосудов  
 XBP1 – X-бокс-связывающий белок 1  
 XRN1 – 5'-3' экзорибонуклеаза 1

w/s – without stimulation, без стимулирования  
w/t – without treatment, без обработки (введения, применения)  
YB-1 – Y box binding protein 1  
АГ – антиген  
АПК – антиген-представляющие клетки  
в/б - внутрибрюшинно  
в/в – внутривенно  
в/м – внутримышечно  
внДНК – внеклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота  
внРНК – внеклеточная рибонуклеиновая кислота  
ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор  
ДК – дендритные клетки  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
дцДНК – двуцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота  
ИЛ – интерлейкин  
ИФН – интерферон  
миРНК – микроРНК  
siРНК – малая интерферирующая РНК  
ЛПВП – липопротеины высокой плотности  
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота  
НК – нуклеиновая кислота  
ОАГ – опухолеспецифические антигены, опухолеассоциированные антигены  
ОТ-ПЦР – обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция  
предДК – предшественники дендритных клеток  
РНБ - реакции несвернутых белков РНБ  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота  
Трег – Т регуляторные клетки  
ФНО – фактор некроза опухоли  
ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **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 [1]. 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 [1].

На всех этапах опухолевой прогрессии принимают участие опухоль-ассоциированные нуклеиновые кислоты, 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 [2, 3], контроля клеточного цикла, ангиогенеза, адгезии, апоптоза [4-9] и путей онкотрансформации, таких как PI3K/AKT, TGF- $\beta$ , JAK/STAT и MAPK [10-14]; внутриклеточные и внеклеточные регуляторные РНК, участвующие в аутокринной и паракринной регуляции экспрессии их прото-онкогенных и онкосупрессорных мРНК [15, 16]. Среди ДНК, которые могут принимать участие в канцерогенезе, выделяют: внеклеточные ДНК в составе ДНК/белковых комплексов и микровезикул, участвующие в трансформации нормальных клеток [17, 18], в том числе ретротранспозонные ДНК [19-21]; продуцируемые опухолью ДНК, участвующие в усилении так называемых нейтрофильных ловушек (NET), которые способствуют миграции и инвазии опухоли [22-24].

Полученные многочисленные данные об участии опухоль-ассоциированных РНК в канцерогенезе и ДНК в метастазировании позволили по-новому взглянуть на ферменты, способные разрушать нуклеиновые кислоты, как на возможные противоопухолевые и антиметастатические агенты. Препараты на основе природных рибонуклеаз и дезоксирибонуклеаз давно рассматриваются исследователями, как перспективная

альтернатива химиотерапии рака, в связи с их основной функцией - деградацией нуклеиновых кислот.

В мире широким фронтом ведутся исследования противоопухолевого потенциала экзогенных рибонуклеаз. На сегодняшний день продемонстрирован высокий противоопухолевый потенциал различных природных рибонуклеаз - BS-РНКаза из семенников быка [25-28] и онконаза из ооцитов *Rana pipiens* [29-31], относящихся к семейству РНКазы А, а также ряда микробных нуклеаз [32, 33]. 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 [34-36], тогда как в других – ее полное отсутствие [37, 38]. Таким образом, противоопухолевый потенциал РНКазы А остался 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 [33, 39], что делает ее перспективной для исследования противоопухолевого потенциала *in vivo*.

Среди ДНКаз внимание исследователей привлекли два фермента: панкреатическая ДНКазы I быка и рекомбинантная ДНКазы I человека (дорназа альфа) [40]. На линиях опухолевых клеток Calu-1, SK-MES-1, HeLa, HEP-2 и L-929 была продемонстрирована способность ДНКазы I снижать их пролиферацию [41]. Антиметастатический потенциал ДНКазы I был продемонстрирован *in vivo* на модели опухоли L5178Y-ML, метастазирующей в печень [42, 43]. На модели рака поджелудочной железы была показана способность ДНКазы I снижать уровень метастазирования *in vivo* и уменьшать миграционный и инвазивный потенциал опухолевых клеток *in vitro*, не влияя при этом на скорость миграции клеток нормального эпителия поджелудочной железы [44]. Предпринимались попытки применять ДНКазу I для лечения пациентов с различными метастатическими формами рака [45, 46]. 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 [47-49]. 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 загрузки 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 сквартного 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 tandemных 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. С одной стороны, опухоль-ассоциированные нуклеиновые кислоты способствуют прогрессии опухоли при их гиперэкспрессии в клетке, что приводит к ее злокачественному перерождению. С другой стороны опухоль-ассоциированные нуклеиновые кислоты являются важным звеном, формирующим противоопухолевый иммунитет.

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* (биназа) 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 вДНК 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 44 российских и международных конференциях (Приложение 2).

### **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, Новосибирск). 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. (Институт цитологии и генетики СО РАН), к.б.н. Патутиной О. А., к.б.н. Марковым О.В. и к.м.н. Сеньковой А.В. (Институт химической биологии и фундаментальной медицины 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. (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта 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. и д.б.н. Рябчиковой Е.И. (Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»).

Анализ уровня миРНК с помощью qПЦР проведен Патутиной О.А. (ИХБФМ СО РАН). Секвенирование ДНК-библиотек, получены из РНК и вДНК 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 вДНК, 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. и защищенных под руководством автора. Результаты кандидатской диссертации к.б.н. Маркова О.В. вошли в Главы 3 и 5. Результаты кандидатской диссертации к.б.н. Патутиной О.А. вошли в Главы 4 и 5.

### **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. Текст изложен на 317 страницах, иллюстрирован 60 рисунками, включает 27 таблиц, список литературы содержит 681 библиографический источник. Приложение 1 включает 6 таблиц, приложение 2 – список научных трудов, вошедших в диссертацию.

**ГЛАВА 1. Природные нуклеазы, проявляющие  
противоопухолевую активность, и механизмы их действия  
(литературный обзор).**

## 1.1. Введение

Согласно современным представлениям экзогенные нуклеазы представляют собой новый класс противоопухолевых препаратов. Среди известных рибонуклеаз, проявляющих противоопухолевую активность, следует упомянуть BS-РНКазу из семенников быка [25-28], а также онконазу из ооцитов лягушки *Rana pipiens* [29-31]. Среди малоизученных в экспериментах *in vivo* рибонуклеаз с цитотоксическим действием следует отметить микробную рибонуклеазу *Bacillus intermedius* (биназу), относящуюся к семейству РНКазы T1 [32, 33, 50, 51].

Противоопухолевый потенциал экзогенных нуклеаз исследуется около 60 лет. Тем не менее, лишь недавние открытия в области контроля злокачественной трансформации клетки с помощью эндогенных нуклеаз, позволили по-новому взглянуть на экзогенные нуклеазы, как средства восполнения недостаточности функции эндогенных нуклеаз. Кроме того, открытия в области внеклеточных ДНК и РНК, уровень которых значительно повышен в крови онкологических больных, позволил предположить новые мишени для экзогенных нуклеаз, которые могут осуществлять функцию контроля злокачественной трансформации не только на уровне клетки, но и на системном уровне.

В обзоре будут рассмотрены: опухоль-ассоциированные внеклеточные нуклеиновые кислоты и их роль в канцерогенезе; механизмы контроля злокачественной трансформации клетки под действием эндогенных нуклеаз; природные нуклеазы, проявляющие противоопухолевую активность; и механизмы, опосредующие противоопухолевое действие природных нуклеаз.

## 1.2. Опухоль-ассоциированные внеклеточные нуклеиновые кислоты и их роль в канцерогенезе

### 1.2.1. Опухоль-ассоциированные внДНК

Первое доказательство существования внеклеточных нуклеиновых кислот было сделано в работах Griffith, который продемонстрировал передачу патогенных свойств от убитых бактерий живым клеткам непатогенного штамма [52]. Через несколько десятилетий Avery с соавторами показали не только перенос генетического материала между различными бактериальными штаммами на примере *Pneumococcus*, но и доказали, что в переносе участвуют именно внДНК [53].

Наличие внДНК в плазме крови было впервые описано в работе Mandel и Métais в 1948 году [54]. Однако данная работа не привлекла особого внимания исследователей вплоть

до 1977 года, когда Anker и Stroun достаточно подробно описали в своей работе циркулирующие внДНК плазмы крови некоторых высших организмов [55]. В 1994 году в составе внДНК крови больных онкологическими заболеваниями были обнаружены последовательности мутантных фрагментов гена *Ras* [56, 57] и мутантных микросателлитных ДНК [58], что дало толчок к появлению различных гипотез об их участии в процессе онкотрансформации. В течение последнего десятилетия внеклеточным нуклеиновым кислотам уделялось все больше внимания, причем не только ДНК, но и опухоль-ассоциированным и некодирующим РНК, которые также обнаруживаются в крови онкологических больных.

Источником внДНК в крови являются некротизированные клетки и клетки в состоянии апоптоза [59]. Остатки некротизированных клеток и апоптотические тельца поглощаются макрофагами и другими фагоцитирующими клетками, которые впоследствии выделяют «переработанные» ДНК в окружающие ткани [60], однако часть апоптотических телец может участвовать в циркуляции, избежав фагоцитоза. В норме некроз встречается значительно реже апоптоза. Хотя он часто наблюдается при развитии опухолей, однако он не может рассматриваться как основной источник внДНК у онкологических больных, т.к. высокие концентрации внДНК наблюдаются, в том числе, на ранних этапах развития опухоли, не сопровождающихся обширным метастазированием и возникновением некротизированных участков [61]. Тем не менее, была обнаружена достоверная корреляция увеличения концентрации циркулирующей в крови ДНК в зависимости от тяжести травмы у пациентов [62]. Некоторые данные позволяют судить о наличии механизма секреции внеклеточных ДНК некоторыми типами клеток [63]. Однако точные доказательства наличия этого процесса и механизмы не были найдены.

ВнДНК, в основном, циркулируют в крови в составе ДНК-гистоновых комплексов, так называемых олигонуклеосомных частиц [64], в комплексе с белками сыворотки крови [65], в составе апоптотических телец, в комплексах с липопротеинами, белком p53 и другими белками [59, 66]. Показано, что олигонуклеосомные частицы могут циркулировать в крови в составе иммунных комплексов с анти-ДНК антителами [67].

Опухоль обычно представляет собой смесь клонов различных раковых клеток, что зависит от геномной и эпигеномной гетерогенности опухоли, и нормальных клеток, формирующих опухолевую строму, поэтому при прогрессировании опухоли в кровь и другие биологические жидкости попадают ДНК как нормальных, так и опухолевых клеток. Таким образом, количество внДНК опухолевого происхождения в крови постоянно меняется и зависит от динамики развития опухоли, клиренса, скорости ее деградации и других

физиологических путей фильтрации крови и лимфы. Отсюда очевидно, что профили вДНК здоровых доноров и больных онкологическими заболеваниями должны сильно различаться как по концентрации вДНК, так и по типам представленных последовательностей.

Среди вДНК крови онкологических больных были обнаружены фрагменты онкогенов и мутантных генов, фрагменты перегруппированных генов, микросателлитные последовательности, не характерные для нормальных клеток, гиперметилированные последовательности [66], мутантные последовательности митохондриальной ДНК [68, 69], ретротранспозонные ДНК [19-21]. Так, в плазме крови пациентов с В-клеточными новообразованиями были обнаружены фрагменты перегруппированных генов, кодирующих тяжелые цепи иммуноглобулинов [70]. У пациентов с внутричерепными опухолями в спинномозговой жидкости была обнаружена повышенная представленность фрагментов гена *Her-2/neu* [71]. В плазме и сыворотке крови пациентов с нейробластомой обнаруживались высокие уровни фрагментов гена *MYC-N*, что позволило использовать его в качестве молекулярного маркера прогрессирования заболевания при дальнейшем ведении пациентов [72, 73].

Наиболее часто среди вДНК плазмы крови онкологических больных встречаются фрагменты мутантного гена *K-Ras*, являющегося ключевым участником внутриклеточных каскадов, ответственных за онкотрансформацию клетки, и гена *p53*, играющего ключевую роль в запуске апоптоза. Этот ген, наряду с *p53*, насчитывает наибольшее количество случаев возникновения мутаций в опухолевых клетках. Мутантные фрагменты гены *K-Ras* обнаруживаются в плазме крови пациентов с панкреатической карциномой и раком поджелудочной железы [74, 75], немелкоклеточным раком легкого [76] и колоректальным раком [77, 78]. Наиболее часто встречаются мутантные последовательности гена *p53* у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой [79, 80], раком яичников [81] и раком груди [82]. Большое количество мутантных последовательностей генов в плазме крови пациентов с онкологическими заболеваниями напрямую связано с нарушением нормального функционирования клетки при ее злокачественном перерождении, а с увеличением объема опухоли это приводит к повышению представленности таких фрагментов.

В последнее время накапливаются данные о присутствии большого количества фрагментов SINE и LINE элементов, относящихся к ретротранспозонам, среди циркулирующих вДНК плазмы крови пациентов с онкологическими заболеваниями [83, 84]. В плазме крови были обнаружены микровезикулы, секретируемые опухолевыми клетками, в которых наряду с фрагментами онкогенов были обнаружены и фрагменты генов с инсерциями LINE-1 и Alu элементов [85]. Роль ретротранспозонов в онкотрансформации в

настоящее время активно обсуждается. В большинстве клеток в норме гены LINE-элементов репрессированы, однако во множестве эпителиальных опухолей эти гены активно экспрессируются, что позволяет предположить связь между активностью LINE-элементов и пролиферативным и метастатическим поведением раковых клеток.

### **1.2.2. Участие внДНК опухолевого происхождения в злокачественной трансформации здоровых клеток**

Горизонтальный перенос ДНК впервые был показан у бактерий, у которых этот процесс играет важную роль в развитии устойчивости к антибиотикам и адаптации к новым средам [86, 87]. Известен также обмен генетическим материалом между клетками в трансплантатах тканей растений [88]. Существует множество работ, опубликованных в между 1960 и 1970 годами, указывающих на то, что эукариотические клетки могут поглощать внеклеточную ДНК и РНК [89, 90], при этом способность обмениваться НК не зависит от источника происхождения донорных НК и клеток-реципиентов [89]. Было показано, что экзогенная ДНК способна индуцировать повреждение хромосом [91] и менять кариотип клеток в случае разного видового происхождения экзогенной ДНК и клетки-реципиента [92]. Также существуют доказательства того, что ДНК, захваченная клетками млекопитающих, подвергается репликации, транскрипции и трансляции [93, 94].

Stroun, Anker и Gahan разработали концепцию обмена генетическим материалом: в экспериментах с бактериями, растениями и высшими организмами они идентифицировали комплексы, содержащие бактериальные ДНК и их собственные ДНК и РНК-зависимые ДНК-полимеразы, способные интегрировать фрагменты бактериального генома в геном клетки-хозяина [95-97]. После идентификации подобных комплексов в высших организмах эти авторы предложили концепцию виртосом, играющих важную роль в межклеточной коммуникации: липопротеиновых комплексов, содержащих ДНК, РНК, а также ДНК и РНК-зависимые ДНК-полимеразы [98]. Важными участниками межклеточной коммуникации также являются нуклеосомы, гистоны, апоптотические тельца, а также микровезикулы и экзосомы, в составе которых обнаруживается как ДНК, так и РНК. Учитывая существование горизонтального переноса ДНК, присутствие больших количеств опухоль-ассоциированных внДНК в крови онкологических больных предполагает их возможное участие в качестве переносчиков определенных «опухолегенных» свойств нормальным клеткам.

Классическая теория метастазирования предполагает, что метастазирование происходит путем распространения по организму клеток первичной опухоли через кровотоки с формированием очагов метастазов в наиболее «чувствительных» к этому органам-мишеням. В 1999 году группа исследователей, возглавляемая Garcia-Olmo, выдвинула гипотезу об

альтернативном пути возникновения метастазов. Согласно этой «генометастатической» теории предполагается, что “метастазы могут возникать путем трансфекции уязвимых клеток, расположенных в органах-мишенях, опухолеспецифическими ДНК из клеток первичной опухоли, циркулирующими в крови” [99]. Эта гипотеза была принята другими авторами как одна из главных моделей, которая может объяснить противоречия в экспериментальных данных, касающихся метастазирования. Впоследствии группа Holmgren представила доказательства, что ДНК опухоли могут попадать в другие клетки при поглощении ими клеточного материала после апоптоза путем горизонтального переноса, что приводило к анеуплоидии и накоплению генетических изменений, ведущих к образованию опухоли [100].

В 2010 году Garcia-Olmo с соавторами было показано участие вДНК опухолевого происхождения в злокачественной трансформации [101]. Линию NIH-3T3 опухолевых клеток мыши культивировали в плазме крови пациентов с колоректальным раком, в которой были выявлены вДНК, содержащие фрагменты мутантных генов *K-ras*, *p53* и  $\beta$ -глобина, или плазме здоровых доноров в течение 20 суток и вводили подкожно мышам линии NOD-SCID. Клетки линии NIH-3T3, которые культивировали в плазме крови онкологических больных, *in vivo* формировали опухоль, в которой обнаруживались мутантные последовательности гена *K-ras*. При этом клетки, культивированные в плазме крови здоровых доноров, *in vivo* опухоль не образовывали. Таким образом, авторами был доказан перенос вДНК опухолевого происхождения и приобретение клетками мыши злокачественного фенотипа опухоли человека. Эти результаты коррелируют с исследованиями других авторов, в которых было показано, что в клетках культуры фибробластов мыши после трансфекции ДНК из опухолей человека обнаруживаются не только трансформированные опухолевые гены, но и огромное количество других фрагментов ДНК человека [102].

В 2012 году группой Dueñas-González было показано, что циркулирующие ДНК способны вызывать возникновение опухолей толстой кишки у крыс и мышей. ВДНК из сыворотки крови больных колоректальным раком и вДНК из культуральной среды, в которой культивировали клетки карциномы толстой кишки человека SW480, содержащие мутацию *K-ras* в обоих аллелях и выделяющие вДНК с мутированным онкогеном в культуральную среду, индуцировала трансформацию клеток NIH-3T3 *in vitro* и опухолегенез *in vivo*. При этом трансформации клеток и повышения их опухолегенных свойств не происходило в случае полного удаления вДНК из сыворотки и супернатанта. У крыс опухоли толстого кишечника были индуцированы путем воздействия 1,2-диметилгидразина, и скорость роста опухолей значительно возрастала после инъекции в область спины крысам

клеток карциномы толстого кишечника человека SW480 в качестве источников внДНК опухолевого происхождения. Таким образом, результаты исследования показали, что внДНК опухолевого происхождения не только вызывает трансформацию клеток, но также способствует росту опухоли в живом организме [103].

внДНК в составе нуклеосом или гистонов могут непосредственно транслоцироваться сквозь клеточную мембрану способом, который является энерго-независимым и не связан с эндоцитозом [104]. Проникновение ДНК в составе комплексов с гистонами (нуклеосомных единиц) в клетки осуществляется за счет неспецифической формы нековалентных ионных взаимодействий с клеточной плазматической мембраной. Учитывая отрицательный заряд ДНК и положительный заряд гистонов, такой комплекс обеспечивает стабильность ДНК в кровотоке и представляет собой некое «мобильное устройство» для транспортировки ДНК в клетки [104]. Было показано, что протеогликаны клеточной поверхности могут собирать нуклеосомы, в то время как высвобождающиеся из состава нуклеосом ДНК проникают в клетки с помощью толл-подобных рецепторов [105, 106]. В нескольких работах была доказана биологическая роль циркулирующих гистонов. Так, внДНК в составе комплексов с гистонами, количество которых повышается в кровотоке при воспалении и сепсисе, оказывали цитотоксический эффект по отношению к эндотелиальным клеткам *in vitro*, а при введении мышам вызывали летальный исход [107].

внДНК также способны попадать в нормальные клетки в составе апоптотических телец, микровезикул и экзосом. В крови пациентов с онкологическими заболеваниями было обнаружено присутствие аномального количества микровезикул, большинство из которых имело опухолевое происхождение [108, 109]. Такие микровезикулы являются главным источником опухоль-ассоциированной внДНК и способны принимать участие в трансформации, и, как следствие, в злокачественном перерождении нормальных клеток [110, 111].

внДНК в опухолевом окружении также принимают участие в формировании так называемых нейтрофильных ловушек (NET). Нейтрофилы представляют значительную часть инфильтрата воспалительных клеток опухолевого окружения [112]. Было показано, что опухоль-ассоциированные нейтрофилы (TAN) проявляют как “опухолегенные”, так и противоопухолевые свойства в зависимости от их активационного статуса [113-115]. Нетозис, запрограммированная смерть нейтрофилов путем лизиса, происходит при активации нейтрофилов под действием патогенов или в определенных условиях. При этом происходит деконденсация хроматина, лизис клеток и ядерных мембран, что, в итоге, приводит к высвобождению нейтрофильных ДНК и формированию NET [116]. Таким

образом, NET состоят из волокон, включающих реконструированные внДНК и антимикробные гранулы [117], и их изначальная функция заключается в формировании ловушек для патогенов и их элиминации [118]. Эти нейтрофильные сети и являются одним из главных источников внДНК [116]. Формирующиеся в условиях развития инфекции или при конкретных патофизиологических состояниях, NET интересны с точки зрения их функций, особенно при аутоиммунных патологиях, раке, сепсисе и при воспалительных реакциях [119-121]. Так, было показано, что продуцируемые опухолью ДНК участвуют в усилении NET и способствуют миграции и инвазии опухоли [22-24, 119]. Таким образом, опухоль-ассоциированные внДНК не только способны участвовать в злокачественной трансформации нормальных клеток, но и могут способствовать диссеминации опухоли за счет интегрирования в NET.

### **1.2.3. Опухоль-ассоциированные внРНК**

Учитывая тот факт, что РНК нестабильны в обогащенной РНКазой плазме крови, долгое время факт существования внРНК не признавался научной общественностью. Коррески с соавторами однозначно продемонстрировали наличие опухоль-ассоциированных РНК в плазме крови онкологических больных [122]. Впоследствии это наблюдение подтвердилось многими авторами и признается повсеместным явлением [123, 124]. Спектр обнаруживаемых в плазме крови РНК достаточно широк: это фрагменты митохондриальных РНК, рРНК, тРНК, мРНК, малые некодирующие РНК (snoРНК, miРНК), которые детектируются в плазме или сыворотке крови в составе рибонуклеопротеинов, внеклеточных мембранных везикул, микровезикул и экзосом [125, 126].

мРНК. Среди внРНК были обнаружены фрагменты мРНК, кодирующие опухоль-ассоциированные антигены, т.е. белки, которые в норме экспрессируются в клетке с низкой эффективностью, но при опухолевой прогрессии уровень их экспрессии значительно возрастает. Большие количества фрагментов таких опухоль-ассоциированных мРНК были обнаружены в плазме крови пациентов с раком легких, щитовидной железы, молочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря и меланомы. (Таблица 1, [www.cnaps.net](http://www.cnaps.net)). В нескольких исследованиях был проведен поиск таких опухоль-ассоциированных мРНК среди внРНК плазмы и сыворотки крови онкологических больных с целью выявления диагностических маркеров. Проведенные исследования позволили сделать вывод о представленности таких мРНК при разных типах рака в крови пациентов.

В нескольких работах в плазме крови пациентов с раком молочных желез, раком щитовидной железы, злокачественной меланомой и гепатоцеллюлярной карциномой были обнаружены повышенные уровни фрагментов мРНК, кодирующих компоненты теломеразы

**Таблица 1.** Опухоль-ассоциированные мРНК, фрагменты которых обнаруживаются в высоких количествах в плазме/сыворотке крови пациентов с онкологическими заболеваниями.

Тип онкологического заболевания/количество пациентов в выборке	Ген	Плазма/сыворотка	Ссылки, примечания
Рак молочных желез/10	маммаглобин	6/10 (60%)	Gal et al, 2001 [127]
Колоректальный рак/50 Здоровые доноры/50	<i>hTERT</i>	Детекция в обеих группах, но у онкологических больных значительно выше, чем у здоровых	Lledo et al, 2004 [128]
Колоректальный рак/53 Здоровые доноры/25	<i>CEA</i> <i>CK 19</i> <i>CEA</i> <i>CK 19</i>	17/53 (32%) 39/53 (74%) 1/25 (4%) 5/25 (20%)	Silva et al, 2002 [129]
Меланома/10	Тирозиназа <i>gp100</i> <i>MART-1</i> <i>PBGD</i>	3-5/10 (30-50%, сыворотка – плазма) 0/10 0/10 7-8/10 (70-80%, сыворотка-плазма)	Hasselmann et al, 2001 [130]
Меланома/119	Тирозиназа <i>MAGE-3</i> <i>MUC-18</i> <i>p97</i>	24/119 (20%) 10/119 (8%) 41/119 (34%) 19/119 (16%)	Hoon et al, 2000 [131]
Карцинома простаты/12	<i>PSMA</i> <i>CEA</i>	4/12 (33%) 1/12 (8%)	Papadopoulou et al, 2004 [132]
Здоровые доноры/18	<i>PSMA</i> <i>CEA</i>	Отрицательно во всех образцах	
Рак молочных желез/18	<i>hTR</i> <i>hTERT</i>	5/18 (28%)	Chen et al, 2000 [133]
Рак молочных желез/25	<i>hTR</i> <i>hTERT</i>	23/25 (92%) 12/25 (48%)	Novakovic et al, 2004 [134]
Злокачественная меланома/29	<i>hTR</i> <i>hTERT</i>	24/29 (83%) 17/29 (59%)	
Рак щитовидной железы/4	<i>hTR</i> <i>hTERT</i>	4/4 (100%) 4/4 (100%)	
Здоровые доноры/7	<i>hTR</i> <i>hTERT</i>	3/7 (43%) 0/7 (0%)	
Гепатоцеллюлярная карцинома /78	<i>hTERT</i>	90%	Miura et al, 2003 [135]
Цирроз печени/10		70%	
Хронический гепатит/12		42%	

**Таблица 1 (продолжение).** Опухоль-ассоциированные мРНК, фрагменты которых обнаруживаются в плазме/сыворотке крови пациентов с онкологическими заболеваниями.

Тип онкологического заболевания/количество пациентов в выборке	Ген	Плазма/ сыворотка	Ссылки, примечания
Рак молочных желез/45  Здоровые доноры/25	маммаглобин <i>СК 19</i>  маммаглобин <i>СК 19</i>	27/45 (60%) 22/45 (49%)  3/25 (12%) 5/25 (20%)	Silva et al, 2001 [136]
Рак легких/8	<i>Her2/neu</i> <i>hnRNP-B1</i>	4/8 (50%) 8/8 (100%)	Fleischhacker et al, 2001 [139]
Рак легких/44 Здоровые доноры/25	<i>hnRNP-B1</i>	0.99 пг/г РНК 0.3 пг/г РНК	Sueoka et al, 2005 [140]
Рак молочной железы/5	<i>5T4</i>	2/5 (40%)	Kopreski et al, 2001 [141]
Рак легких/14		6/14 (43%)	

hTR и hTERT (Таблица 1) [133-134]. Теломераза представляет собой РНК-зависимую ДНК полимеразу, достраивающую теломерные участки, и играет значительную роль в клеточном старении. Уровень ее экспрессии в нормальных клетках крайне низок. Гиперэкспрессия теломеразы в клетках может приводить к эпителиально-мезенхимальному перерождению и опухолевой прогрессии. Повышенные уровни теломеразы обнаруживаются во многих типах опухолей и, таким образом, опухолевые клетки могут служить источником большого количества фрагментов генов hTR и hTERT мРНК в крови пациентов с онкологическими заболеваниями.

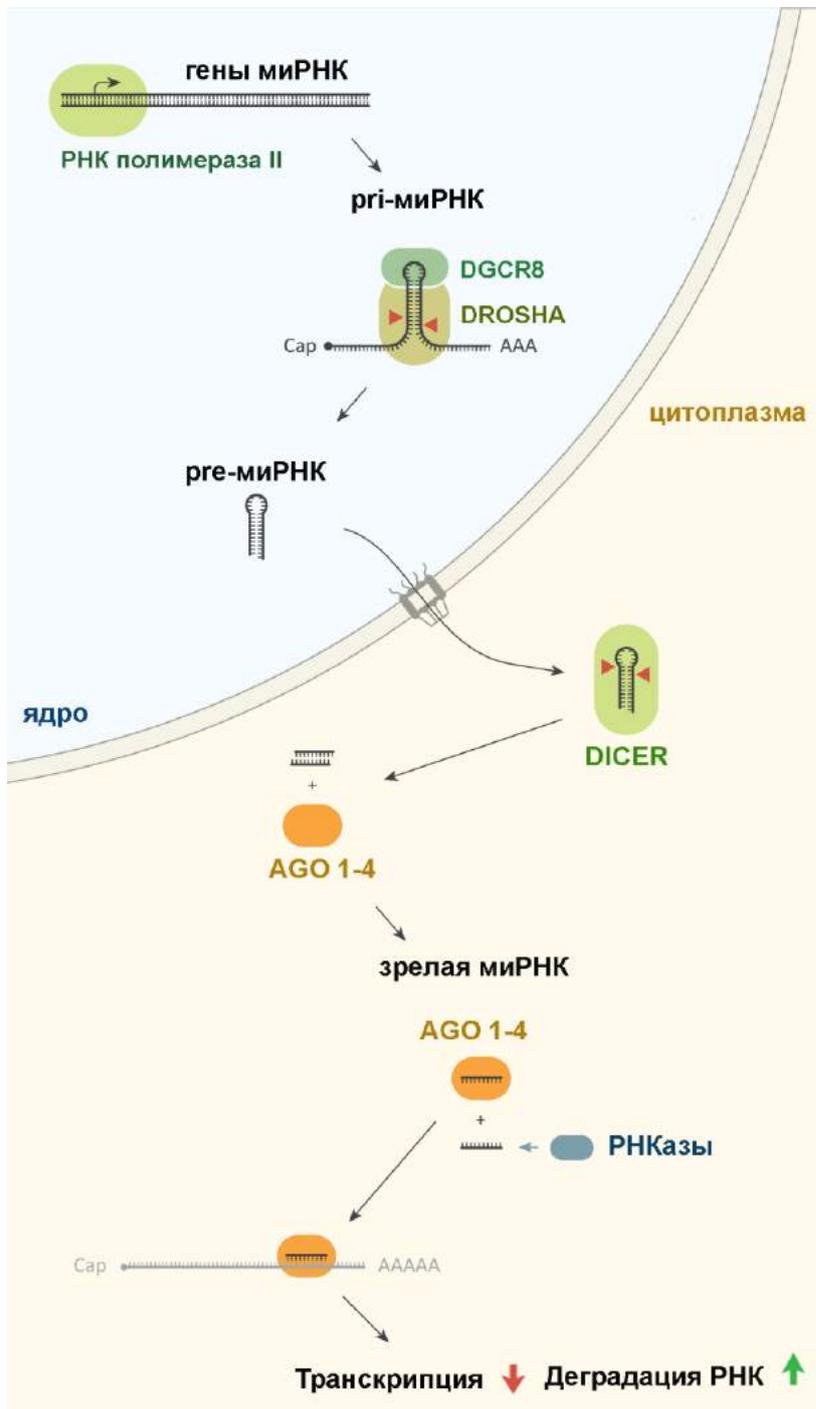
В крови пациентов с раком молочных желез также обнаруживаются высокие уровни мРНК, кодирующих маммаглобин, СК-19 [136] и *Her2/neu* [137], которые являются специфическими маркерами рака молочных желез [138]. СК-19 участвует в поддержании стабильности эпителиальных клеток и его высокие уровни экспрессии определяются также и в опухолевой ткани [138]. Онкоген *Her2/neu* амплифицируется на высоком уровне примерно в 20% случаев рака молочной железы и связан с быстрой пролиферацией опухоли и плохим прогнозом.

В крови пациентов с раком легких детектируется повышенная представленность фрагментов мРНК, кодирующих *Her2/neu*, *hnRNP-B1* и *5T4* [139-141]. *hnRNP-B1* играет важную роль в сплайсинге опухолевых супрессоров и рассматривается в качестве онкогена, для которого была показана важная роль в развитии глиобластомы [142], рака легких [143] и гепатоцеллюлярной карциномы [144]. Онкоген *5T4* участвует в модуляции клеточной адгезии и гиперэкспрессируется во многих типах раковых клеток. Для пациентов со

злокачественной меланомой характерно наличие в крови мРНК, кодирующей тирозиназу, *MAGE-3*, *MUC-18*, *p97* и *PBGD*. Тирозиназа участвует в синтезе меланина, *MAGE-3* участвует в злокачественной трансформации и является главным опухолеспецифическим антигеном меланомы, *MUC18* участвует в клеточной адгезии. Также в крови пациентов с онкологическими заболеваниями обнаруживается повышенная представленность мРНК онкогенов, таких как *Myc* и *Nras*.

*вн-миРНК*. В 2008 году несколькими исследовательскими группами было впервые показано присутствие внеклеточных миРНК (вн-миРНК) в плазме и сыворотке крови человека [145-148]. миРНК представляют собой подкласс малых некодирующих РНК, которые экспрессируются во всех эукариотических клетках и являются регуляторами экспрессии генов на пост-транскрипционном уровне [149, 150]. Гены большинства миРНК транскрибируются РНК полимеразой II с образованием ргi-миРНК транскриптов, которые в дальнейшем процессируются белками *DROSHA* и *DICER* с образованием дуплексов миРНК длиной 19 – 24 нуклеотида (Рис. 1). На конечном этапе дуплекс связывается с белком *AGO* семейства *Argonaute* и одна из цепей деградирует. Далее одна из цепей миРНК в составе комплекса с *AGO* связывается с 3'-нетранслируемой областью (3'UTR) мРНК-мишени, что приводит к снижению стабильности мРНК-мишени и эффективности ее трансляции [149-151]. Однако недавно полученные данные свидетельствуют о том, что миРНК могут также участвовать в выключении транскрипции генов в ядре путем сиквенс-специфичного взаимодействия с промоторными областями в ДНК [152, 153]. У человека было обнаружено более 2000 миРНК, и было показано, что они координируют ключевые клеточные процессы, включая пролиферацию, репарацию ДНК, дифференцировку, метаболизм, апоптоз и онкотрансформацию [149, 150, 154, 155].

Большинство вн-миРНК, выделенных из плазмы крови здоровых доноров и пациентов с онкологическими заболеваниями, обладает высокой стабильностью и устойчивы к рибонуклеазам крови, перепадам рН, колебаниям температуры и длительному хранению [147, 148, 156]. Первоначально предполагалось, что стабильность вн-миРНК обусловлена их инкапсулированием в мембранные везикулы, поскольку эти молекулы со-осаждались совместно с фракциями микровезикул, экзосом и апоптотических телец [157-159]. Однако более поздние исследования показали, что, по крайней мере, в плазме крови 95-99% вн-миРНК находятся не в составе везикул, а в составе рибонуклеопротеидных комплексов миРНК/*AGO2* [156, 160]. В составе вн-миРНК встречаются как онкомиры, так и онкосупрессоры.



**Рис. 1.** Этапы биогенеза и функционирования miРНК. Рисунок адаптирован из Turchinovich et al, 2016 [161].

миРНК секретируются клетками с помощью церамид-зависимого секреторного механизма, включаются в состав липидных или липопротеиновых комплексов, таких как апоптотические тельца, микровезикулы или экзосомы [162, 163], и в таком виде попадают в кровоток. Существуют данные, что вн-миРНК также могут быть побочными продуктами мертвых клеток и сохраняются в плазме крови из-за высокой стабильности комплекса миРНК/Ago2 [164, 165].

Главным резервуаром мембранных везикул в крови считаются тромбоциты [166, 167]. Интересно, что тромбоциты способны высвобождать функциональные митохондрии, заключенные в мембрану тромбоцитов, и, таким образом, являются источником циркулирующих митохондриальных НК [168]. Мембранные везикулы плазмы крови несут мРНК и другие клеточные РНК: 28S и 18S рРНК, тРНК, а также, в меньшей степени, длинные и малые некодирующие регуляторные РНК [166, 169]. Рибонуклеопротеиновые комплексы (RNP) представлены, в основном, комплексами миРНК/AGO2 [156, 160]. Кроме того, в плазме крови обнаруживаются комплексы миРНК и липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), компонентами пути обратного транспорта холестерина, которые являются межклеточными медиаторами и участвуют в коммуникационных путях некодирующих РНК [170].

#### **1.2.4. Участие опухоль-ассоциированных внРНК в злокачественной трансформации здоровых клеток**

Секреция РНК клетками в составе рибонуклеопротеидных комплексов и передача РНК между клетками млекопитающих была описана еще в 1970-х годах прошлого столетия [171, 172]. Основываясь на наблюдениях, что экзогенные РНКазы обладают цитостатическим эффектом, и на том факте, что ангиогенин, обеспечивающий васкуляризацию опухолей, по последовательности идентичен РНКазе А человека на 40% и имеет высокую каталитическую активность, Benner разработал гипотезу о том, что определенный баланс между РНК, РНКазами и рибонуклеазными ингибиторами контролирует развитие тканей у высших организмов [173].

Впервые возможность трансформации нормальных клеток рибонуклеопротеидными комплексами была показана на примере РНК-протеолипидного комплекса 27S рРНК и гликофинголипида, выделенного из сыворотки крови пациентов с меланобластомой [174]. Ретикулярные клетки из костного мозга трансформировали этим комплексом в культуральной среде и наблюдали значительное изменение морфологии клеток, включая полиморфизм клеток и увеличение скорости пролиферации [174]. На примере РНК из опухолевых клеток, полученных от мышей с плазмоцитомой, была показана конверсия

поверхностных рецепторных иммуноглобулинов В-лимфоцитов и иммуносупрессивное действие [175, 176], что является доказательством того, как иммуносупрессия осуществляется опухолью посредством собственной РНК. У человека также была продемонстрирована передача РНК из клеток миеломы нормальным лимфоцитам, что приводило к синтезу рецепторных иммуноглобулинов [177].

Было показано, что клетки HeLa могут включать экзогенные мононуклеотиды и более крупные фрагменты олигонуклеотидов во вновь синтезированную РНК [178]. РНК, выделенная из асцитной жидкости карциномы Эрлиха, усиливает приживаемость трансплантата и скорость роста гомологичной опухоли после обработки ею опухолевых клеток [179, 180]. Таким образом, РНК и рибонуклеопротеиновые комплексы могут представлять собой специфический секреторный продукт опухолевых клеток, способный опосредовать взаимодействие хозяин-опухоль или осуществлять информационное взаимодействие между эукариотическими генами и их продуктами [181].

Недавнее открытие регуляторных РНК, в том числе и миРНК, привело к возникновению революционной гипотезы о том, что вн-миРНК могут опосредовать межклеточный сигналинг паракринным или даже эндокринным путем. Гипотеза возникла после того, как несколько исследовательских групп обнаружили в кровотоке большое количество миРНК в составе рибонуклеопротеидных комплексов, микровезикул и экзосом. Эта парадигма была в значительной степени подкреплена многочисленными последующими публикациями, демонстрирующими, что миРНК в составе различных микровезикул могут попадать в клетки-реципиенты, менять экспрессию генов и вызывать функциональные эффекты [157, 163, 182-185].

Самым сильным подтверждением теории межклеточной коммуникации с помощью вн-миРНК является доказательство подавления мРНК-мишени в клетках-реципиентах под действием миРНК после обработки клеток-реципиентов фракцией экзосом [163, 183, 184, 186-188]. Одним из примеров является разрушение плотных контактов в эпителиальных клетках кровеносных сосудов под действием miR-105 в составе экзосом, секретлируемых соседними раковыми клетками, и последующее усиление метастазирования [186]. Кроме того, гиперэкспрессия miR-105 в неметастазирующих раковых клетках индуцировала проницаемость сосудов и метастазы, тогда как ингибирование miR-105 в опухолях приводило к снижению этих эффектов [186].

Межклеточная коммуникация с помощью вн-миРНК была также доказана в отношении клеток иммунной системы. В частности, в экзосомах, выделенных из культур дендритных клеток, были обнаружены две миРНК, участвующих в регуляции иммунного

ответа, провоспалительная miR-155 и иммуносупрессивная miR-146a, которые в составе экзосом поглощались клетками-реципиентами. Обе miR-155 и miR-146a в составе комплекса с AGO снижали уровень их соответствующих мРНК-мишеней и перепрограммировали клеточный ответ в ответ на введение эндотоксина [188]. Кроме того, иммунные клетки обменивались miR-155 и miR-146a *in vivo*, а инъекции экзосом, содержащих miR-146a, ингибировали воспалительный ответ на эндотоксин на мышинных моделях, тогда как инъекции экзосом, содержащих miR-155, способствовали воспалению, вызванному тем же стимулом.

На примере тучных клеток был показан механизм регуляции активности или дифференцировки других тучных клеток посредством передачи экзосомальной мРНК и миРНК между клетками [157]. Так, в составе экзосом тучных клеток был идентифицирован ряд миРНК, в том числе и lin-4, let-7, miR-1, miR-15, miR-16, miR-181 и miR-375 [157]. Две хорошо изученные миРНК lin-4 и let-7 играют роль в регуляции клеточной пролиферации и относятся к онкосупрессорам [189-191]. миРНК miR-1, miR-17, miR-18, miR-181 и miR-375 играют важную роль в контроле ангиогенеза, гематопоеза, экзоцитоза и опухолегенеза [190, 191], что может свидетельствовать о важной функции контроля на уровне организма с помощью миРНК, переносимыми экзосомами.

Было показано, что клетки глиобластомы секретируют экзосомы, содержащие мРНК, миРНК и ангиогенные белки, которые поглощаются нормальными клетками, такими как микрососудистые эндотелиальные клетки мозга [182]. Среди миРНК экзосом была обнаружена онкогенная miR-21, которая гиперэкспрессируется в клетках глиобластомы [192]. мРНК, наиболее представленные в экзосомах глиобластомы, кодировали белки, участвующие в ангиогенезе, клеточной пролиферации, иммунном ответе, клеточной миграции и модификации гистонов. Эти результаты доказывают, что микровезикулы опухолевых клеток служат средством, с помощью которого опухоль может манипулировать своим окружением, делая его более благоприятным для ее роста и инвазии.

### 1.2.5. Заключение

Таким образом, биологическая активность внеклеточных нуклеиновых кислот может быть суммирована следующим образом: (1) эукариотические клетки могут захватывать экзогенные нуклеиновые кислоты *in vitro* и *in vivo*; (2) экзогенные нуклеиновые кислоты могут попадать в ядро клетки-хозяина *in vitro* и *in vivo* и транскрибироваться в случае кодирующих нуклеиновых кислот; (3) экзогенные нуклеиновые кислоты могут вызывать генетическую трансформацию клеток-реципиентов, хотя и редких случаях; (4) экзогенные нуклеиновые кислоты могут вызывать повреждение хромосом и оказывать цитотоксическое

действие на клетки-реципиенты; (5) внДНК, содержащая фрагменты онкогенов, может трансформировать клетки-реципиенты, как это было показано в культуре клеток; (6) экзогенные ДНК и нуклеосомы могут инициировать индукцию провоспалительных цитокинов и ауто-антител; (7) экзогенная РНК может поглощаться клетками и способна транскрибироваться и транслироваться с образованием белков; (8) регуляторные РНК, в частности, миРНК, могут регулировать процессы контроля развития тканей и онкотрансформации на уровне организма путем паракринной и эндокринной регуляции. Таким образом, опухолевая внДНК является компонентом, способным вызывать изменение генома нормальных клеток, что в итоге приводит к онкотрансформации нормальных клеток и подтверждает гено-метастатическую гипотезу. Учитывая разнообразие механизмов биологической активности внРНК, можно с уверенностью утверждать, что внРНК является важным участником межклеточной коммуникации и переключения внутриклеточных каскадов, контролирующих клеточную пролиферацию и дифференцировку, что указывает на ее участие в контроле многих процессов, включая активацию иммунной системы в ответ на патогены и канцерогенез.

### **1.3. Роль эндогенных РНКаз и ДНКаз млекопитающих в контроле внутриклеточных событий и сигнальных путей, ответственных за онкотрансформацию**

#### **1.3.1. Введение**

Нарушение регуляции экспрессии генов является характерным признаком многих видов рака. К таким нарушениям относятся амплификация и делеция генов [193, 194], повреждение ДНК [195] и нарушение таких важных процессов, как транскрипция [196], сплайсинг [197] и локализация транскриптов [198]. Исследования последнего десятилетия показали важность посттранскрипционного этапа в контроле экспрессии генов, в частности, в деградации мРНК. Процессы, обеспечивающие стабильность мРНК, ингибирование трансляции и деградацию транскриптов, связаны друг с другом сложным образом, и на них могут влиять цис-действующие элементы, такие как поли (А) последовательности и AU-богатые элементы (ARE), и транс-действующие факторы, такие как некодирующие РНК (ncРНК), РНК-связывающие белки (RBP) и рибонуклеазы (РНКазы).

В работах по исследованию ARE и ARE-связывающих белков было высказано предположение, что существует важная связь между дисфункцией транс-действующих факторов, принимающих участие в метаболизме мРНК, и онкогенезом [199, 200]. Некоторые белки, относящиеся к гетерогенным ядерным рибонуклеопротеинам (hnRNP) и способные связываться со значительным числом транскриптов, выступают в роли онкогенов и генов-

супрессоров опухолей, которые опосредуют свое действие за счет стабилизации транскриптов или их деградации [201]. Более того, компоненты процесса деаденилирования и эндогенные рибонуклеазы могут быть рекрутированы псРНК и RBP для регуляции экспрессии онкогенов и генов-супрессоров опухолей [202]. Эти данные подчеркивают важность понимания метаболизма мРНК и транс-действующих факторов, которые связаны с опухолевой прогрессией. Эндогенные РНКазы являются участниками посттранскрипционного контроля экспрессии генов, и, таким образом, изменение уровня их представленности и/или функционирования в клетке приводит к событиям онкогенеза и опухолевой прогрессии. Эндогенные ДНКазы являются ключевыми участниками репликации и репарации ДНК и контролируют целостность и сохранность генома, что является важным аспектом поддержания нетрансформированного состояния клетки. Эндогенные ДНКазы, часто обладают и рибонуклеазной активностью, что расширяет спектр их возможных функций в поддержании нормального оборота нуклеиновых кислот в клетке. Эндогенные РНКазы и ДНКазы, участвующие в контроле злокачественного перерождения, суммированы в Таблице 2.

В данной части обзора будет рассмотрена роль внутриклеточных нуклеаз в поддержании нормального функционирования клетки и события, происходящие при нарушении уровня экспрессии/функционирования эндогенных нуклеаз.

### **1.3.2. РНКазы, участвующие в событиях обычной деградации мРНК: CCR4b, PARN и XRN1**

Оборот мРНК, прошедших правильный процессинг, в клетке осуществляется с помощью различных транс-действующих факторов. Этот путь отличается от путей надзора за мРНК, задача которых заключается в детекции и деградации aberrantных транскриптов, которые не прошли правильный процессинг. Процесс распада мРНК в клетках млекопитающих начинается с деаденилирования [203], и в нем также принимают участие эндогенные эндорибонуклеазы. Существует ряд комплексов рибонуклеаз с белками, которые принимают участие в этом важном процессе, такие как PAN2-PAN3, CCR4b-NOT и PARN, которые инициируют деградацию мРНК и действуют на этапе, определяющем скорость оборота мРНК и уровень экспрессии генов.

В клетках млекопитающих такие комплексы за счет экзонуклеазной активности осуществляют деградацию поли-А хвоста различных мРНК, процессируя мРНК-молекулу таким образом, что возможна полная ее деградация под действием экзосомального комплекса (Рис. 2, В). Эти комплексы деградируют любые полиаденилированные мРНК и не обладают особой специфичностью. Эксперименты с подавлением этих РНКаз с помощью

РНК-интерференции продемонстрировали их участие в фертильности и контроле клеточного роста [204]. В нескольких работах было выявлено, что мутации в этих ферментах или снижение/повышение их экспрессии приводит к индукции опухолевого фенотипа клетки.

CCR4b. Рибонуклеаза CCR4b, деаденилаза, входящая в комплекс CCR4b–NOT, считается про-онкогеном, поскольку была показана ее способность активировать рост клеточных линий фибробластов [206]. В нормальных условиях этот фермент регулирует уровень p27Kip1 мРНК, кодирующей опухолевый супрессор, который ингибирует циклин-зависимые киназы и препятствует опухолевому росту. Более того, в клетках с выключенным CCR4b, наблюдалось повышение уровня p27Kip1 и замедление клеточного роста [206]. Однако, до сих пор нет сообщений, свидетельствующих об изменениях уровней CCR4b в различных типах опухолей.

PARN. Среди РНКаз, контролирующих уровень мРНК в составе комплексов с RBP, следует отметить поли-А РНКазу PARN (Рис. 2, Б). РНКазы PARN проявляет деаденилазную активность и в составе комплекса с RBP, дестабилизирующего структуру мРНК, может действовать в качестве потенциального опухолевого супрессора, приводя к деградации ряда мРНК, таких как мРНК *IL-8* и *VEGF* мРНК. В нескольких работах было показано, что в клетках злокачественной глиомы RBP существует в дефектной форме и не способен рекрутировать PARN [208, 209], что приводит к снижению функционирования данного комплекса и, как следствие, к прогрессированию опухоли. Кроме того, PARN и экзосомальный комплекс могут рекрутироваться белком KSRP и в составе такого комплекса вызывают дестабилизацию различных мРНК, включая c-jun и uPA, чей повышенный уровень связан с раковыми заболеваниями [205, 210]. В другом исследовании было продемонстрировано, что PARN в составе комплекса с CUG-BP приводила к дестабилизации c-fos и ФНО- $\alpha$  мРНК [211].

XRN1. Помимо процесса деаденилирования 5'–3' экзорибонуклеазы, такие как РНКазы XRN1 (Рис. 2, Б), также инициируют деградацию мРНК после декэпирования транскрипта-мишени. XRN1 является примером опухолевого супрессора, при нарушении экспрессии которого происходит онкотрансформация и развитие опухоли. В первичных образцах остеогенной саркомы и дочерних клеточных линий было обнаружено снижение экспрессии или полная потеря XRN1 мРНК [213].

Можно заключить, что такие эндогенные РНКазы, участвующие в обычном пути деградации мРНК, влияют на экспрессию генов, вовлеченных в пролиферацию, контроль клеточного цикла, ангиогенез и сигнальные пути онкотрансформации.

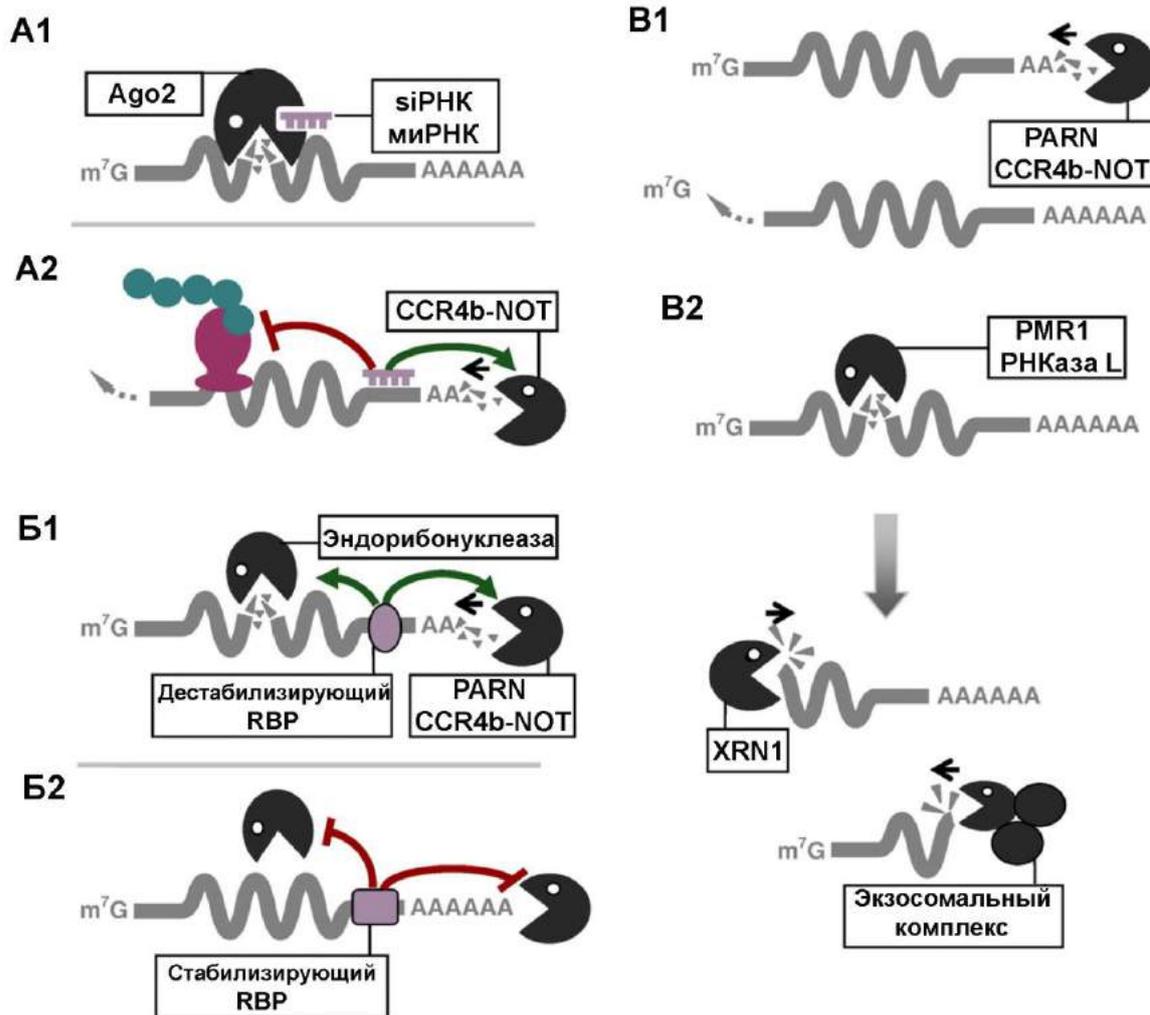
**Таблица 2.** Эндогенные РНКазы и ДНКазы, принимающие участие в контроле или развитии опухолевой прогрессии.

Процесс, в котором участвует РНКаза	РНКаза	Тип рака	Изменение	Биологическая функция	Ссылки
Обычный распад мРНК	CCR4b	N/D	N/D	Деаденилирование, гомологичная рекомбинация, регуляция p27Kip1 мРНК, ингибирование под действием антипролиферативных агентов	[206, 207]
	PARN	MG	Недоступность для мРНК	Деаденилирование, нонсенс-опосредованный распад мРНК, регуляция <i>c-jun</i> , <i>c-fos</i> , <i>TNF-<math>\alpha</math></i> , <i>uPA</i> мРНК	[208-212]
	XRN1	OSC	Снижение уровня в клетке	5'-3'-экзонуклеаза	[213]
РНКазы, активирующиеся в клетке под действием специфических сигналов	РНКаза L	PC	Высокая встречаемость измененных вариантов со сниженной активностью (R462Q и E265X)	Противовирусный ответ	[214-218]
	IRE1	PanC HNPCC IRE1 BC	Повышенная активность	Реакция несвернутых белков, сплайсинг XBP1 мРНК, регуляция CD59 мРНК	[219-221]
	PMR1	BCCL HCC N/D	Повышенная экспрессия Повышенная активность N/D	Активна при фосфорилировании под действием c-Src, регулирует мРНК вителлогенина	[222-224]
Созревание миРНК	DROSHA	ESSC	Повышенная экспрессия	Процессинг ргi-миРНК	[225-227]
		CSCC	Амплификация		
	DICER	LCL	Повышенная доступность для ргi-миРНК	Процессинг ргi-миРНК	[228-236]
		MC	Измененная экспрессия		
		LC	Повышенная экспрессия		
		PC			
		OC			
		BL	Деплеция		
		LC (мыши)			
		NSCLC			
BC	Пониженная экспрессия				
AGO2	BC	Повышенная экспрессия	Активация комплекса с миРНК для выключения мРНК	[233, 237, 238]	
	BCCL	Измененная экспрессия			

**Таблица 2 (продолжение).** Эндогенные РНКазы и ДНКазы, принимающие участие в контроле или развитии опухолевой прогрессии.

Процесс, в котором участвует РНКазы	РНКазы	Тип рака	Изменение	Биологическая функция	Ссылки	
Другие	ANG	PA	Повышенная экспрессия	Ангиогенез, клеточная пролиферация, регуляция tРНК	[239-242]	
	G3BP	GC	Повышенная экспрессия	Регуляция <i>C-тус</i> мРНК, регуляция вхождения в S фазу	[243-245]	
		MN				
		BC				
	APE1	HNSCC	Повышенная экспрессия	Экцизионная репарация оснований, апурин/апиримидин эндонуклеаза, редокс-активация транскрипционных факторов, 3'-5'—эксонуклеаза, 3'-фосфодиэстераза, активность РНКазы H.	[246-250]	
		CA				
		ESSC				
		TA				
		ML				
		OSC				Повышенная экспрессия
		BC				Локализация в цитозоле
		HC				
		CC				Высокая частота встречаемости варианта D148E
		Рак легких*				
LM	Повышенный уровень фосфорилированной APE1					
FEN1	PA	Повышенная экспрессия	Удаление праймеров РНК во время репликации ДНК, 3'-5'—эксонуклеаза, активность РНКазы H	[251-254]		
	NSCLC					
	SCLC					

Список сокращений к Таблице 2: BC, карцинома молочной железы; BCCL, клеточные линии, полученные из карциномы молочной железы; BL, лимфома Беркетта; CC, аденокарцинома толстого кишечника; CCCC, цервикальная плоскоклеточная карцинома; ESSC, плоскоклеточная карцинома пищеварительного тракта; GC, карцинома желудка; HCC, гепатоцеллюлярная карцинома; HNPCC, наследственный неполипозный рак толстой кишки; HNSCC, плоскоклеточный рак головы и шеи; LC, аденокарцинома легких; LCL, клеточные линии лейкомиического происхождения; LM, леймиома; \*Рак легких, включающий проскокклеточную карциному, аденокарциному, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточную карциному; MC, мукоэпидермоидная карцинома; MG, злокачественная глиома; ML, миелома; MN, меланома; NSCLC, немелкоклеточный рак легкого; OC, серозная карцинома яичника; OSC, остеосаркома; PanC, панкреатическая аденокарцинома; PC, аденокарцинома простаты; SCLC, мелкоклеточный рак легкого; TA, тироидная аденома, включающая макрофолликулярную аденому и комбинированную аденому.



**Рис. 2.** Механизмы действия эндогенных РНКаз. **A1.** AGO2 в комплексе с некодирующими РНК (siРНК, miРНК) индуцирует расщепление мРНК. **A2.** miРНК может участвовать в ингибировании процесса трансляции путем рекрутинга ферментов путей распада РНК, таких как деаденилазы и декэпирующие ферменты. **B1.** РНК-связывающие белки (RBP) участвуют в контроле стабильности мРНК. Дестабилизирующие RBP могут активировать путь деаденилирования или рекрутировать набор эндорибонуклеаз для ускорения распада мРНК. **B2.** Стабилизирующие RBP могут ослаблять распад мРНК путем связывания или с кодирующими районами или с 3' UTR-районами мРНК. **B1.** РНКазы могут действовать или самостоятельно, или в комплексе с другими факторами распада, направляя мРНК по пути деградации. Деаденилазы, такие как PARN и CCR4b, в составе комплекса CCR4b-NOT удаляют поли-А хвост мРНК-мишени, тогда как декэпирующие ферменты удаляют 5'-m<sup>7</sup>G мРНК кэп. **B2.** Эндорибонуклеазы, такие как PMR1 и РНКазы L, могут расщеплять мРНК посередине последовательности. Комбинация этих трех процессов облегчает последующую деградацию мРНК экзорибонуклеазами и распад транскриптов в направлении 5'-3' (XRN1) или 3'-5' (экзосомальный комплекс). Рисунок адаптирован из Kim et al, 2009 [255].

### 1.3.3. РНКазы, активирующиеся в клетке под действием специфических сигналов: РНКазы L, IRE1 и PMR1

Существует ряд эндогенных РНКаз, которые в норме в клетке не экспрессируются, однако активируются либо под действием специфических стрессовых сигналов (РНКазы L,

IRE1), либо под действием прото-онкогенов (PMR1) [222, 256, 257]. РНКазы L участвуют в противовирусной защите, но также и в супрессии опухолей, мутации в этом ферменте были обнаружены во многих типах опухолей. В последнее время возрос интерес к РНКазе IRE1, для которой помимо ее роли в борьбе со стрессом ЭР были показаны эффекты, связанные с онкогенезом и апоптозом. Появился ряд доказательств, указывающих на связь между РНКазой PMR1 и развитием опухоли. В норме эта РНКаза находится в инактивированном состоянии, но активируется для участия в распаде мРНК.

РНКаза L. РНКаза L человека представляет собой эндорибонуклеазу, экспрессирующуюся во множестве типов нормальных и раковых клеток млекопитающих [258]. Была показана ее способность расщеплять как в бесклеточной системе, так и в клетках, вирусные РНК [259, 260], рРНК [261, 262] и некоторые клеточные РНК [263-265]. Было обнаружено, что РНКаза L расщепляет одноцепочечные РНК по фосфодиэфирным связям в UU- и UA-последовательностях [266]. РНКаза L контролирует стабильность мРНК, кодируемых в митохондриях, в клетках человека и мыши [263, 267] и дестабилизирует мРНК генов, индуцируемых под действием интерфероновой реакции на вирусную инфекцию [265]. Однако основная роль РНКазы L заключается в участии в реакциях врожденного иммунитета и усилении противовирусного ответа [268, 269]. Была показана способность РНКазы L участвовать в регуляции интерферон-индуцируемого апоптоза путем контроля стабильности митохондриальных мРНК [270].

Активность РНКазы L находится под контролем ингибитора. В норме фермент существует в мономерной латентной форме, и его активность выключена за счет связывания с ингибитором RLI [264, 271]. Однако, при связывании с 2',5'-присоединенными олигоаденилатами (2-5 A), образующимися под действием 2-5-A-синтаз, РНКаза L димеризуется и функционирует в цитоплазме как активированная РНКаза [272].

Ген, кодирующий РНКазу L, у человека картируется в участке генома, связанном с восприимчивостью к наследственному раку предстательной железы (НРС) [273]. Аминокислотные замены и мутации в РНКазе L приводят к агрессивному росту метастазов [214], повышенному риску развития рака простаты [215, 216], колоректального рака [217] и рака поджелудочной железы (Таблица 2) [218]. Опухоль-супрессирующая функция РНКазы L была хорошо охарактеризована в контексте интерфероновой сигнализации. Было сделано предположение, что РНКаза L разрушает митохондриальные РНК, что приводит к высвобождению цитохрома C и активации каспазы 3 в процессе апоптоза, запускаемого под действием ИФН- $\alpha$  или противоопухолевых препаратов [270, 274]. Действие РНКазы L также заключается в повышении экспрессии опухолевых супрессоров. Так, было показано, что

активность РНКазы L необходима для повышения уровня MIC-1/NAG-1, кодирующего лиганд суперсемейства белков TGF- $\beta$ , который способен связываться с рецепторами TGF- $\beta$  и запускать TGF- $\beta$  сигналинг, участвующий в онкотрансформации. Каким образом РНКазы L способна повышать уровень определенных мРНК пока не известно, но существует мнение, что этот фермент может разрушать ингибиторные миРНК или рРНК, которые могут инициировать активацию транскрипционной машины [275].

Было также обнаружено, что РНКазы L действует как нижележащий эффектор опухолевого супрессора BRCA1, который активируется при сигналинге под действием ИФН- $\gamma$  и способствует апоптозу в раковых клетках [276]. Аналогично, в клетках предстательной железы путь дигидротестостерона (ДГТ) может выступать в роли антагониста интерферонового сигналинга, что в итоге способствует выживанию и пролиферации клеток [277]. Снижение активности РНКазы L, например, в случае ее мутантных форм, приводит к снижению расщепления ДГТ-индуцированных мРНК, способствующих онкотрансформации, тогда как гиперэкспрессия РНКазы L дикого типа приводит к ингибированию опухолевого генеза [277], подтверждая ее роль как опухолевого супрессора.

Такая же функция РНКазы L была показана на модели фибросаркомы мыши [278]. Так, гиперэкспрессия экзогенной РНКазы L человека в клетках фибросаркомы мыши значительно замедляла рост опухоли, а после ее выключения опухоль начинала прогрессировать [278]. Таким образом, РНКазы L может действовать в качестве опухолевого супрессора, и уровень ее экспрессии, так же, как и активность, имеют решающее значение для регулирования роста и выживания клеток.

IRE1. IRE1 является трансмембранной эндорибонуклеазой, локализуемой в ЭПР. В ее структуру входит эндорибонуклеазный/киназный домен, располагающийся со стороны цитоплазмы, и стрессо-чувствительный домен с внутренней стороны ЭПР. При воздействии стрессовых сигналов происходит димеризация и автофосфорилирование IRE1, что приводит к появлению у нее рибонуклеазной активности [257]. В клетках млекопитающих субстратами для IRE1 являются ее собственная мРНК, а также значительное число мРНК, которые кодируют белки, участвующие в регуляции процессов ангиогенеза [279], X-бок-связывающий белок 1 (XBP1) и CD59 [257, 280, 281]. Гиперэкспрессия IRE1 приводит к снижению экспрессии CD59, вовлеченного в развитие рака легких [280]. В результате расщепления мРНК *XBP1* РНКазой IRE1 происходит сплайсинг транскрипта, кодирующего потенциальный транскрипционный фактор XBP1, который активирует транскрипцию генов, необходимых для реакции несвернутых белков (РНБ). РНБ представляет собой гомеостатический сигнальный путь, который корректирует в ЭПР способность белков

структурироваться, и регулирует либо выживаемость клеток, либо апоптоз в соответствии с потребностями клетки [282]. Таким образом, IRE1, выступая в роли регулятора РНБ, является важной РНКазой, определяющей развитие опухоли или ее гибель.

Существуют данные о связи XBP1 с опухолевой прогрессией при гипоксии, которая характерна для всех солидных опухолей в состоянии стресса ЭПР. Было показано, что IRE1-XBP1 сигналинг способствует выживанию опухолевых клеток и росту опухоли. Гиперэкспрессия XBP1 в клетках рака молочной железы с высоким уровнем экспрессии эстрогеновых рецепторов приводит к эстроген-независимому росту и снижает чувствительность опухолевых клеток к антиэстрогенам [219]. Сходным образом, гиперэкспрессия XBP1 может приводить к индукции множественной миеломы у мышей [283]. Более того, было обнаружено активное функционирование IRE1-XBP1 сигналинга в клеточных линиях опухолей молочной железы с повышенной выживаемостью [220] и в активно делящихся клетках рака печени [221]. Было обнаружено, что IRE1-XBP1 сигналинг используется онкобелком Hbx для активации вируса гепатита В, что приводит к развитию гепатокарциномы [284]. Таким образом, IRE1 является РНКазой, играющей важную роль в канцерогенезе.

Была обнаружена и опухоль-супрессирующая функция IRE1. В нескольких работах, посвященных скринингу генома, было обнаружено, что IRE1 $\alpha$  часто встречается в мутантной форме при многих типах рака [285, 286]. Также было показано, что медиаторы опухолевой супрессии VAX и VAK способны влиять на уровень функционирования РНБ путем непосредственного взаимодействия с IRE1 в клетках мыши и человека [287]. Что более важно, было установлено, что IRE1-РНБ сигналинг может быть рекрутирован различными агентами для подавления роста опухолевых клеток и их гибели [288, 289].

Существуют данные, свидетельствующие о роли IRE1 как про-апоптотического фактора. Так, было показано, что повышенная экспрессия IRE1 значительно увеличивает уровень апоптоза синовиальных фибробластов мыши [290]. В недавних работах было обнаружено, что процессинг мРНК *XBP1* с помощью IRE1 $\alpha$  обеспечивает клеткам повышенную выживаемость при ЭПР-стрессе, тогда как активация митоген-активируемой протеин киназы семейства JNK под действием IRE1 $\alpha$  на поздних стадиях ответа на ЭР-стресс приводит к запуску апоптоза [291]. Были получены данные, что активация JNK в ответе на ЭР-стресс предшествует активации XBP1 [291] и может иметь решающее значение в выборе направления: выживание или гибель клетки. Таким образом, для окончательных выводов о роли IRE1-РНБ сигналинга в опухолевой прогрессии требуются дополнительные исследования.

PMR1. PMR1, полисомальная рибонуклеаза 1, представляет собой эндорибонуклеазу, изначально полученную из полисом печени лягушки. Однако, позднее ее ортолог был обнаружен и в клетках млекопитающих [292]. Локализуясь на полисомах в цитоплазме, PMR1 имеет уникальную последовательность и структуру, которые отличают ее от других групп РНКаз. Было показано, что PMR1 инициирует распад мРНК во время процесса трансляции ее мРНК-мишеней только в составе полисомы. Способность PMR1 нацеливаться на полисомы и активировать распад мРНК определяется фосфорилированием с помощью прото-онкогена c-Src по остатку тирозина на C-конце молекулы [222]. Было обнаружено, что c-Src-фосфорилирование может активироваться под действием сигналов EGFR пути, ассоциированного с опухолевой прогрессией.

C-Src является известным прото-онкогеном, высокий уровень экспрессии которого характерен для многих типов рака человека [293]. Благодаря своей киназной активности c-Src активирует большое количество разнообразных транскрипционных факторов и сигнальных каскадов, что приводит к пролиферации клеток. Существующая механистическая модель участия c-Src в канцерогенезе, предложенная Peng с коллегами [294], предполагает, что c-Src может использовать путь распада мРНК под действием PMR1 для разрушения транскриптов, кодирующих опухолевые супрессоры.

В активации PMR1 участвуют и другие внутренние стимулы, такие как Hsp90, который способен связываться с PMR1 и стабилизировать ее структуру от протеасомной деградации, что приводит к поддержанию ее функции распада мРНК в клетке [294]. Поскольку Hsp90 является медиатором клеточной пролиферации, существует предположение, что этот белок продлевает срок службы PMR1 для поддержания процесса распада мРНК, кодирующих регуляторы клеточного роста [295].

Недавно полученные данные показали, что повышенная миграционная активность и инвазивность клеток рака молочной железы MCF-7 связана с высокой активностью PMR1, мишенями которой являются миРНК семейства miR-200 [296], ответственные за контроль адгезии и инвазии [297, 298]. Эти данные указывают на потенциальную роль PMR1 в развитии рака и его прогрессии.

#### **1.3.4. РНКазы, участвующие в биогенезе миРНК: DROSHA, DICER и AGO2**

Последнее время накапливается все больше данных, свидетельствующих о связи между дисрегуляцией в экспрессии миРНК и развитием раковых заболеваний. В созревании и выполнении основных функций миРНК участвует три ключевых РНКазы, изменение в уровне экспрессии которых оказывает прямое влияние на канцерогенез.

DROSHA. Созревание миРНК начинается с процессинга ргі-миРНК. Этот этап осуществляется с помощью РНКазы DROSHA в составе комплекса с DGCR8. DROSHA принадлежит к семейству РНКазы III и является РНКазой, специфично расщепляющей РНК по двуцепочечным участкам. Существует ряд доказательств ее роли как прото-онкогена. Так, было показано, что повышенная экспрессия DROSHA и кодирующих эту РНКазу мРНК обнаруживалась при раке пищевода [225]. Подавление функционирования этого белка в линиях опухолевых клеток приводило к ингибированию их пролиферации.

В других исследованиях была показана корреляция между повышением уровня мРНК, кодирующей DROSHA, и увеличением числа ее геномных копий в клинических образцах и клеточных линиях цервикальной плоскоклеточной карциномы [226]. Также была показана повышенная экспрессия DROSHA в клетках рака шейки матки, что указывает на ее возможную роль в качестве опухолевого активатора [227].

В нескольких исследованиях описывается возможный механизм участия РНКазы DROSHA в канцерогенезе. Его повышенную активность при процессинге ргі-миРНК связывают с влиянием на уровень миРНК, приводящих к онкотрансформации клетки. В одном исследовании было показано, что активный процессинг ргі-miR-191 с помощью DROSHA приводил к повышенному уровню экспрессии miR-191 в лейкемических клеточных линиях [299].

Было обнаружено, что факторы роста, такие как TGF- $\beta$  и BMP, влияют на нижележащие трансдукторы, которые взаимодействуют с DROSHA и повышают его доступность и/или активность в отношении ргі-miR-21. Это приводит к быстрому повышению уровня miR-21 в клетках гладкой мускулатуры сосудов и снижению уровня экспрессии опухолевого супрессора PDCD4 [300]. Повышенный уровень экспрессии miR-21 при многих типах рака указывает на возможные нарушения экспрессии/функционирования DROSHA [301-304]. В недавних работах было продемонстрировано, что мутации в микропроцессорном комплексе DROSHA/DGCR8 приводят к высокому риску развития аденосаркомы почки [305, 306].

Таким образом, РНКазы DROSHA, с одной стороны, крайне важна для правильного процессинга предшественников миРНК, тогда как с другой стороны нарушение в уровне ее экспрессии, а особенно повышение функциональной активности, является негативным событием для клетки и приводит к онкотрансформации.

DICER. DICER также является РНКазой, принадлежащей семейству РНКазы III, и участвует в процессинге рге-миРНК [307]. В нескольких исследованиях было обнаружено ее участие в дестабилизации AU-богатых мРНК [308, 309]. Эта РНКазы считается одним из

основополагающих регуляторов созревания миРНК и их дерегуляции при канцерогенезе. Действует ли DICER в качестве прото-онкогена или опухолевого супрессора – неизвестно, поскольку эта РНКаза участвует в процессинге всех двуцепочечных миРНК без предпочтения к последовательности. Однако, гиперэкспрессию DICER, а также ее aberrantную функцию, часто связывают с канцерогенезом, что указывает на ее роль прото-онкогена. Тем не менее, есть ряд доказательств, указывающих, что DICER функционирует и как онкосупрессор.

В нескольких исследованиях сообщалось о избыточной экспрессии DICER при раковых заболеваниях: раке слюнной железе [228], легких [229], раке простаты [230] и яичников [231], а также при лимфоме Беркитта [232], что свидетельствует о ее участии в процессинге онкогенных миРНК и повышении уровня их экспрессии. Интересным фактом является то, что уровень экспрессии DICER в клетках контролируется с помощью миРНК семейства let-7, относящихся к опухолевым супрессорам [310, 311].

Тем не менее, есть факты, указывающие на то, что снижение уровня экспрессии DICER и последующее снижение степени созревания миРНК могут усиливать канцерогенез [233, 234]. Было обнаружено, что снижение уровня DICER является маркером неблагоприятного прогноза у пациентов с раком легкого [235]. В другом исследовании было показано, что снижение уровня DICER свидетельствует о рецидиве в случае немелкоклеточного рака легкого [236]. Нарушение экспрессии и внутриклеточной локализации DROSHA и DICER коррелирует с прогрессированием различных типов опухолей и плохим прогнозом [312]. Кроме того, было обнаружено, что генетические дефекты в гене Dicer1 приводят к перераспределению репертуара миРНК и злокачественной трансформации [313].

AGO2. pre-миРНК процессируются DICER с образованием зрелых миРНК, которые образуют комплекс с РНКазой AGO2 и в составе этого комплекса деградируют мРНК за счет комплементарного связывания со зрелой миРНК. AGO2 взаимодействует с DICER [314] и участвует в процессинге pre-миРНК [315]. Изменение уровня AGO2 приводит к дерегуляции активности миРНК. Так, повышенный уровень AGO2 обнаруживается в клетках рака молочной железы и связан с агрессивным ростом опухоли [233].

Кроме того, экзогенная экспрессия AGO2 в клеточной линии MCF7 приводила к увеличению пролиферации клеток и к приобретению ими фенотипа, характеризующего эндотелиально-мезенхимальную трансформацию [238]. Каким образом повышенный уровень AGO2 приводит к канцерогенезу не совсем ясно. Существуют данные, что избыточная экспрессия AGO2 усиливает конкуренцию между различными видами миРНК, что в итоге

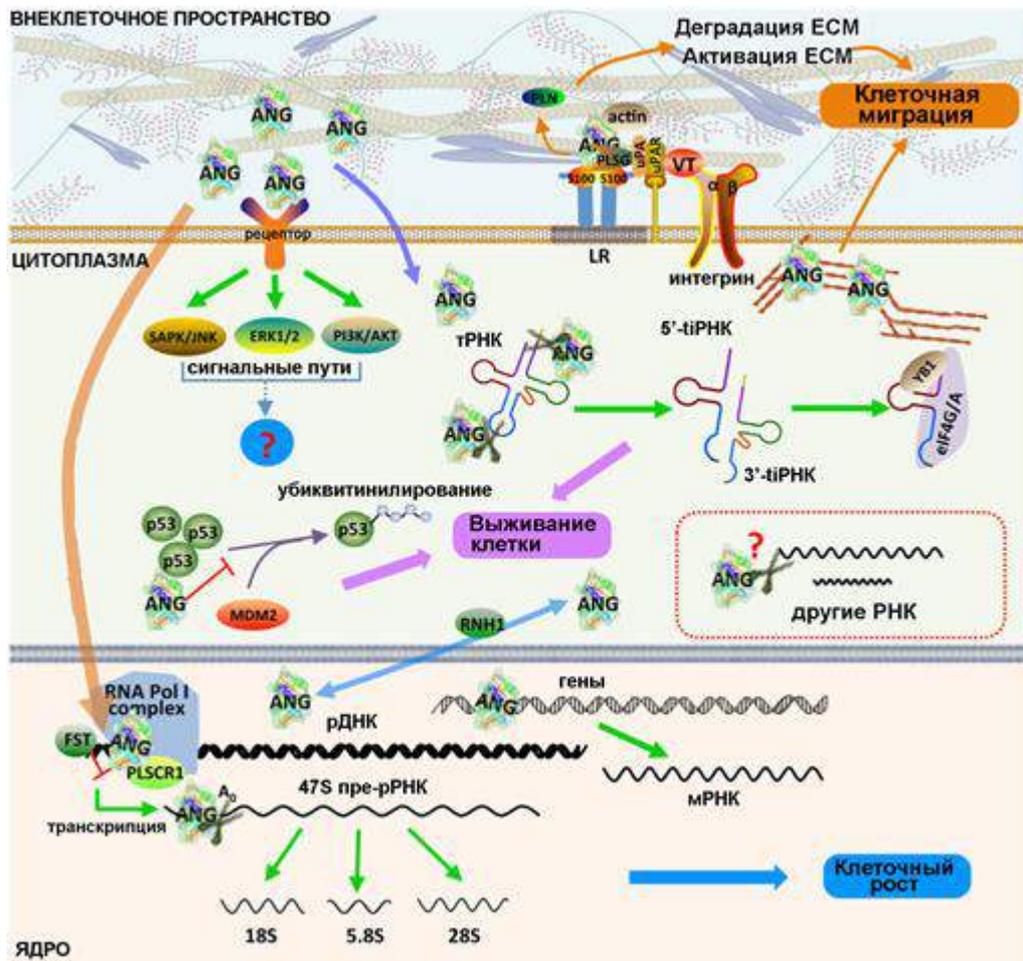
приводит к изменению в регулировании экспрессии генов и позволяет онкогенным миРНК лучше проявлять свои эффекты [316]. Однако, снижение ее уровня экспрессии также является для клетки негативным событием и приводит к ослаблению процессинга миРНК под действием DICER [315].

### **1.3.5. Многофункциональные ДНКазы с РНКазной активностью и РНКазы ядра/цитоплазмы: ангиогенин, G3BP, APE1 и FEN1**

Усилия многих исследователей направлены на выявление новых РНКаз, которые играют ключевую роль в регуляции экспрессии генов. Было обнаружено несколько ферментов с РНКазной активностью, важных для канцерогенеза и диссеминации опухоли. Ангиогенин, который относится к РНКазам семейства РНКазы А и имеет с ней высокую гомологию, участвует в процессах васкуляризации, и изменение его активности связывают с развитием рака. G3BP влияет на оборот мРНК с-тус, и нарушение его экспрессии или образование мутантных форм обнаруживают при раке. И наконец, два фермента, APE1 и FEN1, изначальной функцией которых является участие в процессах репарации и репликации ДНК, последнее время привлекают пристальное внимание из-за их способности расщеплять РНК и того факта, что нарушение их экспрессии связывают с онкогенезом.

Ангиогенин. Ангиогенин (ANG) относится к РНКазам семейства РНКазы А. Первоначально у человека ANG был выделен как фактор ангиогенеза опухолевого происхождения. ANG - секретируемый фактор роста, присутствующий в нормальных тканях и жидкостях человека, таких как плазма [317], амниотическая жидкость [318], микроокружение опухоли [319], и цереброспинальная жидкость [320]. Экспрессии ANG клетками различных тканей предполагает, что его функции не ограничиваются неоваскуляризацией.

ANG является эндорибонуклеазой и расщепляет РНК по одноцепочечным участкам со специфичностью CpA > CpG > UpA > UpG [321], сходной со специфичностью РНКазы А. Его каталитическая активность на несколько порядков ниже, чем у РНКазы А, однако, она необходима для ангиогенеза [239]. На Рис. 3 приведен механизм действия ангиогенина в клетке. Секретируемый ANG попадает в клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза и накапливается в ядрышках. В серии исследований показано, что ANG участвует в метаболизме нуклеиновых кислот. При внутриядерной локализации ANG индуцирует транскрипцию 47S рге-рРНК путем связывания с ABE и UCE на промоторе рибосомальной ДНК (рДНК). В результате ANG увеличивает количество активно транскрибирующих рДНК



**Рис. 3.** Схематическое представление механизмов действия ANG [326]. Секретируемый ANG подвергается рецептор-опосредованному эндоцитозу и попадает с клеточной поверхности внутрь клетки, где аккумулируется в ядрышке в условиях роста или в цитоплазме в условиях стресса. Внеклеточный ANG в различных клетках и условиях активирует пути передачи сигнала, включая пути SAPK/JNK, ERK1/2 и PI3K/AKT, хотя точный механизм активации не выяснен. Одним из опухолегенных механизмов ANG является его взаимодействие с комплексами на поверхности клеток, что приводит к деградации внеклеточного матрикса, активации матриксных металлопротеиназ и способствует клеточной миграции и инвазии. Вторым опухолегенным механизмом ANG после попадания в цитоплазму является расщепление тРНК с образованием tiРНК в условиях стресса, а далее 5'-tiРНК взаимодействуют с трансляционным сайленсером YB-1 и ингибируют инициацию трансляции путем рекрутинга eIF4G/A у неэкспрированных мРНК. ANG также ингибирует фосфорилирование p53 по 15-му остатку серина и последующее связывание Mdm2, что приводит к убикуитинированию p53. Кроме того, ANG в цитоплазме может влиять на сборку стрессовых волокон и фокальную адгезию, что усиливает клеточную миграцию. Третьим опухолегенным механизмом является его участие в транскрипции/процессинге рРНК и транскрипции мРНК в условиях клеточного роста.

и способствует сборке иницирующего комплекса путем эпигенетической активации через метилирование промотора и модификацию гистонов [322, 323]. ANG может усиливать процессинг рРНК, действуя как эндонуклеаза и расщепляя по первому сайту расщепления (A0) pre-рРНК 47S [324]. В дополнение к этому в экспериментах *in vitro* была показана

способность ANG расщеплять 28S и 18S рРНК с образованием продуктов длиной 100-500 нк [325], что может указывать на его участие в процессинге рРНК.

Есть несколько доказательств, указывающих на то, что повышенное содержание ANG в ядре может влиять на транскрипцию множества мРНК. Так, было показано его участие в регуляции экспрессии 699 генов, повышенный уровень которых ассоциирован с канцерогенезом, нарушением сигнальных путей Wnt и TGF- $\beta$  [326]. Предварительные данные показали, что ANG может участвовать в деградации миРНК [326]. ANG может действовать подобно активатору перестройки хроматина и регулировать таким образом транскрипцию мРНК. И хотя нет доказательств, что ANG обладает метилтрансферазной или ацетилтрансферазной активностью, по всей вероятности, он выступает в роли структурного или адапторного белка, рекрутируя для этих целей другие ферменты.

ANG также играет важную роль в метаболизме тРНК, который происходит в цитоплазме. Было показано, что ANG расщепляет консервативный одноцепочечный 3'-ССА-конец тРНК или антикодоновую петлю тРНК с образованием так называемых tiРНК или tRF в ответ на окислительный стресс, гипоксию или голодание [327-329]. Помимо ANG в продукции tiРНК участвуют также и другие внутриклеточные РНКазы, такие как PrrC, Rny1, DICER, РНКазы Z и РНКазы P [330-332]. Продукция tiРНК под действием ANG играет значительную функциональную роль в пролиферации клеток и канцерогенезе [333]. Образующиеся tiРНК ре-программируют трансляцию белков, способствуя репарации повреждений и выживанию клетки [334]. 5'-конец tiРНК взаимодействует с трансляционным сайленсером YB-1, приводя к ингибированию трансляции за счет рекрутинга eIF4E/G/A от экзистированных мРНК или eIF4G/A от некэпированных мРНК. Из двух половинок тРНК, образующихся под действием ANG, 5'- tiРНК (но не 3'-tiРНК) ингибирует трансляцию *in vitro*, однако, далеко не все 5'- tiРНК активны. Так была показана активность только для 5'-tiРНК<sup>Ala</sup> и 5'-tiРНК<sup>Cys</sup>, что связывают с присутствием в них олиго-G мотива (от четырех до пяти остатков гуанина) на 5'-конце. Фактически, о локализации, относительной представленности и стабильности tiРНК в клетке известно мало.

В качестве компонента внеклеточного матрикса секретлируемый ANG может запускать серию сигнальных ответов путем связывания с 170-кДа трансмембранным рецептором [335]. Было продемонстрировано, что ANG активирует киназу ERK1/2, протеин киназы В/Akt и SAPK/JNK в различных клетках [336-338]. Активация этих ключевых медиаторов сигналинга приводит к продукции большого количества рибосомальных белков и, как следствие, клеточному росту. ANG также индуцирует синтез оксида азота, который является важным биологическим регулятором, вовлеченным в активацию сигнального пути PI3K/Akt [339].

Более того, белок RNH1, связываясь с ANG, блокирует сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR, регулируя таким образом биологическую функцию ANG в раковых клетках [340, 341]. Кроме того, ANG может активировать путь NF-κB, способствующий выживанию клетки, и Bcl-2-опосредованный запрет апоптоза [342, 343].

Имеющиеся данные показывают, что ANG влияет почти на все стадии канцерогенеза, включая защиту опухолевых клеток от плохих условий, способствуя их пролиферации, усиливая миграцию, инвазию и индуцируя ангиогенез. В солидных опухолях часто встречаются области неоптимальных условий роста, и для клеток в этих областях характерно перепрограммирование экспрессии генов, позволяющее адаптироваться к этим условиям, выживать и пролиферировать. ANG является одним из белков, позволяющих отвечать на стресс, и его экспрессия активируется под действием транскрипционного фактора HIF-1 [344]. Было показано, что секреция ANG значительно возрастает в клетках злокачественной меланомы человека и рака шейки матки в условиях гипоксии [345, 346]. ANG инактивирует p53 путем ингибирования его фосфорилирования по остатку Ser-15 и последующее связывание с Mdm2, что приводит к убиквитинилированию p53 [342]. Это указывает на возможную роль ANG в запрете апоптоза в раковых клетках. ANG в ответ на стресс в клетках млекопитающих расщепляет tPHK с образованием регуляторных tiPHK, как уже было сказано выше, что в результате приводит к ре-программированию трансляции белков и выживанию клетки [347].

В свою очередь, снижение уровня экспрессии ANG в опухолевых клетках приводит к подавлению их пролиферации. Так в клетках меланомы в отсутствие ANG не наблюдалось пролиферации под действием основного фактора роста фибробластов [348]. Для клеток HeLa, нокаутных по ангиогенину, было показано заметное подавление пролиферации, а в клетках аденокарциномы предстательной железы его выключение приводило к торможению транскрипции рРНК, пролиферации и роста ксенотрансплантата у мышей [349, 350].

ANG секретируется опухолевыми клетками во внеклеточный матрикс и способствует опухолевой прогрессии. Так, было показано, что ANG секретируется клетками глиобластомы в составе микровезикул и стимулирует образование сосудов эндотелиальными клетками [319]. Клетки гепатоцеллюлярной карциномы также секретируют ANG, индуцируя рост клеток Ито и ремоделирование внеклеточного матрикса [351]. При раке предстательной железы, ANG внеклеточного матрикса может стимулировать инвазию нормальных фибробластов предстательной железы и фибробластов, ассоциированных с раком предстательной железы [352]. Поскольку ANG может способствовать деградации базальной мембраны и внеклеточного матрикса, это позволяет эндотелиальным клеткам проникать и

мигрировать в опухоль. Другой аспект функционирования ANG в микроокружении опухоли может включать подавление иммунной системы, поскольку ANG обладает иммуносупрессирующим действием.

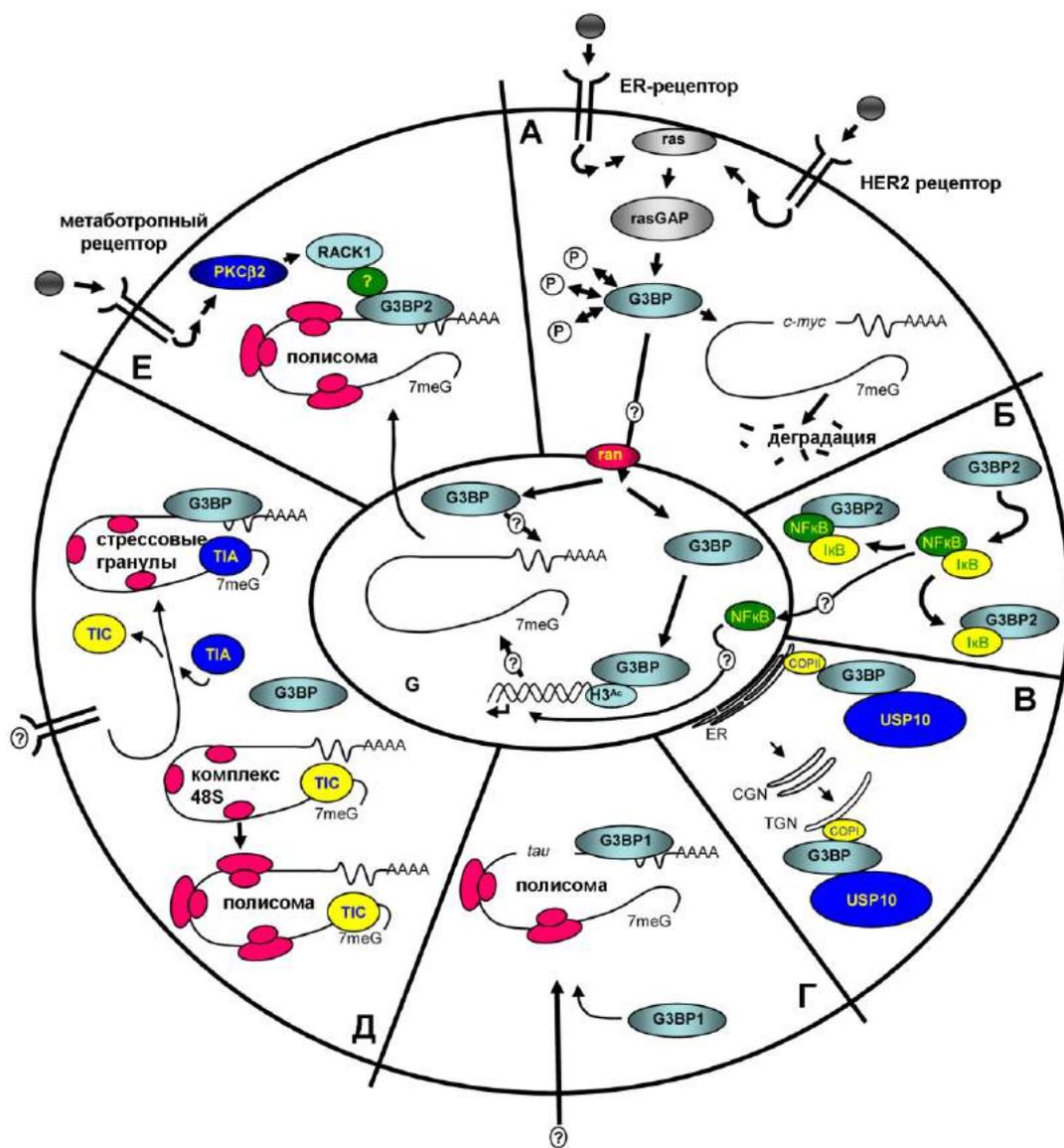
G3BP. Семейство белков G3BP млекопитающих состоит из двух эндорибонуклеаз G3BP1 и G3BP2 со схожей молекулярной структурой, которые локализуются в ядре и цитоплазме. *In vitro* было продемонстрировано, что G3BP расщепляет 3'-UTR С-Мус мРНК с преимущественной специфичностью по связям С-А [245]. Доказанные и предполагаемые функции РНКаз семейства G3BP представлены на Рис. 4.

Активность эндорибонуклеазы зависит от фосфорилирования ее сериновых остатков, а в делящихся клетках G3BP мигрирует к плазматической мембране и может взаимодействовать с RasGAP, участвуя, таким образом, во внутриклеточной передаче сигналов и злокачественной трансформации [245, 353] (Рис. 4, А). G3BP задействована во множестве сигнальных путей, которые участвуют в канцерогенезе и метастазировании, включая пути NF- $\kappa$ B и Ras, а также убиквитин-протеасомную систему [354-357] (Рис. 4, Б, В). G3BP1 и G3BP2 взаимодействуют с p53 и Mdm2, модулируя их экспрессию и локализацию и приводя к запрету апоптоза [358]. G3BP1 является белком, ассоциированным с полисомами, и, вследствие этого, предполагают его связь с метаболизмом мРНК. Было показано его присутствие в комплексах RNP, содержащих tau мРНК, что говорит о его возможном участии в ре-моделировании цитоскелета [359].

Было показано, что повышенная экспрессия G3BP коррелирует с прогрессией рака молочной железы, рака шеи и головы, колоректального рака, рака щитовидной железы и плоскоклеточной карциномы желудка [243, 244]. Тем не менее, в одном исследовании было показано, что снижение уровня G3BP ассоциировано в большем числе случаев с метастатической карциномой легких, чем с неметастатическими формами рака легких [360]. Несмотря на то, что полученные данные противоречивы, они интересны с учетом того факта, что G3BP участвует в различных путях, связанных с динамикой цитоскелета, которые, как известно, влияют на метастазирование [361, 362].

APE1. APE1, апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1, является ферментом, проявляющем как дезоксирибонуклеазную, так и рибонуклеазную активность. Основная функция APE1 заключается в участии в репарации ДНК и окислительно-восстановительной регуляции транскрипционных факторов. В эксцизионной репарации оснований (BER) APE1 функционирует как апурин/апиримидин эндодезоксирибонуклеаза и исправляет повреждения ДНК, вызванные окислительными или алкилирующими агентами. APE1, как эндорибонуклеаза, участвует в контроле метаболизма одноцепочечных РНК, в частности,

участвует в регуляции уровня С-Мус мРНК путем расщепления по UA и CA связям детерминантного кодирующего участка с-мус мРНК [363]. APE1 участвует в процессе контроля качества рРНК во время деления клетки [364].



**Рис. 4.** Схематическое представление биологической активности G3BP в клетках [243]. На диаграмме представлены различные биологические эффекты G3BP, описанные в литературе: (A) сигнальный путь gasGAP, который, согласно предположениям, приводит к деградации С-Мус; (B) вовлечение NFκB и IκB в ядерно-цитоплазматическое равновесие; (C) взаимодействие с убиквитин-специфичными протеазами (USP), которые могут участвовать в ретроградном и анти-ретроградном путях секреции белков. Также предложена роль G3BP, связанная с метаболизмом РНК: (D) взаимодействие G3BP1 с tau мРНК; (E) участие в формировании гранул стресса; (F) роль в активности полисомом. (G) возможная роль G3BP в ядре во взаимодействии ацетилированного Histone 3 и мРНК, облегчающая ее экспорт.

Таким образом, APE1 выполняет в клетке несколько функций и с помощью рибонуклеазной активности может поддерживать генетическую целостность и регулировать оборот различных мРНК. Недавно было высказано предположение, что этот белок может выполнять неканонические, но, тем не менее, важные функции в метаболизме РНК, влияя на посттранскрипционный контроль экспрессии генов [365-367].

Повышенная экспрессия APE1 была обнаружена в клетках ряда опухолей. Так, повышенный уровень APE1 детектировался в опухоли пациентов с множественной миеломой [246] и гепатоцеллюлярной карциномой [368], а в случае остеосаркомы был связан с устойчивостью опухоли к лечению и плохим прогнозом для пациентов [247]. APE1 является ядерным белком, тем не менее, при приобретении клетками ракового фенотипа происходит его перераспределение между ядром и цитоплазмой [369]. И если его функции, как ядерного белка, известны, то функции в цитоплазме, опосредующие злокачественную трансформацию клетки, остаются неизученными. Тем не менее, есть данные, что уровень эндорибонуклеазной активности APE1 в цитоплазме коррелирует с агрессивным фенотипом опухоли. Предполагают, что его функции могут заключаться в расщеплении миРНК и мРНК, кодирующих опухолевые супрессоры или онкогены.

У человека обнаруживают семь полиморфных вариантов белка APE1, у которых РНКазная активность не охарактеризована [370]. Наиболее часто встречающийся вариант APE1 D148E сохраняет свою апурин/апиримидин-дезоксирибонуклеазную активность. Гомозиготные варианты D148E (E/E) ассоциируют с повышенным риском развития нескольких видов рака, включая колоректальный рак [248]. Аналогичным образом было обнаружено, что полиморфизм D148E в значительной степени связан с повышенным риском развития рака легких [249]. Тем не менее, повышенный риск связан не с апурин/апиримидин-ДНКазной активностью белка, а, по всей вероятности, именно с РНКазной активностью, которая может влиять на оборот мРНК в клетке [255]. Посттрансляционные модификации APE1 также связывают с опухолевой прогрессией, хотя данных пока немного. В одном из исследований была обнаружена повышенная представленность фосфорилированного APE1 в экстрактах лейомиомы, что свидетельствует о его связи с опухолевым генезом гладкой мускулатуры матки, и та же картина наблюдалась в клеточных линиях, полученных из злокачественной лейомиомы [250].

FEN1. Флэп-эндонуклеаза 1 человека (FEN1) локализуется в ядре, обладает эндорибонуклеазной активностью и способна расщеплять *in vitro* как синтетические, так и природные РНК в двуцепочечных участках (стеблевых структурах) с 5'-конца [371], хотя ее способность к расщеплению РНК в клетках в настоящее время не подтверждена [255]. К

функциям FEN1 относится удаление РНК-праймеров во время репликации ДНК, 5'-3'-экзонуклеазная активность по дцДНК, гэд-эндонуклеазная активность и РНКазы Н-подобная активность [251, 252]. Интересным является тот факт, что экзонуклеазная активность FEN1, по-видимому, играет роль в фрагментации апоптотической ДНК, в то время как гэд-эндонуклеазная активность важна для запуска остановленной вилки репликации ДНК. Подобно APE1 белок FEN1, помимо своей функции удаления РНК-праймеров во время репликации ДНК, может также участвовать в регуляции уровня РНК в клетке.

При развитии опухоли белок FEN1 играет две противоположные роли. Гиперэкспрессия данного белка обнаруживается во множестве агрессивных быстрорастущих опухолей [253, 254]. Главным образом, клеточной пролиферации может способствовать функция FEN1, заключающаяся в удалении РНК-праймеров при репликации ДНК. Однако, может ли FEN1 участвовать в обороте других клеточных РНК, пока не выяснено. Было обнаружено, что сниженная эндодезоксирибонуклеазная активность FEN1 ассоциирована с развитием опухолей и *in vitro* модулируется циклин-зависимыми киназами – мессенджерами путей сигнальной трансдукции, способствующих клеточному росту [372]. При этом в быстрое прогрессирование опухолей вносит вклад также и гаплонедостаточность FEN1 [373].

На мышинных моделях было показано, что недостаточность FEN1 вносит существенный вклад в частоту и множественность возникновения опухолей [374], что может быть связано со снижением эффективности удаления РНК-праймеров и запуска остановленной вилки репликации из-за снижения концентрации фермента. С другой точки зрения, способность FEN1 расщеплять РНК также может играть важную роль в канцерогезе [255].

### 1.3.6. Заключение

В регуляции экспрессии генов на уровне мРНК участвует множество трансдействующих факторов, которые включают некодирующие РНК, РНК-связывающие белки и РНКазы, которые контролируют деградацию и оборот транскриптов и, таким образом, продукцию белков. Нарушения этих процессов вызваны aberrantными уровнями или неправильным функционированием этих факторов, что приводит к злокачественной трансформации клетки и прогрессированию рака. Среди этих факторов РНКазы не только играют ключевую роль в обороте различных транскриптов на разных временных этапах клеточного цикла, но также и в процессинге РНК, участвующих в контроле трансляции. Некоторые РНКазы участвуют как в индукции, так и в супрессии опухолевой прогрессии. Среди РНКаз, которые непосредственно участвуют в распаде мРНК, CCR4b способствует прогрессии клеточного цикла, тогда как другие РНКазы, в частности, PARN и XRN1,

проявляют опухоль-супрессирующую активность. РНКазе L, IRE1 и PMR1 для осуществления опухоль-модулирующих функций требуются определенные сигналы. РНКазы L, согласно многочисленным исследованиям, зарекомендовала себя как опухолевый супрессор, тогда как IRE1 может осуществлять как опухоль-индуцирующую, так и опухоль-супрессирующую активность. Ангиогенин был описан самым первым среди рибонуклеаз-протоонкогенов, и повышенный уровень его экспрессии был отмечен во многих типах раковых клеток. PMR1 проявляет свойства протоонкогена и является эффектором сигнального пути EFGR. Было показано, что мишенью для РНКазы G3BP *in vitro* является С-Мус мРНК, поэтому его роль связывают с контролем канцерогенеза.

Кроме того, было обнаружено, что ферменты, участвующие в репликации и репарации ДНК, также проявляют РНКазную активность. В условиях стресса или при утрате сигнала ядерной локализации происходит перераспределение этих ферментов между ядром и цитоплазмой, где они могут влиять на уровень клеточных РНК. Для подтверждения этого потребуются дальнейшие исследования, которые позволят выявить новые механизмы регулирования оборота РНК в клетке.

Ферменты, участвующие в биогенезе миРНК, также способны участвовать в модулировании злокачественной трансформации. Так, DROSHA, участвующая в процессинге ргi-миРНК, характеризуется, как протоонкоген, а aberrантная активность DICER и AGO2, которые являются критическими регуляторами экспрессии генов по механизму РНК-интерференции, приводит к событиям опухолевой прогрессии.

В настоящее время существует предположение, что многие РНКазы до сих пор не идентифицированы в клетках млекопитающих, и, соответственно, нет никакой информации об осуществляемых ими функциях. В частности, нет данных об участии РНКаз млекопитающих в событиях распада мРНК, которые позволяют избавляться от aberrантных мРНК: непрерывном распаде (non-stop decay), заключающемся в высвобождении рибосом, застопорившихся на 3'-конце мРНК, и стимуляции экзосомальных комплексов для быстрой деградации транскриптов; нонсенс-опосредованном распаде (non-sense-mediated decay), заключающемся в деградации неправильно сплайсированных транскриптов, и распаде не полностью транслированных мРНК (no-go decay) [375]. Существует много наблюдений, которые указывают на участие в этих путях неописанных деаденилаз, экзосомальных ферментов и эндорибонуклеаз. Например, есть данные о РНКазе дрожжей, участвующей в эндонуклеолитическом распаде дефектных мРНК, которая является частью пути no-go decay. В исследованиях *in vitro* было показано, что белок Dom34 архей и дрожжей (Pelota у эукариот), выполняет функцию рибонуклеазы в распаде не полностью транслированных

мРНК [376]. Было показано, что белок Pelota высококонсервативен от насекомых до млекопитающих и играет важную роль в контроле самообновления стволовых клеток у плодовых мух и деления клеток у мышей [375].

Таким образом, эндогенные нуклеазы являются важной частью поддержания нормального гомеостаза клетки за счет контроля оборота РНК, избавления от дефектных РНК, сохранения нормального транскриптома клетки, а нарушение в уровне их экспрессии или функционирования приводит к злокачественной трансформации и онкогенезу.

## **1.4. Экзогенные противоопухолевые нуклеазы и механизм их действия**

### **1.4.1. Введение**

Обнаружение в 50-е годы токсичности экзогенных рибонуклеаз (РНКаз) по отношению к опухолевым клеткам послужило толчком к изучению этих ферментов в качестве противоопухолевых препаратов. В настоящее время в мире широким фронтом ведутся исследования противоопухолевого потенциала экзогенных рибонуклеаз и, в меньшей степени, экзогенных дезоксирибонуклеаз. Противоопухолевые рибонуклеазы представляют собой основные белки небольшого размера (10-29 кДа), принадлежащие к двум суперсемействам РНКаз – РНказы А и РНказы Т1. Их цитотоксические свойства напрямую связаны с ферментативной активностью, то есть способностью катализировать расщепление фосфодиэфирных связей в РНК.

Одной из первых была исследована противоопухолевая активность панкреатической бычьей РНказы А, для которой были получены противоречивые результаты [34-38]. Вследствие этого внимание привлекли другие рибонуклеазы – BS-РНКаза (РНКаза, выделенная из семенников быка) [26], РНказы амфибий - онконаза (РНКаза, выделенная из ооцитов лягушки *Rana pipiens*) [377], сSBL и jSBL (РНказы, выделенные из *Rana catesbeiana* и *Rana japonica*, соответственно) [378], микробные РНказы [32, 379] и конъюгаты РНКаз с различными молекулами [380], которые проявляли цитотоксическую и противоопухолевую активность.

Панкреатическая бычья ДНКаза I широко используется для лечения вирусных и аутоиммунных заболеваний, в том числе и вызванных вирусом герпеса, аденовирусами и другими ДНК-содержащими вирусами. Для лечения муковисцидоза и острой бронхиальной астмы используется коммерчески доступная рекомбинантная человеческая ДНКаза I (дорназа альфа) в качестве агента, который уменьшает вязкость мокроты у пациентов [381, 382]. Однако, в качестве противоопухолевого препарата ДНКаза I зарекомендовала себя лишь в небольшом числе исследований.

В данной части обзора будут рассмотрены известные противоопухолевые экзогенные рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы, а также возможные механизмы их цитотоксичности и противоопухолевой активности.

#### **1.4.2. Бычья панкреатическая РНКаза А и панкреатическая РНКаза 1 человека**

Бычья панкреатическая рибонуклеаза А (РНКаза А) представляет собой белок небольшого размера (124 аминокислоты, 13.7 кДа) и обладает самой высокой каталитической активностью среди белков своего суперсемейства. РНКазы суперсемейства РНКазы А катализируют расщепление РНК по фосфодиэфирным связям после остатков пиримидинов в одноцепочечных участках. РНКаза А является первой из рибонуклеаз, чья противоопухолевая активность была исследована *in vitro* [383-385] и *in vivo* [34, 35, 386-388]. Однако, полученные результаты были противоречивы. Этот фермент в дозах 40 – 1000 мг/кг вызывал замедление роста солидных и асцитных опухолей у мышей и крыс [34-36]. В других работах было показано, что РНКаза А не проявляет цитотоксического и противоопухолевого действия даже при инъекциях высоких доз фермента в солидные опухоли [37, 38, 389]. Предпринимались попытки исследовать панкреатическую РНКазу 1 человека, которая также является представителем семейства РНКазы А с достаточно высокой каталитической активностью, в качестве противоопухолевого препарата, однако фермент на культурах клеток проявлял очень слабое цитотоксическое действие. Отсутствие цитотоксического действия РНКазы А и РНКазы 1 связывали с их инактивацией под действием внутриклеточного рибонуклеазного ингибитора (RI), который формирует с этими РНКазами чрезвычайно прочный комплекс ( $K_d < 10^{-15}$  М) [390]. Это мнение главенствовало последние 60 лет.

В ряде работ повышение цитотоксичности РНКазы А и РНКазы 1 было достигнуто за счет конъюгации мономеров этих РНКаз с пептидами, белками и антителами, что усилило эффективность их захвата опухолевыми клетками [391-394]. Youle с соавторами присоединяли остаток трансферрина по 89-му аминокислотному остатку РНКазы 1, что повышало цитотоксичность РНКазы 1 по отношению к клеткам, экспрессирующим рецепторы к трансферрину [395]. Для получения вариантов РНКазы А и РНКазы 1, устойчивых к RI, использовались методы белковой инженерии [396-398], химической модификации [399] или конверсии белка с образованием ковалентных димеров [400, 401]. D'Alessio с соавторами с помощью сайт-направленного мутагенеза создали искусственные димеры РНКазы А и РНКазы 1, которые проявляли цитотоксичность по отношению к раковым клеткам [400, 402]. Это позволило получить производные РНКазы А и РНКазы 1 с высокой противоопухолевой активностью.

Первые клинически исследования РНКазы А в качестве противоопухолевого препарата были проведены корейскими исследователями в 1972 году [403]. В исследовании принимали участие 23 пациента с различными типами рака: гемангиоэндотелиомой, плоскоклеточной карциномой, фибросаркомой, гепатомой с метастазами в лимфоузлы, карциноматозным перитонитом, липосаркомой, синовиальной саркомой, злокачественной лимфомой, гигантоклеточной саркомой, лейкемической бронхогенной карциномой и раком желудка. У большей части пациентов эффекта от применения РНКазы А обнаружено не было. Тем не менее, в случае прямого введения в опухоль в большой концентрации (до 3 мг/кг/день) была отмечена значительная регрессия опухоли у пациентов с фибросаркомой, липосаркомой, синовиальной саркомой и плоскоклеточным раком и даже ее полное исчезновение [403].

Несмотря на обнадеживающие результаты, интерес к терапевтическому потенциалу РНКазы А на долгое время исчез, однако появился спустя несколько десятилетий, когда была обнаружена способность РНКаз оказывать цитотоксические эффекты на опухолевые клетки в значительно более низких дозах, чем применялись в 50-х годах прошлого века. Так, в 2002 году конъюгирование РНКазы А с поли[N-(2-гидроксипропил)метакриламидом] позволило получить конструкции, эффективно подавляющие рост меланомы у мышей nude [404]. В 2004 году появились первые сведения о цитотоксическом действии вариантов РНКаз, которые, тем не менее, были способны инактивироваться под действием RI. Был разработан цитотоксический вариант панкреатической РНКазы человека PE5, несущий сигнал ядерной локализации, который, несмотря на чувствительность к RI, продемонстрировал высокую цитотоксичность на панели различных опухолевых клеток [405]. В дальнейшем, дополнительные модификации, вносимые в структуру PE5, привели к появлению вариантов РНКазы 1 с высокой цитотоксичностью [406].

В период с 2010 года по настоящее время проводилось несколько клинических исследований панкреатической РНКазы А для лечения различных типов опухолей. Первое исследование (фаза I, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01201018), проводившееся в период сентябрь 2010 – июнь 2012 г, заключалось в применении РНКазы А в пероральной форме (препарат O'Shadi R) для лечения пациентов с различными онкологическими заболеваниями [45]. И хотя официальный отчет об исследовании до сих пор не представлен, тем не менее, с тех пор стартовало еще четыре клинических испытания РНКазы А: для лечения метастазирующего немелкоклеточного рака легкого [407], мезотелиомы [408], базальной клеточной карциномы [409], острой миелоидной лейкемии и лимфоидной лейкемии [410].

В связи с противоречивыми результатами о противоопухолевой активности РНКазы А, механизм ее действия фактически до настоящего времени был не изучен.

#### **1.4.3. Онконаза/ранпирназа (из ооцитов лягушки *Rana pipiens*)**

В конце 1980-х годов корпорация Alfacell проводила изучение экстракта эмбрионов леопардовой лягушки (*R. pipiens*), обладающего сильной цитостатической и цитотоксической активностью. Активным компонентом экстракта оказался основной белок небольшого размера (11.82 кДа), который также обнаруживался в неоплодотворенных ооцитах. Аминокислотная последовательность этого белка, первоначально названного Р-30, а позднее онконазой или ранпирназой, имела сходство с последовательностью ферментов суперсемейства РНКазы А [411]. Онконаза является самым маленьким белком суперсемейства РНКазы А, и ее последовательность составляет 104 аминокислоты.

Онконаза проявляет заметную рибонуклеазную активность [411, 412], которая в  $10^2$ - $10^5$  раз ниже по сравнению с активностью РНКазы А [411, 413]. Кроме того, было обнаружено, что онконаза является чрезвычайно стабильным белком и не подвергается инактивации под действием RI [413]. Цитостатические и цитотоксические свойства онконазы первоначально были исследованы на клеточных линиях лейкоза HL-60 человека, подчелюстной карциномы А-253 и аденокарциномой толстой кишки Colo 320 CM [414]. Онконаза вызывала замедление скорости пролиферации клеток путем увеличения продолжительности фазы G1 клеточного цикла, сопровождающейся снижением частоты репликации ДНК. В более поздних работах цитотоксичность онконазы была показана на клеточных линиях опухолей различного гистогенеза: В-клеточных лимфоидных опухолях [415], хронической миелоидной лейкемии [416], легочной карциномы и панкреатической аденокарциномы [417], множественной миеломы, аденокарциномы и рака простаты [418].

Одновременное применение онконазы и цитостатиков *in vitro* для обработки опухолевых клеток приводило к сильному синергическому эффекту. Так, было показано, что синергический эффект достигался на клеточных линиях легочной карциномы А549 и панкреатической аденокарциномы ASPC-1 при одновременном использовании онконазы с тамоксифеном и трифторперазином (Силазином) [417] или ловастатином [419]. Полученные данные дали толчок дальнейшим исследованиям, которые выявили синергизм онконазы в сочетании с другими агентами *in vitro*, такими как винкристин [29], ФНО- $\alpha$  [420], интерфероны [421, 422], ионизирующее излучение [423], индуцирующие дифференцировку агенты [424], цефалантин [418] и тамоксифен *in vivo* [425]. Цитотоксичность онконазы увеличивалась при умеренной (39.0°C) гипертермии [426]. Наблюдаемый синергизм интересен и потенциально важен для клинического применения фермента, поскольку этот

эффект был отмечен при сочетании онконазы с противоопухолевыми агентами, каждый из которых характеризовался совершенно другим механизмом действия, а некоторые из них имели очень низкую токсичность.

Первоначальные исследования онконазы *in vivo* были проведены на модели карциномы Мэдисон М109 мышей и было продемонстрировано, что выживаемость животных-опухоленосителей после лечения онконазой возрастает в 12 раз по сравнению с контролем [427]. В недавних работах на моделях ксенографтов мезотелиомы было показано значительное подавление роста опухоли под действием онконазы [428], на моделях ксенографтов немелкоклеточного рака легкого и мезотелиомы – подавление роста опухоли и ангиогенеза при сочетанном действии онконазы и дигидроартемизинина [429]. В ряде работ была продемонстрирована противоопухолевая активность онконазы, конъюгированной с антителами, специфично адресующими фермент в опухолевые клетки [430, 431]. В недавних работах на модели ксенографтов глиомы мышей было показана высокая противоопухолевая активность онконазы, конъюгированной с хлоротоксином [432]. Последние из предпринятых исследований онконазы заключались в получении димеров фермента, которые демонстрировали значительное увеличение ее цитотоксичности по отношению к опухолевым клеткам [433].

Онконаза была одной из первых рибонуклеаз, исследуемых в клинических испытаниях. Онконаза была одобрена для клинического использования в качестве орфанного препарата для лечения неоперабельной злокачественной мезотелиомы в США, Европе и Австралии [434, 435]. Клинические испытания показали, что онконаза хорошо переносится пациентами, имеет низкую иммуногенность, но обладает высокой нефротоксичностью [435]. Однако, недавние клинические испытания онконазы для лечения пациентов с немелкоклеточным раком легкого [436] и мезотелиомой [437] были досрочно прекращены.

#### **1.4.4. BS-РНКаза (из семенников быка)**

BS-РНКаза была независимо открыта Hosokawa и Irie в 1971 году [438], D'Alessio с коллегами в 1972 г [439], а также Dostal и Matousek в 1972 [440]. Это единственная из всех рибонуклеаз, имеющая четвертичную структуру. BS-РНКаза представляет собой природный димер, который состоит из двух идентичных субъединиц, связанных двумя дисульфидными связями и нековалентными взаимодействиями [439, 441]. Аминокислотная последовательность субъединицы BS-РНказы и ее структура демонстрируют принадлежность фермента к суперсемейству панкреатической РНказы А [442, 443]. Как у РНказы А полипептидная цепь субъединицы BS-РНказы состоит из 124 аминокислотных остатков и на 80% гомологична РНказе А. Наиболее важным отличием BS-РНказы от

РНКазы А является наличие двух остатков цистеина в позициях 31 и 32 субъединицы BS-РНКазы. Эти два остатка и участвуют в формировании межмолекулярной дисульфидной связи, между Cys31 одной субъединицы и Cys 32 второй субъединицы, что приводит к димеризации фермента [444]. Димерный фермент (27.218 кДа) представляет собой смесь двух различных четвертичных форм, обозначаемых как M=M и M×M [445].

Рибонуклеазная активность является крайне важной для цитотоксичности BS-РНКазы и, следовательно, для противоопухолевой активности фермента [446]. Однако, в работах Vestia с соавторами [447] и Kim с соавторами [448] было показано, что единичная субъединица, которая обладает более высокой каталитической активностью по сравнению с димерной BS-РНКазой, не проявляет цитотоксического действия по отношению к опухолевым клеткам. Объяснение было получено в работах Murthy и Sirdeshmukh [449] и заключалось в том, что отдельная субъединица, но не димерная форма фермента, инактивируется под действием цитозольного RI. Кроме того, было показано, что димерная форма BS-РНКазы, но не мономерная, вызывает дестабилизацию мембран опухолевых клеток, и эта дестабилизация вносит вклад в наблюдаемый противоопухолевый эффект фермента [450].

Противоопухолевое действие BS-РНКазы изучалось, в основном, на клетках опухолевых линий, и, в меньшей степени, на моделях опухолей *in vivo*. Так, BS-РНКаза проявляла цитотоксическое действие на различных опухолевых клеточных линиях – карциномы щитовидной железы, фибробластных клетках SVT2 и 3T3, миелоидных клетках ML-2 и клетках нейробластомы (NB-1 и NB-2) [25, 451-453]. Цитотоксическое действие BS-РНКазы также было изучено на клеточных линиях нейробластомы человека SK-N-SH и UKF-NB-4, обладающих фенотипом множественной лекарственной устойчивости (MDR), и чувствительных линиях нейробластомы IMR-32, UKF-NB-1, UKF-NB-2 и UKF-NB-3 [27]. Оказалось, что независимо от чувствительности клеток нейробластомы к цитостатикам, они с одинаковой эффективностью элиминируются под действием BS-РНКазы [27]. Попытки присоединения BS-РНКазы к наночастицам с целью повысить ее проникновение в опухолевые клетки не принесли успеха, так как цитотоксичность интактной и конъюгированной с наночастицами BS-РНКазы по отношению к клеткам лейкемии и лимфомы была одинакова [454].

В работах Soucek с соавторами были получены конъюгаты BS-РНКазы с поли[N-(2-гидроксипропил)метакриламидом] (PHРМА), препятствующим деградации фермента в кровотоке, и на модели меланомы человека у мышей линии nude было показано значительное ингибирование роста опухоли под действием таких конъюгатов при

внутривенном введении, тогда как интактная BS-РНКаза была неэффективна [455]. Конъюгаты BS-РНКаза РНРМА были также изучены на различных моделях опухолей человека у мышей линии CD-1 nude. Конъюгаты при внутривенном и внутрибрюшинном введении мышам с меланомой, нейробластомой или раком яичников по схеме 2.5 и/или 1 мг/кг в течение 10 дней продемонстрировали существенное уменьшение опухолевых трансплантатов, в то время как интактная BS-РНКаза при введении в дозах порядка 10 мг/кг показала лишь незначительный противоопухолевый эффект [28].

#### 1.4.5. Микробные рибонуклеазы

В недавнее время было открыто множество РНКаз бактериального происхождения, проявляющих цитотоксическую активность. В отличие от цитотоксических РНКаз млекопитающих, которые относятся к суперсемейству РНКазы А, микробные РНКазы принадлежат суперсемейству РНКазы Т1. Суперсемейство РНКазы Т1 состоит из 25 ферментов грибкового и бактериального происхождения, имеющих сходную аминокислотную последовательность и третичную структуру [456]. РНКазы суперсемейства РНКазы Т1 катализируют расщепление РНК по фосфодиэфирным связям после остатков гуанина в одноцепочечных участках. В таблице 3 приведены микробные РНКазы и их биологические эффекты.

РНКазы грибов, также известные как риботоксины ( $\alpha$ -сарцин, митогиллин и рестриктоцин) расщепляют эукариотическую 28S рРНК большой субъединицы рибосомы по единственной фосфодиэфирной связи и таким образом инактивируют синтез белков, вызывая апоптоз и клеточную смерть [457-459]. Хотя  $\alpha$ -сарцин показал высокую цитотоксическую активность против ряда опухолей, в том числе и саркомы, однако проявлял высокую гепатотоксичность и вызывал токсические поражения сердца у здоровых животных (Таблица 3).

Наиболее известные из микробных рибонуклеаз, проявляющих цитотоксическое действие по отношению к опухолевым клеткам, это РНКазы Sa (РНКаза *Streptomyces aureofaciens*), барназа (РНКаза *Bacillus amyloliquefaciens*) и биназа (РНКаза *Bacillus intermedius*) (Таблица 3). Согласно недавней генотипической идентификации, штамм, известный как *B. intermedius*, относится к видам *B. Pumilus*, поэтому он был соответствующим образом переименован (GenBank Accession No. HQ650161.1). Биназа и барназа не имеют гомологии с РНКазами млекопитающих и не связываются с RI [460]. Барназа и биназа представляют собой белки небольшого размера и состоят из 110 (12.382 кДа) и 109 (12.213 кДа) аминокислот, соответственно [461, 462]. Их первичные структуры гомологичны на 85%.

В ряде исследований биназа и барназа продемонстрировали биологические эффекты, которые свидетельствуют о перспективности их использования для элиминации злокачественных клеток. Была показана способность барназы ингибировать пролиферацию клеток линий карциномы и лейкемии человека [463]. Для направленной доставки в опухолевые клетки две молекулы барназы конъюгировали с одноцепочным варибельным фрагментом (scFv) гуманизированного антитела 4D5, направленного к внеклеточному домену рецептора эпидермального фактора роста человека 2 HER2, гиперэкспрессирующегося во многих карциномах человека [463, 464]. Цитотоксический эффект такого конъюгата в 1000 раз превышал цитотоксический эффект интактной барназы [463]. На основе барстара, который является ингибитором барназы бактериального происхождения, и барназы, конъюгированных с фрагментами различных антител и различными наночастицами, было предложено создание многофункциональных супрамолекулярных структур для элиминации злокачественных клеток [465].

Цитотоксичность биназы была исследована в работах Макарова с соавторами на ряде клеточных линий, отличающихся экспрессируемыми онкогенами: миелоидных предшественниках FDC-P1; клетках FDC-P1-N822K, экспрессирующих онкоген KIT; трансдуцированных клетках FDC-P1, экспрессирующих онкоген AML1-ETO; трансдуцированных клетках FDC-P1-N822K, экспрессирующих онкогены AML1-ETO и KIT; клетках острой миелоидной лейкемии Kasumi-1, экспрессирующих также оба онкогена [33, 39]. Было показано, что чувствительность клеток к биназе зависит от экспрессии онкогенов и наиболее чувствительна была линия клеток Kasumi-1 [33]. Было обнаружено, что высокий уровень экспрессии онкогена c-kit также повышает чувствительность опухолевых клеток к биназе [51], что позволяет предположить, что онкогенные мРНК могут быть мишенями для биназы.

Несмотря на то, что противоопухолевый потенциал микробных рибонуклеаз в преклинических и клинических испытаниях еще не изучался, тем не менее, микробные РНКазы являются самыми «молодыми» РНКазами с высокой противоопухолевой активностью, эти ферменты являются перспективными кандидатами для создания противоопухолевых препаратов.

#### **1.4.6. Возможные механизмы цитотоксического действия РНКаз**

Предполагаемый и частично подтвержденный в различных исследованиях механизм цитотоксического действия экзогенных РНКаз складывается из этапов связывания с опухолевой клеткой, интернализации, выхода в цитозоль и непосредственного

**Таблица 3.** Микробные РНКазы и их биологические эффекты.

Источник	РНКаза	Исследованные клеточные линии и вирусы	Эффект	Ссылки
<b>Бактерии</b>				
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Химерные токсины барназы с PE (PE-Bar) PE: эндотоксин A <i>Pseudomonas</i>	Клеточные линии фибробластов мыши (L929), эпидермоидной карциномы, карциномы молочной железцы, гепатомы, глиобластомы.	Цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам, токсичность для мышей.	Prior et al, 1996 [466]
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	РНКаза Sa (заряженные мутанты и варианты с N-концевой достройкой)	Клетки острой миелоидной лейкемии человека Kasumi-1	Цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам за счет запуска апоптоза	Mitkevich et al, 2014 [467]
<i>Bacillus intermedius</i>	Биназа	Клетки лейкемии Kasumi-1	Запуск апоптоз по внешнему и внутреннему пути	Mitkevich et al, 2013 [468]
<i>Bacillus intermedius</i>	Биназа	Клетки рака яичника человека (SKOV3 и OVCAR5), клетки нормального эпителия яичника (HOSE1 HOSE2)	Снижение жизнеспособности клеток и селективный запуск апоптоза путем активации каспазы-3	Garipov et al, 2014 [469]
<i>Bacillus intermedius</i>	Биназа	Фибробласты куриных эмбрионов (нормальные и трансформированные вирусом саркомы Рауса), мышинные фибробласты (клетки NIH3T3, трансформированные v-ras, v-src, v-fms, и нормальные)	Ингибирование клеточной пролиферации и мембранного тока в фибробластах куриных эмбрионов и v-ras-трансформированных клетках NIH3T3	Ilinskaya et al, 2001 [32]
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	РНКаза Sa 3	Клетки эритролейкемии человека K-562	Ингибирование пролиферации клеток РНКазой Sa 3 с IC <sub>50</sub> , превышающей IC <sub>50</sub> онконазы в 10 раз.	Shevcik et al, 2002 [379]
<i>Bacillus intermedius</i>	Биназа	Клетки альвеолярной аденокарциномы человека A549	Запуск апоптотического ответа (фрагментация ДНК, клеточная смерть), не токсична для нормальных клеток легочного эпителия	Cabrera-Fuentes et al, 2013 [470]

Таблица 3 (продолжение). Микробные РНКазы и их биологические эффекты.

Источник	РНКаза	Исследованные клеточные линии и вирусы	Эффект	Ссылки
<b>Грибы</b>				
<i>Bacillus intermedius</i>	РНКаза	Вирус табачной мозаики	Ингибирование вируса на 90%	Zhou and Niu, 2009 [471]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Asp-fI (главный аллерген)	Макрофагальные клетки	Деградация рибосомальной РНК и ингибирование синтеза белков	Madan et al, 1997 [472]
<i>Aspergillus giganteus</i>	$\alpha$ -сарцин	Клетки рабдомиосаркомы человека	Специфическое расщепление 28S рРНК, ингибирование синтеза белка и апоптоз	Olmo et al, 2001 [458]
<i>Aspergillus giganteus MDH18894</i>	$\alpha$ -сарцин	Различные опухолевые модели животных (протестировано 28 опухолей)	Цитотоксичность по отношению к ткани печени человека (Chang), KB (Eagle), Detroit 6 (Berman), ткани сердца человека (Girardi), Maben (Frisch), саркоме 180 (Foley)	Olson et al, 1965 [473]
<i>Aspergillus restrictus</i>	Иммуноконъюгаты рестриктоцина	Карцинома молочной железы человека MCF-7, карцинома толстого кишечника человека HT-29, карцинома яичника человека MeWo и OVCA, здоровые мышцы линии BALB/c	Специфическое расщепление 28S рРНК, ингибирование синтеза белков путем блокирования этапа элонгации, низкая токсичность для мышей	Conde et al, 1989 [474]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Рекомбинантный митогиллин и иммуноконъюгаты митогиллина	Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC)	Токсичность для Т-клеток и мононуклеарных клеток периферической крови	Better et al, 1992 [475]

Адаптировано из Names and Demir, 2015 [476].

действия на внутриклеточные РНК (Рис. 5). Помимо влияния на внутриклеточные РНК, РНКазы при попадании в кровоток могут оказывать действие и на опухоль-ассоциированные циркулирующие вРНК.

Связывание РНКаз с опухолевой клеткой. Исследователи полагают, что способность РНКаз избирательно элиминировать опухолевые клетки основана на различиях в структурно-функциональных свойствах нормальных и малигнизированных клеток. При неопластической трансформации в плазматической мембране клеток происходит увеличение молярного соотношения между фосфолипидами этаноламина и фосфолипидами холина [477]. Это приводит к увеличению отрицательного заряда мембраны, что облегчает связывание с положительно заряженными молекулами РНКаз. Кроме того, селективное взаимодействие молекул РНКазы с опухолевыми клетками обеспечивается усиленным отрицательным зарядом опухолей за счет анионного фосфотидилсерина, экспонирующегося на поверхности кровеносных сосудов в опухолях [478].

Анализ связывания РНКазы А с клетками *in vitro* и *in cellulo* выявил, что РНКазы А формирует плотные контакты с поверхностным протеогликанами, содержащими



**Рис. 5.** Главные этапы взаимодействия цитотоксических РНКаз с опухолевыми клетками. Адаптировано из Makarov et al, 2008 [479].

глюкозаминогликаны, такие как гепаран сульфат и хондроитин сульфат, а также остатки сиаловой кислоты [480]. Для онконазы было подтверждено электростатическое связывание с плазматической мембраной клетки, экспонирующей остатки сиаловой кислоты [481]. С этим наблюдением соотносятся результаты Ильинской и коллег [482], продемонстрировавшие, что увеличение катионизации биназы повышает цитотоксические свойства фермента.

Электростатическое связывание катионных участков молекулы РНКазы с отрицательно заряженными гликолипидами и гликопротеинами мембран может затронуть рецепторные компоненты сигнальных систем клетки и повлиять на различные звенья передачи внутриклеточных регуляторных сигналов [483]. Тем не менее, было показано, что BS-РНКазы одинаково легко связываются как с нормальными, так и с опухолевыми клетками, однако является более токсичной для малигнизированных клеток [484].

Помимо электростатического связывания с поверхностью опухолевых клеток РНКазы могут связываться с трансмембранными белками, участвующими в передаче сигналов. Было показано, что в трансформированной клетке белок онкогена *ras*, гиперэкспрессирующийся более чем в 25% случаев онкопатологий человека и в 20-60% неоплазий у экспериментальных животных [485], ковалентно связан с остатком пальмитиновой кислоты и закреплён в клеточной мембране [486]. Мембранная локализация белка может способствовать его взаимодействию с экзогенными РНКазами, которые в свою очередь могут повлиять на процессы передачи сигналов.

Таким образом, первым этапом является связывание положительно заряженных РНКаз с отрицательно заряженной мембраной клетки или трансмембранными белками, участвующими во внутриклеточной передаче сигналов, и проникновение внутрь путём эндоцитоза.

Интернализация РНКаз и выход в цитозоль. На примере онконазы было показано, что ее интернализация происходит путем энергозависимого эндоцитоза [487], который опосредуется комплексом AP-2/клатрин, то есть по клатрин-динамин независимому механизму [488]. Исследование проникновения РНКазы А в работах Raines с коллегами показало, что РНКазы А интернализируются с помощью многоступенчатого механизма, который вовлекает клатрин-зависимый механизм и проникновение в составе макропиносом [489]. По типу проникновения в клетку РНКазу А можно отнести к белкам, проникающим в клетки (cell-penetrating protein).

На этапе выхода в цитозоль РНКазы могут связываться RI и подвергаться инактивации. Есть мнение, что RI действует как защитный механизм против внеклеточных РНКаз, которые могли случайно попасть в цитоплазму [490]. Константа ингибирования  $K_i$

(RI) для РНКазы А составляет  $4 \cdot 10^{-14}$  М, и, поскольку концентрация RI внутри клетки и в тканевых жидкостях составляет 1 – 4 мкМ, то РНКазы А в концентрации  $\leq 1$  мкМ оказывается инактивированной [491], чем исследователи и объясняют отсутствие противоопухолевого эффекта в ряде работ с РНКазой А. BS-РНКазы и РНКазы амфибий в силу своих структурных особенностей не подвергаются ингибированию RI. Это наблюдение позволило некоторым исследователям предположить, что предпосылкой для проявления РНКазой цитотоксичности является способность избегать взаимодействия с RI, однако эта гипотеза является спорной. Так, Naddeo и коллеги показали, что димеры РНКазы А, несмотря на их прочное связывание с рибонуклеазным ингибитором, вызывают значительный цитотоксический эффект [492].

В опухолевых клетках существуют пути внутриклеточного транспорта, в котором участвуют определенные органеллы, перемещающие РНКазы в цитозоль. Действительно, BS-РНКазы была обнаружена в цистернах аппарата Гольджи малигнизированных, но не нормальных клеток [493]. Это наблюдение, по всей видимости, указывает на наличие нескольких путей транспорта белка внутри клетки, не все из которых приводят к высвобождению фермента в цитозоль.

Разрушение клеточной РНК. На следующем этапе РНКазы попадают в цитозоль, где разрушают клеточную РНК. Очевидно, что центральной молекулярной мишенью РНКаз являются разнообразные РНК: рРНК, мРНК, РНК в составе рибонуклеопротеинов, тРНК и некодирующие малые РНК. РНКазы в условиях *in vitro* разрушают рРНК и тРНК в равных количествах, тем не менее, *in vivo* для каждой РНКазы более предпочтительным является определенный тип РНК: BS-РНКазы разрушает рРНК [484, 494], тогда как онконаза - тРНК [495, 496]. Это может быть связано со следующими факторами: (1) специфической локализацией РНКаз внутри клетки; (2) типом рибонуклеопротеидного комплекса, который может экранировать РНК от действия РНКаз или, наоборот, делать более доступным для расщепления, (3) протеолизом или модификацией фермента после проникновения в клетку [497]. Таким образом, токсическое действие РНКаз связано с их основной функцией – способностью катализировать расщепление РНК. Однако существуют данные, указывающие на то, что рибонуклеазная активность РНКаз является не единственной составляющей механизма противоопухолевой активности. Показано, что панкреатическая РНКазы человека обладает не связанной с каталитической активностью функцией дестабилизации двуспиральной РНК [498], а бактериальная РНКазы III влияет на экспрессию генов не только путем деградации двуцепочечных РНК в ходе процессинга, но и путем ее необратимого связывания [499].

После проникновения РНКаз в цитозоль происходит разрушение клеточной РНК, вследствие чего блокируется синтез белков и запускается апоптоз. Так, в клетках, обработанных BS-РНКазой [25, 402] и онконазой [500-502] были зафиксированы специфические признаки апоптоза. Кроме того, цитостатические эффекты РНКаз могут быть связаны с их способностью подавлять функции  $K_{Ca}$ -каналов в опухолевых клетках [482], как это было показано в работах Макарова и Ильинской для биназы.

Более подробно рассмотрим опухоль-ассоциированные РНК и другие возможные мишени в опухолевой клетке в качестве молекулярных мишеней РНКаз. Онконаза проявляет свои антипролиферативные и цитотоксические свойства путем регуляции клеточного цикла и индукции программируемой клеточной смерти [503-506]. Было показано, что онконаза активирует каспазу-3 и одновременно снижает уровень Bcl-2, что приводит к индукции апоптоза в опухолевых клетках [507]. Еще одной потенциальной мишенью онконазы является дцРНК-зависимая протеинкиназа R, фермент, который фосфорилирует I $\kappa$ B и, таким образом, активирует транскрипционный фактор NF $\kappa$ B, что повышает чувствительность опухоли к другим противоопухолевым препаратам [508]. Внутриклеточными мишенями онконазы являются тРНК, рРНК, мРНК и, как было показано в недавних работах, миРНК [509]. В дополнение к этим механизмам генной регуляции, также было показано, что онконаза активирует каскад протеолитических каспаз и сериновых протеаз, что приводит к гибели клеток [502].

Механизм цитотоксического действия BS-РНКазы по отношению к опухолевым клеткам не до конца изучен. Основываясь на своих наблюдениях и наблюдениях других исследователей Kim с коллегами предложили следующий механизм цитотоксического действия BS-РНКазы [510]. Фермент в виде смеси форм M=M и M×M в равном количестве поступает в клетку с помощью поглощающего эндоцитоза. Форма M=M в цитозоле диссоциирует с образованием двух мономерных субъединиц и инактивируется под действием RI. Форма M×M, стабилизированная нековалентными взаимодействиями, остается в виде димера, не подвергается связыванию RI и расщепляет внутриклеточную РНК с предпочтением рРНК, что приводит к цитотоксическому действию на опухолевые клетки.

В случае биназы было показано, что обработка клеток ферментом приводит к значительному снижению суммарного количества внутриклеточной РНК, которое, тем не менее, не коррелирует с уровнем цитотоксического действия биназы [511]. Поскольку биназа сохраняет свою каталитическую активность после интернализации в опухолевых клетках в течение 48 ч [511], она способна индуцировать регуляторные изменения. Было показано, что

биназа в опухолевых клетках приводит к повышению уровня проапоптотических p53 и hSK4 мРНК, и снижению уровня антиапоптотической bcl-2 мРНК.

Важным аспектом цитотоксичности биназы является ее избирательность по отношению к опухолевым клеткам, экспрессирующим ряд онкогенов. Эта избирательность была продемонстрирована в ряде работ, хотя основы такой селективности не до конца понятны. Так, было показано, что фибробласты, трансформированные онкогенами Ras и Kit, более восприимчивы к токсическому эффекту биназы, чем нетрансформированные клетки [32, 39, 51]. Это было подтверждено для онкогена kit в работе, где ингибирование тирозинкиназы Kit иматинибом привело к резкому снижению чувствительности миелоидных клеток, трансформированных онкогеном kit, к биназе [51].

Было сделано предположение, что наблюдаемые эффекты изменения уровней внутриклеточных опухоль-ассоциированных РНК под действием экзогенных РНКаз могут быть следствием как прямой деградации мРНК, так и деградации миРНК, которые подавляют экспрессию определенных генов, и/или генерации нового набора siРНК-подобных молекул, которые могут участвовать в регуляции внутриклеточных процессов по механизму РНК-интерференции [512, 513].

Таким образом, каталитическая активность экзогенных РНКаз рассматривается в качестве ключевого фактора, определяющего регуляцию внутриклеточных процессов с участием РНК. Как уже обсуждалось в разделе 1.3, контролируемая эндогенными РНКазми деградация РНК играет значительную роль в контроле экспрессии генов, созревании и обороте РНК, которые могут быть ассоциированы со злокачественным перерождением клетки и опухолевой прогрессией. И экзогенные РНКазы могут в какой-то степени восполнять уровень эндогенных РНКаз и участвовать в контроле опухоль-ассоциированных РНК.

#### **1.4.7. Панкреатическая бычья ДНКаза I**

Панкреатическая бычья дезоксирибонуклеаза I (ДНКаза I) – секретлируемая эндонуклеаза (31 кДа), впервые выделенная из экстракта поджелудочной железы быка и расщепляющая ДНК по двуцепочечным участкам [514]. Основной физиологической функцией ДНКазы I считают разрушение ДНК, попадающей с пищей, до коротких олигонуклеотидов. Кроме того, было показано, что ДНКаза I участвует в контроле аутоиммунитета, подавляя аутоиммунную реакцию на собственную ДНК за счет разрушения хроматина погибших клеток [515, 516] и фрагментации апоптотической ДНК [517].

Исследования ДНКазы I в качестве антиметастатического и противоопухолевого агента ведутся достаточно давно, однако, несмотря на очевидный успех, полученные данные отрывочны и немногочисленны. Первая работа, продемонстрировавшая противоопухолевую активность панкреатической ДНКазы I на модели асцитной карциномы Эрлиха мышей, появилась в 1961 году [518]. В 1964 году появились первые сведения о противоопухолевой активности бактериальной ДНКазы из *Serratia marcescens* [519]. В 1967 году в работах Салганика был показан антиметастатический потенциал ДНКазы I на моделях спонтанного лимфолейкоза [520]. Однако, исследование противоопухолевого потенциала ДНКазы I оставалось неизведанной территорией в течение многих лет.

В 1993 году в работах японских ученых был продемонстрирован антиметастатический потенциал ДНКазы I на модели рака печени L5178Y-ML [521]. В 2009 году группой Alvarado-VaÂsquez было проведено исследование влияния ДНКазы I на пролиферацию клеток опухолевых линий Calu-1, SK-MES-1, HeLa, HEP-2, L-929 [41]. Было показано снижение количества опухолевых клеток в 5-9 раз под действием ДНКазы I, в то время как фермент не влиял на пролиферацию нормальных (нетрансформированных) клеточных линий. В работе Wen с коллегами в 2013 году была показана антиметастатическая активность ДНКазы I *in vivo* на ортотопической модели ксенотрансплантата рака поджелудочной железы [44].

Karli впервые предложил применять ДНКазу I в клинике в качестве препарата индивидуальной противораковой терапии в 2001 году. Схема его терапии представляет собой использование ДНКазы I для запуска каскада апоптотических реакций, ведущих, в том числе, к высвобождению в кровь все большего количества ДНКазы I, что приводит к усилению первоначального сигнала. Им были показаны значительные успехи в снижении количества опухолевых клеток под действием ДНКазы I для хемо- и радиорезистентной линии меланомы человека [522]. В настоящее время ДНКазу I проходит клинические испытания для лечения метастазирующих опухолей в виде препарата O'Shadi D для перорального применения совместно с РНКазой А [45, 407-410].

Механизмы противоопухолевого действия ДНКазы I изучены недостаточным образом. В работе Wen с соавторами было показано, что антиметастатическое действие ДНКазы I связано с разрушением вДНК, интегрированных в нейтрофильные ловушки (NET) [44]. Так, было показано, что обработка ДНКазой I клеток рака поджелудочной железы, на поверхности которых была обнаружена повышенная представленность вДНК опухолевого происхождения, приводила к деградации вДНК и неспецифически снижала миграцию и инвазию. Исследователи предположили существование петли с положительной

обратной связью, в которой внДНК способствует экспрессии воспалительного хемокина CXCL8, что приводит к более высокому продуцированию внДНК раковыми клетками поджелудочной железы, а лечение ДНКазой I приводит к значительному снижению уровня CXCL8 вследствие снижения уровня внДНК [44].

Накопленные в последнее время данные о присутствии большого количества внДНК в крови онкологических больных позволяют сделать предположение, что эти внДНК также могут быть мишенями для ДНКазы I, однако прямых доказательств пока не получено.

### **1.5. Заключение**

События, опосредующие злокачественную трансформацию клетки, неконтролируемую пролиферацию, повышение миграции и инвазии, представляют собой сложные и многостадийные процессы, на всех этапах которых принимают участие опухоль-ассоциированные НК. Правильный баланс между внутриклеточными РНК, кодирующими онкогены, и РНК, кодирующими опухолевые супрессоры, также как и баланс между регуляторными онкогенными или онкосупрессорными миРНК, определяет нормальный фенотип клетки, и нарушение этого равновесия приводит к ее перерождению. Внеклеточные опухоль-ассоциированные кодирующие и регуляторные РНК вносят значительный вклад в опухолевую прогрессию за счет дистанционной трансфекции нормальных клеток и формирования новых опухолевых очагов. Внеклеточные ДНК, кодирующие онкогены, или фрагменты ретротранспозонов в последнее время считаются одними из главных участников процесса метастазирования в связи со своей способностью трансфецировать нормальные клетки, приводить к повышению уровня экспрессии онкогенных белков и вносить нарушения в ДНК нормальной клетки за счет интеграции мобильных элементов.

В контроле НК-гомеостаза клетки принимают участие эндогенные нуклеазы, роль которых связана с поддержанием целостности геномной ДНК и выбраковыванием абберантных РНК. В связи с этим изменение уровня экспрессии или функционировании эндогенных нуклеаз приводит к накоплению абберантных НК, неспособных выполнять свои функции, или транскриптов, кодирующих онкогенные белки, которые меняют нормальное функционирование сигнальных путей клетки на патологическое, что приводит к онкогенезу и прогрессированию опухоли.

Экзогенные нуклеазы давно рассматриваются исследователями в качестве перспективных противоопухолевых препаратов. Накоплено много данных, подтверждающих, что мишенями экзогенных РНКаз в опухолевой клетке являются именно опухоль-ассоциированные РНК. Это позволяет предположить, что экзогенные РНКазы могут

восполнять уровень и/или функцию эндогенных РНКаз, нарушенных в опухолевой клетке, и участвовать в контроле опухоль-ассоциированных РНК. Открытие участия циркулирующих внНК в метастазировании позволило предположить, что они могут быть также мишенями для экзогенных нуклеаз. Экзогенные нуклеазы, снижая концентрацию опухоль-ассоциированных внНК в кровотоке, могут снижать метастатическую нагрузку и, как следствие скорость диссеминации опухоли.

Таким образом, экзогенные нуклеазы могут рассматриваться в качестве перспективных противоопухолевых и антиметастатических препаратов, избирательно действующих на уровне опухоль-ассоциированных НК.

## **ГЛАВА 2. Экспериментальная часть (материалы и методы)**

## 2.1. Материалы

### 2.1.1. Реактивы и препараты

В работе были использованы акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, TEMED, Трис, ЭДТА, диэтилпиракарбонат (DEPC), бромфеноловый синий, ксиленцианол, формальдегид, параформальдегид, фиколл, FBS (ICN, Германия); циклофосфамид («Биохимик», Россия); винкристин (Lens-Farm, Россия); преднизолон (Nyscomed, Россия); раствор антибиотиков и антимикотика (100 ед./мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина), мехлорэтамин гидрохлорид (тривиальное название эмбихин) (Aldrich, США); платидиам (тривиальное название цисплатин) (Лаксма, Чехия); рубомицин (Ферейн, Россия); фосфатно-солевой буфер (PBS) (ICN Biomedicals, США); среда для отделения лимфоцитов LSM (MP Biomedicals, США); формальдегид, мочеви́на, персульфат аммония, агароза, конканавалин А, МТТ, DTT, Хекст-33258, SYBR Green II, винбластин, доксорубин, цитарабин, культуральные среды RPMI, DMEM и IMDM, среда для отделения моноцитарно-лейкоцитарной фракции Histopaque-1083, магнитные бусы Dynabeads Mouse DC Enrichment Kit и Dynal Mouse CD8 Negative Isolation Kit, набор реагентов для определения концентрации белка Total Protein Kit Micro-Lowry Peterson's Modification (Sigma, США); среда Opti-MEM, Lipofectamine 2000, набор реагентов для мультиплексного анализа Mouse Cytokine 10-Plex Panel, наборы для определения концентрации РНК и ДНК Qubit® RNA Assay Kit, Qubit® RNA BR Assay Kit и Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, США); EVA-Green (Biotium, США, и Invitrogen, США); 10×ПЦР мастер-микс (Вектор-Бест, Россия); сыворотка Ну Clone FBS, наборы реагентов для иммуноферментного анализа Mouse IFN gamma, Mouse Interferon Alpha, Mouse IL-6, Mouse IL-1 alpha, Mouse TNF alpha ELISA kits (ThermoScientific, США); трипановый синий (BioRad, США); бромистый этидий (Fluka, Швейцария); рекомбинантный ГМ-КСФ, рекомбинантный ИЛ-4 и рекомбинантный ИЛ-2 мыши (Millipore, США); Wizard Plus Megapreps DNA Purification System (Promega, США); PerfectPrep EndoFree Plasmid Maxi Kit (5 Prime, Германия); Mouse IFN-γ ELISPOT Set (BD Bioscience Pharmingen, США); моноклональные анти-мышинные антитела анти-CD4-PE (CALTAG, Великобритания); анти-CD206-FITC (BioLegend, США); анти-CD8-FITC, анти-CD11c-FITC, анти-CD83-PE (BD Biosciences, США), анти-CD80-FITC, анти-CD86-PE, анти-МНС II-FITC (Life Technologies, США); набор для выделения миРНК mirVana miRNA Isolation Kit и реагент Trizol (Ambion, США); набор для экстракции ДНК QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, США); набор для удаления рибосомальной РНК RiboMinus Eukaryote Kit (Life Technologies, США); наборы для конструирования ДНК библиотек SOLiD™ small RNA expression kit (SREK), SOLiD™ whole transcriptome kit и ABS

SOLiD™ Fragment Library Construction Kit (Applied Biosystems™, США); наборы для ПЦР Advantage 2 Polymerase Mix, Advantage 2 PCR Buffer (Clontech, США) и SYBR-Green-containing BioMasterCor HS-qPCR (BiolabMix, Россия).

Остальные использованные в работе реактивы были отечественного производства и имели квалификацию “о.с.ч.” и “х.ч.”.

В работе использовали ферменты: эндонуклеазы рестрикции BamHI, Vne I (СибЭнзим, Россия), ДНК-полимеразу Taq и ревертазу M-MLV производства Лаборатории биоорганической химии ферментов (ИХБФМ СО РАН). В работе использовали T4-полинуклеотидкиназу (Fermentas, Литва), Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, США), обратную ревертазу SuperScript III (Invitrogen, США), AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, США), ДНКазу I (Boehringer Mannheim, Германия), ДНКазу I (2400 Kunitz/мг, Sigma-Aldrich, США) и РНКазу А (Sigma, США).

Биназа была любезно предоставлена к.х.н. Миткевичем В. А. (ИМБ РАН, Москва). Биназу (12.3 кДа) выделяли из ростовой среды клеток *Escherichia coli* BL21, несущих плазмиду pGEMGX1/ent/Bi. Очистку фермента проводили, как описано в [523]. Содержание эндотоксинов в препаратах биназы, определенное с помощью *Limulus amoebocyte lysate test* (LAL) (Charles River Endosafe), составило 5 EU/мг. Каталитическую активность биназы подтверждали с использованием в качестве субстрата poly(I) [511].

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]аденозин-5'-трифосфат ([ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ) с удельной активностью ~ 4000 Ки/ммоль были производства «Биосан» (Россия).

### 2.1.2. Оборудование

В работе использовали амплификатор PCRExpress (Hybaid, США); многоканальный спектрофотометр Multiscan RC (Labsystems, Финляндия); спектрофотометр BioMate 3 (Thermo LabSystems, США); флуоресцентный спектрофотометр Cary Eclipse (Varian, Австралия); Axioimager Z microscope (ZEISS, Германия); вакуумную сушилку для акриламидных гелей (LABCONCO, США); рН-метр Orion 410A (США); счетчик радиоактивности (Canberra Packard, США); центрифуги Eppendorf 5810R, Eppendorf 5415R, Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Германия) и Contron T42K (Centricon Instruments, Италия); проточный цитофлуориметр Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США); магнитный концентратор Dynal Magnetic Particle Concentrator (Chemicon, США); анализатор размеров и дзета-потенциалов частиц и молекул Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Великобритания); ультразвуковая баня Ultrasonic cleaner 08849-02 (Cole-Parmer, США); система гель-документации Infinity-1500/36M (Vilber Lourmat, Франция); вортекс для

пробирок Reax top (Heidolph, Германия), молекулярный имаджер Pharos FX Plus Molecular Imager (Bio-Rad, США); флюориметр Qubit™ (Invitrogen, США); регистратор жизнеспособности клеток в режиме реального времени xCELLigence (ACEA Biosciences, США), микроскоп Zeiss Primo Vert (Zeiss, Германия), оснащенный камерой AxioCam ERc5s CCD.

Для обработки полученных результатов использовали следующее программное обеспечение: Microsoft Excel 2010, CXP Analysis, Adobe Photoshop CS3, Gel-Pro Analyzer 4.0, VideoTest Morphology 5, Axiovision v. 3.1, ImageJ, FastQC, Bioscope 1.3, Viesscan Professional V8.2.13, Statistica 10.0. Для анализа данных использовали интернет-ресурсы NCBI Primer-BLAST, OligoAnalyzer 3.1, Miranda (<http://microRNA.org>), TargetScan Mouse 7.0 0 (<http://www.targetscan.org>), PANTHER (<http://pantherdb.org>), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/kaas/>), ToppFun (<https://toppgene.cchmc.org>) и Gene Card (<http://www.genecards.org>).

Гистологические срезы визуализировали с помощью микроскопа Axioimager Z, оснащенного CCD камерой (ZEISS, Германия). Для работы с клетками использовали ламинарный бокс Ламинар-С. (Ламинарные системы, Россия), CO<sub>2</sub>-инкубатор производства Sanyo (Япония), автоматический счетчик клеток TC20 производства Bio-Rad (США). Для наблюдения за клетками использовали инвертированный микроскоп Биолам П2-1 (ЛОМО, Россия). В работе использовали культуральный пластик производства TPP (Швейцария), Costar (США).

### 2.1.3. Плазмиды

В работе была использована плазида pEGFP производства Clontech (Германия), содержащая ген зеленого флуоресцентного белка. Плазида pHIV-2, содержащая фрагмент РНК HIV-1 под промотором РНК-полимеразы фага Т7, была любезно предоставлена профессором Г. Дж. Гроссом (Университет г. Вюрцбурга, Германия).

Для приготовления всех буферных растворов и реакционных проб использовали воду, очищенную на установке MilliQ (Millipore, США). Все растворы и среды фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0.22 или 0.45 мкм (TPP, Швейцария).

### 2.1.4. Буферы и растворы

<b>PBS</b>	1.47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 4.29 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 137 mM NaCl
<b>TBE</b>	2 mM ЭДТА, 0.089 M Трис-борат, pH 8.3
<b>Раствор бромистого</b>	0.002%-ный бромистый этидий в воде

**этидия**

<b>Раствор М</b>	20%-ный фиколл, 0.025%-ный бромфеноловый синий, 0.025%-ный ксиленцианол
<b>Буфер ОТ</b>	50 мМ Трис-НСl, 75 мМ КСl, 3 мМ MgCl <sub>2</sub>
<b>ТЕ-буфер</b>	10 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 1 мМ EDTA
<b>ОТ-буфер</b>	50 мМ Трис-НСl, рН 8.3, 75 мМ КСl, 3 мМ MgCl <sub>2</sub> , 10мМ DTT
<b>ПЦР-буфер</b>	10 мМ Трис-НСl, рН 8.3, 50 мМ КСl, 0.5 мМ MgCl <sub>2</sub>
<b>Буфер Н</b>	30 мМ HEPES-КОH, 100 мМ КAc, 2 мМ MgAc
<b>Буфер Т4 ПНК</b>	50 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 10 мМ MgCl <sub>2</sub> , 1мМ DTT, 0.1 мМ спермидин
<b>Буфер D</b>	10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 2.5 мМ MgCl <sub>2</sub> , 0.1 мМ CaCl <sub>2</sub>
<b>Буфер R</b>	50 мМ Трис-НСl, рН 7.0, 200 мМ КСl, 1 мМ EDTA, 100 мкг/мл суммарной тРНК <i>E. coli</i>
<b>Буфер E</b>	50 мМ EDTA в PBS
<b>Раствор М</b>	8 М мочевиha, 0.025%-ный бромфеноловый синий, 0.025%-ный ксиленцианол
<b>Раствор F</b>	15%-ный Ficoll-400 в воде, 0.025%-ный бромфеноловый синий, 0.025%-ный ксиленцианол
<b>Раствор G</b>	50%-ный глицерин, 0.05%-ный бромфеноловый синий, 0.05%-ный ксиленцианол

**2.1.5. Олигонуклеотиды**

Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН с помощью стандартного фосфитамидного метода и выделены с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ.

Для проведения реакции обратной транскрипции в работе использовали рандомизированные гексапраймеры. Для дизайна шпилечных RT-праймеров к миРНК использовали последовательность петли, описанную в [524]. Последовательности RT-праймеров приведены в Таблице 4. Последовательности специфических праймеров к генам *mdr1a*, *mdr1b*, *bcl-2*, *p53*,  $\beta$ -актину, *RORg*, *Foxp3*, *GATA3* и *Tbet* мыши для проведения ПЦР были выбраны с использованием программы OLIGOS и на основании литературных данных [525, 526] (Таблица 4). Последовательности специфических праймеров к генам *Drosha*, *xpo5*, *dicer1*, *eif2c2*, *rpl30*, *Myc*, *Dusp6*, *Fam89b*, *Map2k4*, *Mtap*, *Serpinf1*, *Hprt1* и *Ywhaz* мыши были выбраны с использованием программ NCBI Primer-BLAST и OligoAnalyzer 3.1. Прямой праймер к U6 был выбран на основании литературных данных [527].

Олигодезоксирибонуклеотид ДНК<sub>59</sub> с последовательностью 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГСААГСТГАССТГАССТГАААТТКАТТГТГТГСАССТСА

**Таблица 4.** Последовательность праймеров для обратной транскрипции миРНК

Наименование	Последовательность РТ-праймеров*, 5' → 3'
<i>mtu</i> -mir-18a-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACT <u>ATCTGCACT</u>
<i>mtu</i> -mir-17-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC <u>CTACCTGCAC</u>
<i>mtu</i> -mir-31-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC <u>CCAGCTATGCC</u>
<i>mtu</i> -mir-29-b-1-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC <u>CTAAACCACCA</u>
<i>mtu</i> -mir-145a-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC <u>AGGGATTCCCT</u>
<i>mtu</i> -mir-451a-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC <u>ACAACTCAGTAA</u>
<i>mtu</i> -mir-10b-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC <u>CCACAAATTCG</u>
<i>mtu</i> -mir-21-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC <u>CTCAACATCAG</u>
<i>mtu</i> -let-7g-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC <u>ACAAC TGTACAA</u>
U6	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC <u>AAA AATATGGAACG</u>

\*В последовательности праймера подчеркиванием выделен участок, комплементарный соответствующей миРНК.

**Таблица 5.** Последовательности специфических праймеров для проведения ПЦР

Наименование	Последовательность прямого праймера, 5' → 3'	Последовательность обратного праймера, 5' → 3'
β-актин-1	AGCCATGTACGTAGCCATCCA	TCTCCGGAGTCCATCACAATG
β-актин-2	CTCTCCCTCACGCCATCCT	TCCGCCTAGAAGCACTTGC
β-актин-3	TCCACCA CCACAGCTGAGAGG	CAGCTTCTCTTTGATGTCACG
β-актин-4	TCTTTGCAGCTCCTTCGTTG	AGTGAGGTA TAGCCACGAGA
Tbet	CGGTACCAGAGCGGCAAGT	CATGCTGCCTTCTGCCTTTC
GATA3	TACTTGCGTTTTTTCGCAGGA	GATCTGTCGCTTTCGGGCCT
RORγ	GGAGCTCTGCCAGAATGACC	CAAGGCTCGAAACAGCTCCAC
Foxp3	CAGCTGCCTACAGTGCCCCTA	CATTTGCCAGCAGTGGGTAG
<i>mtu</i> -mir-18a-5p	GCGTAAGGTGCATCTAGTG	GTGCAGGGTCCGAGGT
<i>mtu</i> -mir-17-5p	AGACAAAGTGCTTACAGTGC	GTGCAGGGTCCGAGGT
<i>mtu</i> -mir-31-5p	AGGCAAGATGCTGGCA	GTGCAGGGTCCGAGGT
<i>mtu</i> -mir-29-b-1-5p	AACGCTGGTTTTCATATGGT	GTGCAGGGTCCGAGGT
<i>mtu</i> -mir-145a-5p	AGGTCCAGTTTTCCAGGA	GTGCAGGGTCCGAGGT

**Таблица 5 (продолжение).** Последовательности специфических праймеров для проведения ПЦР.

Наименование	Последовательность прямого праймера, 5' → 3'	Последовательность обратного праймера, 5' → 3'
<i>mmu-mir-451a-5p</i>	ACGCAAACCGTTACCATTAC	GTGCAGGGTCCGAGGT
<i>mmu-mir-10b-5p</i>	TACCCTGTAGAACCGAA	GTGCAGGGTCCGAGGT
<i>mmu-mir-21-5p</i>	AGACTAGCTTATCAGACTGA	GTGCAGGGTCCGAGGT
<i>mmu-let-7g-5p</i>	AACGCTGAGGTAGTAGTTTGT	GTGCAGGGTCCGAGGT
<i>U6</i>	CTCGCTTCGGCAGCACA	GTGCAGGGTCCGAGGT
<i>droscha</i>	ATGAAAGGAGCAGAGAGCGG	CATCTCCCCAGGCAACTCTG
<i>xpo5</i>	GGCATGAAGTTCTGTCCCGT	TCGGGAGGAGTTGAAGAAAGC
<i>dicer1</i>	CAAACAGATGGAGGCGGAGT	ATTAGAGATCGGCGCTCGTG
<i>EIF2C2</i>	TCCATCAAGTGGGTGTCGTG	GGGTTGGAACAGCCTTCAGA
<i>rpl30</i>	CTCTCTTCTGTCCTCTGTGTAT	AAGGATAACCAACTTCGCTTTG
<i>Dusp6</i>	CCTGGAAGGTGGCTTCAGTA	AGTCCGTTGCACTATTGGGG
<i>Fam89b</i>	CAAGGAGATGGTGGGGCTG	CTCCTCGTCATCAGACAGGC
<i>Map2k4</i>	CATGCAGGGTAAGCGCAAAG	ATCCCAGTGTTGTTCAAGGGG
<i>Mtap</i>	ATACTCCATTCGGCAAGCCAT	CTCTCTCAAGGACCCGCAAG
<i>Serpinf1</i>	TTCAAGGGGCAGTGGGTAAC	CAGGGGCAGGAAGAAGATGA
<i>Hprt1</i>	TTGCTGACCTGCTGGATTAC	AGTTGAGAGATCATCTCCAC
<i>Ywhaz</i>	CCTCAACTTCTCTGTGTTCTA	TGCTTCATCTCCTTGGGTATC
<i>Myc</i>	CGACTACGACTCCGTACAGC	CCAGATATCCTCACTGGGCG
<i>mdr1a</i>	GCAGGTTGGCTAGACAGGTTGT	GAGCGCCACTCCATGGATAA
<i>mdr1b</i>	CTGCTGTTGGCGTATTTGGG	TGGCAGAATACTGGCTTCTGCT
<i>bcl-2</i>	TCGCAGAGATGTCCAGTCAGC	CATCCCAGCCTCCGTTATCC
<i>p53</i>	GAACCGCCGACCTATCCTTAC	GTTTGGGCTTTCCTCCTTGAT
B1_mus1	AGGCGGATTTCTGAGTTCAA	GAGACAGGGTTTCTCTGTGTAG
L1_mus 1	GCCAGGTATCTGTGCATCTT	ACTCTAGCTCTCTCCTGAGTTT

-3' был любезно предоставлен к.б.н. Гусаченко О. Н. (Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

РНК HIV-1 (96-звенный фрагмент) была любезно предоставлена к.б.н. Федоровой А. А. (Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

### 2.1.6. Клеточные культуры

Клетки B16-F10 (меланома мыши) были получены из банка клеточных культур Института Цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клеточная линия ВНК-IR780, эндогенно экспрессирующая зеленый флуоресцентный белок, была получена из ВНК клеток (почка хомяка) и любезно предоставлена профессором В. С. Прасоловым (ИМБ РАН, Москва).

Клетки инкубировали в DMEM с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой (FBS), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, и 0.25 мкг/мл амфотерицина в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub> при 37 °С, и регулярно пассировали для поддержания экспоненциального роста.

### 2.1.7. Лабораторные животные и опухолевые модели

В работе использовали 10-14-недельных мышей линии СВА/LacSto (далее СВА), С57Bl/J6 и А/Sn развода вивария ИЦиГ СО РАН и ИХБФМ СО РАН. Животных содержали по 10 особей в клетке в хорошо освещенном помещении. Мыши имели свободный доступ к еде и воде. Эксперименты с животными проводили согласно директиве ЕС Directive 2010/63/EU.

Для экспериментов использовали аденокарциному Кребс-2, карциному легких Льюис (LLC), лимфосаркомы LS, RLS [528] и гепатому HA-1 [529] мышей, любезно предоставленные к.б.н., профессором Поповой Н.А., к.б.н. Калединым В.И. и к.м.н. Николиным В.П. (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск). Для экспериментов также использовали меланому B16 мыши и лимфосаркому RLS<sub>40</sub>, полученную автором. Штаммы опухолей Кребс-2, LS и RLS, LLC и HA-1 постоянно поддерживаются в виварии ИЦиГ СО РАН путем регулярного пассирования на мышах.

### 2.1.8. Липосомы

В работе использовали поликатионные липосомы серии N-DOPE: 2X3-DOPE, 2D3-DOPE, X2-DOPE, S1-DOPE, S2-DOPE и S3-DOPE. 2X3 - 1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид; 2D3 - 1,26-бис(1,2-ди-О-тетрадецил-гас-глицерин)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид; X2 - 1,17-диамино-*N*<sup>1</sup>-[(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-триазадодеканат тригидрохлорид; S2 - (холест-5-ен-3β-ил)-21-амино-4,5-дитиа-8-оксо-9,13,18-триазагенэйкозаноат тригидрохлорид; S3 - 1,22-диамино-*N*<sup>1</sup>-[(холест-5-ен-3β-ил)оксикарбонил]-3,4-дитиа-8-оксо-7,10,14,19-тетраазадокозан тетрагидрохлорид, DOPE - 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин.

В работе использовали маннозилированные липосомы серии МЛ: М1, М2, М3, М4, М5 и М6. МЛ состояли из катионного липида 2X3, липида-хелпера DOPE (1 : 2 мол. отношение) и маннозилированных липоконъюгатов **1** (1-[6-(α-D-маннопиранозилокси)гексил]амино-4-{6-[гас-2,3-ди(тетрадецилокси)проп-1-илоксикарбониламино]гексил}аминобутан-1,4-дион, липосомы М1, М2 и М3) и **2** (3-[6-(α-D-

маннопиранозилокси)гексил]амино-4-{6-[гас-2,3-ди(тетрадецилокси)проп-1-илоксикарбониламино]гексил}аминоциклобут-3-ен-1,2-дион, липосомы М4, М5 и М6), взятых в молярном отношении 2.5, 5 и 10%, соответственно.

Поликатионные липосомы серии N-DOPE и МЛ были любезно предоставлены к.х.н. Шмендель Е. В. и д.х.н., профессором Масловым М. А. (МИРЭА, Москва).

## **2.2 Методы**

### **2.2.1. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот**

#### **2.2.1.1. Электрофорез в агарозном геле**

Качество выделенной РНК и разделение фрагментов ДНК проверяли с помощью электрофореза в 1-2%-ном агарозном геле в буфере ТВЕ при напряжении электрического поля 20 В/см. Гель окрашивали бромистым этидием, фотографировали при визуализации в ультрафиолетовом свете с использованием прибора Infinity-1500/36M.

#### **2.2.1.2. Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях**

Для разделения фрагментов РНК использовали электрофорез в 8%-ном ПААГ при соотношении акриламид : N,N'-метиленабисакриламид = 20 : 1 в присутствии 8 М мочевины в буфере ТВЕ при напряженности электрического поля 30-45 В/см. Перед нанесением на гель пробы растворяли в растворе М. Гели высушивали и радиоавтографировали с использованием экрана молекулярного имаджера Pharos FX Plus Molecular Imager.

#### **2.2.1.3 Электрофорез в ПААГ в нативных условиях**

Разделение продуктов ПЦР проводили в 8%-ном ПААГ при соотношении акриламид : N,N'-метиленабисакриламид = 20 : 1 в буфере ТВЕ при напряженности электрического поля 30-45 В/см. Перед нанесением на гель к пробам добавляли одну пятую от объема пробы раствора F. Положение продуктов в геле определяли путем окрашивания раствором бромистого этидия при визуализации в УФ свете.

### **2.2.2. Введение [<sup>32</sup>P]-метки по 5'-концу РНК и ДНК**

Введение [<sup>32</sup>P]-метки по 5'-ОН РНК HIV-1 и ДНК<sub>59</sub> проводили в реакционной смеси объемом 10 мкл, содержащей 0.1 мКи [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТР, 5 ед. акт. Т4 полинуклеотидкиназы, 2 мкг РНК HIV-1 или ДНК<sub>59</sub> и буфер Т4 ПНК при 37 °С в течение 30 мин [530]. 5'-[<sup>32</sup>P]-РНК и 5'-[<sup>32</sup>P]-ДНК выделяли с помощью электрофореза в 8%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. По окончании электрофореза полосу геля, содержащую меченую РНК HIV-1 или ДНК<sub>59</sub>, визуализировали с помощью радиоавтографии и вырезали из геля. Меченую ДНК<sub>59</sub> элюировали путем пассивной элюции в 100 мкл воды в течение 12 ч при 4 °С и постоянном

перемешивании, меченную РНК HIV-1 элюировали в 300 мкл 0.3 М ацетата натрия, pH 5.2, в присутствии 10%-ного фенола, затем осаждали этиловым спиртом и хранили при - 20 °С.

### **2.2.3. Получение первичных культур клеток**

#### ***2.2.3.1. Получение первичных культур опухолевых клеток***

На 10–12 день развития асцитной опухоли (Кребс-2, LS, RLS, RLS<sub>40</sub>) 0.5 мл физиологического раствора вводили животным в брюшную полость. Мышь умерщвляли методом дислокации шейных позвонков, далее асцитную жидкость собирали с помощью шприца и разводили в 5 мл PBS. Солидные опухоли (LLC, HA-1, LS, RLS, RLS<sub>40</sub>) на 14–16 дни развития гомогенизировали и разводили в 5 мл PBS. Полученную клеточную суспензию наслаивали на 3 мл среды LSM или Histopaque-1083, центрифугировали при 450 g в течение 15 мин. Фракцию клеток, находящуюся на границе раздела LSM или Histopaque-1083 и супернатанта, переносили в чистую пробирку, содержащую 5–7 мл PBS, суспендировали и центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Полученные клетки культивировали в среде IMDM, содержащей 10%-ный FBS и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика (100 ед./мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина), в концентрации  $3 \times 10^5$  кл/мл в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub> при 37 °С или использовали для трансплантации, получения суммарной РНК и лизата непосредственно после выделения.

#### ***2.2.3.2. Выделение предшественников ДК (преДК) мыши из костного мозга***

Мышь умерщвляли методом дислокации шейных позвонков, извлекали бедренные и большие берцовые кости. Концы костей удаляли, диафизы дважды промывали 3 мл буфера PBS. Клетки суспендировали, костно-мозговые преДК выделяли с помощью центрифугирования на среде Histopaque-1083, как описано в п. 2.2.3.1.

#### ***2.2.3.3. Получение незрелых ДК из костно-мозговых преДК***

К клеточной суспензии предшественников ДК мыши ( $10^6$  кл/мл) в среде IMDM, содержащей 10%-ный FBS и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика (100 ед./мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина), добавляли ГМ-КСФ мыши (20 нг/мл) и ИЛ-4 мыши (50 нг/мл). Каждые 48 ч клетки собирали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин, удаляли половину объема среды и заменяли на свежую среду с ГМ-КСФ (20 нг/мл) и ИЛ-4 (50 нг/мл). На 6–7 день из костно-мозговых преДК получали незрелые ДК.

#### ***2.2.3.4. Получение первичной культуры спленоцитов из селезенки мыши***

Мышей линии C57Bl/6J умерщвляли методом дислокации шейных позвонков, извлекали селезенку и гомогенизировали раздавливанием между стеклами. Гомогенат смывали со стекла 3-4 мл буфера PBS. Дальнейшее выделение спленоцитов проводили, как описано в п. 2.2.3.1. Спленоциты помещали в среду IMDM, содержащую 10%-ный FBS и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика, в концентрации  $10^6$  кл/мл и культивировали в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub> при 37 °С.

#### **2.2.4. Получение биологического материала**

##### ***2.2.4.1. Получение сыворотки крови***

Кровь собирали с помощью канюли из ретро-орбитального синуса экспериментальных животных и использовали для получения сыворотки. Сыворотку крови получали методом формирования тромба при 37 °С в течение 30 мин с последующей инкубацией при 4 °С в течение ночи. Тромб извлекали и сыворотку центрифугировали (1500 g, 4 °С, 20 мин). Образцы сывороток хранили при -70 °С.

##### ***2.2.4.2. Получение плазмы крови***

Кровь (~ 0.6 мл) собирали с помощью канюли из ретро-орбитального синуса экспериментальных животных в пробирки, содержащие 0.2 мл буфера Е. Полученную кровь разделяли на плазму и фракцию клеток крови путем центрифугирования при 150 g (центрифуга Contron T42K) в течение 20 мин при 4 °С. Плазму крови собирали в чистые пробирки, центрифугировали при 500 g (центрифуга Contron T42K) в течение 20 мин при 4 °С и хранили при -20 °С.

##### ***2.2.4.3. Получение лизата клеток***

В случае асцитных форм опухолей клетки выделяли из асцита с помощью центрифугирования на среде Histopaque-1083, как описано в п. 2.2.3.1. В случае монослойных клеточных культур клетки открепляли от культурального пластика с помощью трипсина, последовательно промывали средой IMDM, содержащей 10%-ный FBS, и буфером PBS. Полученные клетки ресуспендировали в среде IMDM без сыворотки и антибиотиков в плотности  $5 \times 10^6$  кл/мл. Клетки инкубировали при -70 °С в течение 20 мин и при 24 °С до полного растаивания. Всего проводили четыре таких цикла. Лизат центрифугировали при 300 g в течение 1 мин, и далее фильтровали супернатант через нитроцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Суммарную концентрацию белка в лизате определяли с помощью Total Protein Kit Micro-Lowry Peterson's Modification. Лизат хранили при температуре -20 °С.

## **2.2.5. Выделение нуклеиновых кислот**

### **2.2.5.1. Выделение суммарной клеточной РНК**

Суммарную клеточную РНК выделяли из клеток с помощью реагента TRIzol согласно протоколу фирмы-изготовителя. Клетки ( $5-10 \times 10^6$ ) осаждали центрифугированием при 450 g. в течение 5 мин. Супернатант удаляли, к осадку клеток добавляли 1 мл TRIzol, тщательно перемешивали и инкубировали при 24 °С в течение 5 мин. Далее к образцу добавляли 0.2 мл хлороформа, встряхивали и инкубировали при 24 °С в течение 3 мин. Водную фазу отделяли от органической центрифугированием (12000 g, 4 °С, 15 мин). РНК осаждали из водной фазы 0.5 объемами изопропанола при 24 °С в течение 10 мин. Осадок РНК отделяли центрифугированием (12000 g, 4 °С, 5 мин), промывали 75%-ным этанолом, высушивали при 24 °С в течение 5-10 мин и растворяли в H<sub>2</sub>O milli Q, хранили при -20 °С.

Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 260 нм. Сохранность выделенной РНК проверяли с помощью электрофореза в 1%-ной агарозе.

### **2.2.5.2. Выделение внРНК из сыворотки крови**

внРНК выделяли из сыворотки с помощью реагента TRIzol по модифицированному протоколу. К 3 мл сыворотки добавляли 9 мл TRIzol, тщательно перемешивали и инкубировали при 24 °С в течение 5 мин. Далее к образцу добавляли 0.3 мл хлороформа, встряхивали и инкубировали при 24 °С в течение 3 мин. Водную фазу отделяли от органической центрифугированием (12000 g, 4 °С, 15 мин). Осаждение и определение концентрации проводили, как описано в п. 2.2.5.1.

### **2.2.5.3. Выделение внеклеточных нуклеиновых кислот из плазмы крови**

внДНК и внРНК выделяли из 0.1 мл плазмы крови методом сорбции на мелкодисперсном стекле [531]. Концентрацию внДНК измеряли на флуоресцентном спектрофотометре после окрашивания нуклеиновой кислоты Hoechst 33258 [532]. Концентрацию внРНК измеряли на флуоресцентном спектрофотометре после окрашивания SYBR Green II в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Концентрации нуклеиновых кислот определяли по калибровочным кривым. Для построения калибровочных кривых использовали растворы ДНК спермы лосося с концентрациями 0, 10, 20, 100, 200, 500 нг/мл и растворы суммарной РНК клеток RLS с концентрациями 0, 10, 20, 100, 200, 500 нг/мл.

#### **2.2.5.4. Фракционирование суммарной РНК**

Суммарную РНК из опухолевых клеток и сыворотки крови разделяли на фракцию высокомолекулярных РНК (>200 нк) и фракцию низкомолекулярных РНК (<200 нк), включающую миРНК, с помощью mirVana miRNA Isolation Kit согласно протоколу фирмы производителя. Чистоту и целостность РНК проверяли с помощью прибора Bioanalyzer (Agilent Technologies, США). Рибосомальные РНК удаляли из фракции высокомолекулярных РНК с помощью RiboMinus Eukaryote Kit согласно протоколу фирмы-производителя. Обогащение фракции низкомолекулярных РНК проводили с помощью mirVana miRNA Isolation Kit. Концентрацию высокомолекулярных РНК измеряли с использованием Qubit® RNA BR Assay Kit согласно протоколу фирмы-производителя с помощью флуориметра Qubit™, концентрацию низкомолекулярных РНК - с использованием Qubit® RNA Assay Kit.

#### **2.2.5.5. Выделение вДНК из сыворотки крови**

вДНК выделяли из сыворотки крови с помощью экстракции фенолом (фенол–Tris–HCl, pH 8.0) и хлороформом. К 1 мл сыворотки добавляли 1 мл фенола, тщательно перемешивали и инкубировали при 24 °С в течение 5 мин. Водную фазу отделяли от органической центрифугированием (12000 g, 4 °С, 10 мин). Далее к водной фазе добавляли 1 мл хлороформа, встряхивали и инкубировали при 24 °С в течение 10 мин. Водную фазу отделяли от органической центрифугированием (12000 g, 4 °С, 15 мин). ДНК концентрировали их водной фазы с помощью QIAquick® Gel Extraction Kit и хранили в 50 мкл водного раствора при –20 °С. Концентрацию вДНК измеряли с использованием Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit согласно протоколу фирмы-производителя с помощью флуориметра Qubit™.

#### **2.2.6. Работа с опухолевыми моделями мыши**

##### **2.2.6.1. Трансплантация опухолей**

Аденокарцинома Кребс-2. Клетки Кребс-2 ( $10^5$  кл в 0.2 мл PBS/животное) трансплантировали в/м в правую бедренную мышцу мышам линии C57Bl/6J (самцам). Мышей выводили из эксперимента путем дислокации шейных позвонков на 19 день развития опухолей

Карцинома легких Льюис (LLC) с первичным опухолевым узлом. Клетки LLC ( $6 \times 10^5$  кл в 0.2 мл PBS/животное) трансплантировали в/м в правую бедренную мышцу мышам линии C57Bl/6J (самкам или самцам) для формирования солидной опухоли. Мышей выводили из эксперимента на 20 день развития опухолей.

Метастатическая карцинома легких Льюис (LLC). Клетки LLC ( $1.25 \times 10^5$  кл в 0.1 мл PBS/животное) вводили в/в в хвостовую вену мышам линии C57Bl/6J (самкам) для формирования солидной опухоли. Мышей выводили из эксперимента на 20 день развития опухолей.

Гепатома HA-1. Клетки HA-1 ( $10^6$  кл в 0.1 мл в физиологическом растворе) трансплантировали в/м в правую бедренную мышцу мышам линии A/Sn (самкам) для формирования солидной опухоли. Мышей выводили из эксперимента на 20 день развития опухолей

Лимфосаркомы LS, RLS и RLS<sub>40</sub>. Клетки LS, RLS и RLS<sub>40</sub> ( $10^6$  кл/мл в 0.2 мл в физиологическом растворе) трансплантировали в/м в правую бедренную мышцу мышам линии CBA (самкам) для формирования солидной опухоли или в/б для формирования опухоли в асцитной форме. Мышей выводили из эксперимента на 20 день развития опухолей.

Метастатическая меланома B16. Клетки B16 ( $10^5$  кл в 0.1 мл PBS) трансплантировали в/в в хвостовую вену мышам линии C57Bl/6J (самкам или самцам). Мышей выводили из эксперимента на 15 день после трансплантации.

Эксперименты на мышах по прививанию опухолей проводили при содействии к.м.н. Сеньковой А.В. (Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) и к.б.н., профессора Поповой Н.А., к.б.н. Каледина В.И. и к.м.н. Николина В.П. (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск). Инъекции в/в проводили при содействии к.м.н. Сеньковой А.В. и к.м.н. Николина В.П.

#### **2.2.6.2. Определение параметров опухолевого роста**

В ходе эксперимента, как только опухоли начинали пальпироваться, каждые 2 - 3 дня проводили измерение их объема с помощью штангенциркуля. Объем опухоли подсчитывали, используя отношение  $(\pi/6 \times \text{длина} \times \text{высота} \times \text{ширина})$  [533]. По окончании каждого эксперимента мыши были препарированы, опухоли изъяты и взвешены. Вес опухоли определяли как разницу между весом лапы с опухолью и противоположной лапы без опухоли. Процент подавления роста опухоли вычисляли по формуле:

$$\text{Ингибирование роста опухоли (\%)} = ((\text{Средний вес опухоли}_{\text{контроль}} - \text{Средний вес опухоли}_{\text{эксперимент}}) / \text{Средний вес опухоли}_{\text{контроль}}) \times 100.$$

Время удвоения роста опухоли, DT, вычисляли по формуле [534]:  $DT = (t - t_0) \times \ln 2 / (\ln V - \ln V_0)$ , где  $(t - t_0)$  – время между двумя измерениями размера опухоли,  $V_0$  – начальный размер опухоли,  $V$  – конечный размер опухоли.

### 2.2.6.3. Гистологическое исследование и морфометрирование

На 15 день (для модели меланомы B16) и 20 день (для моделей лимфосарком, LLC, HA-1) развития опухолей мышей подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков под легким эфирным наркозом. Далее проводили забор материала для последующего патоморфологического и морфометрического исследований: лёгкие в случае меланомы B16 и LLC, печень в случае лимфосарком, гепатомы HA-1. Исследуемые органы и опухолевые узлы отделяли и фиксировали в 10%-ном нейтральном растворе формалине в течение 7 дней. Количество поверхностных легочных метастазов подсчитывали с помощью бинокулярного микроскопа.

Патоморфологический анализ экспериментальных образцов был проведен к.м.н. Сеньковой А.В. (Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск), д.м.н. Малковой Е.М. и Тарановым О.С. под руководством д.б.н. Рябчиковой Е.И. (ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск). Образцы легких и печени мышей после фиксации обезживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации, просветляли ксилолом и заключали в парафин. Для исследования брали большую долю правого легкого и большую долю печени и изготавливали фронтальный срез, соответствующий гистотопограмме. Срезы толщиной до 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Патоморфологическое и морфометрическое исследование препаратов проводили с помощью микроскопа AxioStar plus, оснащенного камерой MRc5. Для проведения морфометрического анализа гистотопограмм препараты сканировали на сканере Epson Perfection 2400 с разрешением 1200 dpi и обрабатывали с помощью программы Viesscan Professional V8.2.13. Измерение площади среза доли легкого и площади метастазов на данном срезе проводили с использованием программы Adobe Photoshop CS2. Рассчитывали процент площади метастазов по отношению к площади измеряемой доли легкого. Торможение развития метастазов оценивали путем вычисления индекса ингибирования метастазов (ИИМ):

$$\text{ИИМ} = \left[ \frac{\text{Средняя площадь метастазов}_{\text{эксперимент}} - \text{Средняя площадь метастазов}_{\text{контроль}}}{\text{Средняя площадь метастазов}_{\text{контроль}}} \right] \times 100\%$$

ИИМ контрольной группы отражал отсутствие ингибирования метастазов и соответствовал 0 %.

Морфометрическое исследование печени проводили с использованием закрытой тестовой системы, состоящей из 100 точек площадью  $3.2 \times 10^6$  мкм<sup>2</sup>, накладывая сетку случайным образом и подсчитывая в каждой группе 70-100 полей зрения. Были оценены объемные плотности (V<sub>v</sub>, %) нормальной паренхимы печени, дистрофически и некротически

измененных гепатоцитов, а также численная плотность ( $N_v$ ) двуядерных гепатоцитов, отражающих регенераторный потенциал печени.

### **2.2.7. Исследование противоопухолевой активности вакцин на основе дендритных клеток**

#### **2.2.7.1. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток антителами**

Для характеристики спленоцитов использовали анти-CD4-PE (CALTAG) и анти-CD8-FITC (BD Biosciences) антитела; ДК – анти-CD11c-FITC (BD Biosciences), анти-CD206-FITC (BioLegend), анти-CD83-PE (BD Biosciences), анти-CD80-FITC, анти-CD86-PE, анти-МНС II-FITC (Life Technologies) антитела. Клетки ( $5 \times 10^6$ ) центрифугировали при 200 g в течение 10 мин, удаляли супернатант и суспендировали в 250 мкл буфера PBS. Центрифугировали при 200 g в течение 10 мин и удаляли супернатант. К клеткам добавляли 95 мкл буфера PBS и 0.4 мкг моноклональных антител и инкубировали при 0 °C в течение 1 ч. Клетки дважды промывали буфером PBS, суспендировали в 400 мкл 4%-ного раствора формальдегида. Анализ проводили с помощью проточной цитофлуорометрии на приборе Cytomics FC500, результаты обрабатывали с помощью программы CXP Analysis.

#### **2.2.7.2. Приготовление комплексов катионных липосом и нуклеиновых кислот**

Для трансфекции ДК использовали плазмидную ДНК pEGFP-C2 (далее pEGFP), суммарную РНК из ВНК-IR780 клеток (далее РНК-EGFP), клеток меланомы мыши B16 (далее РНК-B16), клеток аденокарциномы Кребс-2 (далее РНК-Кребс-2) и клеток карциномы легких Льюис (далее РНК-LLC). Суммарную РНК выделяли с помощью реагента TRIzol, как описано в п. 2.2.5.1.

Комплексы ДНК(РНК)/липосомы формировали при следующих соотношениях N/P (соотношение количества аминогрупп в липосомах к количеству фосфатных групп в НК): 1/1, 2/1, 4/1, 6/1, 8/1 и 10/1 для трансфекции ДНК (1 мкг ДНК соответствовал  $3.08 \times 10^{-9}$  моль фосфатов) или 1/1 и 2/1 для трансфекции РНК (1 мкг РНК соответствовал  $2.94 \times 10^{-9}$  моль фосфатов). Комплексы катионных липосом с нуклеиновыми кислотами формировали в среде Opti-MEM в отсутствие сыворотки интенсивным перемешиванием 0.5 мкг ДНК или 5 мкг РНК с липосомами, взятыми в соответствующих концентрациях; полученные смеси инкубировали 20 мин при 24 °C и использовали для трансфекции.

#### **2.2.7.3. Физико-химическая характеристика липосом и липоплексов**

Для измерения характеристик липосом 25 мкл липосом (1 мМ) растворяли в 975 мкл деионизованной воды MilliQ. Для измерения характеристик липоплексов 1 мкг pEGFP-C2 смешивали с липосомами, взятыми в концентрациях, соответствующих P/N соотношениям

N/P 1/2, 1/1, 2/1, 4/1, 6/1, 8/1 и 10/1, в 1 мл деионизованной воды MilliQ и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Размер частиц и  $\zeta$  потенциал измеряли с помощью прибора Malvern Zetasizer Nano.

#### **2.2.7.4. Агглютинация с конканавалином А**

Исследование агглютинации липосом с конканавалином А (КонаА) проводили по модифицированной методике [535]. Реакционная смесь (объем 100 мкл) содержала 25 мкг КонаА, 25 нМ липосом, PBS, pH 7.4, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Мутность раствора регистрировали с помощью спектрофотометра BioMate3 при 360 нм. Изменение мутности раствора регистрировали в течение 10 мин при 24 °С. Далее к раствору добавляли 1 мг маннозы (в 10 мкл PBS, pH 7.4, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) и регистрировали изменение мутности раствора еще в течение 5 мин.

Эффективную константу скорости формирования комплексов КонаА с липосомами рассчитывали по формуле.

$T(t) = a + be^{-kt}$  (1), где  $T$  – мутность раствора;  $t$  – время;  $k$  – эффективная константа скорости изменения мутности раствора.

#### **2.2.7.5. Трансфекция рEGFP, РНК-EGFP, РНК-Кребс-2, РНК-LLC и РНК-В16 в преДК и незрелые ДК мыши**

Клетки высаживали в 24-луночный планшет (преДК,  $5 \times 10^5$  кл/лунку; незрелые ДК,  $4 \times 10^5$  кл/лунку) в среде IMDM за 30 мин до трансфекции. Для приготовления пДНК-содержащих липоплексов рEGFP (0.5 мкг/лунку) смешивали с липосомами в концентрациях, соответствующих соотношениям N/P 1/1, 2/1, 4/1, 6/1, 8/1 и 10/1. Для формирования РНК-содержащих липоплексов РНК-EGFP, РНК-LLC или РНК-В16 (5 мкг/лунку) смешивали с липосомами в концентрациях, соответствующих соотношениям N/P 1/1 и 2/1. Липоплексы формировали в 50 мкл среды Opti-MEM в отсутствие сыворотки в течение 20 мин при 24 °С, как описано в п. 2.2.7.2. Клетки инкубировали с липоплексами в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub> при 37 °С в течение 4 ч. После этого к клеткам добавляли FBS до концентрации 10% и инкубировали в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub> при 37 °С в течение 44 ч. Трансфекцию ДНК или РНК с помощью реагента Lipofectamine 2000 проводили в соответствии с протоколом производителя. Эффективность трансфекции оценивали с помощью проточной цитометрии на приборе FC500.

#### **2.2.7.6. Проточная цитометрия**

Для характеристики эффективности трансфекции липоплексов, содержащих рEGFP ДНК и РНК-EGFP, использовали проточную цитометрию. Через 48 ч после трансфекции

клетки, трансфицированные pEGFP ДНК или РНК-EGFP, механически открепляли от дна планшета скребком и собирали центрифугированием при 200 g (Eppendorf 5810R) в течение 5 мин. Клетки промывали PBS и фиксировали 2%-ным формальдегидом в PBS. Полученные образцы анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием проточного цитофлуориметра FC 500, данные обрабатывали с помощью программного обеспечения CXP Analyze. Интенсивность флуоресценции отдельных клеток измеряли в относительных единицах флуоресценции (RFU). Все экспериментальные точки были повторены три раза для статистического анализа.

Эффективность трансфекции (TE) характеризовалась двумя значениями: процентом флуоресцентных клеток и средней интенсивностью флуоресценции (MFI) в образце. Процент pEGFP-положительных клеток в анализируемых образцах рассчитывали по формуле:  $pEGFP^+(\%) = pEGFP^+_{\text{образец}} (\%) - pEGFP^+_{\text{контроль}} (\%)$ , где  $pEGFP^+_{\text{образец}} (\%)$  – процент флуоресцентных клеток в анализируемом образце,  $pEGFP^+_{\text{контроль}} (\%)$  – процент флуоресцентных клеток в отрицательном контроле. Среднюю интенсивность флуоресценции клеток рассчитывали по формуле:  $MFI (RFU) = MFI_{\text{образец}} (RFU) - MFI_{\text{контроль}} (RFU)$ , где  $MFI_{\text{образец}} (RFU)$  – средняя флуоресценция клеток в анализируемом образце,  $MFI_{\text{контроль}} (RFU)$  – средняя флуоресценция клеток в отрицательном контроле. Клетки, инкубированные в отсутствии pEGFP ДНК или РНК-EGFP и липосом, использовали в качестве отрицательного контроля: в данных образцах процент флуоресцентных клеток и интенсивность флуоресценции не превышали экспериментальную ошибку (1 – 3%). Клетки, инкубированные в присутствии pEGFP ДНК или РНК-EGFP и Lipofectamine 2000, использовали в качестве положительного контроля.

#### **2.2.7.7. Нагрузка ДК лизатом клеток Кребс-2**

Лизат клеток Кребс-2 получали, как описано в п. 2.2.4.3. Для трансфекции ДК использовали лизат из расчета 120 мкг белка на 1 мл клеточной суспензии ДК ( $10^6$  ДК). Инкубацию ДК с лизатом проводили в атмосфере 5%-ного  $CO_2$  при 37 °C в течение 4 ч.

#### **2.2.7.8. Исследование противоопухолевой активности ДК, нагруженных РНК в комплексах с липосомами *ex vivo*, на модели меланомы**

Метастатическую модель меланомы В16 индуцировали у мышей линии С57В1/6J, как описано в п. 2.2.6.1. Мышей делили на 13 групп (n=5-6) и, начиная с четвертого дня после трансплантации проводили следующие инъекции: группа 1 (контроль) – физ/раствор в/в; 2, 3, 4 и 5 – в/в зрелые ДК ( $10^5$  кл/животное), трансфицированные РНК-В16 в комплексе с Lipofectamine 2000 (2), липоплексами 2Х3-DOPE/РНК-В16 (3), 2D3-DOPE/РНК-В16 (4) и Х2-DOPE/РНК-В16 (5), соответственно; 8, 9, 10, 11, 12 и 13 – в/в ДК ( $10^5$  кл/мышь),

трансфицированные 2X3-DOPE/PHK-B16 (8), M1/PHK-B16 (9), M2/PHK-B16 (10), M4/PHK-B16 (11), M5/PHK-B16 (12) и M6/PHK-B16 (13), соответственно.

На 15 день развития опухоли мышей выводили из эксперимента, извлекали легкие и фиксировали в 4% растворе формальдегида в течение 2 недель. Количество поверхностных легочных метастазов подсчитывали с помощью бинокулярного микроскопа. Кровь собирали, использовали для получения сыворотки.

#### **2.2.7.9. Реакция аллогенных смешанных лимфоцитов**

В качестве стимуляторных клеток использовали: (1) – контроль (w/t), нестимулированные ДК; (2) – ДК, обработанные 100 нг/мл ЛПС; (3) – ДК, обработанные 10 мкг/мл PHK-B16; (4) и (5) – ДК, трансфицированные липоплексами 2X3-DOPE/PHK-B16 и M6/PHK-B16 (N/P 2/1, 10 мкг PHK на  $10^6$  ДК), соответственно; (6) и (7) – ДК, обработанные липосомами 2X3-DOPE и M6, соответственно, в концентрациях, соответствующих концентрациям в липоплексах. Во всех образцах ДК инкубировали с соответствующими стимулирующими агентами при 37 °C и 5%-ном CO<sub>2</sub> в течение 4 ч. Спленоциты выделяли из селезенки мыши линии C57Bl/6J, как описано в п. 2.2.3.4. Спленоциты ( $10^5$  кл/лун) культивировали в 96-луночной планшете в присутствии  $10^4$  стимуляторных клеток при 37 °C и 5%-ном CO<sub>2</sub> в течение 5 суток. Суммарный объем составлял 150 мкл/лун. Пролиферацию спленоцитов оценивали с помощью WST-1 теста в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Индекс пролиферации (PI) рассчитывали по формуле:  $PI (o.e.) = (OD_{450} \text{ образец} - OD_{620} \text{ образец}) / (OD_{450} \text{ спленоциты} - OD_{620} \text{ спленоциты}) \times 100$ , где  $OD_{450} \text{ образец}$  и  $OD_{620} \text{ образец}$  – оптическая плотность в лунках с образцами на длинах волн 450 нм и 620 нм, соответственно;  $OD_{450} \text{ спленоциты}$  и  $OD_{620} \text{ спленоциты}$  – оптическая плотность в лунках со спленоцитами без стимуляторных ДК на длинах волн 450 нм и 620 нм, соответственно. Уровень пролиферации спленоцитов в отсутствие ДК соответствовал 100% и был принят за одну относительную единицу (o.e.).

#### **2.2.7.10. Праймирование T-лимфоцитов *in vivo* с помощью липосом серии МЛ**

Здоровых мышей линии C57Bl/6J (самцов) возрастом 10-12 недель делили на четыре группы (n=3): группе 1 (контроль) - вводили 200 мкл Opti-MEM в/в; 2, 3 и 4 – 200 мкл липоплексов 2X3-DOPE/PHK-B16, M5/PHK-B16 и M6/PHK-B16, соответственно, приготовленных при соотношении N/P=2/1 в Opti-MEM (10 мкг PHK/животное), в/в. На 7 день мышей выводили из эксперимента и выделяли спленоциты, как описано в п. 2.2.3.4. Спленоциты высаживали в полной среде IMDM ( $10^6$  кл/мл) в присутствии ИЛ-2 (5 нг/мл) и активировали лизатом клеток меланомы B16 (20 мкг белка/мл) при 37 °C в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub> в течение четырех дней с реактивацией на второй день. Полученные ЦТЛ

(эффекторные клетки) добавляли к клеткам меланомы В16 (таргетные клетки, 25 тыс. кл/луноку) в соотношении эффекторные клетки/таргетные клетки 1/1, 5/1, 10/1 и 20/1 и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Процент специфически лизированных клеток подсчитывали следующим образом: специфический лизис (%) =  $100 - (OD_{570\text{эксп}} - OD_{620\text{эксп}}) / (OD_{570\text{конт}} - OD_{620\text{конт}}) \times 100$ , где  $OD_{570\text{эксп}}$  и  $OD_{570\text{конт}}$  оптическая плотность экспериментальных и контрольных лунок, соответственно, при длине волны 570 нм, и  $OD_{620\text{эксп}}$  и  $OD_{620\text{конт}}$  оптическая плотность экспериментальных и контрольных лунок, соответственно, при длине волны 620 нм.

### **2.2.7.11. Состав вакцин и схемы вакцинации мышей ДК**

**Состав вакцины.** Тип ДК вакцины указан как: С/Т/А, где С – схема применения 1 (профилактическая) или 2 (терапевтическая), Т- трансфектант, А – источник антигена; или С-И/Т/А, где С – схема применения 1 (профилактическая) или 2 (терапевтическая), И – количество иммунизаций, Т- трансфектант, А – источник антигена. Для модели Кребс-2 ДК вакцины получали из ДК, нагруженных суммарной РНК-Кребс-2 в комплексах с Lipofectamine 2000 (вакцины 1/LF/РНК, 2/LF/РНК) или опухолевым лизатом (вакцины 1/лизат, 2/лизат), или интактных ДК, обработанных Lipofectamine 2000 (вакцины 1/LF, 2/LF). Для модели LLC ДК вакцины получали из ДК, трансфицированных суммарной РНК-LLC в комплексах с коммерческим препаратом Lipofectamine 2000 (вакцины 1/LF/РНК, 2/LF/РНК) или катионными липосомами 2D3-DOPE (вакцины 1/2D3/РНК, 2/2D3/РНК). Для модели меланомы В16 ДК вакцину получали из ДК, трансфицированных суммарной РНК-В16 в комплексе с катионными липосомами 2D3-DOPE (вакцины 1-1/2D3/РНК, 1-2/2D3/РНК, 2-1/2D3/РНК, 2-2/2D3/РНК). Все ДК вакцины вводили в/в в дозе  $10^5$  кл/животное в 0.2 мл PBS.

#### **Схема применения 1 (профилактическая).**

Модель Кребс-2: Животных делили на три группы (n=6) и вводили ДК вакцины в/в: (1) – 1/LF; (2) – 1/LF/РНК; (3) – 1/лизат. Через 7 дней после вакцинации ДК животным трансплантировали клетки опухоли Кребс-2, как описано в п. 2.2.6.1. Мышей выводили из эксперимента на 19 день развития опухоли.

Модель LLC: Животных делили на две группы (n=6-8) и вводили ДК вакцины в/в: (1) – 1/LF/РНК; (2) – 1/2D3/РНК. Клетки опухоли LLC трансплантировали внутримышечно, как описано в п. 2.2.6.1, через 7 дней после введения ДК вакцин. Животных выводили из эксперимента на 20 день.

Модель меланомы В16: Животных делили на две группы (n=5) и вводили ДК вакцины в/в: (1) – 1-1/2D3/РНК за 7 дней до трансплантации опухоли (однократная вакцина); (2) – 1-

2/2D3/PHK за 14 и 7 дней до трансплантации опухоли (двукратная вакцина). Клетки меланомы B16 трансплантировали, как описано в п. 2.2.6.1. Животных выводили из эксперимента на 15 день. В профилактической схеме в качестве контроля использовали контроль терапевтической схемы, соответствующий типу опухоли.

### **Схема применения 2 (терапевтическая).**

Клетки опухолей Кребс-2, LLC и B16 трансплантировали мышам, как описано в п. 2.2.6.1.

Модель Кребс-2: На четвертый день после трансплантации Кребс-2 животных делили на четыре группы (n=6) и вводили ДК вакцины в/в: (1, w/t) – PBS; (2) – 2/LF; (3) – 2/LF/PHK; (4) – 2/лизат. Животных выводили из эксперимента на 20 день.

Модель LLC: На четвертый день после трансплантации LLC животных делили на четыре группы (n=6-8) и вводили ДК вакцины в/в: (1, w/t) – PBS; (2) – 2/LF/PHK; (2) – 2/2D3/PHK. Животных выводили из эксперимента на 20 день.

Модель меланомы B16: На четвертый день развития опухоли животных делили на три группы (n=5) и вводили ДК вакцины в/в: (1, w/t) – PBS; (2) – 2-1/2D3/PHK на четвертый день развития опухоли (однократная вакцина); (3) – 2-2/2D3/PHK на четвертый и 11 дни развития опухоли (двукратная вакцина). Животных выводили из эксперимента на 15 день.

Контрольные группы (1, w/t) в терапевтической схеме применения также являлись контрольными группами в профилактической схеме.

Размеры опухолей экспериментальных животных измеряли с помощью штангенциркуля через каждые 2-3 дня в течение эксперимента. Объем опухоли подсчитывали, как описано в п. 2.2.6.2. После окончания эксперимента подсчитывали количество легочных метастазов в группах мышей с метастатическими опухолевыми моделями LLC и B16. На 5, 11 и 19 дни у части животных забирали селезенку и определяли соотношение  $CD4^+/CD8^+$  клеток, как описано в п. 2.2.7.1.

#### **2.2.7.12. Системное введение мышам с меланомой B16 ДК-вакцин или липоплексов**

Клетки меланомы трансплантировал мышам C57Bl/6J, как описано в п. 2.2.6.1. Мышей делили на шесть групп (n=5), и, начиная с четвертого дня после трансплантации, мыши получали следующие инъекции: группа 1 (контроль) - буфер PBS в/в (0.2 мл); 2 и 3 – в/в  $10^5$  ДК, трансфицированных комплексами 2X3-DOPE/PHK-B16 или M6/PHK-B16, соответственно (0.2 мл); 4 и 5 – в/в липоплексы 2X3-DOPE/PHK-B16 и M6/PHK-B16, соответственно, приготовленных при соотношении N/P 2/1 в среде Opti-MEM (10 мкг

РНК/животное, 0.2 мл); 6 – в/в липосомы 2X3-DOPE в количестве, используемом для приготовления липоплексов (0.2 мл).

### ***2.2.7.13. Оценка противоопухолевого цитотоксического Т-клеточного ответа в режиме реального времени***

Спустя 7 дней после введения ДК-вакцин или липоплексов животных из п.2.2.7.12 выводили из эксперимента, выделяли спленоциты, как описано в п. 2.2.3.4, и рестимулировали клетками меланомы В16, обработанными митомицином С (ММС-В16), при соотношении спленоциты/ММС-В16 10/1 при 37 °С, 5%-ном CO<sub>2</sub> в течение 5 дней. Активированные спленоциты культивировали с клетками меланомы В16 для оценки цитотоксического ответа при соотношении спленоциты/опухолевые клетки 20/1. Жизнеспособность опухолевых клеток регистрировали в режиме реального времени с помощью прибора xCELLigence в течение 60 ч.

## **2.2.8. Получение лимфосаркомы с фенотипом МЛЮ**

### ***2.2.8.1. Селекция линии RLS<sub>40</sub> на повышающихся концентрациях винбластина***

Первичная культуры опухолевых клеток RLS была получены из асцитной формы опухоли RLS, как описано в п. 2.2.3.1. Далее селекция состояла из нескольких циклов. Цикл 1: клетки RLS<sub>40</sub> (300 тыс кл/мл, объем 5 мл) культивировали в полной среде IMDM в присутствии 5 нМ винбластин в течение 48 часов при 37°С в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub>. Жизнеспособные клетки отбирали путем центрифугирования на среде LSM, как описано в п. 2.2.3.1, и далее повторяли цикл 1 еще 2-3 раза. Циклы 2, 3 и 4 отличались от цикла 1 концентрацией винбластина – клетки инкубировали в присутствии 10, 20 и 40 нМ винбластина, соответственно, и каждый раз отбирали жизнеспособную фракцию клеток. В результате был получен набор клеточных линий RLS<sub>5</sub>, RLS<sub>10</sub>, RLS<sub>20</sub> и RLS<sub>40</sub>.

### ***2.2.8.2. Определение уровней мРНК генов *mdr1b*, *mdr1a*, *bcl-2*, *p53* и $\beta$ -актина в клетках первичных культур опухолей LS, RLS и RLS<sub>40</sub> методом ОТ-ПЦР***

Для синтеза кДНК использовали суммарную РНК клеток LS, RLS и RLS<sub>40</sub>, выделенную, как описано в п. 2.2.5.1. кДНК получали в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей ОТ-буфер, 2 мкг суммарной клеточной РНК, 0.01 М DTT, 12 пмоль гексануклеотидного праймера, 0.5 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов и 20 ед. обратной транскриптазы М-MLV. Реакцию синтеза кДНК проводили при 37°С в течение 1 ч. Полученные образцы кДНК либо непосредственно использовали для проведения ПЦР, либо хранили при -20°С.

Последовательности олигонуклеотидов, использованных в качестве праймеров, приведены в таблице 5. ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл содержащей 1 мкл кДНК, полученной с помощью реакции обратной транскрипции (п. 2.2.4.1), по 6 пмоль специфических праймеров, 2 ед. *Taq*-полимеразы и 0.05 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов для генов *bcl-2*, *p53*, *mdr1b* и 0.2 мМ – для гена *mdr1a*. Для получения специфических продуктов для генов *mdr1a* и *mdr1b* использовали 26 и 24 циклов амплификации, соответственно; для генов *bcl-2* и *p53* использовали 31 цикл амплификации. Праймеры  $\beta$ -актина добавляли в реакционную смесь для генов *mdr1a*, *mdr1b* после третьего и первого цикла, соответственно, и для генов *bcl-2* и *p53* после шестого цикла. Амплификацию проводили в следующих условиях: 1 цикл, 95°C, 5 мин; 57°C; 1 мин; 72°C, 1 мин. Следующие циклы амплификации проводили в условиях: 94°C, 1 мин; 57°C, 1 мин; 72°C, 1 мин. Последний цикл амплификации, элонгацию, проводили в течение 5 мин при 72°C. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле, либо с помощью 8%-ного ПААГ электрофореза в нативных условиях. Полученные изображения полос обрабатывали с помощью компьютерной денситометрии (Gel-Pro Analyzer 4.0). Для определения уровня экспрессии мРНК интегральную оптическую плотность полос, соответствующих ген-специфическим ПЦР-продуктам, нормализовали на оптическую плотность продукта  $\beta$ -актина.

### **2.2.8.3. Определение чувствительности клеток LS, RLS и RLS<sub>40</sub> к действию цитостатиков с помощью МТТ теста**

Чувствительность клеток линий LS, RLS и RLS<sub>40</sub> к цитостатикам определяли с помощью МТТ теста [536]. Для этого интактные клетки высаживали в 96-луночные планшеты по  $3 \times 10^4$  клеток на лунку, добавляли винбластин (в диапазоне концентраций 1 – 100 нМ для клеток линии LS и RLS и 10 - 700 нМ для клеток линии RLS<sub>40</sub>), доксорубицин (в диапазоне 1 – 200 нМ для клеток линии LS и RLS и 0.5 – 30 мкМ для клеток линии RLS<sub>40</sub>) или цитарабин (в диапазоне - 0.1 - 1 мкМ для клеток линии LS и RLS и 0.1 – 4 мкМ для клеток линии RLS<sub>40</sub>) и инкубировали в течение 48 часов при 37°C в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub>. После окончания инкубации к клеткам добавляли раствор МТТ до концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали в течение 3-4 ч в тех же условиях. Среду удаляли, образовавшиеся в клетках кристаллы формазана растворяли в 100 мкл DMSO и измеряли оптическую плотность по разности поглощения на длинах волн  $\Delta(A_{570} - A_{630})$  нм на многоканальном спектрофотометре. Данные представляли в виде процента живых клеток относительно контроля.

#### **2.2.8.4. Определение чувствительности опухолей LS, RLS и RLS<sub>40</sub> к химиопрепаратам *in vivo***

Суспензию опухолевых клеток LS, RLS или RLS<sub>40</sub> в физиологическом растворе (10<sup>6</sup> кл./мл) объемом 0.2 мл внутримышечно трансплантировали 210 мышам линии СВА для формирования солидной опухоли. На 11 день опухолевой прогрессии мышей делили по группам (n=10) и однократно вводили химиопрепараты: циклофосфамид (25 мг/кг, 50 мг/кг и 100 мг/кг, в/б), цисплатин (10 мг/кг, в/б), винбластин (1.5 мг/кг, в/в) и рубомицин (15 мг/кг, в/в). Цитостатики разводили в физиологическом растворе непосредственно перед введением. Контрольные животные получали инъекции физ/раствора. Через 7 дней после введения препаратов мышей подвергали эвтаназии методом дислокации шейных позвонков и определяли объем опухолей. Объем и вес опухолей определяли, как описано в п. 2.2.6.2.

#### **2.2.9. Исследование противоопухолевого и антиметастатического потенциала бычьей панкреатической РНКазы А, бычьей панкреатической ДНКазы I и рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы)**

##### **2.2.9.1. Инактивация РНКазы А и ДНКазы I**

Реакционную смесь объемом 300 мкл, содержащую 5×10<sup>4</sup> М РНКазы А в воде и 3 мкл DEPC, инкубировали при комнатной температуре в течение 20 ч при постоянном перемешивании. Через 6 и 12 час после начала инкубации повторно добавляли 3 мкл DEPC. По окончании инкубации к реакционной смеси добавляли 3 мкл DEPC и инкубировали при 37 °С в течении 1.5 ч.

Реакционную смесь объемом 0.5 мл, содержащую ДНКазу I в концентрации 10<sup>4</sup> ед. акт./мл, в воде инкубировали при 65 °С в течение 2 ч.

##### **2.2.9.2. Определение активности РНКазы А *in vitro***

Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 5000 имп/мин 5'-[<sup>32</sup>P]-РНК НIV-1, буфер R, интактную РНКазу А или инактивированную РНКазу А в концентрации 10<sup>-10</sup> – 10<sup>-7</sup> М, инкубировали при 37 °С в течение 1 – 15 мин. После окончания реакции смеси последовательно экстрагировали фенолом, смесью фенол/хлороформ (v/v; 1/1) и хлороформом. Продукты расщепления РНК осаждали добавлением 3 М ацетата натрия, рН 5.2, до концентрации 0.3 М и 4-кратным объемом 96%-ного этанола. Продукты расщепления анализировали электрофорезом в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях.

##### **2.2.9.3. Определение активности ДНКазы I *in vitro***

Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 0.2 мкг плазмиды рНIV-2, буфер D, интактную ДНКазу I или инактивированную ДНКазу I в количестве 0.001 – 0.1 ед. акт.,

инкубировали при 37 °С в течение 1 – 15 мин. По окончании реакции к смеси добавляли 5 мкл 7.5 мМ ЭДТА до концентрации 2.5 мМ и инкубировали при 65 °С в течение 10 мин. Продукты расщепления анализировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием геля бромистым этидием.

#### ***2.2.9.4. Исследование токсичности биназы на мышцах линий C57Bl/6J и CBA***

Мышей линий C57Bl/6J или CBA делили на три группы (n=10) и далее проводили следующие инъекции: группе 1 (контроль) – физ/раствор (0.1 мл) в/б трижды в неделю в течение 2 недель; группе 2 и 3 – биназу в дозах 1 и 5 мг/кг (0.1 мл), соответственно, в/б трижды в неделю в течение 2 недель. Также в качестве дополнительного контроля использовали интактных здоровых мышей. В ходе эксперимента оценивали вес животных, состояние волосяного и кожного покровов, уровень потребления пищи и воды. На 14 день животных выводили из эксперимента, забирали печень и анализировали, как описано в п. 2.2.6.3.

#### ***2.2.9.5. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия РНКазы А и ДНКазы I (широкий диапазон доз) на модели LLC с первичным опухолевым узлом***

Трансплантацию LLC самкам линии C57Bl/6J проводили, как описано в п. 2.2.6.1. Животных делили на 14 групп (n=20), и, начиная с четвертого дня после трансплантации опухоли, животные получали в/м: группа 1 (контроль) – физ/раствор (0.1 мл); 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 – РНКазу А в дозах 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.01, 0.05, 0.5, 1, 10 мг/кг (0.1 мл в физ/растворе); 10, 11, 12, 13 и 14 – ДНКазу I в дозах 0.02, 0.12, 0.23, 1.15 и 2.3 мг/кг, соответственно. Введение проводили по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв). На 20 день развития опухолей мышей выводили из эксперимента. Лёгкие изымали, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в DMEM и анализировали, как описано в п. 2.2.6.3. Измерение объема и веса опухолей проводили, как описано в п. 2.2.6.2.

#### ***2.2.9.6. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия РНКазы А и ДНКазы I на моделях LLC и HA-1 с первичным опухолевым узлом***

Трансплантацию LLC самкам линии C57Bl/6J и HA-1 самкам линии A/Sn проводили, как описано в п. 2.2.6.1. Животных каждой линии делили на 9 групп (n=8), и, начиная с восьмого дня после трансплантации опухоли, животные получали в/м: группа 1 (контроль) – физ/раствор (0.1 мл); 2, 3 и 4 – РНКазу А в дозах 0.35, 0.7 и 7 мкг/кг (0.1 мл в физ/растворе), соответственно; 5, 6, 7, 8 и 9 – ДНКазу I в дозах 0.02, 0.12, 0.23, 1.15 и 2.3 мг/кг (0.1 мл в физ/растворе), соответственно. Введение проводили по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв).

На 20 день развития опухолей мышей выводили из эксперимента. Лёгкие изымали, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в DMEM и анализировали, как описано в п. 2.2.6.3. Кровь собирали и готовили плазму, как описано в п. 2.2.4.2. Измерение объема и веса опухолей проводили, как описано в п. 2.2.6.2.

#### ***2.2.9.7. Исследование комбинированного действия РНКазы А и циклофосфида на модели LLC с первичным опухолевым узлом***

LLC трансплантировали мышам линии C57Bl/6J (самкам), как описано в п. 2.2.6.1. Мышей делили на четыре группы (n=8-10), и, начиная с четвертого дня после трансплантации опухоли, мыши получали следующие инъекции: группа 1 (контроль) – физ/раствор в/в (0.1 мл); группа 2 – РНКазу А в дозе 0.7 мкг/кг в/м по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв) в течение 2 недель; группа 3 – циклофосфамид в дозах 150 и 100 мг/кг на 7 и 11 дни после трансплантации, соответственно; группа 4 – РНКазу А в дозе 0.7 мкг/кг в/м по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв) в течение 2 недель и циклофосфамид в дозах 150 и 100 мг/кг на 7 и 11 дни после трансплантации, соответственно.

На 20 день развития опухолей мышей выводили из эксперимента. Лёгкие изымали, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в DMEM и анализировали, как описано в п. 2.2.6.3. Кровь собирали и готовили сыворотку, как описано в п. 2.2.4.1.

#### ***2.2.9.8. Исследование комбинированного антиметастатического действия РНКазы А и ДНКазы I на модели LLC с первичным опухолевым узлом***

LLC трансплантировали мышам линии C57Bl/6J (самкам), как описано в п. 2.2.6.1. Животных делили на 3 группы (n=8), и, начиная с восьмого дня после трансплантации опухоли, животные получали в/м: группа 1 (контроль) – физ/раствор (0.1 мл); 2 - 0.023 мг/кг ДНКазы I и 0.7 мкг/кг РНКазы А (смесь 1); 3 - 0.023 мг/кг ДНКазы I и 0.35 мкг/кг РНКазы А (смесь 2). Введение проводили по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв). На 20 день развития опухолей мышей выводили из эксперимента. Лёгкие изымали, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в DMEM и анализировали, как описано в п. 2.2.6.3.

#### ***2.2.9.9. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия инактивированных ферментов РНКазы А и ДНКазы I на модели LLC с первичным опухолевым узлом***

LLC трансплантировали мышам линии C57Bl/6J (самкам), как описано в п. 2.2.6.1. Животных делили на 5 групп (n=8), и, начиная с восьмого дня после трансплантации опухоли, животные получали в/м: группа 1 (контроль) – физ/раствор; 2 – РНКазу А в дозе 0.7 мкг/кг; 3 - инактивированную РНКазу А (п. 2.2.9.1) в дозе 0.7 мкг/кг; 4 – ДНКазу I в дозе 0.12 мг/кг; 5 – инактивированную ДНКазу I (п. 2.2.9.1) в дозе 0.12 мг/кг. Введение проводили по

схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв). На 20 день развития опухолей мышей выводили из эксперимента. Лёгкие изымали, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в DMEM и анализировали, как описано в п. 2.2.6.3. Измерение объема и веса опухолей проводили, как описано в п. 2.2.6.2.

#### ***2.2.9.10. Исследование антиметастатического действия ДНКазы I in vivo на модели метастатической меланомы B16***

Клетки меланомы B16 трансплантировали, как описано в п. 2.2.6.1. Животных делили на 4 группы (n=20), и, начиная с четвертого дня после трансплантации, животные получали в/м: группа 1 (контроль) – физ/раствор (0.1 мл); 2, 3 и 4 – ДНКазу I в дозах 0.12, 0.6 и 1.2 мг/кг (0.1 мл), соответственно. Инъекции проводили по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв) в течение 2 недель. На 17 день после трансплантации мышей выводили из эксперимента. Лёгкие, селезенку и тимус собирали и фиксировали в 10%-ном нейтрально-буферном формалине для последующего патоморфологического исследования органов. Количество поверхностных метастазов в легких подсчитывали с помощью бинокуляра.

#### ***2.2.9.11. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия биназы на моделях LLC и RLS<sub>40</sub> с первичным опухолевым узлом и метастатической меланоме B16***

Солидные опухоли LLC, RLS<sub>40</sub> и метастатическую модель меланомы B16 индуцировали, как описано в п. 2.2.6.1. Животных с LLC делили на группы (n=10), и, начиная с четвертого дня после трансплантации опухоли, животные получали следующие инъекции: группа 1 (контроль 1) – физ/раствор (0.1 мл) в/м; 2 (контроль 2) - физ/раствор (0.1 мл) в/б; 3, 4 и 5 – биназу в дозах 0.1, 0.5 и 1 мг/кг в/м, соответственно; 6, 7 и 8 - биназу в дозах 0.1, 0.5 и 1 мг/кг в/б, соответственно. Инъекции проводили в течение 2 недель, всего 8 инъекций.

Животных с RLS<sub>40</sub> и B16 делили на группы (n=10), и, начиная с четвертого дня после трансплантации опухоли, животные получали следующие инъекции: группа 1 (контроль) – физ/раствор (0.1 мл) в/б; 2 и 3 – биназу в дозах 1 и 5 мг/кг в/б. Инъекции проводили трижды в неделю в течение 2 недель.

После окончания эксперимента лёгкие (в случае LLC, B16) и печень (в случае RLS<sub>40</sub>) изымали, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в DMEM и анализировали, как описано в п. 2.2.6.3. Измерение объема и веса опухолей проводили, как описано в п. 2.2.6.2.

### ***2.2.9.12. Исследование антиметастатического действия РНКазы А и ДНКазы I на метастатической модели LLC***

Мышам C57Bl/6J вводили внутривенно клетки LLC, как описано в п. 2.2.6. Животных делили на группы (n=10), и, начиная с четвертого дня после трансплантации, животные получали в/м следующие инъекции ежедневно в течение 2 недель: группа 1 (контроль) – физ/раствор (0.1 мл); группа 2 – РНКазу А (0.7 мкг/кг), группа 3 – ДНКазу I (0.12 мг/кг). На 15 день эксперимента легкие изымали, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в DMEM и анализировали, как описано в п. 2.2.6.3.

### ***2.2.9.13. Исследование комбинированного действия биназы и ПХТ на модели RLS<sub>40</sub>***

Солидные опухоли RLS<sub>40</sub> индуцировали, как описано в п. 2.2.6.1. Животных делили на группы (n=10), и, начиная с четвертого дня после трансплантации опухоли, животные получали следующие инъекции в течение 2 недель: группа 1 (контроль) – физ/раствор (0.1 мл) в/б; 2 - ПХТ по протоколу СНОР; 3 и 4 – биназу в дозе 1 и 5 мг/кг в/б, соответственно; 5 - ПХТ по протоколу СНОР и биназу в дозе 1 мг/кг в/б. Химиотерапию проводили на 4 и 11 дни после трансплантации опухоли. Протокол СНОР включал стандартную комбинацию цитостатиков в дозе, соответствующей 1/5 от LD<sub>50</sub>: циклофосфамид (50 мг/кг), доксорубин (4 мг/кг), винкристин (0.1 мг/кг) преднизолон (5 мг/кг). Цитостатики растворяли в физ/растворе непосредственно перед введением в объеме. Доксорубин вводили в/в, остальные цитостатики – в/б.

По окончании эксперимента через 20 мин после последней инъекции биназы кровь собирали, готовили сыворотку, как описано в п. 2.2.4.1, и использовали для анализа уровня цитокинов. Печень изымали, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в DMEM и анализировали, как описано в п. 2.2.6.3. Измерение объема и веса опухолей проводили, как описано в п. 2.2.6.2.

## **2.2.10. Исследование активации иммунной системы под действием нуклеаз и дендритных клеток**

### ***2.2.10.1. Измерение уровней цитокинов в ростовой среде ДК и сыворотке крови животных-опухоленосителей, получавших ДК вакцины***

ДК трансфицировали комплексами РНК-В16 с Lipofectamine 2000, липосомами 2Х3-DOPE, 2D3-DOPE и Х2-DOPE, как описано в п. 2.2.7.5. Через 48 ч после трансфекции ДК механически открепляли от дна планшета скребком и собирали центрифугированием при 200 g (центрифуга Eppendorf 5810R) в течение 5 мин.

Образцы крови собирали у пяти групп мышей с меланомой B16 (n=5), получавших ДК, как описано в п. 2.2.7.8. Образцы крови собирали у пяти групп мышей с меланомой B16, получавших ДК по профилактической и терапевтической схемам, как описано в п. 2.2.7.11.

Сыворотку крови получали, как описано в п. 2.2.4.1. Культуральную среду и сыворотку крови использовали для определения уровня цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-1 $\alpha$ , ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  с помощью наборов реагентов Mouse IFN gamma, Mouse IL-6, Mouse IL-1 alpha и Mouse TNF alpha Colorimetric, Mouse Interferon Alpha ELISA Kits в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Уровни цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ГМ-КСФ, ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  измеряли с помощью набора реагентов Mouse Cytokine 10-Plex Panel в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

### ***2.2.10.2. Измерение уровней цитокинов в сыворотке крови животных-опухоленосителей, получавших лечение нуклеазами***

Образцы крови собирали у пяти групп мышей с лимфосаркомой RLS<sub>40</sub>, получавших лечение биназой в комбинации с химиотерапией, как описано в п. 2.2.8.12. Образцы крови собирали у четырех групп мышей с LLC, получавших лечение РНКазой А в комбинации с циклофосамидом, как описано в п. 2.2.8.7.

Сыворотку крови получали, как описано в п. 2.2.4.1. Уровни цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-1 $\alpha$ , ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  определяли в сыворотке крови с помощью наборов реагентов Mouse IFN gamma, Mouse IL-6, Mouse IL-1 alpha и Mouse TNF alpha Colorimetric, Mouse Interferon Alpha ELISA Kits в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

### ***2.2.10.3. Определение типа Т-хелперного иммунного ответа, развивающегося у животных при введении дендритно-клеточных вакцин***

Для определения типа Т-хелперного иммунного ответа проводили определение уровня экспрессии генов ROR $\gamma$ , Foxp3, GATA3 и Tbet в спленоцитах методом количественной ПЦР. Для этого спленоциты собирали у пяти групп мышей с меланомой B16, получавших ДК по профилактической и терапевтической схемам, как описано в п. 2.2.7.11. Первичную культуру спленоцитов готовили, как описано в п. 2.2.3.4. Суммарную РНК выделяли из 10<sup>7</sup> спленоцитов, как описано в п. 2.2.5.1.

Обратную транскрипцию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 1 мкг суммарной РНК, ОТ-буфер, 50 пмоль гексануклеотидного праймера, 0.5 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата, 20 ед. обратной транскриптазы M-MLV, при 37 °С в течение 1 ч. Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 5 мкл кДНК (разведение 10<sup>-2</sup>), ПЦР мастер-микс (Вектор-Бест, Россия), 1 × EvaGreen, по 0.4 мкМ каждого прямого и обратного праймеров, специфических к ROR $\gamma$ , Foxp3,

GATA3, Tbet и  $\beta$ -актина-3 (Таблица 5). Амплификацию проводили в следующих условиях: (1) 94 °С, 4 мин, 1 цикл; 95 °С, 15 сек; 75 °С, 1 мин; 60 °С, 30 сек, 40 циклов, с последующим определением точки плавления или кривых диссоциации. Уровень экспрессии гена определяли по количеству циклов с использованием стандартной кривой и нормализовали на уровень экспрессии  $\beta$ -актина.

#### **2.2.10.4. Морфологическое исследование селезенки и тимуса**

Морфологическое исследование проводилось к.м.н. Сеньковой А.В. (Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Селезенку и тимус забирали у четырех групп животных с меланомой В16 (n=10), получавших ДНКазу I, как описано в п. 2.2.8.10. Селезенку и тимус фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, подвергали стандартной обработке: производили обезвоживание в растворах этилового спирта возрастающей концентрации, просветляли ксилолом и заключали в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином и изучали на микроскопе AxioStar plus, оснащенном камерой AxioCam MRc5 (Zeiss, Германия).

Для оценки степени активации иммунной системы проводили микроскопическое и морфометрическое исследование селезенки и тимуса с использованием закрытой тестовой системы из 100 точек площадью  $3.2 \times 10^6$  мкм<sup>2</sup>. При морфометрическом исследовании селезенки подсчитывали объемные плотности ( $V_v$ , %) белой и красной пульпы, а также определяли диаметр лимфоидных фолликулов (мкм). При морфометрическом исследовании тимуса оценивали объемные плотности ( $V_v$ , %) коркового и мозгового вещества, подсчитывали корково-мозговой индекс (КМИ) по формуле:  $КМИ = N/n$ , где N и n количество точек, приходящихся соответственно на корковое и мозговое вещество тимуса. Объемную плотность структуры (объемную долю ткани, занимаемую данной структурой) подсчитывали как число узловых точек, приходящихся на данную структуру.

### **2.2.11. Исследование противоопухолевого механизма действия бычьей панкреатической РНКазы А**

#### **2.2.11.1. Определение концентрации внРНК в плазме крови**

Для забора крови использовали мышей линии C57Bl/6J с LLC и мышей линии A/Sn с НА-1 из п. 2.2.9.6. Забор крови проводили у следующих групп мышей: группа 1 - здоровые мыши линии C57Bl/6J (n=5); группы 2 и 3 - мыши линии C57Bl/6J на 12 и 18 дни развития LLC (n=5); группа 4 - мыши линии C57Bl/6J на 18 день развития LLC, получавшие РНКазу А в дозе 0.7 мкг/кг с восьмого дня после трансплантации опухоли. Забор крови был также проведен у таких же групп мышей линии A/Sn, несущих НА-1. Плазму получали, как

описано в п. 2.2.4.2. внРНК выделяли из плазмы крови и определяли их концентрацию, как описано в п. 2.2.5.3.

### **2.2.11.2. Определение суммарной РНКазной активности плазмы крови**

Определение суммарной РНКазной активности плазмы крови проводили в образцах плазмы крови мышей линии C57Bl/6J с LLC и мышей линии A/Sn с HA-1 из п. 2.2.9.6. Реакционную смесь, содержащую [<sup>32</sup>P]-РНК HIV-1 5000 имп/мин, 45 мкл плазмы, 100 мкг/мкл тРНК *E. coli*, инкубировали при 30 – 33 °С в течение 10 – 80 мин. Реакцию останавливали добавлением 45 мкл 0.6 М ацетата натрия, рН 5.2, содержащего 1 мкг тРНК *E. coli*, с последующей экстракцией фенолом, смесью фенол/хлороформ (v/v; 1/1) и хлороформом. Продукты расщепления осаждали добавлением 4-кратного объема 96%-ного этанола. Продукты расщепления РНК и ДНК анализировали электрофорезом в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях.

Эффективные константы скорости расщепления РНК в плазме, которые характеризуют суммарную РНКазную активность плазмы, получали с использованием уравнения  $P_t = P_\infty \cdot (1 - \exp^{-k_{\text{eff}} t})$  [537], где  $P_t$  и  $P_\infty$  соответствуют фракции субстрата, расщепленного в момент времени  $t$  и в конечной точке, соответственно.

### **2.2.11.3. Дизайн эксперимента для конструирования ДНК-библиотек на основе опухолевой и внРНК**

Трансплантацию LLC самкам линии C57Bl/6J проводили, как описано в п. 2.2.6.1. На четвертый день после трансплантации мышей делили на две группы: первая (контроль, n=30) получала инъекции физ/раствора в/м (0.1 мл); вторая группа (n=20) – РНКазу А в дозе 0.7 мкг/кг в/м (0.1 мл). Введение проводили по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв). На 15 день после трансплантации опухоли образцы первичной опухоли и кровь из ретро-орбитального синуса были собраны у всех животных обеих групп через 60 мин после последней инъекции РНКазы А.

### **2.2.11.4. Обработка образцов и выделение РНК**

Для исследования использовали материал, полученный от мышей C57Bl/6J с в/м трансплантированной LLC без лечения и мышей с LLC, получавших РНКазу А в дозе 0.7 мкг/кг по схеме, описанной в п. 2.2.9.5. Из образцов опухоли готовили первичные культуры, как описано в п. 2.2.3.1, и объединяли согласно группам непосредственно перед выделением РНК. Из крови готовили сыворотку, как описано в п. 2.2.4.1, и также объединяли согласно группам. Суммарную РНК выделяли из первичных культур опухолевых клеток, как описано в п. 2.2.5.1. внРНК выделяли из сыворотки крови, как описано в п. 2.2.5.2. Разделение выделенных РНК на фракции низкомолекулярных (<200 нк) и высокомолекулярных (>200

нк) РНК проводили, как описано в п. 2.2.5.4. В результате были получены следующие фракции РНК: фракции опухолевой РНК – фракция высокомолекулярных РНК, выделенная из опухолевой ткани контрольных мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора (RNA<sub>LTC</sub>); фракция высокомолекулярных РНК, выделенная из опухолевой ткани мышей с LLC, получавших инъекции РНКазы А (RNA<sub>LTR</sub>); фракция низкомолекулярных РНК, выделенная из опухолевой ткани контрольных мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора (RNA<sub>STC</sub>); фракция низкомолекулярных РНК, выделенная из опухолевой ткани мышей с LLC, получавших инъекции РНКазы А (RNA<sub>STR</sub>); фракции сывороточных РНК - фракция низкомолекулярных РНК, выделенная из сыворотки крови контрольных мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора (RNA<sub>SSC</sub>); фракция низкомолекулярных РНК, выделенная из сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции РНКазы А (RNA<sub>SSR</sub>). Целостность РНК в составе фракций (RIN, RNA integrity number) определяли путем анализа на приборе Agilent 2100 BioAnalyzer.

#### ***2.2.11.5. Приготовление библиотек низкомолекулярных РНК и секвенирование***

Библиотеки низкомолекулярных РНК готовили с помощью SOLiD™ small RNA expression kit (SREK) по модифицированному протоколу. Реактивы без указания концентрации или объема добавляли согласно протоколу фирмы-производителя. Для этого к фракциям РНК RNA<sub>STC</sub>, RNA<sub>STR</sub>, RNA<sub>SSC</sub>, и RNA<sub>SSR</sub> (по 100 нг каждой фракции) добавляли смесь адаптеров и Hybridization solution, инкубировали при 65 °С в течение 10 мин и при 16 °С в течение 5 мин в термоциклере. Далее добавляли Ligation buffer и Ligation Enzyme Mix (общий объем составил 20 мкл) и проводили реакцию лигирования при 4 °С в течение 16 ч в термоциклере. Далее в реакционную смесь вносили RT Buffer, 2.5 mM dNTP Mix и Aggray Script Reverse Transcriptase (общий объем составил 40 мкл) и проводили реакцию обратной транскрипции при 42 °С в течение 30 мин, после чего проводили обработку РНКазой H при 37 °С в течение 30 мин. Полученную кДНК хранили при -20 °С или сразу использовали для приготовления библиотек.

Аmplification библиотек проводили в реакционной смеси (объемом 100 мкл), содержащей полученную кДНК (1 мкл), PCR Buffer 1, SOLiD primers 1, 2.5 mM dNTP Mix и AmpliTaq. Условия амплификации были следующие: (1) 95 °С, 5 мин, 1 цикл; (2) 95 °С, 30 сек; 60 °С, 30 сек; 72 °С, 30 сек, 17 циклов; (3) 72 °С, 7 мин, 1 цикл. Полученные продукты разделяли с помощью гель-электрофореза в 6%-ном ПААГ и вырезали полосы, соответствующие длине 105-150 п.н. (библиотеки). Элюцию библиотек проводили путем нагревания при 70 °С в течение 5 мин и замораживания при -20 °С в течение 10 мин с последующей инкубацией в присутствии 3 М ацетата аммония при 45 °С в течение ночи. Обессоливание библиотек проводили с использованием QIAquick Gel Extraction Kit согласно

протоколу фирмы производителя. Концентрацию полученных библиотек определяли с помощью Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit согласно протоколу фирмы производителя. Отсутствие побочных продуктов амплификации короче 105 п.н. (так называемых, праймер-димеров) подтверждали анализом на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Подготовка библиотек к секвенированию и секвенирование было проведено к.б.н. Бреннером Е. В. (Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Приготовление частиц с иммобилизованными библиотеками, ПЦР в эмульсии и депонирование частиц проводили согласно стандартным протоколам SOLiD™ V3.5 (Applied Biosystems). Все четыре образца наносили на один слайд и секвенировали на приборе SOLiD™ 3.5. Длина прочтения составила 35 нк. Количество прочтений для библиотек составило  $7.17 \times 10^7$ ,  $5.14 \times 10^7$ ,  $4.26 \times 10^7$  и  $5.65 \times 10^7$ . Данные секвенирования были выложены в виде архива в базе NIH Short Read Archive (accession number SRP031771).

#### ***2.2.11.6. Статистическая обработка результатов секвенирования библиотек малых РНК***

Обработка данных секвенирования была проведена к.б.н. Курильщикова А. М. (Лаборатория молекулярной микробиологии, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Для определения дифференциальной экспрессии в библиотеках прочтения картировали на геном *Mus musculus* NCBI37.  $2.63 \times 10^7$ ,  $1.87 \times 10^7$ ,  $1.39 \times 10^7$  и  $1.78 \times 10^7$  RPKM (прочтений) соответственно библиотекам были уникально картированы на геном. Картирование проводилось с помощью ПО Bioscope v.1.3 (Life Technologies, USA). Аннотирование результатов, расчет покрытия (RPKM) и статистический анализ производился с использованием ПО Cufflinks v.2.0.1 (Center for Bioinformatics and Computational Biology, USA).

#### ***2.2.11.7. Приготовление библиотек полного транскриптома LLC и секвенирование***

Для приготовления библиотек полного транскриптома использовали фракцию высокомолекулярных РНК, выделенную из опухолевой ткани контрольных мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора (RNA<sub>LTc</sub>), и фракцию высокомолекулярных РНК, выделенную из опухолевой ткани мышей с LLC, получавших инъекции РНКазы А (RNA<sub>LTR</sub>). Целостность РНК в составе фракций (RIN) определяли путем анализа на приборе Agilent 2100 BioAnalyzer. Из фракций удаляли рибосомальные РНК, как описано в п. 2.2.5.4.

Библиотеки РНК готовили с помощью SOLiD™ whole transcriptome kit по модифицированному протоколу. Реактивы без указания концентрации или объема добавляли согласно протоколу фирмы-производителя. Фрагментацию РНКазой III проводили в

реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей по 350 нг фракций  $RNA_{LTC}$  или  $RNA_{LTR}$ , RNase III Buffer и РНКазу III, при 37 °С в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 180 мкл деионизованной воды milliQ, РНК высаживали 96%-ным этанолом в присутствии 0.3 М ацетата натрия, рН 5.2, и гликогена (150 мкг) при -20 °С в течение 18 ч. Для проведения реакции лигирования к фрагментированным фракциям  $RNA_{LTC}$  или  $RNA_{LTR}$  (по 70 – 100 нг каждой фракции) добавляли смесь адаптеров (Adapter Mix A) и Hybridization solution, инкубировали при 65 °С в течение 10 мин и при 16 °С в течение 5 мин в термоциклере. Далее добавляли Ligation buffer и Ligation Enzyme Mix (общий объем составил 20 мкл) и проводили реакцию лигирования при 4 °С в течение 16 ч в термоциклере. Обратную транскрипцию проводили, как описано в п. 2.2.10.5. Полученную кДНК хранили при -20 °С или сразу использовали для приготовления библиотек.

Аmplification библиотек проводили в реакционной смеси (объемом 100 мкл), содержащей полученную кДНК (1 мкл), PCR Buffer 1, SOLiD primers 1, 2.5 mM dNTP Mix и AmpliTaq. Условия амплификации были следующие: (1) 95 °С, 5 мин, 1 цикл; (2) 95 °С, 30 сек; 62 °С, 30 сек; 72 °С, 30 сек, 18 циклов; (3) 72 °С, 7 мин, 1 цикл. Полученные продукты обессоливали с помощью QIAquick Qiagen gel extraction kit, разделяли с помощью геле-электрофореза в 6%-ном ПААГ и вырезали полосы, соответствующие длине 150-200 п.н. (библиотеки). Каждую полосу разделяли на четыре фрагмента и два центральных фрагмента использовали для амплификации в тех же условиях в течение 15 циклов, после чего проводили повторное обессоливание. Концентрацию полученных библиотек определяли с помощью Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit. В результате было сконструировано две библиотеки:  $L_C$ , на основе фракции высокомолекулярных РНК из опухолевой ткани контрольных мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора ( $RNA_{LTC}$ ), и  $L_R$ , на основе фракции высокомолекулярных РНК, выделенных из опухолевой ткани мышей с LLC, получавших инъекции РНКазы А ( $RNA_{LTR}$ ).

Подготовку библиотек к секвенированию и секвенирование было проведено к.б.н. Бреннером Е.В. (Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Приготовление частиц с иммобилизованными библиотеками, ПЦР в эмульсии и депонирование частиц проводили согласно стандартным протоколам SOLiD™ V5.5 (Applied Biosystems). Образцы наносили на один слайд и секвенировали на приборе SOLiD™ 5.5. Данные секвенирования были выложены в виде архива в базе GEO Database (accession number GEO GSE63758).

#### **2.2.11.8. Картирование и аннотирование генов**

Картирование и аннотирование последовательностей было проведено к.б.н. Курильщиковым А. М. (Лаборатория молекулярной микробиологии, ИХБФМ СО РАН,

Новосибирск). Картирование полученных последовательностей в геноме *Mus musculus* genome (версия NCBI37) проводили с помощью программного обеспечения Bioscope software v.1.2 с использованием базовых параметров. Анализ дифференциальной экспрессии проводили с помощью пакета Cufflinks software v.2.0.1 [538].

Гены были аннотированы в терминах Gene Ontology с использованием системы классификации PANTHER. Картирование сигнальных путей проводили с использованием пакета Pathview для языка R. Перед началом картирования величины Log2fold RPKM для каждого гена были приведены к диапазону от -1 до 1. Последовательности генов были соотнесены с соответствующими сигнальными каскадами с помощью автоматического сервера аннотирования KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/kaas/>).

#### ***2.2.11.9. Исследование влияния каталитической активности РНКазы А на профиль миРНК в клетках LLC***

Приготовление первичной культуры клеток из солидной опухоли LLC проводили, как описано в п. 2.2.3.1. Клетки сажали в 6-луночный планшет в плотности of  $1.5 \times 10^6$  кл/лунку в среде IMDM, содержащей 10%-ную FBS и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика. К клеткам добавляли интактную РНКазу А или РНКазу А, инактивированную DEPC, до конечной концентрации  $10^{-8}$  М. Клетки инкубировали при 37 °С и 5%-ном CO<sub>2</sub> в течение 48 ч и далее выделяли РНК, как описано в п. 2.2.5.1. В итоге было получено три фракции суммарной РНК: (1) суммарная РНК из клеток LLC, обработанных физ/раствором (RNA<sub>Tc</sub>); (2) суммарная РНК из клеток LLC, обработанных интактной РНКазой А (RNA<sub>TR</sub>); (3) суммарная РНК из клеток LLC, обработанных инактивированной РНКазой А (RNA<sub>TRi</sub>).

#### ***2.2.11.10. Определение уровня экспрессии миРНК с помощью количественной stem-loop ПЦР***

Определение уровней миРНК проводили с помощью количественной stem-loop ПЦР [524, 539]. Реактивы без указания концентрации или объема добавляли согласно протоколу фирмы-производителя. Синтез кДНК проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 3 мкг суммарной РНК RNA<sub>STc</sub>, RNA<sub>STR</sub>, RNA<sub>Tc</sub>, RNA<sub>TR</sub>, RNA<sub>TRi</sub> или 0.25 мкг RNA<sub>SSc</sub> или RNA<sub>SSR</sub> (или суммарной РНК из независимого повторного эксперимента), First-Strand Buffer, по 0.5 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата, 10 мМ DTT, 200 ед. акт. обратной ревертазы SuperScript III и 0.05 мкМ миРНК-специфичных праймеров для обратной транскрипции (Таблица 4). RT праймеры предварительно нагревали при 70 °С в течение 5 мин и инкубировали по льду в течение 2 мин перед добавлением в реакционную смесь. Обратную транскрипцию проводили в следующих условиях: (1) 16 °С, 30 мин; (2) 30 °С, 30 сек, 42 °С, 30 сек, 50 °С, 30 сек, 60 циклов; (3) 85 °С, 5 мин. Амплификацию проводили в

реакционной смеси объемов 20 мкл, содержащей Advantage 2 Polymerase Mix, Advantage 2 PCR Buffer, по 0.6 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата, 1 × EvaGreen и по 0.2 мкМ прямого и обратного миРНК-специфичных праймеров (Таблица 5). Амплификацию проводили в следующих условиях: (1) 95 °С, 2 мин; (2) 94 °С, 15 сек; 58 °С, 30 сек для miR-21, miR-29b-1, let7-g, miR-10b, miR-451a, miR-17 и miR-18a, 40 циклов; (2) 94 °С, 15 сек; 62 °С, 30 сек для miR-145a and miR-31, 40 циклов; (3) 70 °С, 30 сек. Уровень экспрессии миРНК из опухолевой ткани нормализовали на уровень экспрессии *U6* и *rpl30*, концентрацию сывороточных миРНК нормализовали на объем сыворотки.

#### **2.2.11.11. Исследование изменений экспрессии генов *Drosha*, *Xpo5*, *Dicer1* и *Eif2c2* (*Argonaute 2* [*Ago2*]) методом количественной ПЦР**

Обратную транскрипцию проводили в реакционной смеси объемом 40 мкл, содержащей 5 мкг RNA<sub>LTc</sub>, RNA<sub>LTR</sub>, RNA<sub>Tc</sub>, RNA<sub>TR</sub> или RNA<sub>TRi</sub> (или суммарную РНК из независимого повторного эксперимента), ОТ-буфер, 10 мМ DTT, по 0.5 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата, 100 пмоль гексануклеотидного праймера и 20 ед. акт. M-MLV обратной транскриптазы, при 37 °С в течение 60 мин. Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 5 мкл кДНК (разведение 10<sup>-2</sup>), 0.5 ед. акт. AmpliTaq Gold, PCR Gold Buffer, 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 0.35 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата, 1 × EvaGreen и по 0.25 мкМ специфических прямого и обратного праймеров (Таблица 5). Амплификацию проводили в следующих условиях: (1) 94 °С, 6 мин; (2) 94 °С, 12 сек; 60 °С, 15 сек; 72 °С, 30 сек, 40 циклов. Уровень экспрессии генов нормализовали на уровень экспрессии генов *Hprt1* и *rpl30*. Относительную экспрессию генов считали с помощью программного обеспечения BioRad IQ5.

#### **2.2.11.12. Валидация данных секвенирования полного транскриптома с помощью количественной ПЦР**

Экспрессию генов *Dusp6*, *Fam89b*, *Map2k4*, *Mtap*, *Serpinf1* и *Angptl4* оценивали с помощью количественной ПЦР. Синтез кДНК проводили в реакционной смеси объемом 40 мкл, содержащей 5 мкг RNA<sub>LTc</sub> или RNA<sub>LTR</sub> (или суммарную РНК из независимого повторного эксперимента), ОТ-буфер, 10 мМ DTT, 0.5 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 100 пмоль гексануклеотидного праймера и 20 ед. акт. обратной транскриптазы M-MLV, при 37 °С в течение 60 мин. Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 5 мкл кДНК (разведение 10<sup>-2</sup>), 0.6 ед. акт. Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase, ПЦР буфер, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.2 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 1×EvaGreen и 0.25 мкМ специфических прямого и обратного праймеров (Таблица 5). Амплификацию проводили в следующих условиях: (1) 94 °С, 4 мин, 1 цикл; (2) 94 °С, 40 сек; 60 °С, 30 сек; 72 °С, 30 сек, 40 циклов, с последующим

определением точки плавления или кривых диссоциации. Уровень экспрессии генов определяли по количеству циклов с использованием стандартной кривой и нормализовали на уровень экспрессии генов *Hprt1* и *Ywhaz*. Относительную экспрессию генов определяли с помощью программного обеспечения BioRad IQ5.

## **2.2.12. Исследование противоопухолевого механизма действия ДНКазы I**

### **2.2.12.1. Определение концентрации внДНК в плазме крови**

Для забора крови использовали мышей линии C57Bl/6J с LLC и мышей линии A/Sn с НА-1 из п. 2.2.9.6. Забор крови проводили у следующих групп мышей: группа 1 - здоровые мыши линии C57Bl/6J (n=5); группы 2 и 3 - мыши линии C57Bl/6J на 12 и 18 дни развития LLC (n=5); группа 4 - мыши линии C57Bl/6J на 18 день развития LLC, получавшие ДНКазу I в дозе 0.12 мг/кг с восьмого дня после трансплантации опухоли. Забор крови был также проведен у таких же групп мышей линии A/Sn с НА-1. Плазму получали, как описано в п. 2.2.4.2. внДНК выделяли из плазмы крови и определяли их концентрацию, как описано в п. 2.2.5.3.

### **2.2.12.2. Определение суммарной ДНКазной активности плазмы крови**

Определение суммарной ДНКазной активности плазмы крови проводили в образцах плазмы крови мышей линии C57Bl/6J с LLC и мышей линии A/Sn с НА-1 из п. 2.2.9.6. Реакционную смесь, содержащую 45 мкл плазмы, 30 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5000 имп/мин [<sup>32</sup>P]-ДНК<sub>59</sub> и 10<sup>-6</sup> М ДНК<sub>59</sub>, инкубировали при 30 - 33 °С в течение 10 – 75 мин. Реакцию останавливали добавлением 40 мкл 0.3 М ацетата натрия, рН 5.2, содержащего 1 мкг ДНК<sub>59</sub>, с последующей экстракцией фенолом, смесью фенол/хлороформ (v/v; 1/1) и хлороформом. Продукты расщепления осаждали добавлением 4-кратного объема 96%-ного этанола. Эффективные константы скорости расщепления ДНК в плазме считали, как описано в п. 2.2.11.2.

### **2.2.12.3. Определение чувствительности клеток меланомы В16 к действию ДНКазы I**

Чувствительность клеток линии меланомы В16 к ДНКазе I определяли с помощью МТТ теста [536]. Для этого клетки высаживали в 96-луночный планшет по  $4 \times 10^4$  клеток на лунку в среде IMDM, содержащей 10%-ную FBS и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика. Через 24 ч среду заменяли на среду без сыворотки, добавляли ДНКазу I в диапазоне концентраций  $1 - 20 \times 10^3$  ед.акт./мл и инкубировали при 37 °С и 5%-ном CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. Далее к клеткам добавляли раствор МТТ до концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали в течение 3-4 ч в тех же условиях. Среду удаляли, образовавшиеся в клетках кристаллы формазана растворяли в 100 мкл DMSO и измеряли оптическую плотность по разности поглощения на длинах волн  $\Delta(\lambda_{570} - \lambda_{630})$  нм на многоканальном спектрофотометре

Multiscan RC (Labsystems, Финляндия). Данные представляли в виде процента живых клеток относительно контроля.

#### **2.2.12.4. Определение миграционной активности клеток меланомы B16 под действием ДНКазы I методом зарастания царапины (Scratch assay)**

Клетки меланомы B16 высевали в 6-луночный планшет таким образом, чтобы через 12 ч клеточная культура достигла состояния 95%-ного конфлюэнтного монослоя ( $1.5 \times 10^6$  клеток на лунку). В клеточном монослое наносили царапины носиком пипетки на 200 мкл шириной 0.5 мм, монослой трижды промывали PBS для удаления открепленных клеток и инкубировали в среде DMEM, содержащей ДНКазу I в концентрации  $0.1 - 3.0 \times 10^3$  ед.акт./мл, при 37 °C и 5%-ном насыщении CO<sub>2</sub> в течение 48 ч. Границы царапины маркировали и фотографировали зоны повреждения каждые 2 ч в течение двух суток с помощью микроскопа Zeiss Primo Vert (Zeiss, Германия). Длину зоны миграции оценивали, как разницу между границами царапин через 0 и 48 ч после нанесения повреждения. Площадь миграции оценивали, как отношение площади, заполненной клетками через 48 ч, к начальной площади царапины, относительно контроля. Скорость миграции клеток оценивали путём расчёта степени зарастания царапины по формуле:  $v = (1 - X) \times 100\%$ , где X – отношение свободной площади царапины через 2, 24 и 48 ч к первоначальной площади царапины. Для обчёта площади и длины миграции использовали программу ImageJ [540]. Для оценки статистической достоверности данных, полученных для контроля и каждой дозы ДНКазы I, получали фотографии в трёх независимых экспериментах, данные усредняли, приводили в виде MEAN±SEM.

#### **2.2.12.5. Дизайн эксперимента для конструирования ДНК-библиотек из внДНК**

Трансплантацию LLC самкам линии C57Bl/6J возрастом 10-14 недель проводили, как описано в п. 2.2.6.1. Мышей делили на две группы (n=10), и, начиная с четвертого дня после трансплантации, мыши получали следующие инъекции в/м: группа 1 (контроль) - физ/раствора (0.1 мл); 2 – ДНКазы I в дозе 0.12 мг/кг (0.1 мл). Введение проводили по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв). На 15 день после трансплантации опухоли собирали кровь из ретро-орбитального синуса у всех животных обеих групп через 60 мин после последней инъекции ДНКазы I.

#### **2.2.12.6. Обработка образцов и выделение внДНК**

Из крови готовили сыворотку, как описано в п. 2.2.4.1. внДНК выделяли из шести образцов каждой группы, как описано в п. 2.2.5.5, и объединяли согласно группам. Концентрацию ДНК измеряли, как описано в п. 2.2.5.5. В итоге было получено три фракции внДНК: внДНК<sub>н</sub> (внДНК из сыворотки крови здоровых мышей C57Bl/6J), внДНК<sub>LLC</sub> (внДНК

из сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора) и  $\text{внДНК}_D$  ( $\text{внДНК}$  из сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции ДНКазы I).

#### ***2.2.12.7. Приготовление ДНК библиотек из $\text{внДНК}$ и секвенирование***

Библиотеки  $\text{внДНК}$  готовили с помощью модифицированного протокола ABS SOLiD™ Fragment Library Construction Kit. Реактивы без указания концентрации или объема добавляли согласно протоколу фирмы-производителя.  $\text{внДНК}_h$ ,  $\text{внДНК}_{\text{LLC}}$  и  $\text{внДНК}_D$  (200 нг) озвучивали в деионизованной воде milliQ в объеме 50 мкл с помощью системы Covaris S2 при 30 °C в течение 155 сек. Для образования тупых концов фрагменты  $\text{внДНК}$  достраивали с помощью реакции лигирования. Для этого реакционную смесь объемом 100 мкл, содержащую озвученную  $\text{внДНК}$  (200 нг), End-Polishing Buffer, 2.5 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата, 20 ед. акт. End-Polishing Enzyme 1 и 40 ед. акт. End-Polishing Enzyme 2, инкубировали при 20 °C в течение 30 мин. Обессоливание библиотек проводили с использованием QIAquick Gel Extraction Kit. Лигирование с двуцепочечными адапторами проводили в реакционной смеси объемом 100 мкл, содержащей озвученную достроенную  $\text{внДНК}$  (200 нг), двуцепочечные адапторы 1 и 2, T4 ligase Buffer, 25 ед. акт. T4 ДНК лигазы, при 20 °C в течение 15 мин. Полученные продукты разделяли с помощью гель-электрофореза в 1.5%-ной LE-агарозе и вырезали полосы, соответствующие длине 150-250 п.н. (библиотеки). Элюцию библиотек проводили с использованием QIAquick Gel Extraction Kit.

Ник-трансляцию и амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 400 мкл, содержащей 2 нг ДНК, по 5 мкМ Primer 1 и Primer 2, 355 мкл Platinum PCR Amplification Mix, в следующих условиях: (1) 72 °C, 20 мин (ник-трансляция); (2) 95 °C, 5 мин (денатурация); (3) 95 °, 15 сек; 62 °C, 15 сек; 70 °C, 4 мин, 6 циклов; (4) 70 °C, 5 мин (снятие кривых плавления). Полученные продукты разделяли с помощью гель-электрофореза в 1.5%-ной LE-агарозе, вырезали полосы, соответствующие длине 150-250 п.н. (библиотеки), и элюировали, как описано выше. В результате было получено три библиотеки:  $L_h$  (из  $\text{внДНК}$  сыворотки крови здоровых мышей C57Bl/6J),  $L_{\text{LLC}}$  (из  $\text{внДНК}$  сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора) и  $L_D$  (из  $\text{внДНК}$  сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции ДНКазы I).

Секвенирование было проведено к.б.н. Бреннером Е. В. (Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Подготовку к секвенированию (иммобилизацию на магнитных частицах, ПЦР в эмульсии, обогащением частиц и модификацией 3'-концов) проводили с помощью стандартных протоколов ABS SOLiD™ 5.500. Секвенирование проводили на платформе ABS SOLiD™ 5.500 (длина фрагмента

прочтения 75 нк). Общий объем данных секвенирования составил не менее 50 млн последовательностей.

Данные секвенирования были выложены в базе NCBI BioProject (accession number PRJNA313482).

#### **2.2.12.8. Анализ данных секвенирования**

Первичная обработка данных секвенирования была проведена к.б.н. Курильщикова А. М. (Лаборатория молекулярной микробиологии, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Данные секвенирования были обработаны с помощью ПО Trimmomatic 0.32 [541]. Затем качество данных оценивали с помощью ПО FastQC. Данные картировали на референс, состоящий из 980 тандемных повторов генома *Mus musculus*, с использованием ПО Bioscope v.1.3. Для оценки покрытия опухоль-ассоциированных генов данные NGS картировали на геном *Mus musculus* (MM9) с помощью ПО Bioscope 1.3. Количество прочтений, картированных на экзоны генов *Hmga2*, *Fos*, *Myc*, *Nras* и *Jun*, было нормировано на общее количество прочтений в каждой библиотеке RPM.

#### **2.2.12.9. Определение уровня гена *Myc* методом количественной ПЦР**

Аmplификацию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 0.1 – 0.5 нг вДНК, SYBR-Green-containing BioMasterCor HS-qPCR и по 0.4 мкМ прямого и обратного специфических праймеров к *Myc* и  $\beta$ -актин-4 (Таблица 5). Условия реакции были следующие: (1) 95 °С, 6 мин; (2) 95 °С, 15 сек; 59 °С, 15 сек; 65 °С, 45 сек, 40 циклов. Уровень экспрессии гена *Myc* нормализовали на уровень экспрессии  $\beta$ -актина.

#### **2.2.12.10. Определение уровня *SINE* и *LINE* элементов в крови мышей C57B/6J с LLC и метастатической меланомой B16, получавших ДНКазу I**

Уровень *SINE* и *LINE* определяли среди вДНК, полученных из крови: (1) здоровых мышей C57B/6J; (2) мышей с в/м трансплантированной LLC; (3) мышей с в/м трансплантированной LLC, получавших ДНКазу I в дозе 0.12 мг/кг, как описано в п. 2.2.9.6; (4) мышей с в/в трансплантированной меланомой B16; (5) мышей с в/в трансплантированной меланомой B16, получавших ДНКазу I в дозе 0.12 мг/кг, как описано в п. 2.2.9.10. Кровь собирали через 60 мин после последней инъекции ДНКазы I. Сыворотку крови получали, как описано в п. 2.2.4.1. вДНК выделяли из сыворотки крови, как описано в п. 2.2.5.5.

Аmplификацию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 0.1 – 0.5 нг вДНК, SYBR-Green-containing BioMasterCor HS-qPCR и по 0.6 мкМ прямого и обратного специфических праймеров к B1\_mus1 (*SINE* элементы) и L1\_mus1 (*LINE* элементы) (Таблица 5). Условия реакции были следующие: (1) 95 °С, 6 мин; (2) 95 °С, 15 сек;

59 °С, 20 сек; 65 °С, 60 сек, 30 циклов. Уровень ДНК нормализовали относительно стартового количества вДНК.

### **2.2.13. Статистический анализ**

Все эксперименты *in vitro* проводили не менее, чем в трех повторах. Все эксперименты *in vivo* проводили не менее, чем в двух повторах.

Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Фишера (Fisher LSD) и критерия Тьюки (Tukey). Значение  $p \leq 0.05$  отражало статистически достоверные отличия. Для статистического анализа использовали программу STATISTICA 10.0.

**ГЛАВЫ 3 – 7. Подавление опухолевой прогрессии путем  
инактивации опухоль-ассоциированных нуклеиновых кислот и  
индукции специфического иммунного ответа (результаты и  
обсуждение)**

### **ГЛАВА 3. Противоопухолевые вакцины на основе модифицированных дендритных клеток, способных эффективно экспрессировать и презентировать опухолеспецифические антигены и запускать цитотоксический Т-клеточный ответ**

В настоящее время в терапии онкологических заболеваний особое место занимают методы, основанные на активации иммунной системы. Среди множества подходов выделяется использование вакцин на основе дендритных клеток (ДК), способных запускать и поддерживать опухолеспецифический Т- и В-клеточный иммунный ответ [542]. В последнее время ДК выступают в роли объектов, которые исследователи используют для нагрузки опухоль-ассоциированными антигенами. ДК способны их процессировать и презентировать на поверхности в комплексах с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) первого и второго типа наивным Т-клеткам. В результате чего происходит созревание и активация опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), способных мигрировать к опухоли и уничтожать опухолевые клетки. Помимо этого запускается ответ Т-хелперных клеток (Th-клеток) первого и второго типа, стимулирующий Т- и В-клеточные звенья противоопухолевого иммунного ответа.

Несмотря на то, что дендритно-клеточные вакцины широко исследуются *in vivo* и в клинике [47-49], остается ряд нерешенных вопросов. Так, известным фактом является уход опухоли от иммунного надзора в связи с подавлением микроокружением опухоли иммунной системы. Опухоль и ее микроокружение, в том числе опухоль-ассоциированные макрофаги и нейтрофилы, инфильтрирующие опухоль, продуцируют разнообразные цитокины и хемокины, которые препятствующие созреванию АПК, что приводит к подавлению их функциональной активности и, как следствие, к сдвигу Т-хелперного иммунного ответа  $Th2/Th17 > Th1$ . Th1-ответ является важным звеном противоопухолевого иммунитета, поскольку определяет дифференцировку цитотоксических Т-лимфоцитов из CD8<sup>+</sup> Т-клеток и, таким образом, определяет поляризацию ЦТЛ-ответа. Вакцины на основе ДК считаются одним из наиболее эффективных способов преодоления иммунодефицита с использованием собственных ресурсов организма в связи с их способностью поляризовать Т-хелперные ответы  $Th1 > Th2/Th17$ .

Поэтому в настоящее время крайне актуальной является разработка вакцин на основе ДК, позволяющих преодолевать вызванные опухолью иммунодефицитные состояния. Задачей настоящей главы являлась разработка и исследование новых дендритно-клеточных

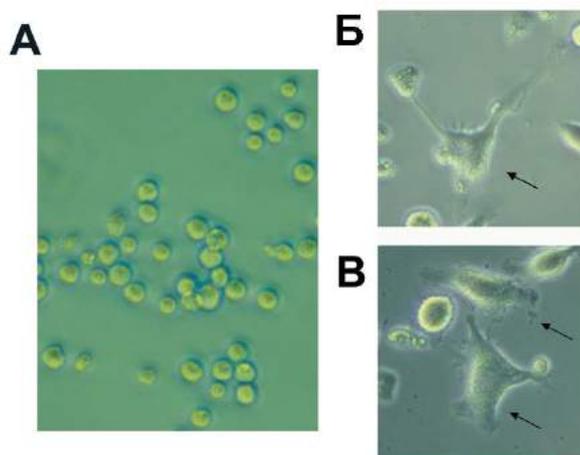
вакцин, основанная на принципе высокоэффективной и избирательной доставки опухолеспецифической РНК с помощью липосомальных композиций.

### 3.1. Выбор поликатионных липосом, эффективно доставляющих нуклеиновые кислоты в ДК

#### 3.1.1. Приготовление и характеристика ДК вакцин

В работе использовали костно-мозговые преДК и полученные из них незрелые ДК. ПреДК получали из клеток костного мозга мышей линии С57В1/6J с помощью центрифугирования на среде Histopaque-1083. CD11c<sup>+</sup> преДК изолировали путем иммуносорбции с помощью иммуномагнитных бус. Незрелые ДК получали культивированием преДК или CD11c<sup>+</sup> преДК в присутствии ИЛ-4 и ГМ-КСФ в течение шести дней (см. п. 2.2.3.3). ДК вакцину получали нагрузкой незрелых ДК ОАГ в виде опухолевого лизата (пассивным методом) или суммарной опухолевой РНК (в комплексах с катионными липосомами).

Степень зрелости ДК определяли по морфологическим характеристикам: наличию разветвленных отростков плазматической мембраны, так называемых дендритов. Как видно из Рис. 6А, костно-мозговые преДК представляли собой клетки небольшого размера округлой формы. В присутствии факторов созревания преДК претерпевают морфологические изменения с образованием незрелых ДК. Незрелые ДК значительно увеличиваются в размере в сравнении с преДК, и на их плазматической мембране появляются многочисленные дендриты (Рис. 6, Б, В). Таким образом, примененный протокол воспитания преДК приводит к образованию популяции незрелых ДК со всеми типичными морфологическими признаками этих клеток.



**Рис. 6.** Морфология костно-мозговых преДК сразу после выделения (А) и незрелых ДК на шестой день культивирования в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 (Б-В). Стрелками показаны ДК с отличительными морфологическими свойствами. Морфология клеток оценивалась с помощью фазово-контрастной микроскопии при увеличении 400×.

### **3.1.2. Методология, использованная для определения способности ДК активировать противоопухолевый ответ *ex vivo* и *in vivo***

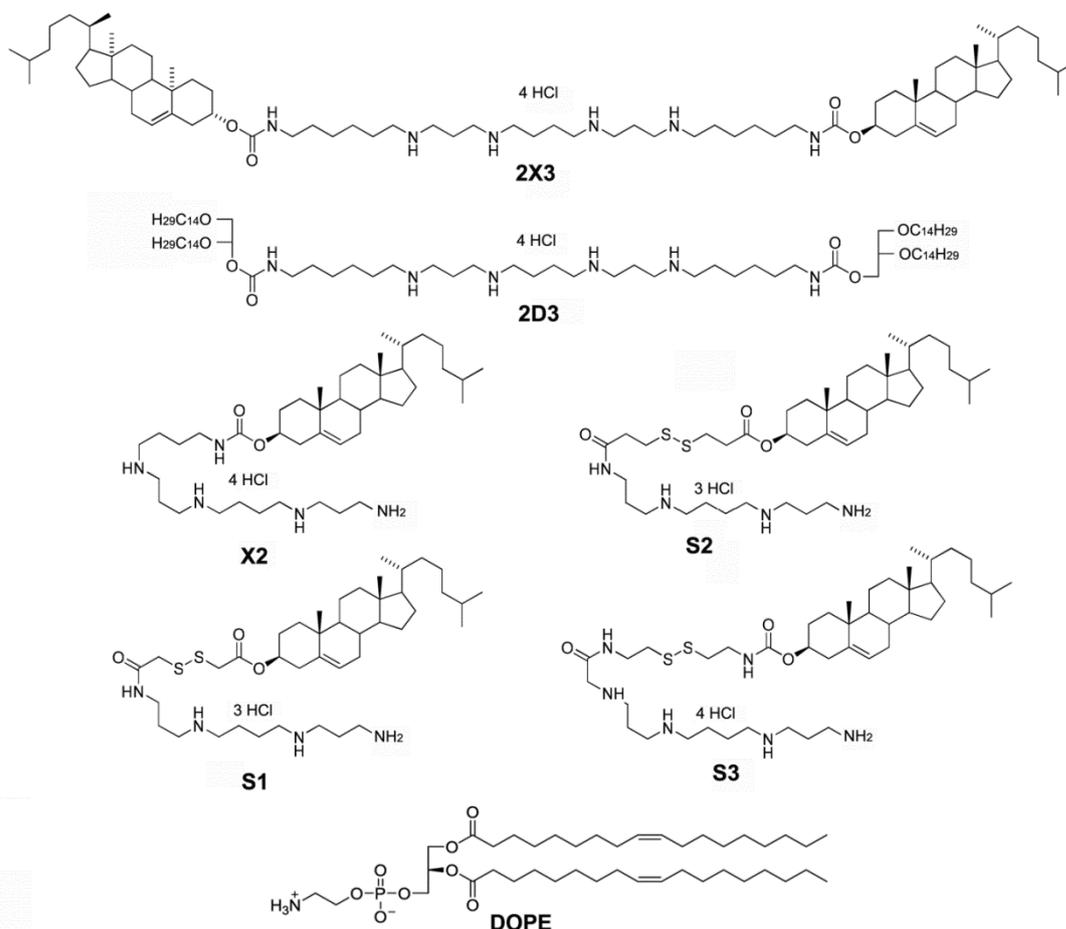
Способность модифицированных ДК запускать противоопухолевый ответ оценивали *ex vivo* по интенсивности противоопухолевого цитотоксического Т-клеточного ответа (ЦТЛ), запускаемого такими ДК, и *in vivo* по снижению размеров опухоли и количества метастазов у экспериментальных животных.

Для оценки интенсивности опухолеспецифического ЦТЛ ответа, запускаемого модифицированными ДК, из селезенок мышей, получавших внутривенные инъекции модифицированных ДК или липоплексов (комплексов липосом с суммарной опухолевой РНК), выделяли спленоциты, рестимулировали их с помощью различных ОАГ, таких как ДК, нагруженных суммарной опухолевой РНК или лизата опухолевых клеток. После рестимуляции опухолеспецифические ЦТЛ культивировали с опухолевыми клетками и оценивали интенсивность цитотоксического ответа с помощью МТТ-теста или в режиме реального времени. Противоопухолевый потенциал ДК, нагруженных ОАГ, оценивали *in vivo* по эффективности подавления роста опухоли и количества метастазов.

### **3.1.3. Поликатионные липиды и липосомы серии N-DOPE**

На первом этапе исследовали серию новых катионных липосом N-DOPE, состоящих из поликатионных липидов на основе остатков холестерина или диалкилглицерина, связанных со спермином, и липида-хелпера диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Структуры катионных липидов и их химические названия приведены на Рис. 7. Липиды были синтезированы и любезно предоставлены для работы к.х.н. Шмендель Е. В. и д.х.н. М. А. Масловым (МИРЭА, Москва). Все липиды состояли из биосовместимых и нетоксичных структурных элементов, таких как холестерин, диалкилглицерин и спермин. Поликатионные липиды содержали один (липиды X2, S1, S2 и S3) или два (2X3) остатка холестерина или диалкилглицерина (2D3), связанных со спермином. Катионные липосомы состояли из поликатионных липидов и цвиттерионного фосфолипида DOPE в молярном отношении 1:1, для которого были экспериментально показаны наибольшие уровни трансфекции [543, 544].

Липоплексы, т.е. комплексы, состоящие из липосом и ДНК или РНК, были приготовлены при разных соотношениях N/P (отношение количества аминогрупп катионных липидов к количеству фосфатных групп нуклеиновых кислот), поскольку ранее было показано, что данный параметр определяет эффективность трансфекции и специфичен для разных типов нуклеиновых кислот [545, 546].



**Рис. 7.** Структуры компонентов поликатионных липосом серии N-DOPE. 2X3 - 1,26-бис(холест-5-ен-3 $\beta$ -илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетразагексакозан тетрагидрохлорид; 2D3 - 1,26-бис(1,2-ди-О-тетрадецил-гас-глицерин)-7,11,16,20-тетразагексакозан тетрагидрохлорид; X2 - 1,17-диамино-*N*<sup>1</sup>-[(холест-5-ен-3 $\beta$ -ил)оксикарбонил]-5,9,14-триазагептадекан тетрагидрохлорид; S1 - (холест-5-ен-3 $\beta$ -ил)-19-амино-3,4-дитиа-6-оксо-7,11,16-триазадодеканаат тригидрохлорид; S2 - (холест-5-ен-3 $\beta$ -ил)-21-амино-4,5-дитиа-8-оксо-9,13,18-триазагенэйкозаноат тригидрохлорид; S3 - 1,22-диамино-*N*<sup>1</sup>-[(холест-5-ен-3 $\beta$ -ил)оксикарбонил]-3,4-дитиа-8-оксо-7,10,14,19-тетразадокозан тетрагидрохлорид, DOPE - 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин.

### 3.1.4. Исследование трансфекционной активности липосом серии N-DOPE по отношению к костно-мозговым преДК и незрелым ДК

Для оценки способности катионных липосом серии N-DOPE доставлять нуклеиновые кислоты в клетки была изучена доставка плазмидной ДНК pEGFP-C2, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (EGFP), и суммарной РНК из клеток ВНК IR-780, экспрессирующих EGFP (далее РНК-EGFP), в мышинные CD11c<sup>+</sup> преДК и незрелые ДК с помощью проточной цитометрии.

Липоплексы, состоящие из плазмидной ДНК pEGFP-C2 или РНК-EGFP и исследуемых катионных липосом, сформированные при различных соотношениях N/P, добавляли к

клеткам в среде IMDM без сыворотки с последующей инкубацией в полной среде IMDM (см. п. 2.2.7.2). Таким образом, эффективность доставки НК оценивали по эффективности внутриклеточного синтеза зеленого флуоресцентного белка, что позволяет оценить правильность внутриклеточной локализации доставляемой нуклеиновой кислоты и возможность процессинга синтезированного белка ДК. Количество трансфицированных клеток (количество EGFP-позитивных клеток в популяции) и интенсивность флуоресценции клеток оценивали методом проточной цитометрии.

Данные по эффективности доставки pEGFP-C2 с помощью липосом в преДК и незрелые ДК представлены в Таблице 6. Из представленных данных видно, что две липосомальные композиции 2X3-DOPE и 2D3-DOPE обладали высокой эффективностью трансфекции (TE), как с точки зрения количества трансфицированных клеток, так и интенсивности флуоресценции (MFI) (Таблица 6).

**Таблица 6.** Доставка pEGFP-C2 с помощью катионных липосом серии N-DOPE в костно-мозговые преДК и незрелые ДК.

N/P	Липосомы	Флуоресцентные клетки (TE, %) / Интенсивность флуоресценции (MFI, RFU)			
		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 цвиттерионного фосфолипида DOPE в молярном отношении 1:1. Количество флуоресцентных клеток и интенсивность флуоресценции оценивали через 48 ч после трансфекции. Уровень трансфекции pEGFP-C2 с помощью Lipofectamine 2000 (LF) использовали в качестве контроля. Данные представлены в виде MEAN. Значения S.E.M. не превышали 10%. «-» - не проводили исследование.

Заметная эффективность доставки была показана для липосом X2-DOPE и S2-DOPE. Липосомальные композиции S1-DOPE и S2-DOPE показали низкий уровень трансфекции. Увеличение соотношения N/P приводило к повышению эффективности трансфекции для липосом 2X3-DOPE, 2D3-DOPE, X2-DOPE и S2-DOPE, в то время как липосомы S1-DOPE и S3-DOPE во всем интервале соотношений трансфицировали менее 10% преДК и обеспечивали уровень флуоресценции клеток схожий с уровнем, наблюдаемым для Lipofectamine 2000. Для липосом 2X3-DOPE, 2D3-DOPE и X2-DOPE была также показана эффективная доставка pEGFP в незрелые ДК (Таблица 6).

В Таблице 7 показана эффективность доставки РНК-EGFP с помощью катионных липосом в преДК и незрелые ДК. Оказалось, что те же липосомальные композиции, что опосредовали эффективную доставку плазмидной ДНК, за исключением X2-DOPE, эффективно доставляли РНК-EGFP в преДК: 2X3-DOPE, 2D3-DOPE и S2-DOPE. Эти же

**Таблица 7.** Доставка РНК-EGFP с помощью катионных липосом в костно-мозговые преДК и незрелые ДК.

	Липосомы	Флуоресцентные клетки (TE, %) / Интенсивность флуоресценции (MFI, RFU)	
		1/1	2/1
преДК	LF	0.1 / 0.3	
	2X3-DOPE	14.1 / 2.2	29.6 / 3.0
	2D3-DOPE	11.7 / 1.5	37.8 / 5.9
	X2-DOPE	8.6 / 0.04	58.4 / 1.4
	S1-DOPE	2.5 / 0.1	6.3 / 0.3
	S2-DOPE	6.3 / 0.4	31.5 / 3.5
	S3-DOPE	2.1 / 0.2	31.8 / 0.3
	незрелые ДК	LF	-
2X3-DOPE		-	33.6 / 4.2
2D3-DOPE		-	49.4 / 3.2
X2-DOPE		-	58.8 / 1.5
S2-DOPE		-	44 / 3.9

Липосомы состояли из поликатионных липидов и цвиттерионного фосфолипида DOPE в молярном отношении 1:1. Количество флуоресцентных клеток и интенсивность флуоресценции оценивали через 48 ч после трансфекции. Уровни трансфекции РНК-EGFP с помощью Lipofectamine 2000 (LF) использовали в качестве контроля. Данные представлены в виде MEAN. Значения S.E.M. не превышали 10%. «-» - не проводили исследование.

липосомальные композиции обеспечивали эффективную доставку РНК-EGFP в незрелые ДК (Таблица 7). Липосомы S1-DOPE доставляли РНК-EGFP в преДК с наименьшей эффективностью.

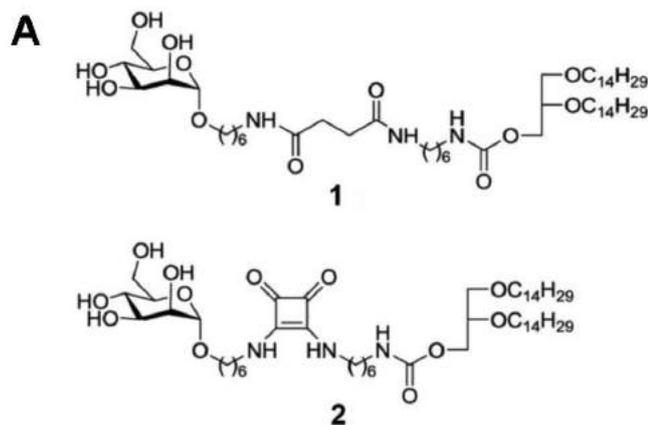
Поликатионные липиды 2X3 и 2D3 могут быть классифицированы как гемини-сурфактанты – соединения, в которых два гидрофобных домена симметрично соединены посредством жесткого или гибкого линкеров с гидрофильными катионными концевыми группами. Гемини-сурфактанты хорошо зарекомендовали себя для доставки нуклеиновых кислот в клетки и демонстрировали средний или высокий уровень трансфекционной активности [547]. 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. Так липосомы 2X3-DOPE с двумя остатками холестерина показали существенно более высокую эффективность трансфекции по сравнению с липосомами X2-DOPE, содержащими один остаток холестерина.

### **3.1.5. Мультикомпонентные поликатионные липосомы серии МЛ, содержащие адресные конструкции**

Для разработки композиций, способных направленно (таргетно) доставлять нуклеиновые кислоты в интересующие клетки и органы, используют стратегию сборки катионных липосом с введением в их состав липофильных молекул, содержащих лиганды, способные с высокой эффективностью взаимодействовать с поверхностными рецепторами клеток-мишеней. ДК и макрофаги экспрессируют лектиновый рецептор, способный узнавать углеводы, включая маннозу, на клеточных стенках инфекционных агентов (бактерии, грибы, вирусы и т.д.) [548]. Было показано, что введение остатков маннозы в химические вектора приводит к увеличению эффективности доставки нуклеиновых кислот в ДК [549, 550] и индукции противоопухолевого ответа [551, 552]. Такая селективная доставка ОАГ в ДК позволяет увеличить концентрацию ОАГ на поверхности ДК и усилить презентацию антигенов эффекторным клеткам.

Для конструирования таргетных липосом использовали принцип модульности, основанный на сборке липосом из нескольких компонентов, включая основной трансфекционный липид, липид-хелпер DOPE и липоконъюгаты, содержащие в своем составе остатки маннозы. В качестве основы для разработки таргетных маннозилированных липосом (серия МЛ), адресованных к лектиновым рецепторам ДК, в качестве коровых липосом были выбраны липосомы 2X3-DOPE, которые при доставке как ДНК, так и РНК,

показали лучшее соотношение TE / MFI. Липосомы 2D3-DOPE не были выбраны по причине присутствия в их структуре остатков диалкилглицерина, которые могут затруднять сборку целевых липосом или снижать их стабильность. Структуры компонентов МЛ представлены на Рис. 8.



**Б**

Процентное содержание липида	M1	M2	M3	M4	M5	M6
2X3	48.25	47.5	45	48.25	47.5	45
DOPE	48.25	47.5	45	48.25	47.5	45
<b>1</b>	2.5	5	10	-	-	-
<b>2</b>	-	-	-	2.5	5	10

**Рис. 8. А.** Структуры липоконъюгатов, входящих в состав липосом серии МЛ. **Б.** МЛ состояли из катионного липида 2X3, липида-хелпера DOPE (1 : 2 мол. отношение) и маннозилированных липоконъюгатов **1** (1-[6-( $\alpha$ -D-маннопиранозилокси)гексил]амино-4-{6-[*rac*-2,3-ди(тетрадецилокси)проп-1-илоксикарбониламино]гексил}аминобутан-1,4-дион, липосомы M1, M2 и M3) и **2** (3-[6-( $\alpha$ -D-маннопиранозилокси)гексил]амино-4-{6-[*rac*-2,3-ди(тетрадецилокси)проп-1-илоксикарбониламино]гексил}аминоциклобут-3-ен-1,2-дион, липосомы M4, M5 и M6), взятых в молярном отношении 2.5, 5 и 10%, соответственно.

Маннозилированные липосомы состояли из липидов 2X3 и DOPE (1:2 мол. отношение) с добавлением 2.5, 5 или 10% мол. маннозилированных липоконъюгатов **1** (липосомы M1, M2, M3, соответственно) или **2** (липосомы M4, M5, M6, соответственно) (Рис. 8). Маннозилированные липоконъюгаты состояли из биосовместимых компонентов и содержали остаток D-маннозы, соединенный с диалкилглицерином через сукцинильный (липоконъюгат **1**) или сквартный (липоконъюгат **2**) линкеры, отличающиеся друг от друга пространственной структурой и гибкостью (Рис. 8).

Анализ физикохимических свойств липосом серии МЛ показал, что средний диаметр липосом M1 – M6 больше, чем у коровых липосом 2X3-DOPE. Липосомы M1 – M3, 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 коровых липосом 2X3-DOPE (первичные данные не приведены).

При добавлении к липосомам как серии N-DOPE, так и серии МЛ, плазмидной ДНК происходило постепенное уменьшение их среднего размера, коррелирующее с увеличением соотношения N/P (до 57 нм при N/P 10/1). Исследованные липоплексы, сформированные при низких соотношениях N/P 2/1 и 1/1, имели отрицательный поверхностный заряд, который становился положительным при увеличении N/P до 4/1. Следует отметить, что при высоких соотношениях N/P (8/1 и 10/1) формировались очень компактные липоплексы с высоким положительным зарядом.

### 3.1.6. Исследование специфичности взаимодействия липосом серии МЛ с аналогом маннозного рецептора конканавалином А

Для оценки доступности маннозы в составе липосом серии МЛ была исследована агглютинация МЛ с КонА, который является растительным аналогом маннозного рецептора и имеет в своей структуре четыре сайта связывания остатков D-маннозы [553, 554]. В Таблице 8 представлены эффективные константы скорости формирования комплексов с КонА, которые фактически отражают способность липосом серии МЛ связываться с лектиновыми рецепторами АПК. Все липосомы серии МЛ эффективно связывались с КонА. С увеличением количества маннозилированных липоконъюгатов **1** или **2** в составе МЛ с 2.5% мол. до 10% мол. эффективная константа скорости  $k$  увеличивалась (Таблица 8). Коровые липосомы 2X3-DOPE также характеризовались высокой константой связывания,

**Таблица 8.** Эффективные константы скорости формирования комплексов КонА-липосомы ( $k$ ).

Липосомы	$k^*, \text{с}^{-1}$
2X3	$(8.7 \pm 0.2) \times 10^{-3}$
М1	$(3.0 \pm 0.1) \times 10^{-3}$
М2	$(5.2 \pm 0.2) \times 10^{-3}$
М3	$(11.1 \pm 0.3) \times 10^{-3}$
М4	$(3.6 \pm 0.1) \times 10^{-3}$
М5	$(6.8 \pm 0.1) \times 10^{-3}$
М6	$(7.4 \pm 0.3) \times 10^{-3}$

\* Для расчета  $k$  использовали формулу:

$T(t) = a + be^{-kt}$ , где  $k$  – эффективная константа скорости образования комплексов,  $t$  – время.

несмотря на отсутствие остатков маннозы в их составе, по всей вероятности, за счет электростатических взаимодействий (Таблица 8). Таким образом, все исследуемые МЛ специфично связываются с аналогом маннозного рецептора и могут быть использованы для рецептор-опосредуемой доставки ОАГ в ДК.

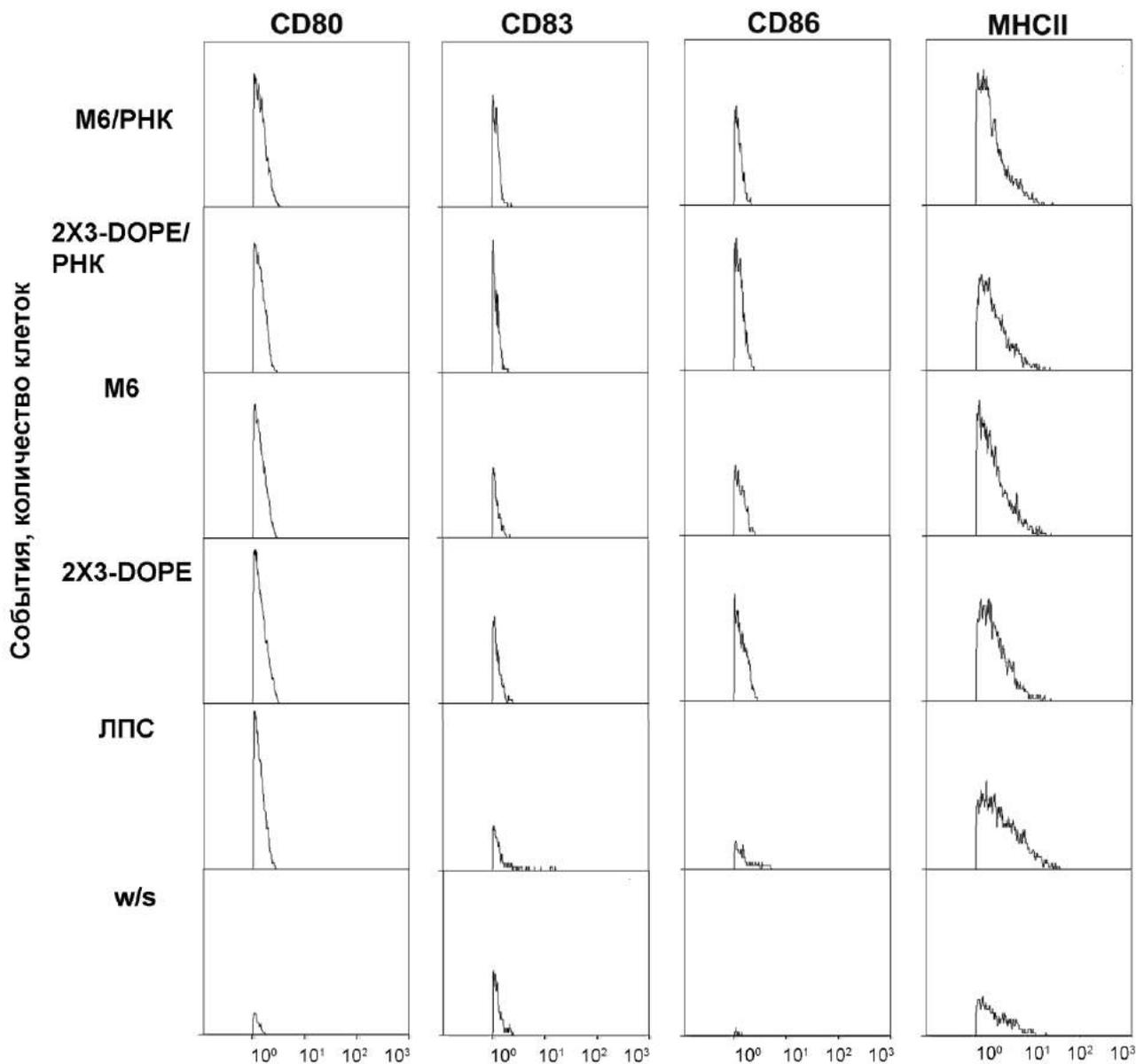
### **3.1.7. Определение плотности маннозных рецепторов на поверхности ДК и оценка маркеров созревания ДК**

Для исследования эффективности трансфекции плазмидной ДНК и РНК с помощью адресных липосом серии МЛ в преДК и незрелые ДК в популяции CD11c<sup>+</sup> клеток вначале оценили содержание маннозных рецепторов на поверхности клеток и экспрессию маркеров созревания ДК CD80, CD83, CD86 и МНС II. Количество CD11c<sup>+</sup> клеток среди общей популяции преДК составило 6.8%. На шестой день созревания в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 культура незрелых ДК уже содержала около 54% CD11c<sup>+</sup> клеток. Содержание маннозных рецепторов на поверхности преДК и незрелых ДК определяли путем окрашивания mAb к CD206: согласно полученным данным около 4% преДК и 45% незрелых ДК экспрессируют на своей поверхности маннозные рецепторы CD206.

Зрелые ДК получали путем обработки незрелых ДК липосомами 2X3-DOPE и М6 или их липоплексами с РНК-В16 и оценивали фенотип зрелых ДК по уровням экспрессии маркеров созревания CD80, CD83, CD86 и МНС II (Рис. 9). В качестве положительного контроля использовали ДК, обработанные ЛПС (100 нг/мл, 24 ч). Оказалось, что обработка ДК не нагруженными липосомами приводит к увеличению плотности маркеров созревания на поверхности ДК даже в большей степени, чем их обработка ЛПС (Рис. 9, панели ЛПС, 2X3-DOPE и М6, все маркеры). При обработке ДК липоплексами 2X3-DOPE/РНК-В16 и М6/РНК-В16 происходило значительное увеличение плотности CD83 и CD86 на поверхности ДК по сравнению с ДК, обработанными только липосомами. Таким образом, наши данные показали, что как пустые липосомы, так и липосомы, нагруженные РНК, стимулируют созревание ДК в отсутствие каких-либо дополнительных факторов.

### **3.1.8. Исследование трансфекционной активности маннозилированных липосом по отношению к преДК и незрелым ДК**

Эффективность трансфекции плазмидной ДНК pEGFP-C2 и РНК в комплексах с МЛ в преДК и незрелые ДК представлена в Таблицах 9 и 10. При соотношении N/P 1/1 и 2/1, когда заряды липоплексов являются отрицательными, нейтральными или умеренно положительными, большой вклад в эффективность трансфекции по нашим предположениям



**Рис. 9.** Экспрессия маркеров созревания на поверхности ДК после их инкубации в присутствии липосом 2X3-DOPE, М6 и липоплексов 2X3-DOPE/PHK, М6/PHK. PHK – суммарная PHK клеток меланомы В16; w/s – ДК без стимуляции (негативный контроль); ЛПС – ДК, обработанные ЛПС (положительный контроль). ДК были окрашены анти-CD80 (PE), анти-CD83 (PE), анти-CD86 (FITC), анти-МНС II (FITC) mAb и проанализированы с помощью проточной цитометрии.

будет вносить рецептор-опосредованная доставка. Из представленных данных видно, что при N/P 1/1 и 2/1 интенсивность флуоресценции преДК, опосредованная экспрессией EGFP, в 1.1 – 1.5 раза выше для липосом М1, М2, М3 и М6 по сравнению с липосомами 2X3-DOPE (Таблица 9). Тем не менее, интенсивность флуоресценции и, что более важно, количество EGFP-положительных клеток, слишком малы (до 0.7 RFU и 12%, соответственно), что, по всей вероятности, связано с низкой плотностью маннозных рецепторов на поверхности преДК.

Таблица 9. Доставка рEGFP-C2 в преДК и незрелые ДК с помощью липосом серии МЛ.

N/P	Липосомы <sup>1)</sup>	Флуоресцентные клетки (TE, %) / Интенсивность флуоресценции (MFI, RFU) <sup>2)</sup>					
		1/1	2/1	4/1	6/1	8/1	10/1
преДК	LF	4.6 / 0.1					
	2X3-DOPE	10.0 / 0.3	11.7 / 0.4	15.3 / 1.5	23.7 / 1.3	25.1 / 1.4	37.1 / 1.5
	M1	11.3 / 0.4	13.3 / 0.6	17.9 / 1.3	25.5 / 1.2	25 / 1.5	35.7 / 1.6
	M2	11.1 / 0.4	16.2 / 0.8	22.0 / 1.1	24.6 / 1.2	21.3 / 1.3	25.7 / 1.7
	M3	12.4 / 0.5	13.8 / 0.8	20.6 / 1.0	22.9 / 1.1	19.3 / 1.0	18.2 / 1.0
	M4	7.1 / 0.2	9.1 / 0.3	20.0 / 1.2	24.9 / 1.2	31.7 / 1.2	41.1 / 1.5
	M5	7.5 / 0.2	9.2 / 0.2	21.4 / 1.1	28.8 / 1.2	38.2 / 1.1	51.8 / 1.4
	M6	11.5 / 0.4	16.5 / 0.7	24.7 / 1.0	28.1 / 1.2	33.4 / 1.4	47 / 1.5
незрелые ДК	LF	-	-		-	-	
	2X3-DOPE	-	-	21.3 / 1.2	-	30 / 1.4	33.4 / 1.4
	M1	-	-	21 / 1.2	-	35.2 / 1.4	37 / 1.3
	M2	-	-	15.2 / 1.0	-	32.2 / 1.4	31.6 / 1.2
	M3	-	-	13.6 / 0.8	-	34.3 / 1.4	37.8 / 1.4
	M4	-	-	23.4 / 1.2	-	32.6 / 1.3	29.5 / 1.2
	M5	-	-	24.1 / 1.3	-	32.8 / 1.4	29.4 / 1.2
	M6	-	-	20 / 1.0	-	35.7 / 1.3	36.8 / 1.3

<sup>1)</sup>Липосомы серии МЛ состояли из липида 2X3 и липида-хелпера DOPE в молярном отношении 1:2, а также липоконъюгатов 1 или 2, содержащих остатки маннозы. <sup>2)</sup> Уровень трансфекции рEGFP-C2 (количество флуоресцентных клеток и интенсивность флуоресценции) оценивали через 48 ч после трансфекции по уровню экспрессии зеленого флуоресцентного белка. Уровень трансфекции рEGFP-C2 с помощью Lipofectamine 2000 (LF) и коровых липосом 2X3-DOPE использовали в качестве контроля. Данные представлены в виде MEAN. Значения S.E.M. не превышали 10%.

Липоплексы, сформированные при высоких соотношениях N/P (от 4/1 до 10/1), имеют большой положительный заряд, поэтому при доставке рEGFP в клетки основной вклад будет определяться электростатическими взаимодействиями между положительно заряженными липоплексами и отрицательно заряженной клеточной мембраной ДК. Действительно, при данных N/P разница в эффективности трансфекции между контрольными липосомами 2X3-DOPE и МЛ не превышала 10% (Таблица 9). При увеличении соотношения N/P наблюдалось повышение эффективности трансфекции как с точки зрения количества трансфицированных преДК, так и интенсивности флуоресценции. При высоких N/P липосомы М4, М5 и М6 в 1.2 – 1.4 раза более эффективно доставляли рEGFP в преДК по сравнению с коровыми липосомами 2X3-DOPE и М1 – М3 (Таблица 9), однако интенсивность флуоресценции клеток была примерно одинакова для всех липосом (Таблица 9).

Данные по доставке pEGFP с помощью МЛ в незрелые ДК с большим содержанием маннозных рецепторов показали, что при соотношении N/P 4/1 МЛ обладали одинаковыми или более низкими (для липосом М2 и М3) уровнями ТЕ по сравнению с коровыми липосомами 2X3-DOPE (Таблица 9). При увеличении N/P наблюдалось увеличение трансфекционной активности для всех липосом (Таблица 9).

Доставку РНК-EGFP в комплексах с МЛ осуществляли при низких соотношениях N/P 1/1 и 2/1 (Таблица 10), при которых главным механизмом трансфекции будет рецептор-опосредованный эндоцитоз. Из представленных данных видно, что при N/P 1/1 липосомы М3 наиболее эффективно доставляли РНК-EGFP в преДК по сравнению с другими МЛ и коровыми липосомами 2X3-DOPE (Таблица 10). Другие липоплексы МЛ/РНК-EGFP,

**Таблица 10.** Доставка РНК-EGFP в преДК и незрелые ДК с помощью липосом серии МЛ.

N/P	Липосомы <sup>1)</sup>	Флуоресцентные клетки (ТЕ, %) / Интенсивность флуоресценции (MFI, RFU) <sup>2)</sup>	
		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

<sup>1)</sup> Липосомы серии МЛ состояли из липида 2X3 и липида-хелпера DOPE в молярном отношении 1:2, а также липоконъюгатов **1** или **2**, содержащих остатки маннозы. <sup>2)</sup> Уровень трансфекции РНК-EGFP (количество флуоресцентных клеток и интенсивность флуоресценции) оценивали через 48 ч после трансфекции по уровню экспрессии зеленого флуоресцентного белка. Уровень трансфекции pEGFP-C2 с помощью Lipofectamine 2000 (LF) и коровых липосом 2X3-DOPE использовали в качестве контроля. Данные представлены в виде MEAN. Значения S.E.M. не превышали 10%.

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 10).

Доставка РНК-EGFP в незрелые ДК с помощью МЛ при соотношении N/P 2/1 показала, что липосомы М1, М4 – М6 обладали высоким уровнем ТЕ, сравнимым с 2X3-DOPE (Таблица 10), 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.

Следует отметить, что доставка РНК-EGFP с помощью МЛ как в преДК, так и в незрелые ДК была более эффективной по сравнению с доставкой рEGFP-C2. Это можно объяснить свойствами РНК: молекулы РНК меньше по размеру и более гибкие по сравнению с пДНК, что обусловило более легкую компактизацию РНК в липоплексы. Кроме того, в случае с РНК необходима лишь доставка в цитозоль, тогда как пДНК должна быть доставлена в ядро.

Липоплексы МЛ с ДНК, как и липосомы 2X3-DOPE/ДНК, сформированные при высоких соотношениях N/P, несут положительный заряд и взаимодействуют с клетками, в основном, за счет электростатических взаимодействий с отрицательно заряженной клеточной мембраной, а не за счет взаимодействия с маннозными рецепторами, или вклад такого взаимодействия очень небольшой. Напротив, при низких N/P липоплексы имеют отрицательный заряд или близкий к нейтральному, и в этом случае вклад рецептор-опосредованного эндоцитоза становится основным. Именно при низких соотношениях N/P (1/1 и 2/1) для всех липосом серии МЛ наблюдался выигрыш в трансфекционной эффективности в сравнении с коровыми липосомами 2X3-DOPE. Однако значение ТЕ при доставке ДНК в ДК при таких соотношениях были слишком низки для того, чтобы достичь необходимые уровни нагрузки ДК *in vitro*. Таким образом, введение в состав липосом 2X3-DOPE маннозилированных липоконъюгатов не привело к существенному увеличению эффективности доставки ДНК в преДК и незрелые ДК *in vitro*. Возможно, это связано с тем, что сама по себе коровая липосомальная композиция 2X3-DOPE уже обеспечивала очень высокие уровни доставки рДНК в ДК, и на этом уровне вклад рецептор-опосредованной доставки был небольшим.

Иная картина наблюдается для РНК (Таблица 10). По сравнению с коровыми липосомами 2X3-DOPE при доставке РНК в составе липоплексов серии МЛ в незрелые ДК хотя и не наблюдалось выигрыша в количестве флуоресцентных клеток, тем не менее, интенсивность флуоресценции превышала таковую для коровых липосом, что говорит о

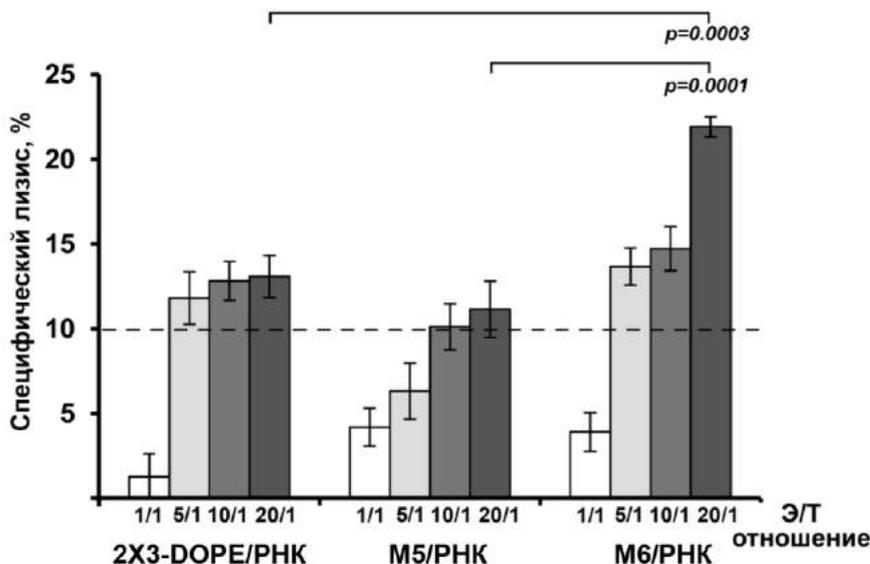
более высоком уровне экспрессии трансгена и указывает на существенный вклад рецептор-опосредованной доставки.

### **3.2. Исследование противоопухолевого потенциала ДК, нагруженных комплексами опухолевой РНК и катионных липосом**

#### **3.2.1. 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 [555]. Уникальная способность ДК заключается в активации  $CD4^+$  Т-хелперов и  $CD8^+$  ЦТЛ, таким образом, в определении направленности противоопухолевых иммунных реакций.

Преимущество адресных конструкций для доставки нуклеиновых кислот в АПК 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 2X3-DOPE/РНК-В16, М5/РНК-В16 и М6/РНК-В16 вводили внутривенно здоровым мышам линии С57В1/6J (см. п. 2.2.7.10). В качестве контроля использовали пустые липосомы 2X3-DOPE. На седьмой день после введения липоплексов получали первичные культуры спленоцитов, проводили их рестимуляцию с помощью лизата клеток меланомы В16 в присутствии ИЛ-2 в течение четырех дней и оценивали их цитотоксичность против клеток меланомы В16 с помощью МТТ-теста (Рис. 10). Из рисунка видно, что интенсивность ЦТЛ ответа в случае липоплексов РНК с коровыми липосомами 2X3-DOPE и липосомами М5, содержащих 5% мол. маннозилированных липоконъюгатов **2** со сквартным линкером статистически значимо не отличалась от уровня лизиса под действием непраймированных спленоцитов (базовая линия, 7 – 10% клеток, Рис. 10). В случае липосом М6, содержащих 10% мол. маннозилированных липоконъюгатов **2** со сквартным линкером, наблюдался специфический лизис клеток меланомы В16, который был в 2.2 и 1.7 раз выше по сравнению с непраймированными спленоцитами и липосомами 2X3-DOPE, соответственно (при соотношении эффекторные клетки / таргетные клетки = 20 / 1), при этом отличия были статистически достоверны. Следует отметить, что интенсивность ЦТЛ ответа в случае праймирования Т-клеток под действием пустых липосом 2X3-DOPE, не содержащих РНК,



**Рис. 10.** Лизис клеток меланомы В16 под действием спленоцитов, праймированных липоплексами 2X3-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 Опти-МЕМ (контроль), уровень базовой линии не превышал 7-10%. Э/Т соотношение эффекторные клетки (спленоциты) / таргетные клетки (клетки В16). Статистический анализ проводили с помощью т-теста Стьюдента. Данные представлены как MEAN±S.E.M.

статистически значимо не отличалась от уровня лизиса под действием непраймированных спленоцитов (первичные данные не приведены).

Полученные данные показали, что липосомы М6 при введении в организм праймируют опухолеспецифические ЦТЛ с эффективностью, в два раза превышающей эффективность липосом 2X3-DOPE. Таким образом, адресные липосомы, демонстрируя примерно 1.1-1.5-кратный выигрыш в доставке РНК в ДК *in vitro* по сравнению с липосомами 2X3-DOPE, имеют двукратный выигрыш в праймировании ЦТЛ на уровне организма, по всей вероятности, за счет вовлечения в этот процесс не только ДК, но и других АПК, в частности, макрофагов.

### 3.2.2. Бесклеточные вакцины - комплексы липосом М6 с РНК, сравнимые по эффективности с ДК-вакцинами

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 комплексов липосом с опухолевой РНК в организм-опухоленоситель липосомам необходимо

сначала найти и трансфицировать ДК, которые, в свою очередь, далее будут праймировать ЦТЛ.

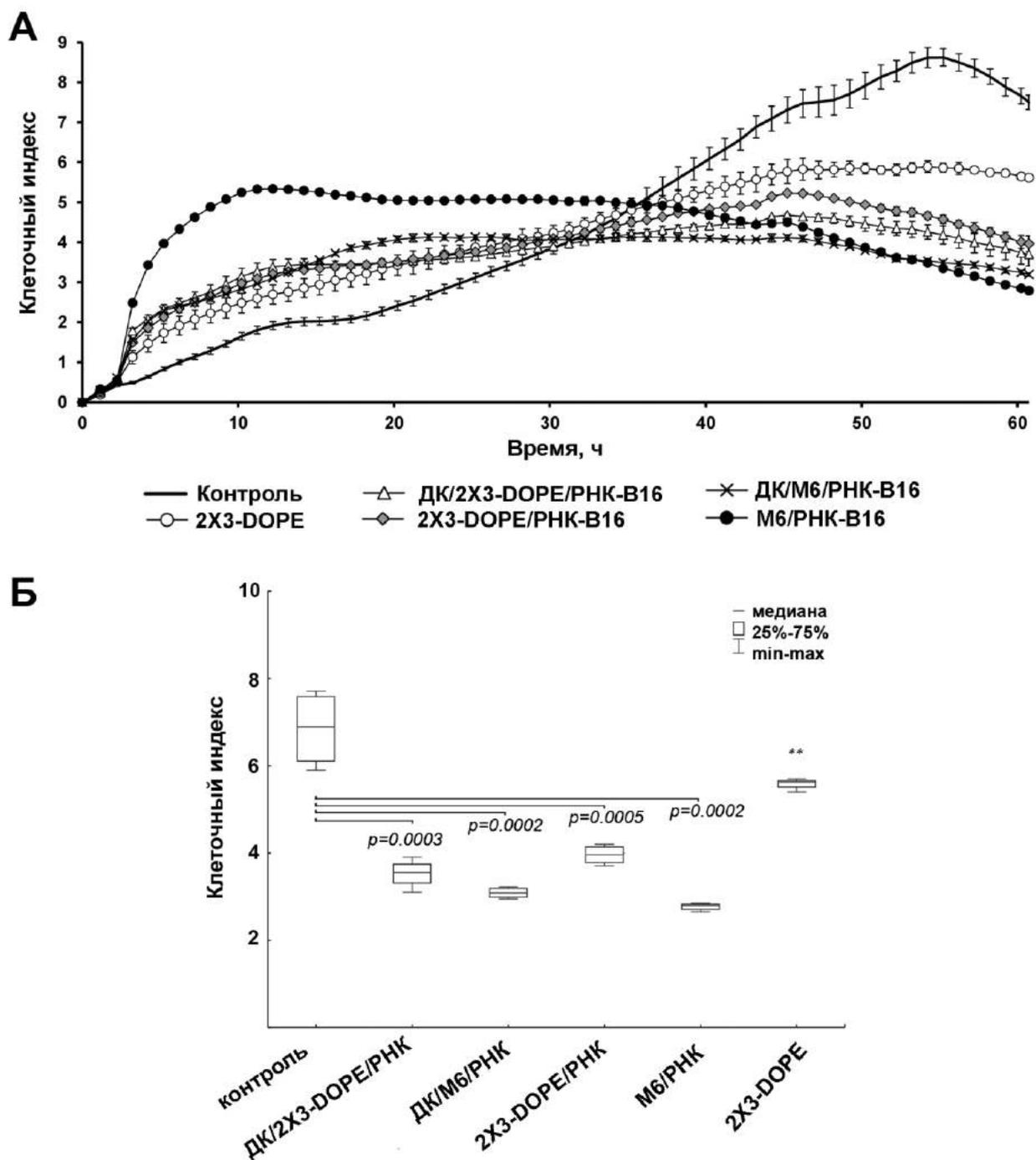
С целью сравнения эффективности праймирования ЦТЛ под действием липосом и ДК мышам линии C57Bl/6J трансплантировали клетки меланомы В-16 и в/в вводили комплексы липосом 2Х3-DOPE или М6 с РНК-В16, либо классические ДК-вакцины, где ДК были трансфицированы данными липоплексами *ex vivo* (п. 2.2.7.12). Из селезенки экспериментальных животных получали спленоциты и рестимулировали их клетками меланомы В16, обработанными митомицином С. Эффективность противоопухолевых ЦТЛ оценивали по способности уничтожать клетки меланомы В16 *in vitro* в режиме реального времени (Рис. 11, А).

Внутривенное введение животным с меланомой как липоплексов, так и ДК-вакцин, инициировало активацию ЦТЛ (Рис. 11, А, Б). Липоплексы М6/РНК активировали наиболее эффективные ЦТЛ, которые снижали количество клеток меланомы В16 в 2.7 раза относительно контроля через 60 ч совместной инкубации ЦТЛ с опухолевыми клетками (Рис. 11, А, Б). И эффективность липоплексов М6/РНК была сравнима с эффективностью ДК-вакцин, нагруженных комплексами такого же состава (Рис. 11, А). Липоплексы 2Х3-DOPE/РНК В16, как интактные так и в составе ДК-вакцины, были менее эффективны по сравнению с липоплексами и ДК-вакциной на основе липосом М6 (Рис. 11, А).

Липосомы 2Х3-DOPE, не содержащие РНК, также влияли на активацию опухолеспецифических ЦТЛ, что выражалось в снижении количества клеток меланомы в 1.3 раз относительно контроля, однако снижение было статистически недостоверным. Такая неспецифическая активация ЦТЛ может быть обусловлена, прежде всего, тем, катионные липосомы, неся большую плотность положительного заряда, распознаются толл-подобными рецепторами иммунокомпетентных клеток как патогенные агенты, что и приводит к некоторой активации иммунной системы [556].

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

Одним из главных вопросов нашего исследования был вопрос, насколько эффективны ДК-вакцины, полученные путем трансфекции ДК липоплексами опухолевой РНК с липосомами серии N-DOPE и МЛ, в индукции противоопухолевого ответа *in vivo*. Для исследования противоопухолевого потенциала ДК, трансфицированных комплексами липосом с суммарной опухолевой РНК, использовали метастатическую модель меланомы, формирующую первичного опухолевого узла и характеризующуюся метастазами в легких.



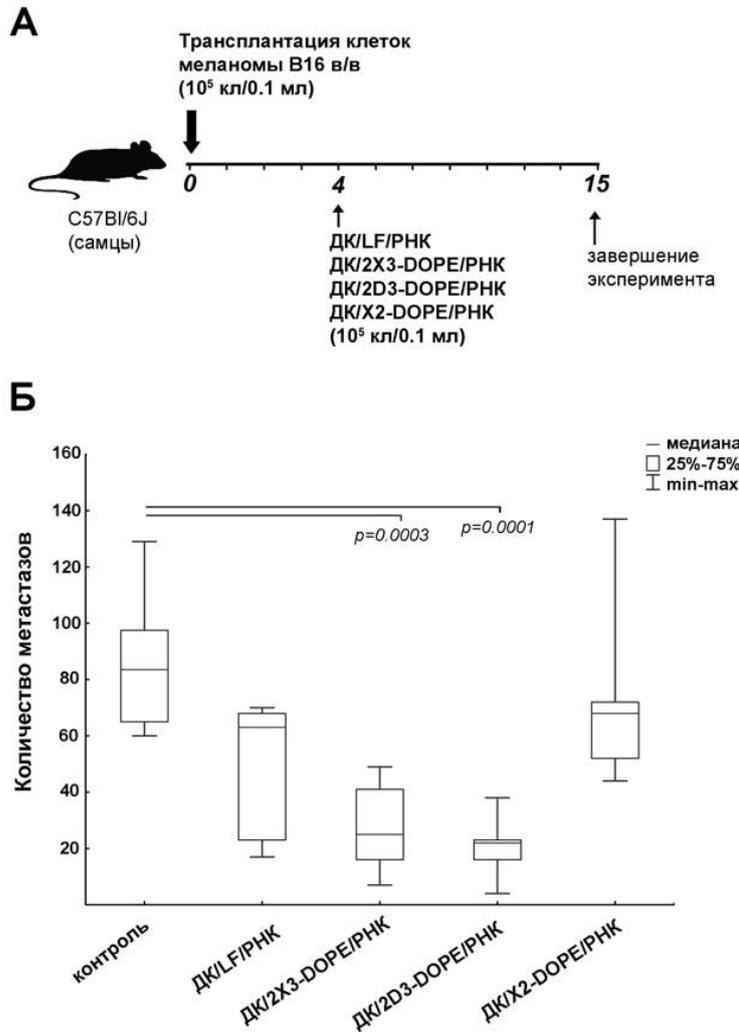
**Рис. 11.** Цитотоксическое действие спленоцитов мыши, индуцированных *in vivo* под действием ДК, нагруженных РНК-В16 в комплексах с липосомами 2X3-DOPE или М6, и комплексов липосом с РНК-В16, против клеток меланомы В16. **А.** Оценку жизнеспособности клеток меланомы В16 проводили в реальном времени с помощью прибора xCELLigence (“ACEA Biosciences”, США). Данные представлены как средний клеточный индекс  $\pm$  стандартное отклонение. **Б.** Диаграмма типа «ящик с усами», отражающая медианное значение клеточного индекса на время окончания эксперимента (60 ч). Статистическая обработка данных была проведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки. Значение  $p$  отражает статистически достоверные отличия по сравнению с контролем, \*\* - статистически недостоверные отличия по сравнению с контролем.

Для исследования из серии липосом N-DOPE были выбраны липосомы 2X3-DOPE, 2D3-DOPE и X2-DOPE, продемонстрировавшие высокую эффективность доставки РНК в незрелые ДК *in vitro*. В качестве источника ОАГ для нагрузки незрелых ДК использовали суммарную РНК, выделенную из клеток меланомы В16 (РНК-В16). Клетки меланомы В16 трансплантировали в/в мышам линии С57В1/6J и на четвертый день после трансплантации мышам в/в однократно вводили ДК, нагруженные липоплексами 2X3-DOPE/РНК-В16, 2D3-DOPE/РНК-В16 или X2-DOPE/РНК-В16 (п. 2.2.7.8). В качестве контроля сравнения использовали мышей-опухоленосителей, получавших инъекции физ/раствора, и мышей, получавших инъекции ДК, трансфицированных РНК-В16 с помощью Lipofectamine 2000.

На Рис. 12 приведено количество поверхностных метастазов в легких мышей с меланомой после лечения. Медианное количество метастазов в группе мышей, которым вводили ДК, нагруженные LF/РНК-В16, составило 63, что в 1.3 раза ниже по сравнению с контролем, получавшим физ/раствор (медиана 84). Введение животным ДК, трансфицированными липоплексами 2X3-DOPE/РНК-В16 и 2D3-DOPE/РНК-В16, привела к значительному снижению количества легочных метастазов (Рис. 12): 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, нагруженные LF/РНК-В16. ДК, нагруженные X2-DOPE/РНК-В16, незначительно снижали количество легочных метастазов (медиана 68), однако отличия были статистически недостоверны.

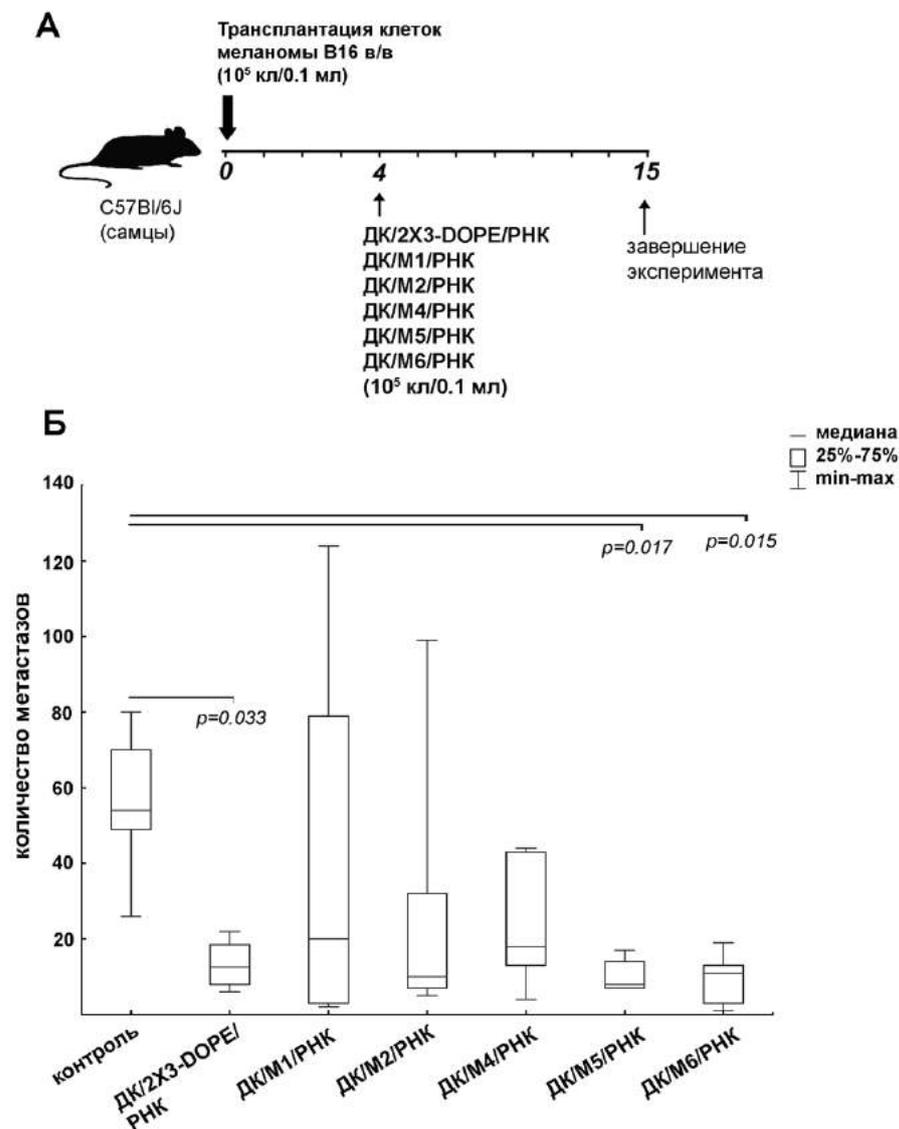
Интересным фактом является то, что эффективность трансфекции липосомами и уровень флуоресценции трансфицированных ими клеток не очевидно коррелирует с антиметастатическим эффектом ДК, нагруженных липосомами. Так, по соотношению TE/MFI преимущество имели липосомы 2D3-DOPE > 2X3-DOPE (Таблица 7). Тем не менее, антиметастатический эффект ДК/2X3-DOPE был сравним с ДК/2D3-DOPE. Однако, ДК, нагруженные липосомами X2-DOPE, которые имели самое лучшее соотношение TE/MFI (Таблица 7), практически не ингибировали развитие метастазов.

Для исследования антиметастатической активности ДК, нагруженных липосомами серии МЛ в комплексе с опухолевой РНК, были выбраны липосомы 2X3-DOPE, М1, М2, М4, М5 или М6. Липосомы М3 не исследовали в эксперименте *in vivo* вследствие низкой эффективности трансфекции в экспериментах *in vitro*. Микроскопическое исследование поверхности легких показало, что иммунизация мышей ДК, трансфицированными липоплексами 2X3-DOPE/РНК-В16, М5/РНК-В16 и М6/РНК-В16, приводило к значительному снижению количества легочных метастазов (Рис. 13).



**Рис. 12.** Подавление метастазов на модели меланомы В16 с помощью ДК, трансфицированных липосомами серии N-DOPE в комплексе с опухолевой РНК. **А.** Схема эксперимента. **Б.** Количество поверхностных метастазов в легких мышей с меланомой В16 после введения ДК, нагруженных РНК-В16 в комплексах с катионными липосомами серии N-DOPE. Диаграмма типа “ящик с усами”, 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.

Медианное количество метастазов в группах мышей, получавших лечение ДК, нагруженными липоплексами 2Х3-DOPE/РНК-В16, составило 13 и было в 4.2 раза ниже по сравнению с контролем ( $p=0.033$ , Рис. 13). Липоплексы М5/РНК-В16 и М6/РНК-В16 более эффективно снижали количество метастазов: медианное количество составило 8 и 11, соответственно, что в 6.7 и 5 раз ниже по сравнению с контролем ( $p=0.017$  и  $p=0.015$ ,



**Рис. 13.** Подавление метастазов на модели меланомы В16 с помощью ДК, трансфицированных липосомами серии МЛ в комплексе с опухолевой РНК. **А.** Схема эксперимента. **Б.** Количество метастазов у животных с меланомой В16 после введения ДК, нагруженных РНК-В16 в комплексах с МЛ. Диаграмма типа “ящик с усами”, отражающая медианное значение. Статистический анализ был проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием наименьшей значимости Фишера (Fisher LSD). Значение  $p$  отражает статистически достоверные отличия по сравнению с контролем.

Рис. 13). Для мышей, получавших инъекции ДК, трансфицированных липоплексами М4/РНК-В16, медианное количество метастазов составило 18 и было в 3 раза ниже по сравнению с контролем ( $p=0.035$ , Рис. 13). В группе мышей, получавших ДК, нагруженные липоплексами М1/РНК-В16 или М2/РНК-В16, медианное количество метастазов снижалось (20 и 10, соответственно), тем не менее, большой разброс значений внутри групп показал, что снижение статистически недостоверно.

Как и в случае липосом серии N-DOPE не наблюдалось прямой корреляции между эффективностью трансфекции липосомами и уровнем флуоресценции трансфицированных

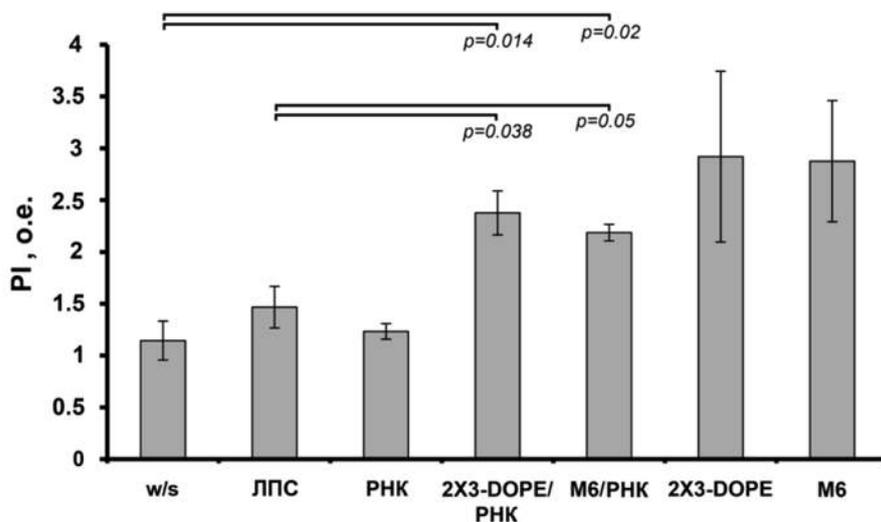
ими клеток с антиметастатическим эффектом ДК. Так, ДК, нагруженные липосомами М5 и М6, имеющими схожее соотношение ТЕ/МFI (Таблица 10), которая была сравнима с 2Х3-DOPE (Таблица 10), подавляли метастазы с самой высокой эффективностью. Тем не менее, липосомы М1, имеющие самое лучшее соотношение ТЕ/МFI, обладали наименьшей антиметастатической эффективностью (Таблица 10, Рис. 13).

Таким образом, из серии адресных липосом МЛ липосомы М5 и М6 являются лучшими кандидатами для приготовления опухолеспецифических ДК-вакцин *ex vivo*.

#### **3.2.4. Исследование аллостимуляторной активности ДК, нагруженных комплексами МЛ с РНК-В16**

Поскольку ДК, трансфицированные М5/РНК-В16 и М6/РНК-В16, продемонстрировали высокую эффективность в запуске антиметастатического ответа на модели меланомы В16 *in vivo*, а сами липоплексы при введении *in vivo* вызывали индукцию высокоэффективных ЦТЛ, была оценена такая важная характеристика, как способность липоплексов влиять на способность ДК стимулировать пролиферацию спленоцитов. Влияние липосом на стимуляторную способность ДК исследовали в реакции аллогенных смешанных лимфоцитов *in vitro* (Рис. 14). Для этого ДК, нагруженные липоплексами 2Х3-DOPE/РНК-В16 или М6/РНК-В16, ко-культивировали с аллогенными спленоцитами и через 24 ч оценивали их пролиферацию. Оказалось, что ДК, нагруженные липоплексами 2Х3-DOPE/РНК-В16 или М6/РНК-В16, обладали высокой стимуляторной активностью и усиливали пролиферацию спленоцитов в 1.9 – 2 раза по сравнению с нестимулированными ДК и с ЛПС (Рис. 14). ДК, обработанные пустыми липосомами 2Х3-DOPE или М6, также стимулировали пролиферацию спленоцитов, однако отличия были статистически недостоверны (Рис. 14).

Несмотря на то, что различия в стимуляторной активности не нагруженных липосом 2Х3-DOPE и М6 находились на границе статистической достоверности, тем не менее, они продемонстрировали высокий уровень стимуляции пролиферации спленоцитов. Способность повышать пролиферацию спленоцитов была показана и для некоторых других типов липосом. Так было показано, что липосомы на основе катионного липида 3β-N-(диметиламиноэтил)карбамата с холестерином при подкожном введении стимулируют пролиферацию спленоцитов в организме мыши [557]. Полученные нами данные указывают на потенциальную возможность использования липоплексов с опухолеспецифической РНК в качестве бесклеточных вакцин, то есть, минуя стадию приготовления ДК-вакцин, для индукции специфического противоопухолевого ответа в организме.



**Рис. 14.** Индекс пролиферации (PI) спленоцитов после стимуляции ДК, нагруженными липоплексами. Для стимуляции аллогенных спленоцитов были использованы незрелые ДК, обработанные РНК-В16, липоплексами 2X3-DOPE/РНК-В16 или М6/РНК-В16, пустыми липосомами 2X3-DOPE или М6. В качестве отрицательного контроля использовали уровень PI под действием нестимулированных незрелых ДК (w/s), в качестве положительного контроля использовали уровень PI под действием ДК, обработанных ЛПС. Спленоциты ( $1 \times 10^5$  кл/лун) культивировали в 96-луночном планшете в присутствии  $10^4$  стимуляторных клеток при  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  в течение 5 дней. Уровень пролиферации (PI) спленоцитов в отсутствие стимуляторных ДК взят за 1 относительную единицу (о.е.). Данные были статистически обработаны с помощью т-теста Стьюдента, отличия при  $p < 0.05$  считали статистически достоверными. Данные представлены как  $\text{MEAN} \pm \text{S.E.M.}$

### 3.3. Эффективность профилактических и терапевтических дендритно-клеточных вакцин в подавлении прогрессии экспериментальных опухолей

ДК наиболее часто используют в противоопухолевой терапии в качестве терапевтических вакцин [558]. Для приготовления терапевтических вакцин из мононуклеарных клеток периферической крови и/или костного мозга пациента выделяют преДК и инкубируют в присутствии ростовых факторов для получения незрелых ДК. После нагрузки незрелых ДК опухолевыми антигенами (нуклеиновыми кислотами, белками, лизатами опухолевых клеток и т.д.) *ex vivo* их вводят обратно пациенту, где ДК мигрируют в периферические лимфатические узлы и селезенку и инициируют активацию противоопухолевого Т- и В-клеточного иммунного ответа. Этот метод хорошо известен и широко используется [48, 559] для лечения диагностированных опухолей.

ДК в качестве профилактических противоопухолевых вакцин исследуется, прежде всего, на мышинных опухолевых моделях. Использование профилактических вакцин

необходимо в случае, когда наличие опухоли еще не установлено в организме пациента, однако, существует значительный риск ее развития. Профилактические вакцины могут быть также полезны для пациентов с высокими уровнями опухолевых маркеров в крови. Помимо пациентов с предрасположенностью к опухолевым заболеваниям, профилактические ДК вакцины в комплексе с химиотерапией могут иметь потенциальное значение после хирургического удаления опухолей и метастазов, когда визуально наличие опухолевых клеток в организме трудно установить.

Несмотря на то, что были получены многообещающие результаты при использовании ДК в качестве противоопухолевых профилактических вакцин в экспериментах на мышинных опухолевых моделях *in vivo* при лечении карциномы легких Льюис [560], лимфомы [561] и меланомы [562, 563], направление профилактических дендритно-клеточных вакцин только начинает развиваться.

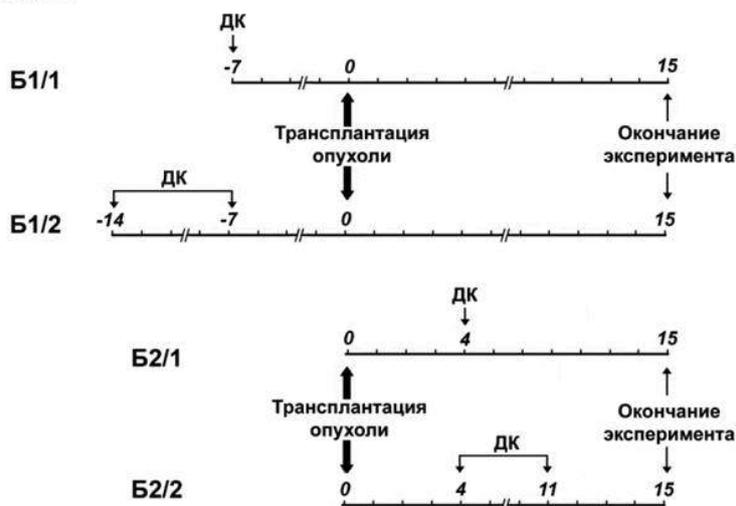
В данном разделе проведено сравнение двух схем лечения животных с различными модельными опухолями с помощью профилактических и терапевтических ДК вакцин.

### **3.3.1. Экспериментальные модели и схемы введения ДК-вакцин.**

В работе использовали три различные модели опухолевой прогрессии, отличающиеся наличием первичных опухолевых узлов и метастазированием: аденокарциному Кребс-2 (далее Кребс-2, неметастазирующая опухоль с первичным узлом), меланому В16 (опухоль без первичного опухолевого узла с метастазами в легких) и карциному легких Льюис (LLC, опухоль с первичным опухолевым узлом и метастазами в легких).

ДК вакцины получали из костно-мозговых преДК культивированием в среде в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 с последующей нагрузкой незрелых ДК ОАГ. В качестве ОАГ для нагрузки ДК использовали источники множества опухолевых антигенов, а именно лизат опухолевых клеток и суммарную опухолевую РНК. Данные источники опухолевых антигенов были выбраны, поскольку они содержали максимальный набор антигенов, представленных в опухолевых клетках, и, таким образом, при их нагрузке в ДК существовала возможность запуска поликлональных иммунных ответов широкого спектра [564, 565]. В качестве трансфектантов для доставки РНК в ДК использовали Lipofectamine 2000 (LF) и катионные липосомы 2D3-DOPE, чей высокий трансфекционный потенциал был продемонстрирован ранее (см. раздел 3.2).

Экспериментальные схемы введения ДК вакцин представлены на Рис. 15. Схема 1 (Рис. 15, А1, Б1/1, Б1/2) отражает режим профилактической вакцинации. В моделях опухолей

**А. Модели Кребс-2, LLC****Б. Модель V16**

**Рис. 15.** Схемы применения ДК вакцин в терапии экспериментальных опухолей. (А) Аденокарцинома Кребс-2 и карцинома легких Льюис (LLC). (Б) Меланома V16. А1, Б1/1, Б1/2 – Схема 1, профилактическая схема введения ДК. А2, Б2/1, Б2/2 – Схема 2, терапевтическая схема введения ДК. В модели меланомы V16 использовали как однократные (Б1/1, Б2/1), так и двукратные (Б2/1, Б2/2) инъекции модифицированных ДК.

Кребс-2 и карциномы легких Льюис (LLC) мыши были однократно в/в иммунизированы ДК вакцинами за семь дней до трансплантации опухоли. В модели меланомы V16 использовали одну (Рис. 15, Б1/1) или две ДК вакцинации (Рис. 15, Б1/2) с недельным интервалом между ними – начальную иммунизацию проводили за две недели до трансплантации опухоли, ревакцинацию осуществляли за неделю до трансплантации опухоли. Схема 2 (Рис. 15, А2, Б2/1, Б2/2) отражает режим терапевтического введения ДК вакцин. Животные-опухоленосители получали в/в инъекции ДК вакцин на четвертый день после трансплантации опухоли, ревакцинацию мышей в модели меланомы V16 проводили на 11-ый день развития опухоли, через неделю после первой ДК вакцинации (Рис. 15).

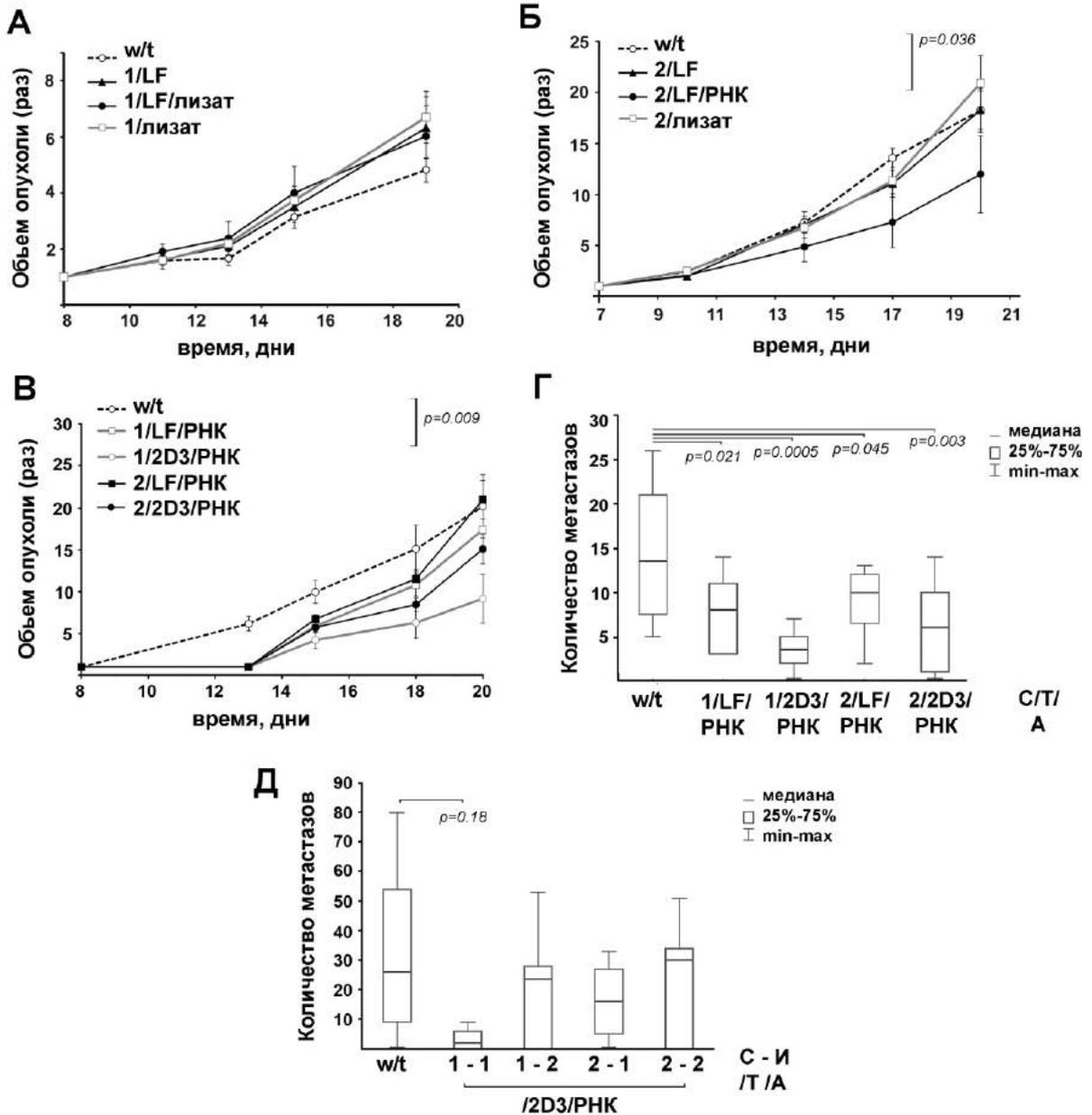
### 3.3.2. Сравнение противоопухолевой активности профилактической и терапевтической схем применения ДК на различных опухолевых моделях

Эффективность противоопухолевого ответа при профилактической и терапевтической ДК вакцинации представлена на Рис. 16. Тип вакцины для моделей Кребс-2 и LLC приведен как С/Т/А – схема (1 – профилактическая, 2 – терапевтическая)/трансфектант/источник антигена, для модели меланомы В16 тип вакцины приведен как С-И/Т/А – схема (1 – профилактическая, 2 – терапевтическая) – количество иммунизаций /трансфектант / источник антигена.

Мы показали, что в случае опухоли Кребс-2 профилактические вакцины как на основе РНК, так и на основе лизата не влияли на рост опухоли (Рис. 16, 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 без лечения (w/t), тогда как терапевтическая вакцина на основе лизата (2/лизат) была лишь слабо иммуногенной (Рис. 16, 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 сравнению с контролем (Рис. 16, В). В этой же группе животных наблюдался и наиболее эффективный антиметастатический ответ – снижение количества легочных метастазов в 4.7 раз относительно контрольной группы (Рис. 16, Г). Терапевтическая вакцинация мышей-опухоленосителей такой же вакциной (2/2D3/РНК) приводила к 2.3-кратному снижению количества метастазов по сравнению с контролем (Рис. 16, Г), однако не вызывала подавления роста первичной опухоли (Рис. 16, 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. 16, Г).

На модели меланомы В16 использовали как одно-, так и двукратную вакцинацию ДК (Рис. 15, Б1/2, Б2/2). В качестве ДК вакцин использовали ДК, трансфицированные липоплексами РНК-В16/2D3-DOPE. Оказалось, что однократная профилактическая вакцинация 1-1/2D3/РНК наиболее эффективна и приводит к 10-кратному снижению количества легочных метастазов по сравнению с контролем (w/t) (Рис. 16, Д). Двукратная профилактическая вакцинация приводила лишь к 1.5–2-кратному снижению числа



**Рис. 16.** 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 инъекции физ/раствора. **В и Г.** Влияние ДК-вакцин на скорость роста первичной опухоли LLC и количество метастазов. w/t – контроль, животные с LLC, получавшие инъекции физ/раствора. 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 метастатической модели меланомы В16. 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 В16, получавшие инъекции физ/раствора. Статистический анализ был проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием наименьшей значимости Фишера (Fisher LSD). Данные представлены как MEAN±S.E.M. Значение  $p$  отражает статистически достоверные отличия по сравнению с контролем.

метастазов (Рис. 16, Д), что свидетельствует о ее неэффективности. Нами было сделано предположение, что это может быть связано с поляризацией Т-хелперных ответов, которые не сдвигают иммунную систему в сторону надзора за опухолью. Доказательство этого будут рассмотрены в Главе 5.

### 3.4. Заключение

С целью получения новых нетоксичных и высокоэффективных липосомальных систем доставки в ДК мы провели исследование серии поликатионных липидов N-DOPE, состоящих из биосовместимых и нетоксичных структурных доменов, таких как спермин, холестерин и диалкилглицерин. Исследование доставки плазмидной ДНК и РНК в ДК с помощью липосомальных композиций на основе этих липидов выявило две композиции, которые обеспечивают высокий уровень доставки как ДНК, так и РНК, в ДК и эффективную экспрессию в ДК доставляемого трансгена: 2X3-DOPE и 2D3-DOPE. На основе липосом 2X3-DOPE были созданы таргетные (адресные) мультикомпонентные липосомы, которые в своем составе содержали дополнительно липоконъюгат с остатками маннозы. Среди исследованных адресных липосом, композиция М6 на основе липоконъюгата с остатками маннозы и диалкилглицерина, соединенных сквартным линкером, позволила добиться значительного выигрыша в эффективности доставки опухолевой РНК в незрелые ДК по сравнению с липосомами 2X3-DOPE.

Следует отметить, что, хотя ДК являются трудным объектом для доставки в них нуклеиновых кислот, тем не менее, эффективность трансфекции и ДНК, и РНК в ДК с помощью липосом 2X3-DOPE и М6 была сравнима с эффективностью, которая достигалась при использовании других методов доставки, таких как вирусные вектора [566, 567], электропорация [568] и таргетные липосомы [569, 570]. Наблюдаемая нами эффективность доставки была сравнима с эффективностью таких трансфектантов, как DOTAP (Roche), 60%, и TransPassR2 (New England Biolabs), 52%, и значительно превышала эффективность доставки с помощью TransPassR1 (New England Biolabs), 22%, и Lipofectamine (Invitrogen), 5%, при очень низкой токсичности. Таким образом, разработанные нами липосомы серии МЛ обладают трансфекционной активностью, сравнимой с лучшими системами доставки, низкой токсичностью и могут быть использованы для доставки в ДК и другие АПК как *in vitro*, так и *in vivo*.

В мире предпринимались попытки использовать адресные липосомы для лечения меланомы. Ранее было показано, что маннозилированные липосомы с инкапсулированной siРНК, адресованной к мРНК IDO (Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1), эффективно подавляют экспрессию IDO в ДК, что приводит к модулированию типа Т-хелперного ответа, и, как следствие, к замедлению роста меланомы и повышению выживаемости мышей-

опухоленосителей [569]. Применение внутрибрюшинных инъекций маннозилированных липоплексов с плазмидной ДНК pUb-M, кодирующей меланома-ассоциированный антиген gp100, приводило к трансфекции ДК и макрофагов, а также к индукции меланома-специфичных ЦТЛ, ингибированию роста меланомы и повышению выживаемости животных-опухоленосителей [570]. ДК, нагруженные липосомами 2X3-DOPE или M6 с РНК В16, продемонстрировали эффективное подавление метастазов на модели меланомы мыши. Кроме того, показана возможность использования комплексов адресных липосом в качестве бесклеточных противоопухолевых вакцин, сравнимых по эффективности с ДК-вакцинами, нагруженными *ex vivo* комплексами такого же состава.

Наши данные показали, что профилактическая схема применения ДК-вакцин наиболее эффективна в отношении высокоагрессивных метастазирующих опухолей, тогда как терапевтическая схема - неметастазирующих опухолей. Исследованные нами опухолевые модели мыши имеют то преимущество, что они гомологичны опухолям человека, и, таким образом, успешные схемы применения ДК-вакцин могут быть апробированы в клинике. Так, аденокарцинома Кребс-2 (неметастазирующая опухоль с первичным узлом) соответствует аденокарциноме человека; меланома В16 (метастатическая модель без первичного узла) соответствует метастатической меланоме человека и имитирует клиническую ситуацию, когда в организме детектируются только метастазы; карцинома легких Льюис (метастазирующая опухоль с первичным узлом) соответствует анапластической карциноме легких человека. Эффективность как терапевтических, так и профилактических вакцин, была продемонстрирована в ряде исследований [560, 561]. Однако, данных об эффективности профилактических вакцин в активации антиметастатического ответа крайне мало [562, 563, 571]. Мы впервые показали, что профилактические ДК-вакцины наиболее эффективны именно в предотвращении/ингибировании развития метастазов.

#### **ГЛАВА 4. Исследование противоопухолевого и антиметастатического потенциала бычьей панкреатической РНКазы А, бычьей панкреатической ДНКазы I и микробной рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы)**

Как упоминалось во введении, РНКазы и ДНКазы представляют собой альтернативу химиотерапии рака в связи с их способностью расщеплять нуклеиновые кислоты, участвующие на всех этапах канцерогенеза и метастазирования. Противоопухолевый потенциал РНКазы А в течение 30 лет подвергался сомнению в связи с распространенным мнением, что этот фермент не способен оказывать цитотоксическое действие внутри опухолевой клетки из-за его инактивации под действием рибонуклеазного ингибитора. Однако, первые работы, в которых исследовали противоопухолевое действие РНКазы А, проводились при высоких дозах фермента и относились ко времени, когда главной гипотезой цитотоксической активности фермента полагали прямое расщепление РНК в клетке. В начале 21 столетия, произошел прорыв в области РНК: были открыты регуляторные нуклеиновые кислоты и внеклеточные нуклеиновые кислоты, что позволило предположить существование иных внеклеточных мишеней РНКазы А.

Среди малоизученных рибонуклеаз с цитотоксическим действием следует отметить микробную рибонуклеазу *Bacillus intermedius* (биназу), относящуюся к семейству РНКазы T1, которая активно исследовалась в серии работ российских ученых Ильинской с соавторами и Макарова с соавторами. Эта рибонуклеаза проявляла цитотоксическое действие в культуре клеток лейкемии человека K562 и Kasumi-1, которое, как было показано, зависит от уровня экспрессии онкогенов KIT, AML1-ETO и FLT3 [33, 39, 50, 51]. Однако, изучение противоопухолевого потенциала этого фермента *in vivo* до сих пор не проводилось.

Существуют единичные работы, в которых была продемонстрирована способность ДНКазы I снижать пролиферацию опухолевых клеток [41], и всего лишь несколько работ, в которых было обнаружено антиметастатическое действие ДНКазы I [42-44]. Хотя результаты отрывочны и немногочисленны, перспективность дальнейшего исследования ДНКазы I в качестве противоопухолевого агента не вызывает сомнений. Недавно было обнаружено, что инициация и прогрессирование онкологических заболеваний могут быть ассоциированы с функционированием внДНК опухолевого происхождения [572, 573], что может пролить свет на возможные мишени ДНКазы I.

Задачей данного раздела работы являлось исследование противоопухолевого и антиметастатического потенциала бычьей панкреатической РНКазы А, бычьей панкреатической ДНКазы I и микробной рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы).

## 4.1. Разработка лекарственно-устойчивой модели лимфосаркомы мыши

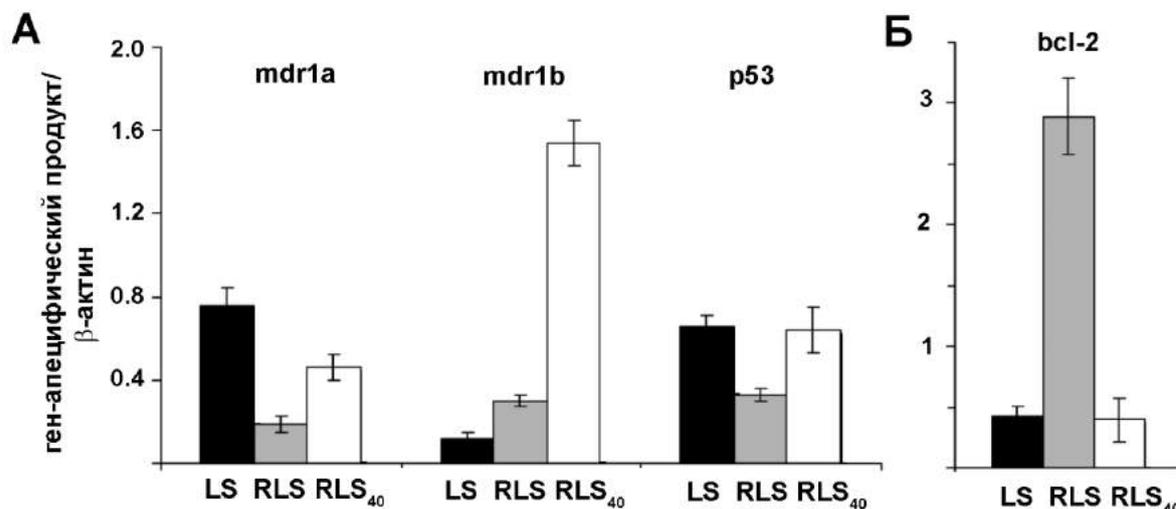
### 4.1.1. Выбор родительских линий LS и RLS для получения линии опухолевых клеток с фенотипом МЛУ

Фенотип множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) опухолей связан с гиперэкспрессией р-гликопротеина, который формирует трансмембранную помпу и участвует в удалении из опухолевой клетки химиопрепаратов, препятствуя, таким образом, гибели опухоли. Опухоли с фенотипом МЛУ представляют особый интерес для исследователей в связи с плохим ответом на химиотерапию и необходимостью использовать для лечения препараты, не являющиеся субстратом для р-гликопротеина. Для исследования противоопухолевой активности природных нуклеаз, являющихся экзогенными белками, было необходимо разработать модель опухоли на мышах, обладающей выраженным фенотипом МЛУ. Для разработки модели были использованы два субштамма перевиваемых лимфосарком мыши – LS и RLS, полученных к.б.н., профессором Поповой Н.А. и ее коллегами (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск). Эти субштаммы характеризуются разной чувствительностью к действию циклофосфамида, метаболит которого, образующийся в печени, является индуктором апоптоза. Лимфосаркома LS, полученная у мышей линии СВА путем однократной инъекции нитрозометилмочевины [528], проявляла высокую чувствительность к циклофосфамиду: её полная регрессия достигалась при внутрибрюшинном введении препарата животным в дозе 50 мг/кг. Субштамм RLS был получен из опухоли LS путем ее многократного пассирования *in vivo* при низких дозах циклофосфамида (15 – 20 мг/кг) [528], и характеризовался устойчивостью к действию циклофосфамида: при дозе 150 мг/кг достигалась регрессия опухоли RLS около 50%.

Различия между этими двумя субштаммами лимфосарком LS и RLS выявляли по их чувствительности к цитостатикам и отличиям в профиле экспрессии генов *mdr1a*, *mdr1b*, *bcl-2* и *p53*, определяющих формирование МЛУ. Для выявления чувствительности к цитостатикам первичные культуры опухолевых клеток были получены из асцитных форм опухолей LS и RLS (см. п. 2.2.3.1), и с помощью МТТ-теста была проведена оценка чувствительности к набору лекарственных препаратов, используемых в химиотерапии: винбластину, доксорубицину и цитарабину. Оказалось, что для клеток линии RLS значения  $IC_{50}$  винбластина было выше в 1.5 раза,  $IC_{50}$  доксорубицина - в 2.9 и  $IC_{50}$  цитарабина – в 1.6 раза по сравнению с  $IC_{50}$  для клеток лимфосаркомы LS.

Для определения уровня экспрессии мРНК генов *mdr1a*, *mdr1b*, *bcl-2* и *p53* использовали метод ОТ-ПЦР (Рис. 17). Оказалось, что экспрессия гена *mdr1b* была в 2.5 раза выше, а *bcl-2* - в 6.7 раз выше в клетках первичной культуры RLS по сравнению с клетками

LS, тогда как экспрессия генов *mdr1a* и *p53* была ниже в 4 и 2 раза, соответственно. Таким образом, резистентная к циклофосфамиду опухоль RLS характеризуется повышенным уровнем экспрессии гена *mdr1b*, сниженным уровнем экспрессии гена *p53* и повышенным уровнем *bcl-2* по сравнению с родительской линией LS.



**Рис. 17.** Сравнение профиля экспрессии генов, участвующих в формировании фенотипа МЛЮ, в клетках линий LS, RLS и RLS<sub>40</sub> методом ОТ-ПЦР. **А.** Уровень экспрессии генов *mdr1a*, *mdr1b* и *p53*. **Б.** Уровень экспрессии гена *bcl-2*. Уровень экспрессии гена нормировали на уровень экспрессии гена β-актина.

#### 4.1.2. Селекция высокорезистентной клеточной линии RLS<sub>40</sub>

С целью получения высокорезистентной к химиопрепаратам культуры клеток, статус которой соответствовал бы опухоли после нескольких сеансов химиотерапии у пациентов, нашей задачей являлось «искусственное усиление» МЛЮ опухоли RLS. Для этого был выбран метод селекции клеток на повышающихся концентрациях цитостатиков, имитирующий токсическое давление химиопрепаратов *in vivo* [574].

Селекцию проводили следующим образом: первый цикл селекции включал два этапа - (1) культивирование клеток RLS в полной среде IMDM в присутствии 5 нМ винбластина при 37°C и 5%-ном насыщении CO<sub>2</sub> в течение двух суток; (2) отбор жизнеспособной фракции опухолевых клеток путём фильтрации на среде для разделения лимфоцитов, (п. 2.2.3.1). Отобранные клетки культивировали в среде, содержащей 5 нМ винбластина, в течение 48 часов для увеличения количества клеток, необходимого для второго этапа селекции. Второй, третий и четвёртый циклы селекции также состояли из двух этапов и отличались только концентрацией винбластина в среде: 10, 20 и 40 нМ, соответственно. В ходе эксперимента был получен набор клеточных линий RLS<sub>5</sub>, RLS<sub>10</sub>, RLS<sub>20</sub> и RLS<sub>40</sub>.

Для подтверждения того, что селекция идет в нужном направлении, полученные после каждого этапа селекции клеточные линии RLS<sub>5</sub>, RLS<sub>10</sub>, RLS<sub>20</sub> и RLS<sub>40</sub> характеризовали по их чувствительности к винбластину, а для клеток линии RLS<sub>40</sub> была также оценена чувствительность к доксорубину и цитарабину (Таблица 11). Значения IC<sub>50</sub> винбластина составили 11, 20, 50 и 320 нМ для клеточных культур RLS<sub>5</sub>, RLS<sub>10</sub>, RLS<sub>20</sub>

**Таблица 11.** Чувствительность селектированных линий RLS<sub>n</sub>, полученных из первичной культуры RLS, к цитостатикам.

Полученная линия	Концентрация винбластина*, нМ	IC <sub>50</sub>		
		Винбластин, нМ	Доксорубин, мкМ	Цитарабин, мкМ
RLS	-	6.2 ± 1.1	0.2 ± 0.01	0.6 ± 0.01
RLS <sub>5</sub>	5	11.2 ± 3.2	-	-
RLS <sub>10</sub>	5	19.7 ± 6.8	-	-
RLS <sub>20</sub>	20	49.7 ± 10.3	-	-
RLS <sub>40</sub>	40	318.9 ± 21.6	10.7 ± 1.3	1.8 ± 0.03

\* – концентрация винбластина, на которой поддерживается культура.

и RLS<sub>40</sub>, соответственно (Таблица 11). На каждом этапе селекции происходило примерно двукратное увеличение значения IC<sub>50</sub> винбластина, однако, при переходе от 20 до 40 нМ IC<sub>50</sub> винбластина линии RLS<sub>40</sub> возросло относительно IC<sub>50</sub> винбластина RLS<sub>20</sub> в 6 раз. IC<sub>50</sub> винбластина для клеточной линии RLS<sub>40</sub> была в 50 раз выше, чем для родительской линии RLS. Значение IC<sub>50</sub> доксорубина и цитарабина для клеточной линии RLS<sub>40</sub> было в 46 и 3 раза выше, соответственно, по сравнению с исходной линией RLS (Таблица 11).

Далее в клетках линии RLS<sub>40</sub> был исследован уровень экспрессии генов *mdr1a*, *mdr1b*, *bcl-2* и *p53* с помощью ОТ-ПЦР и проведено сравнение с профилями экспрессии этих генов в клетках линий LS и RLS (Рис. 17). В клетках линии RLS<sub>40</sub> уровень экспрессии генов *mdr1a* и *p53* вырос в 2 раза по сравнению с клетками линии RLS. Уровень экспрессии гена *mdr1b* в клетках линии RLS<sub>40</sub> повысился в 4 раза, а уровень экспрессии гена *bcl-2* снизился в 10 раз до его уровня в клетках линии LS. Таким образом, в случае опухоли RLS<sub>40</sub> фенотип МЛЮ является полностью опосредованным гиперэкспрессией генов *mdr1a* и *mdr1b*.

#### **4.1.3. Исследование способности клеток линии RLS<sub>40</sub> формировать опухоль *in vivo***

Клетки линии RLS<sub>40</sub> в объеме 0.2 мл (2×10<sup>5</sup> клеток) были трансплантированы мышам линии СВА в/б и в/м с целью оценить их способность формировать опухоль *in vivo* в асцитной

и солидной форме. Эксперименты показали, что клетки линии RLS<sub>40</sub> способны формировать опухоль *in vivo* как в асцитной, так и в солидной форме, при этом скорость роста опухоли RLS<sub>40</sub> не отличалась от скорости роста родительской опухоли RLS. Для того чтобы определить, будет ли меняться профиль экспрессии генов, вовлеченных в формирование фенотипа МЛУ, под действием естественного давления организма, мы провели исследование профиля экспрессии этих генов после нескольких пассажей опухоли *in vivo*. Для анализа экспрессии генов *mdr1a*, *mdr1b*, *p53* и *bcl-2* в клетках опухоли RLS<sub>40</sub> с помощью метода ОТ-ПЦР на 10 день после каждого пассажа опухоли асцитную жидкость собирали, получали культуру клеток (п. 2.2.3.1). После первых трех пассажей опухоли *in vivo* в опухолевых клетках наблюдали профиль экспрессии исследуемых генов, сходный с профилем экспрессии в культуре клеток RLS<sub>40</sub>, что свидетельствует о генетической стабильности опухоли RLS<sub>40</sub>.

В режиме монотерапии было проведено сравнение восприимчивости опухолей LS, RLS и RLS<sub>40</sub> к цитостатикам, используемым в противораковой терапии. Клетки лимфосарком LS, RLS и RLS<sub>40</sub> ( $2 \times 10^5$  клеток) были трансплантированы мышам в правую бедренную мышцу для формирования солидных опухолей. На 11-ые сутки после трансплантации мыши получали однократные инъекции цитостатиков: циклофосфида, винбластин, цисплатина и рубомицина (п. 2.2.8.4). Данные по влиянию цитостатиков на рост опухолей представлены в таблице 12.

**Таблица 12.** Торможение роста опухолей LS, RLS и RLS<sub>40</sub> под действием цитостатиков.

Химиопрепарат	Торможение роста опухоли*, %		
	LS	RLS	RLS <sub>40</sub>
Циклофосфамид	100	16.5	5.0
Цисплатин	93	44	20
Винбластин	20.0	нет эффекта	нет эффекта
Рубомицин	89	51	13

\* торможение роста опухоли вычисляли, как описано в п. 2.2.6.2.

Наиболее чувствительной к действию цитостатиков *in vivo* оказалась лимфосаркома LS (Таблица 12), как и предполагалось, исходя из ее чувствительности к цитостатикам *in vitro*. Наиболее устойчивой к действию химиопрепаратов оказалась лимфосаркома RLS<sub>40</sub>: эта опухоль продемонстрировала в три раза более высокую устойчивость к циклофосфамиду, в два раза более высокую устойчивость к цисплатину и в 4 раза более высокую устойчивость к рубомицину по сравнению с родительской линией RLS (Таблица 12). Таким образом, нами была получена модель лимфосаркомы RLS<sub>40</sub>, которая соответствует статусу опухоли,

наблюдаемому у пациентов после нескольких курсов химиотерапии, и имеет выраженный МЛУ фенотип, обусловленный гиперэкспрессией гена *mdr1b* и умеренной экспрессией гена *bcl-2*.

## 4.2. Исследование противоопухолевой и антиметастатической активности РНКазы А и ДНКазы I *in vivo*

### 4.2.1. Определение доз ферментов для экспериментов *in vivo*

С целью определить диапазон доз ферментов для проведения экспериментов *in vivo* необходимо было определить концентрации РНКазы А и ДНКазы I, при которых наблюдается 50%-ное расщепление нуклеиновых кислот *in vitro* в условиях избытка катализатора по отношению к гидролизуемому субстрату. Для этого активность РНКазы А исследовали в реакции расщепления 96-звенного 5'-[<sup>32</sup>P]-меченого фрагмента РНК HIV-1 в условиях, близких к физиологическим (см. п. 2.2.9.2). 50%-ное расщепление РНК-субстрата достигалось при концентрации РНКазы А 10<sup>-9</sup> М за 10 мин инкубации. Активность ДНКазы I исследовали в реакции расщепления плазмиды рHIV-2 (см. п. 2.2.9.3). Анализ продуктов расщепления показал, что при концентрации ДНКазы I 10 ед.акт./мл наблюдается 50%-ное расщепление ДНК-субстрата за 1 мин инкубации.

Концентрации РНКазы А и ДНКазы I, при которых наблюдали эффективное расщепление нуклеиновых кислот в экспериментах *in vitro*, были взяты за основу для определения диапазона доз ферментов в экспериментах *in vivo*. Пересчёт молярности РНКазы А и единиц активности ДНКазы I в мг на кг веса животного производили по следующим формулам:

$$\text{Доза}_{\text{РНКазы А}} = \frac{M_{\text{РНКазы А}} \times [E]_{\text{РНКазы А}} \times V_{\text{инъекций}}}{m_{\text{мышы}}},$$

$$\text{Доза}_{\text{ДНКазы I}} = \frac{[E]_{\text{ДНКазы I}} \times V_{\text{инъекций}}}{\text{уд. акт. ДНКазы I} \times m_{\text{мышы}}},$$

где  $M_{\text{РНКазы А}}$  - молекулярный вес РНКазы А, 13700 г/М; уд. акт. ДНКазы I - удельная активность ДНКазы I; 2155 ед. акт./мг;  $[E]_{\text{РНКазы А}}$  - концентрация РНКазы А, 1.4×10<sup>-9</sup> М - 1.4×10<sup>-4</sup> М;  $[E]_{\text{ДНКазы I}}$  - концентрация ДНКазы I, 10<sup>4</sup> – 10<sup>6</sup> ед. акт./л;  $V_{\text{инъекции}}$  - объём инъекции, 0.1 мл,  $m_{\text{мышы}}$  – средний вес мышы, 20 г. В результате для экспериментов *in vivo* были использованы следующие дозы ферментов: 0.1 - 50 мкг/кг и 0.5, 1, 10 мг/кг для РНКазы А и 0.02 - 2.3 мг/кг для ДНКазы I.

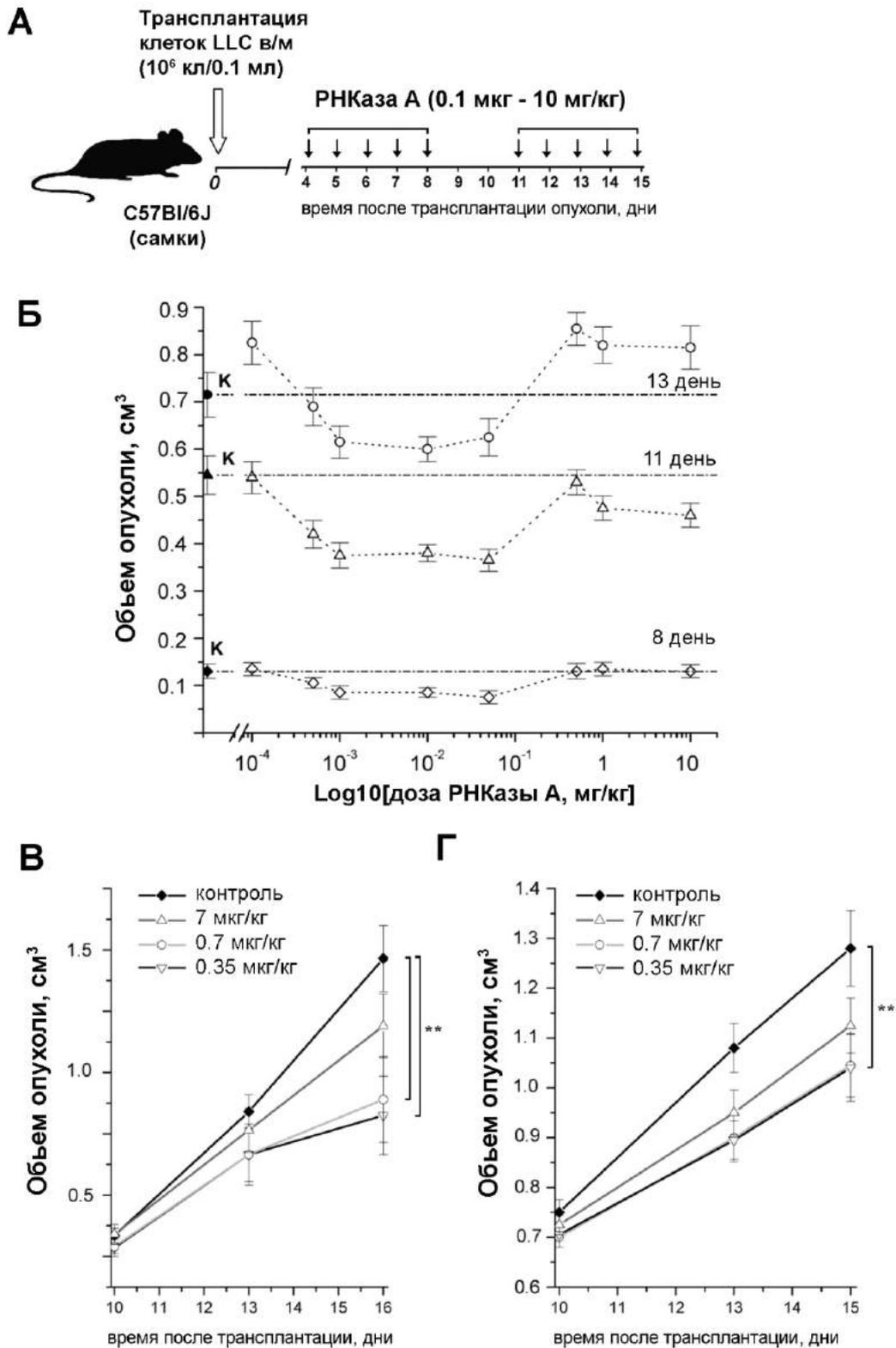
#### 4.2.2. Влияние РНКазы А и ДНКазы I на рост первичной опухоли LLC

Оценку влияния РНКазы А и ДНКазы I на рост первичной опухоли проводили на модели LLC, метастазирующей в легкие. Опухоль трансплантировали мышам линии C57Bl/6 (самкам) внутримышечно (см. п. 2.2.6.1). Начиная с четвертого дня после трансплантации, животные получали ежедневно в/м инъекции физ/раствора (контроль), РНКазы А (0.1 - 50 мкг/кг и 0.5 - 10 мг/кг) или ДНКазы I (0.02 - 2.3 мг/кг) (Рис. 18, А).

На рис. 18 (Б) представлено изменение размеров опухолей в группах экспериментальных животных под действием РНКазы А. Как видно из рисунка, на 8-ой день после трансплантации опухоли и на 4 день ежедневного введения РНКазы А в дозах 1 – 50 мкг/кг отмечалось подавление роста опухолей на 40 - 42 % ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем. К 11-му дню торможение роста опухолей составляло 23 – 33 % ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем в группах мышей, получавших инъекции РНКазы А в дозах 0.5 – 50 мкг/кг, а к 13-му дню размер опухолей в этих группах был на 16 % ниже ( $p < 0.05$ ), чем в контроле. 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 другой модели опухолевой прогрессии – гепатомы HA-1, метастазирующей в печень, на мышах A/Sn. Опухоль LLC была использована нами в этом эксперименте в качестве положительного контроля торможения роста первичной опухоли под действием РНКазы А. У мышей C57Bl/6J и мышей A/Sn внутримышечно индуцировали LLC и HA-1. Начиная с восьмого дня после трансплантации мыши получали инъекции физ/раствора в/м (контроль), РНКазу А (0.35 - 35 мкг/кг) или ДНКазу I (0.02 - 2.3 мг/кг) (см. п. 2.2.9.6).

На рис. 18 (В и Г) приведено влияние РНКазы А на скорость роста LLC и HA-1. Как видно из представленных данных, на 10-ый день развития опухоли, средние размеры опухолей между группами различались слабо (Рис. 18, В и Г). На 15-ый день после трансплантации опухоли в группах мышей с HA-1, получавших инъекции РНКазы А в дозах 0.35 и 0.7 мкг/кг, наблюдалось торможение роста опухолей, которое составило 23% ( $p < 0.05$ ) (Рис. 18, Г). В то же время торможение роста опухолей в соответствующих группах



**Рис. 18.** Влияние РНКазы А на рост первичной опухоли. **А.** Схема эксперимента. **Б.** Ингибирование роста первичной опухоли LLC у мышей линии С57В1/6J в зависимости от дозы РНКазы А. **В.** Кинетика ингибирования роста первичной опухоли LLC у мышей линии С57В1/6J под действием РНКазы А в дозах 0.35, 0.7 и 7 мкг/кг. **Г.** Кинетика ингибирования роста первичной опухоли НА-1 у мышей линии А/Sn в дозах 0.35, 0.7 и 7 мкг/кг. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента, статистически достоверными отличиями считали отличия при  $p < 0.05$  (\*\*) и  $p < 0.01$  (\*\*\*)

животных с LLC составило 43% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем (Рис. 18, В). По окончании эксперимента средний вес опухолей в группах мышей с НА-1 и LLC, получавших инъекции РНКазы А в дозе 0.35 мкг/кг, был на 20 и 31% ниже ( $p < 0.05$ ), соответственно, чем в контрольных группах (первичные данные не приведены). Так же, как и в случае модели LLC, в случае модели гепатомы НА-1 ДНКазы I не оказывала влияния на первичную опухоль.

Для выявления изменения динамики роста первичного опухолевого узла было определено время удвоения объема опухоли (DT) (Таблица 13), расчет DT проводили, как описано в п. 2.2.6.2. Введение РНКазы А в диапазоне доз 0.5 – 50 мкг/кг животным с LLC приводит к замедлению роста первичной опухоли: в контрольной группе DT составило 2.5 дня, и возрастало до 2.9 – 3.5 дней в группах, получавших РНКазу А (Таблица 13). Увеличение доз РНКазы А свыше 0.05 мг/кг приводило к исчезновению противоопухолевого эффекта. Замедление роста первичной опухоли также наблюдалось и в группах животных с НА-1, получавших РНКазу А в диапазоне доз 0.25 – 0.7 мкг/кг: в контрольной группе DT составило 5.7 дней и возрастало до 8.7 дней в экспериментальных группах (Таблица 13). Таким образом, РНКазы А в диапазоне низких доз 50-70 мкг/кг, но не в дозах, превышающих 1 мг/кг, оказывает выраженное противоопухолевое действие.

**Таблица 13.** Время удвоения объема опухолей (DT) LLC и НА-1 после применения РНКазы А.

Доза РНКазы А, мг/кг	Тип опухоли	DT±SEM, дни
0	LLC <sup>a</sup>	2.5±0.2
0.0001		2.5±0.2
<b>0.0005</b>		<b>2.9±0.2</b>
<b>0.0007</b>		<b>3.5±0.2</b>
<b>0.001</b>		<b>3.2±0.2</b>
<b>0.01</b>		<b>3.1±0.2</b>
<b>0.05</b>		<b>3.2±0.2</b>
0.5 - 10		2.5±0.2
0	НА-1 <sup>б</sup>	5.7±0.5
0.00035		<b>8.3±0.7</b>
0.0007		<b>8.7±0.9</b>
0.007		<b>8.5±0.9</b>

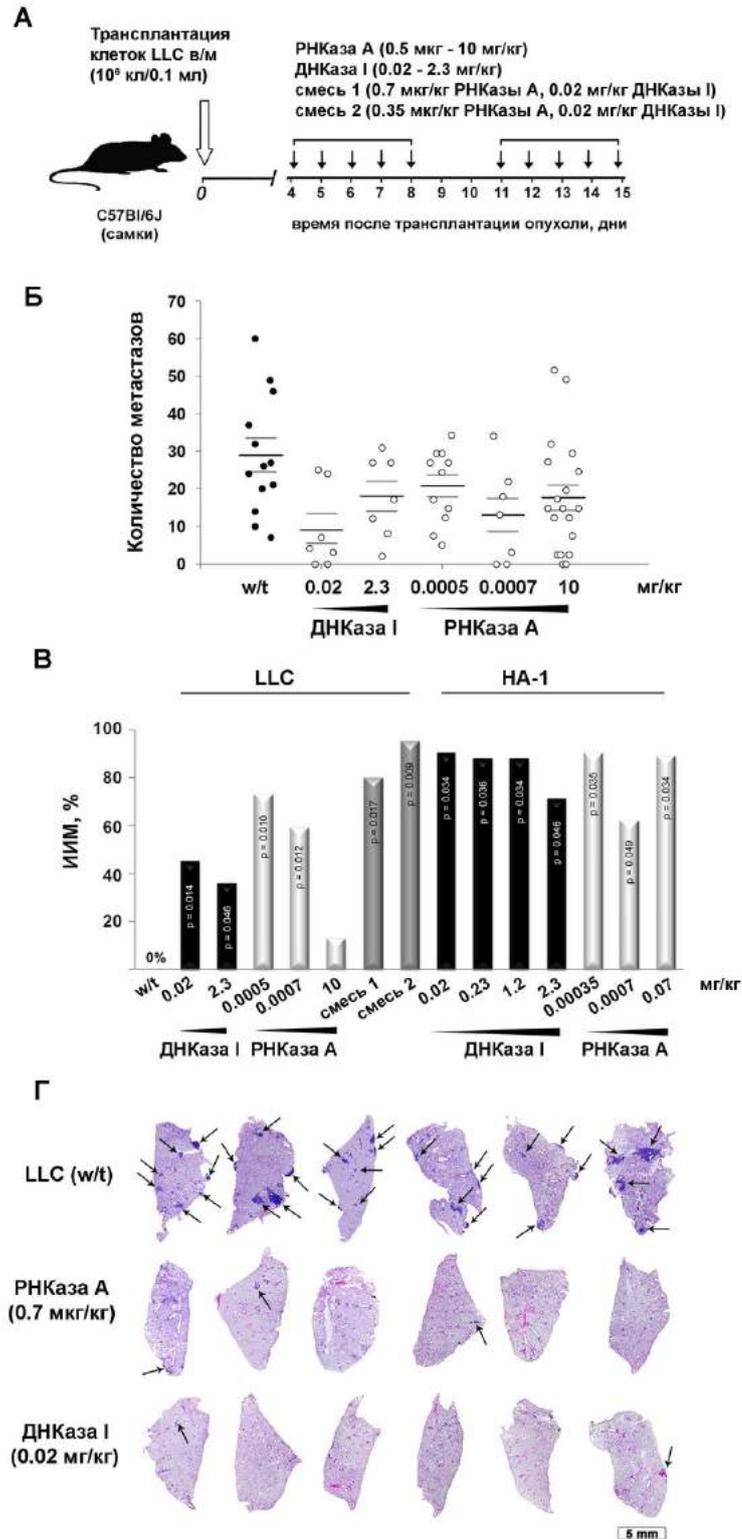
Инъекции РНКазы А проводили, начиная с четвертого<sup>a</sup> или восьмого<sup>б</sup> дней после трансплантации опухолей. DT рассчитывали, как описано в п. 2.2.6.2.

Следует отметить, что РНКазы А в более ранних исследованиях применялись в дозах 1 – 1000 мг/кг [35, 37, 575]. Именно для этого диапазона доз были получены противоречивые результаты по противоопухолевой активности РНКазы А, в ряде работ она была доказана, а в других работах было показано отсутствие противоопухолевой активности, которое связывали с инактивацией фермента под действием цитозольного рибонуклеазного ингибитора. Исходя из наших данных можно предположить, что фермент в низких дозах, по всей вероятности, работает не внутри клетки, а за счет действия на циркулирующие внеклеточные РНК, которые для него являются более доступными после внутримышечного введения.

#### **4.2.3. Исследование антиметастатического действия РНКазы А и ДНКазы I**

Влияние ферментов на метастазирование было исследовано при их применении как в режиме монотерапии на моделях LLC и HA-1 с первичным опухолевым узлом, так и в режиме комбинированной терапии на модели LLC с первичным опухолевым узлом, для которой использовали оба фермента в оптимальных дозах. Оценка антиметастатического действия ферментов в режиме монотерапии проводили, как описано в п. 2.2.9.6. Животным линий C57Bl/6J и A/Sn (самкам) трансплантировали клетки LLC или HA-1, соответственно (см. п. 2.2.6.1), и, с восьмого дня после трансплантации опухоли, животные получали в/м инъекции физ/раствора (контроль); РНКазу А и ДНКазу I. Оценка комбинированного действия РНКазы А и ДНКазы I на метастазирование проводили на модели LLC с первичным опухолевым узлом. У мышей линии C57Bl/6J индуцировали опухоль LLC (см. п. 2.2.6.1), и, на восьмой день после трансплантации, мыши получали в/м инъекции физ/раствора (контроль); смеси 1 (0.02 мг/кг ДНКазы I, 0.7 мкг/кг РНКазы А) или смеси 2 (0.02 мг/кг ДНКазы I, 0.35 мкг/кг РНКазы А), как описано в п. 2.2.9.8.

Микроскопическое исследование поверхности легких выявило, что введение мышам с LLC ферментов в режиме монотерапии приводит к значительному снижению количества метастазов (Рис. 19, А). Среднее количество метастазов составило:  $30 \pm 3$ ,  $13 \pm 4$  и  $18 \pm 3$  в группах мышей, получавших РНКазу А в дозах 0.5 мкг/кг, 0.7 мкг/кг и 10 мг/кг;  $9 \pm 3$  и  $18 \pm 4$  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 ( $29 \pm 5$ ). Поскольку в случае модели HA-1 количественный подсчет метастазов в печени был затруднителен вследствие их диффузных границ, для оценки использовали метод морфометрии с определением индекса ингибирования метастазов (ИИМ), как описано в п. 2.2.6.3. ИИМ контрольной группы принимали за 0%, а ИИМ 100% отражал полное отсутствие метастазов. С целью сравнить эффект также проводили морфометрирование легких в случае модели LLC.



**Рис. 19.** Влияние РНКазы А и ДНКазы I на метастазирование на моделях LLC и HA-1 с первичным опухолевым узлом. **А.** Схема эксперимента. **Б.** Количество поверхностных легочных метастазов у мышей с LLC, получавших РНКазу А или ДНКазу I. Данные представлены, как  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$  **В.** ИИМ в группах мышей, получавших РНКазу А, ДНКазу I или смеси ферментов. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента. **Г.** Гистотопограммы долей легких контрольной и экспериментальных групп мышей с LLC. Окрашивание гематоксилином и эозином. Стрелками указаны крупные метастазы. Шкала соответствует 5 мм.

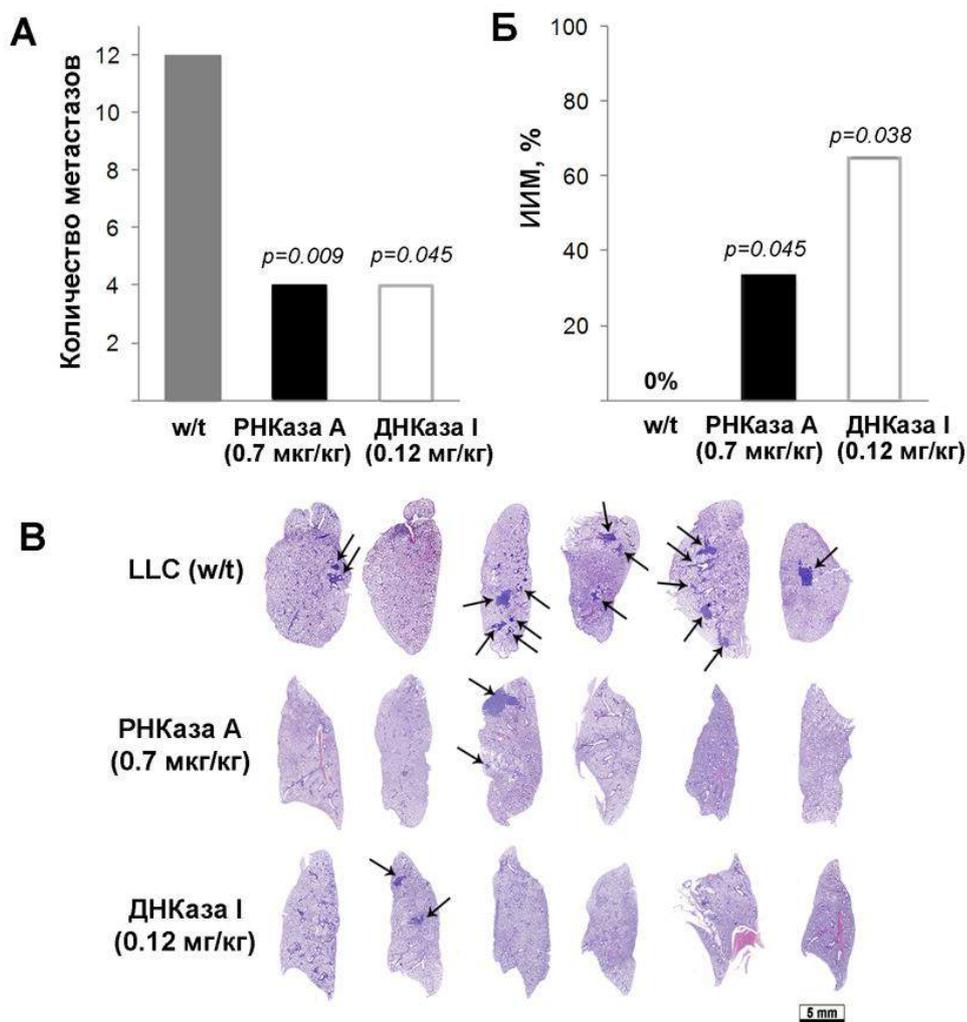
Во всех группах мышей с LLC или НА-1 введение ферментов приводило к снижению площади метастазов (Рис. 19, Б). В группах мышей с LLC, получавших ДНКазу I в дозах 0.02 и 2.3 мг/кг, ИИМ составил 45% и 36% ( $p < 0.05$ ), соответственно. В группах мышей с LLC, получавших РНКазу А, наиболее значительное ингибирование метастазов наблюдалось при дозах фермента 0.5 и 0.7 мкг/кг, в этом случае ИИМ составил 59% и 73% ( $p < 0.05$ ) (Рис. 19, Б). В дозе 10 мг/кг РНКазы А не вызывала достоверного снижения площади метастазов, что согласуется с данными других исследователей о неэффективности использования высоких доз РНКазы А. Наиболее выраженный эффект наблюдался в группах мышей с LLC, получавших оба фермента: ИИМ составил 80% ( $p < 0.05$ ) в группе мышей, получавших смесь 1, и достигал 95% ( $p < 0.01$ ) в группе, получавшей смесь 2 (Рис. 19, Б). Следует отметить, что в случае монотерапии мышей с LLC ДНКазой I наблюдалось более значительное снижение количества поверхностных метастазов по сравнению с РНКазой А (Рис. 19, Б), тем не менее, ИИМ был более низкий, чем для РНКазы А, что свидетельствует о влиянии фермента не только на количество, но и на площадь метастазов. В случае модели НА-1 ферменты вызывали более эффективное уменьшение площади метастазов по сравнению с моделью LLC (Рис. 19, Б): ИИМ варьировал от 62 до 90% ( $p < 0.05$ ) в группах, получавших РНКазу А, и от 70 до 90% ( $p < 0.05$ ) в группах, получавших ДНКазу I.

Типичная топограмма срезов долей легких мышей с LLC до и после введения ферментов представлена на Рис. 19, Г. В легких животных контрольной группы метастазы достаточно крупные и локализуются как в паренхимальной, так и в субплевральной зонах. Введение ферментов приводит к уменьшению размера метастазов и изменению их локализации с паренхимальной на субплевральную, что более выражено в случае ДНКазы I. Такое изменение локализации метастазов может свидетельствовать о гибели опухолевых клеток в кровотоке под действием ферментов (согласно теории открепления онкоцитов от очага первичного возникновения и миграции в отдаленные органы-мишени), либо о разрушении нуклеиновых кислот – потенциальных мишеней в кровотоке, и, как следствие, снижении их концентрации и уменьшении опосредованной опухоли-специфическими НК миграции опухолевых клеток или снижения уровня трансформации нормальных клеток в органах-мишенях.

Для доказательства антиметастатического действия РНКазы А и ДНКазы I также использовали метастатическую модель LLC без первичного опухолевого узла. Мышам С57В1/6J в/в вводили клетки LLC (см. п. 2.2.6.1), и начиная с четвертого дня после трансплантации ежедневно в/м вводили РНКазу А или ДНКазу I (см. п. 2.2.9.12). Количество метастазов, морфометрический анализ и типичная гистотопограмма долей легких

представлена на Рис. 20. Ферменты значительно снижали как количество, так и площадь метастазов в легких. Было отмечено снижение количества метастазов в 4 раза, при этом ИИМ составил 34% и 66% ( $p < 0.05$ ) в группах мышей, получавших РНКазу А и ДНКазу I, соответственно (Рис. 20, А, Б).

Гистологический анализ срезов легких показал, что ферменты существенно снижают количество и площадь метастазов, что сопровождается изменением локализации метастазов с паренхимальной на субплевральную зону (Рис. 20, В). Таким образом, и в отсутствие формирования первичного опухолевого узла ферменты оказывают антиметастатическое действие, выражающееся в снижении, как количества, так и площади метастазов.



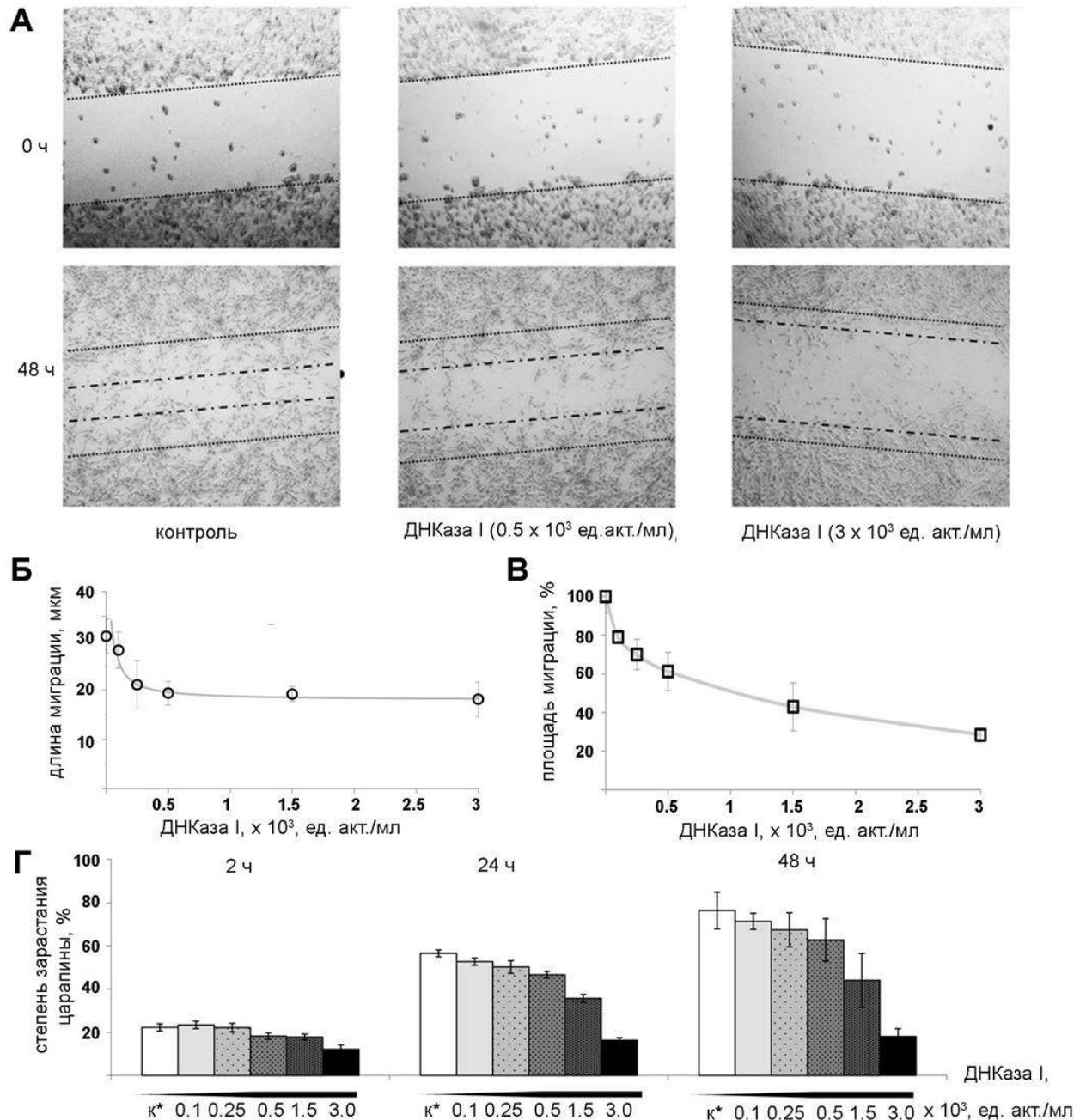
**Рис. 20.** Влияние РНКазы А и ДНКазы I на торможение роста метастазов в метастатической модели LLC. Мышам С57В1/6 вводили внутривенно клетки LLC и начиная с четвертого дня после трансплантации ежедневно вводили в/м РНКазу А (0.7 мкг/кг) или ДНКазу I (0.12 мг/кг). **А.** Количество поверхностных легочных метастазов. **Б.** ИИМ. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента. **В.** Гистотопограмма долей легких контрольной и экспериментальных групп. Окрашивание гематоксилином и эозином. Стрелками указаны крупные метастазы. Шкала соответствует 5 мм.

#### 4.2.4. Подавление инвазивных свойств меланомы В16 *in vitro* и *in vivo* под действием ДНКазы I

Наши данные показали высокую антиметастатическую активность ДНКазы I на двух опухолевых моделях умеренной агрессивности и метастатического потенциала – LLC и гепатоме А1, на ранних стадиях опухолевой прогрессии. Представлялось интересным оценить влияние ДНКазы I на поздние стадии опухолевой прогрессии – когда опухолевые клетки приобретают инвазивный фенотип, мигрируют и проникают в отдаленные органы для формирования вторичных опухолевых центров. Для имитации поздних стадий метастатического процесса нами была выбрана высокоинвазивная опухолевая модель меланомы В16, которая характеризуется высокой агрессивностью развития, активной диссеминацией и при внутривенном введении дает множественные вторичные опухолевые образования во внутренних органах.

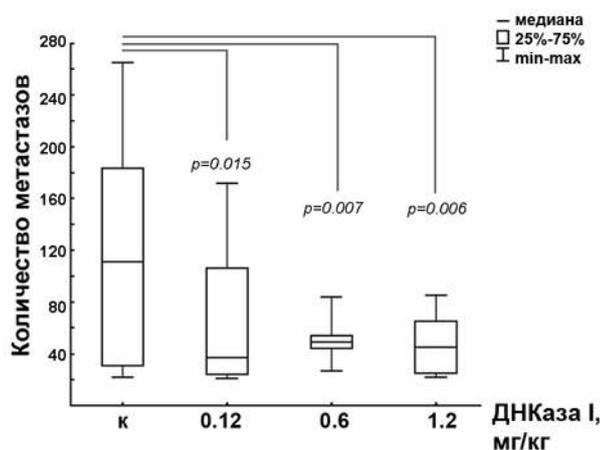
Прежде всего, была проведена оценка чувствительности меланомы В16 к действию ДНКазы I *in vitro* с помощью МТТ-теста. Клетки меланомы инкубировали в течение 24 ч в присутствии ДНКазы I в диапазоне концентраций  $(1-20) \times 10^3$  ед. акт./мл. Выяснилось, что уже при концентрации ДНКазы I  $5 \times 10^3$  ед. акт./мл жизнеспособность клеток В16 снижалась до 80%, а при максимальной используемой дозе,  $20 \times 10^3$  ед. акт./мл, выживаемость клеток составила лишь 25% (первичные данные не приведены). Значение  $IC_{50}$  для ДНКазы I составило  $(10.1 \pm 1.2) \times 10^3$  ед. акт./мл. (первичные данные не приведены).

Поскольку одной из важнейших характеристик инвазивного потенциала опухолевых клеток является миграционная активность, была проведена оценка влияния ДНКазы I на миграционную активность клеток меланомы В16 *in vitro* методом зарастания царапины (Рис. 21). Целостность сформированного клетками монослоя нарушали нанесением царапины и отслеживали скорость заполнения царапины опухолевыми клетками в отсутствие фермента (контроль) и в присутствии ДНКазы I (Рис. 21, А, см. п. 2.2.12.4). Было выявлено, что ДНКазы I вызывает замедление миграции клеток пропорционально дозе фермента (Рис. 21, Б - Г). Так, через 48 ч ДНКазы I в дозе  $0.25 \times 10^3$  ед. акт./мл и выше вызывала двукратное сокращение длины зоны миграции клеточного фронта (Рис. 21, Б). Кроме того, под действием ДНКазы I наблюдалось дозозависимое уменьшение общей площади миграции (Рис. 21, В). Наибольший эффект на скорость миграции клеток меланомы оказывали высокие дозы фермента: через 2 ч инкубации скорость зарастания царапины снижалась вдвое, а к 48 ч – падала в 5 раз (Рис. 21, Г). Следует отметить, что токсический эффект ДНКазы I на клетки меланомы В16 был незначителен, поскольку используемые дозы были в несколько раз меньше  $IC_{50}$ .



**Рис. 21. Анализ миграционной активности клеток меланомы В16 под действием ДНКазы I.** Клетки В16 культивировали в присутствии ДНКазы I в концентрации  $(0.1-3.0) \times 10^3$  ед. акт./мл в течение 48 ч. **А.** Фотографические изображения заполнения царапины опухолевыми клетками через 48 ч инкубации с ДНКазой I в концентрациях  $0.5 \times 10^3$  и  $3 \times 10^3$  ед. акт./мл. (увеличение  $4\times$ ). Прерывистой линией отмечены первоначальные границы царапины, пунктирной линией обозначены границы клеточного монослоя через 48 ч после нанесения повреждения. **Б.** Длина зоны миграции. **В.** Площадь зарастания царапины в культуре клеток В16 через 48 ч инкубации с ДНКазой I (относительно контроля). **Г.** Степень зарастания царапины опухолевыми клетками через 2, 24 и 48 ч инкубации с ДНКазой I. Значения приведены как MEAN  $\pm$  SEM. к\* – контроль, клетки, инкубированные в отсутствие ДНКазы I в течение 48 ч.

Затем, действие ДНКазы I на процесс метастазирования было исследовано *in vivo*. Суспензию клеток меланомы вводили мышам линии C57Bl/6J в/в (см. п. 2.2.6.1). Начиная с четвертых суток после трансплантации опухолевых клеток, животные получали ежедневно в/м инъекции физ/раствора (контроль) и ДНКазы I (0.12-1.2 мг/кг) (см. п. 2.2.9.10). Оказалось, что ДНКазы I статистически достоверно снижает число метастазов на поверхности легких мышей с меланомой B16 во всех группах по сравнению с контролем (Рис. 22). Медианное число метастатических центров в контрольной группе составило 115, а после применения ДНКазы I - 35-50 (Рис. 22).



**Рис. 22.** Влияние ДНКазы I на количество поверхностных метастазов в легких мышей с метастатической меланомой B16. ДНКазу I вводили в дозах 0.12, 0.6 и 1.2 мг/кг в/м мышам C57Bl/6J с метастатической меланомой B16. В качестве контроля использовали мышей с меланомой B16, получавших в/м инъекции физ/раствора. Статистическая обработка данных проведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки. Значение  $p$  отражает статистически достоверные отличия по сравнению с контролем.

В связи с тем, что меланома характеризуется высокой агрессивностью, проявляющейся в стремительности развития заболевания и интенсивном метастазировании, выбор препаратов, способствующих снижению уровня ее метастазирования, является крайне актуальным. В ряде экспериментов с использованием различных типов опухолей показано, что ДНКазы I способна эффективно ингибировать метастазирование [576]. В данном разделе проанализировано влияние ДНКазы I на пролиферативные, инвазивные и метастатические свойства меланомы мышей B16. Впервые показано, что *in vitro* ДНКазы I способствует замедлению пролиферации клеток меланомы и снижает миграционную активность. Эти результаты хорошо согласуются с данными Wen с соавт [44], показавшими, что ДНКазы I уменьшает миграционную активность клеток рака поджелудочной железы.

Впервые на метастатической модели меланомы мыши показано, что ДНКазы I достоверно сокращает количество легочных метастазов. Эти данные по высокой антиметастатической активности ДНКазы I согласуются с ранее полученными результатами

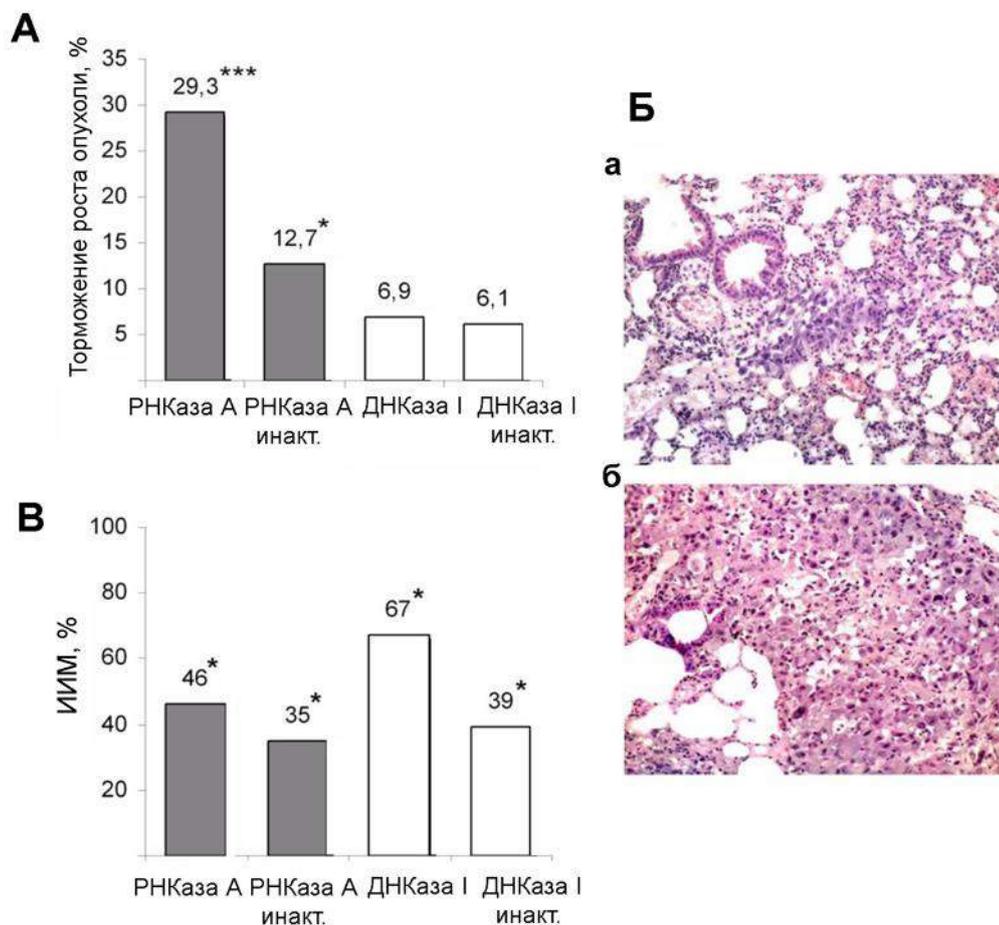
с использованием других опухолевых моделей: рака поджелудочной железы, спонтанного лимфолейкоза и рака печени L5178Y-ML [42, 44, 520].

#### **4.2.5. Вклад каталитической активности РНКазы А и ДНКазы I в противоопухолевое и антиметастатическое действие ферментов**

Для того, чтобы оценить вклад каталитической активности РНКазы А и ДНКазы I в антиметастатическое действие ферментов, была исследована антиметастатическая активность интактных и инактивированных РНКазы А и ДНКазы I на модели LLC. Для инактивации РНКазы А фермент инкубировали в присутствии DEPC в условиях, обеспечивающих количественную модификацию остатков гистидина, находящихся в активном центре фермента, но не влияющих на структуру белка [577]. Активность модифицированной РНКазы А проверяли в реакции расщепления РНК HIV-1 и проводили сравнение с активностью интактного фермента. Было показано, что после обработки DEPC РНКазы А полностью теряет способность расщеплять РНК. Для инактивации ДНКазы I фермент инкубировали при 65°C в течение двух часов и проверяли в реакции расщепления плазмидной ДНК. Анализ показал, что в результате инактивации каталитическая активность ДНКазы I снижается в 10 раз.

LLC в солидной форме индуцировали у мышей C57Bl/6J (самок, см. п. 2.2.6.1). Начиная с восьмого дня после трансплантации мыши получали инъекции в/м физ/раствора (контроль), интактные РНКазы А (0.7 мкг/кг) и ДНКазы I (0.12 мг/кг), а также инактивированные ферменты в тех же дозах (см. п. 2.2.9.9). На Рис. 23 представлено торможение роста опухоли под действием интактных и инактивированных ферментов, а также их влияние на метастазы. Как видно из Рис. 23, на 12-ые сутки после трансплантации LLC инактивированная РНКазы А тормозила рост первичной опухоли в 2 раза менее эффективно, чем интактный фермент. Инактивированная ДНКазы I, как и интактный белок, не оказывала влияния на первичную опухоль.

Так же как и после применения интактных ферментов в образцах лёгких животных, получавших инактивированные РНКазы А и ДНКазы I, наблюдался индуцированный патоморфоз метастазов (Рис. 23, Б). Оценка ИИМ методом морфометрии показала, что в группе мышей, получавших инактивированную РНКазы А, ИИМ был в 1.3 раза меньше, чем в группе животных, получавших инъекции интактного фермента (Рис. 23, В). Инактивированная ДНКазы 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. 23.** Влияние каталитической функции РНКазы А и ДНКазы I на противоопухолевую и антиметастатическую активность. **А.** Торможение роста опухоли LLC в группах мышей, получавших интактные РНКазу А в дозе 0.7 мкг/кг и ДНКазу I в дозе 0.12 мг/кг и инактивированные ферменты. **Б.** ИИМ. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента \* и \*\*\* - указывают на отличия от контроля с  $p < 0.05$  и  $p < 0.001$ , соответственно.

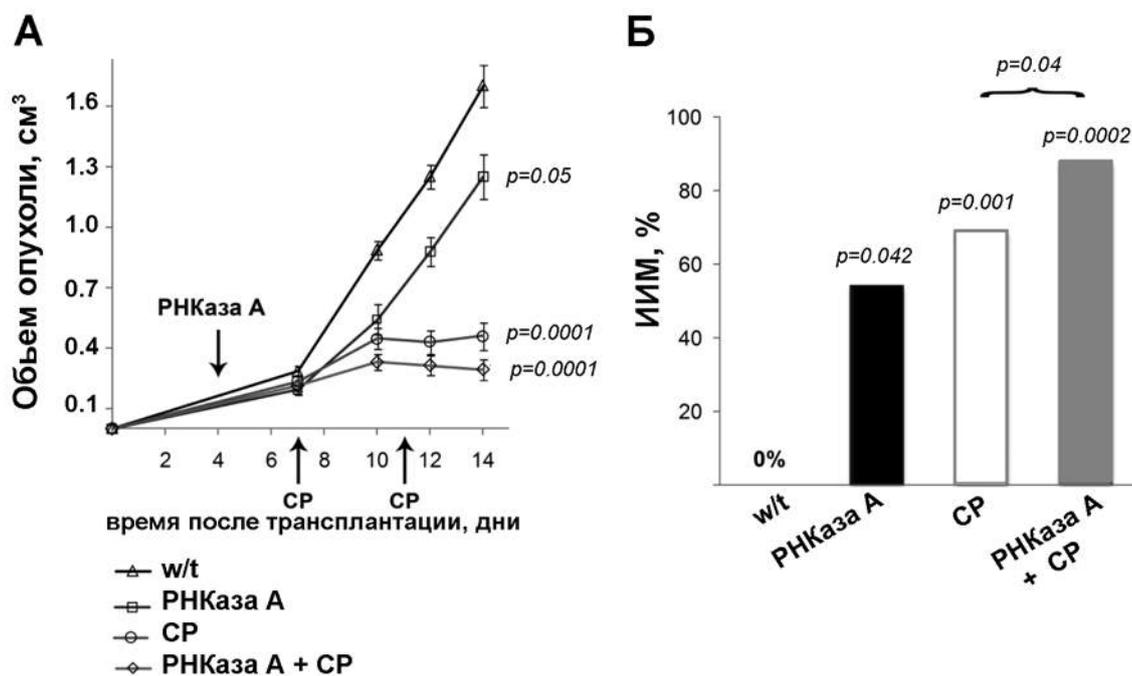
#### 4.2.6. Противоопухолевое и антиметастатическое действие РНКазы А в составе комбинированной терапии с циклофосфамидом

Для того, чтобы оценить возможность использования РНКазы А в качестве средства адъювантной терапии было проведено исследование ее противоопухолевого и антиметастатического действия в составе комбинированной терапии со стандартными химиопрепаратами на модели LLC. LLC трансплантировали мышам линии C57Bl и начиная с четвертого дня после трансплантации опухоли проводили инъекции физ/раствора в/в (контроль), РНКазы А в дозе 0.7 мкг/кг в/м течение двух недель, циклофосфамида в дозах 150 и 100 мг/кг на седьмой и 11 дни после трансплантации, РНКазу А в дозе 0.7 мкг/кг в/м в

течение двух недель и циклофосфамид в дозах 150 и 100 мг/кг на седьмой и 11 дни после трансплантации (см. п. 2.2.9.7).

Исследование динамики роста опухолей показало, что монотерапия РНКазой А или циклофосфамидом приводит к торможению роста первичной опухоли на 30% ( $p < 0.01$ ) и 70% ( $p < 0.0001$ ), соответственно, в том время как в составе комбинированной терапии эффект возрастает до 85% ( $p < 0.0001$ ) (Рис. 24).

При монотерапии РНКазой А ДТ составило  $3.3 \pm 0.2$  дня, циклофосфамидом - составило  $6.8 \pm 1.1$  дня. Под действием комбинированной терапии ДТ значительно увеличилось и составило  $10.3 \pm 1.8$  дня. Анализ метастазов в легких показал, в отсутствие лечения число метастазов составляет в среднем 81. Монотерапия РНКазой А приводила к уменьшению количества метастазов до 42. В группе мышей, получавших монотерапию циклофосфамидом, метастазы были обнаружены только у двух животных, тогда как комбинированная терапия РНКазой А и циклофосфамидом приводила к полному подавлению метастазов. Морфометрический анализ показал, что ИИМ в группе животных, получавших комбинированную терапию, достигал 88%, что значительно превышало эффект монотерапии как РНКазой А (54%), так и циклофосфамидом (69%) (Рис. 24).



**Рис. 24.** Влияние РНКазы А и циклофосфамида (CP) на скорость роста первичной опухоли (А) и метастазов (Б) на модели LLC. Мыши с LLC получали в/м инъекции физ/раствора (контроль, LLC(wt)), монотерапию РНКазой А (РНКазы А), монотерапию CP (CP) и комбинированную терапию РНКазой А и CP. РНКазу А вводили в/м в дозе 0.7 мкг/кг начиная с четвертого дня после трансплантации опухоли, CP вводили в/б на седьмой и 11 дни после трансплантации в дозах 150 и 100 мг/кг. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента.

Таким образом, в случае применения комбинированной терапии, состоящей из РНКазы А и циклофосфида, известного своим апоптогенным действием на опухолевые клетки, было отмечено значительное замедление роста первичной опухоли и ингибирование метастазов. По всей вероятности, это связано с аддитивным действием этих препаратов, обладающих различными механизмами противоопухолевой активности, которая складывается из апоптогенного действия циклофосфида и влияния РНКазы А на какое-то другое звено канцерогенеза.

### **4.3. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия биназы *in vivo***

Исследование противоопухолевой и антиметастатической активности биназы проводили совместно с Лабораторией конформационного полиморфизма белков в норме и при патологии под руководством академика А.А. Макарова (ИМБ РАН, Москва). Митькевичем и коллегами (ИМБ РАН, Москва) в совместных работах с коллегами из ИХБФМ СО РАН была показана цитотоксичность биназы на культуре клеток меланомы В16 и лимфосаркомы RLS<sub>40</sub>. Было обнаружено, что цитотоксический эффект биназы реализуется за счет запуска внешнего и внутреннего пути апоптоза [578]. Активация внутреннего пути апоптоза сопровождается падением митохондриального потенциала, увеличением концентрации кальция и ингибированием дыхательной активности. Синтез ФНО- $\alpha$  клетками под действием биназы способствует запуску внешнего пути апоптоза за счет связывания ФНО- $\alpha$  с рецепторами клеточной смерти и активации каспазы 8. Полученные данные показали, что биназа может представлять интерес в качестве противоопухолевого и антиметастатического препарата, и поэтому ее активность была исследована на широком спектре опухолевых моделей *in vivo*.

#### **4.3.1. Исследование токсичности биназы *in vivo*.**

Поскольку биназа имеет бактериальное происхождение, необходимым являлось исследовать ее токсичность. Поэтому вначале была исследована токсичность биназы в дозах 1 и 5 мг/кг при в/б введении на здоровых мышах линий С57В1/6J и СВА. В качестве контроля были взяты мыши, получавшие физ/раствор в/б. Биназа в используемых дозах не оказывала токсического действия на организм животных: не было выявлено изменений веса животных, состояния шерсти и кожных покровов, физической активности, уровня потребления воды и пищи. Исследование состояния печени после введения биназы показало, что в печени интактных животных и животных, получавших физ/раствор, объемная плотность нормальных гепатоцитов составляет  $82.5 \pm 1.5\%$  от общей паренхимы печени, уровень деструктивных изменений -  $10.5 \pm 0.7\%$ . Биназа в дозе 1 мг/кг не вызывала увеличения

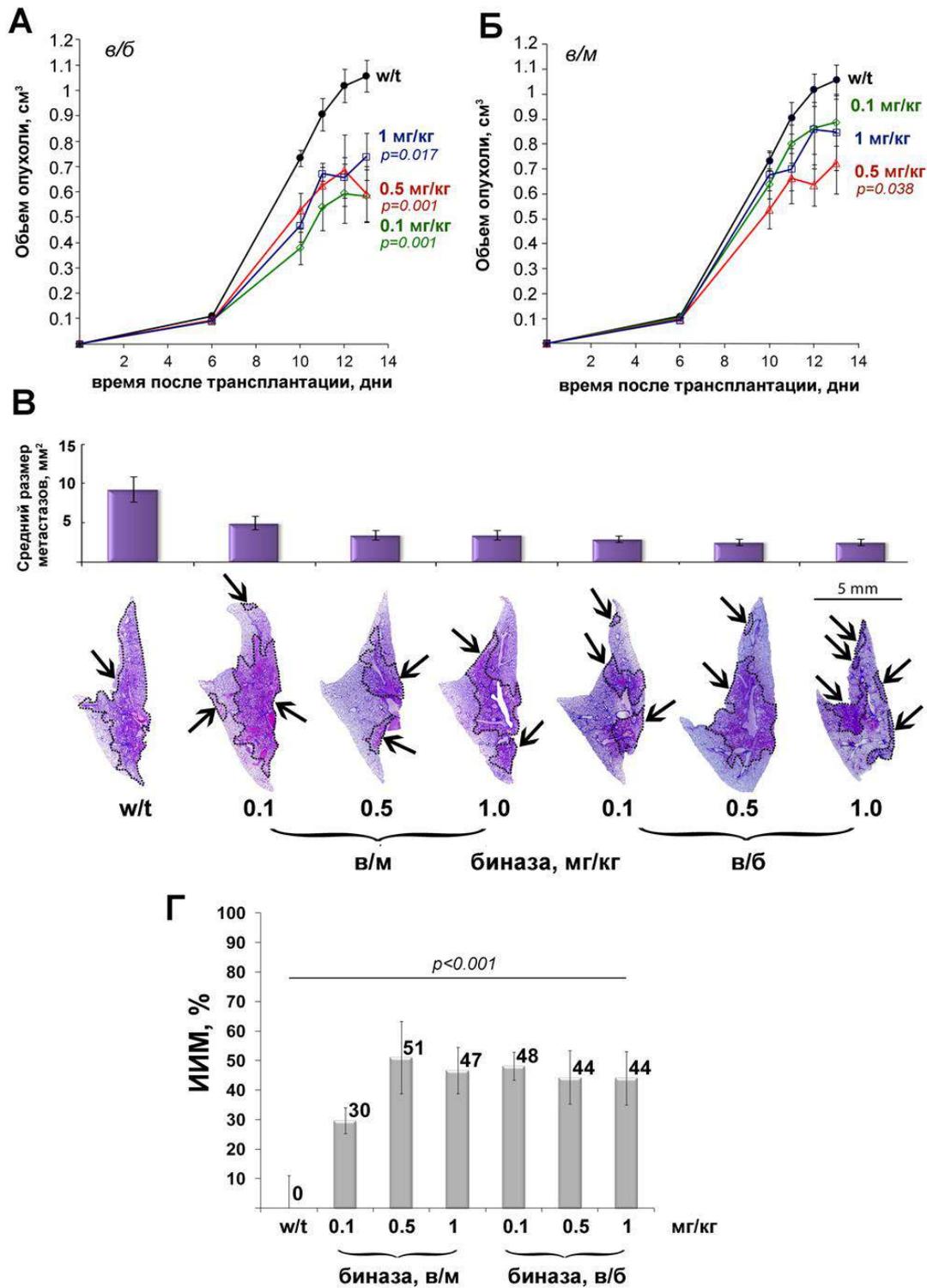
деструктивных изменений печени. Биназа в дозе 5 мг/кг незначительно увеличивала деструктивные изменения, однако, это изменение было статистически недостоверно. Численная плотность двуядерных гепатоцитов в печени мышей, получавших инъекции биназы, не отличалась от этого показателя в контрольных группах ( $1.7 \pm 0.2$ ) во всем диапазоне доз, что указывает на отсутствие снижения регенераторного потенциала печени под действием биназы, и, таким образом, на отсутствие гепатотоксичности.

#### **4.3.2. Исследование противоопухолевого и антиметастатического потенциала биназы на опухолевых моделях различного гистогенеза**

Для выявления противоопухолевого и антиметастатического потенциала биназы использовали три опухолевые модели: LLC, лекарственно-устойчивую лимфосаркому RLS<sub>40</sub> и метастатическую меланому B16. Мышам линии C57Bl/6J были в/м трансплантированы клетки LLC (см. п.2.2.6.1). Для определения наиболее эффективного диапазона доз и оптимального способа введения биназу вводили двумя способами в/б и в/м в дозах 0.1, 0.5 и 1 мг/кг три раза в неделю в течение двух недель (см. п. 2.2.9.11). Исследование динамики роста опухоли показало, что при в/б введении биназа во всем диапазоне доз вызывает замедление роста первичной опухоли, которое достигает 45% (Рис. 25, А). При в/м введении биназы животным-опухоленосителям также было отмечено замедление роста первичной опухоли на 35%, однако, оно было статистически достоверным только для дозы 0.5 мг/кг (Рис. 25, А). Более высокий противоопухолевый эффект биназы при в/б введении по сравнению с в/м, по всей вероятности, связан с лучшей адсорбцией фермента.

Гистологический анализ выявил существенное уменьшение площади легочных метастазов в группах мышей, получавших биназу, по сравнению с контролем (Рис. 25, Б). В группах мышей, получавших биназу в/м, наблюдалось увеличение ИИМ с возрастанием дозы биназы. В итоге ИИМ составил 30 - 47% (Рис. 25, В). Во всех группах животных, получавших биназу в/б, ИИМ составил около 50% (Рис. 25, В).

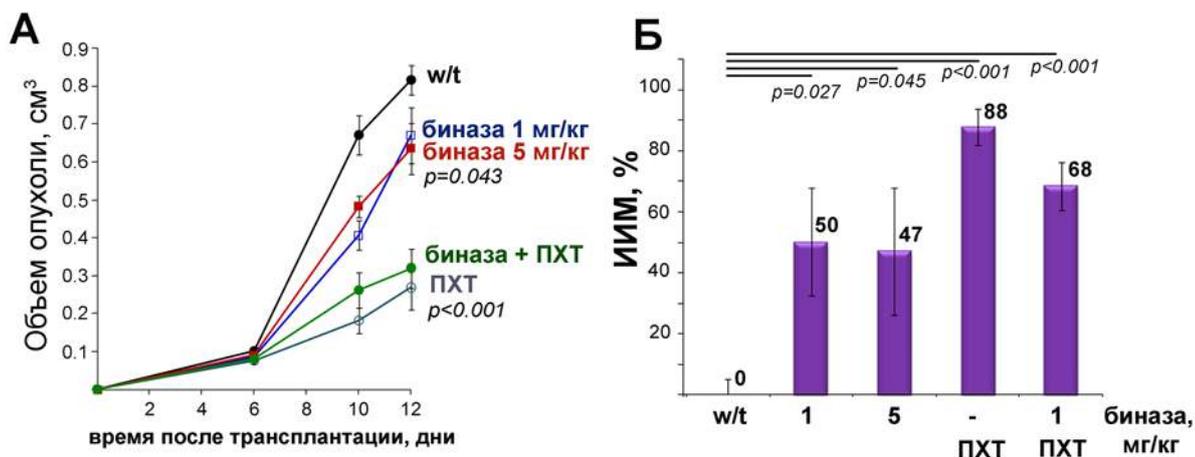
С целью выявить действие биназы на опухоли различных гистологических типов, было проведено исследование ее противоопухолевого потенциала на модели лимфосаркомы RLS<sub>40</sub> с МЛУ, способной формировать первичный опухолевый узел и метастазировать в печень. С целью повышения эффективности лечения были использованы дозы биназы 1 и 5 мг/кг. Поскольку данная опухолевая модель проявляет фенотип МЛУ, для лечения использовали как режим монотерапии биназой, так и режим комбинированной терапии биназой и препаратами полихимиотерапии (ПХТ). Опухоль RLS<sub>40</sub> индуцировали у мышей линии СВА и проводили инъекции биназы (см. п. 2.2.9.13). Начиная с четвертого дня после



**Рис. 25.** Влияние биназы на рост первичной опухоли и метастазов у мышей с LLC. **А.** Влияние биназы на рост первичной опухоли при введении *в/б*. **Б.** Влияние биназы на рост первичной опухоли при введении *в/м*. Биназу вводили трижды в неделю в дозах 0.1, 0.5 и 1 мг/кг с четвертого дня после трансплантации опухоли. **В.** Средний размер метастазов в группах и гистотопограммы срезов долей легких мышей, получавших биназу. Окрашивание гематоксилином и эозином. Метастазы указаны стрелками, границы метастазов отмечены пунктирной линией. **Г.** ИИМ. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента. Величины  $p$  указывают статистически достоверные различия по сравнению с контролем.

трансплантации опухоли, животные получали следующие инъекции в/б - физ/раствора (контроль); ПХТ; биназу в дозах 1 и 5 мг/кг, ПХТ и биназу в дозе 1 мг/кг в/б. Химиотерапию проводили двукратно на четвертый и 11 дни после трансплантации опухоли.

Исследование динамики роста опухоли показало, что на 10 день после трансплантации в группах мышей, получавших биназу в дозе 1 мг/кг, замедление роста опухоли составило 40% (Рис. 26, А). Повышение дозы биназы до 5 мг/кг не привело к повышению терапевтического эффекта: замедление роста опухоли составило 28% (Рис. 26, А). К концу эксперимента замедление роста опухоли в группах, получавших биназу, было примерно одинаковым и составило 20%. Лечение животных-опухоленосителей в режиме ПХТ было в 1.5 – 2 раза более эффективно по сравнению с монотерапией биназой и приводило к замедлению роста первичной опухоли на 60 - 70% (Рис. 26, А). Комбинированная терапия с применением биназы и ПХТ не приводила к потенцированию противоопухолевого эффекта.

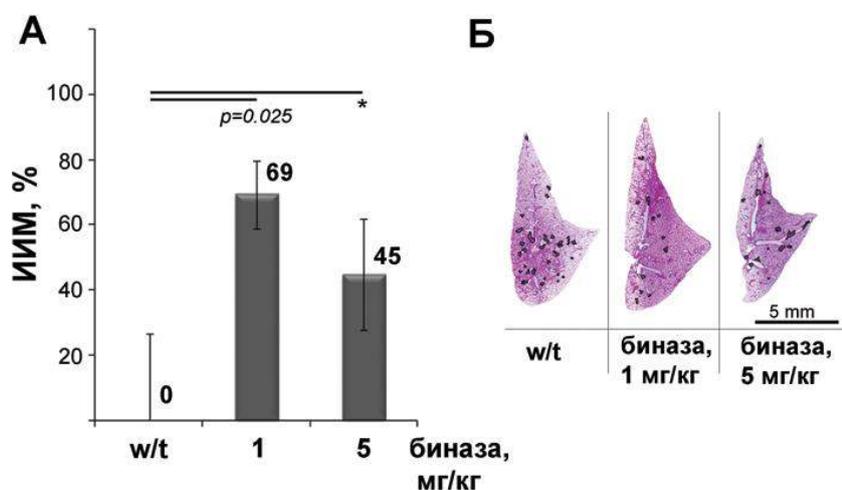


**Рис. 26.** Влияние монотерапии биназой, монотерапии ПХТ и комбинированной терапии биназой и ПХТ на рост первичной опухоли и метастазов у мышей с лимфосаркомой RLS<sub>40</sub>. **А.** Влияние на рост первичной опухоли. Биназу вводили трижды в неделю в дозах 1 и 5 мг/кг с четвертого дня после трансплантации опухоли. ПХТ вводили дважды на четвертый и 11 дни после трансплантации опухоли. **Б.** ИИМ. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента. Величины  $p$  указывают статистически достоверные различия по сравнению с контролем.

Гистологический и морфометрический анализ показал, что ИИМ в группе мышей, получавших ПХТ в составе монотерапии, составил 88% (Рис. 26, Б). Применение биназы в режиме монотерапии приводило к подавлению метастазов на 50% (Рис. 26, Б). При комбинированной терапии ИИМ составил 68%. Таким образом, биназа продемонстрировала

заметную эффективность при подавлении роста лекарственно-устойчивой лимфосаркомы и ее антиметастатическая активность была сравнима с активностью ПХТ.

Антиметастатическое действие биназы было также исследовано на метастатической модели меланомы B16. Меланому B16 индуцировали у мышей C57Bl/6J и, начиная с четвертого дня после трансплантации опухоли, животные получали в/б инъекции физ/раствора (контроль); биназу в дозах 1 и 5 мг/кг, как описано в (см. п. 2.2.6.1 и п. 2.2.9.11). Морфометрический анализ легких экспериментальных животных показал, что биназа в дозе 1 мг/кг приводит к подавлению метастазов на 69% (Рис. 27, А и В). Как и в случае лимфосаркомы RLS<sub>40</sub> в случае меланомы B16 повышение дозы биназы до 5 мг/кг не приводило к потенцированию антиметастатического эффекта: ИИМ составил 45%.



**Рис. 27.** Влияние биназы на развитие метастазов у мышей с метастатической моделью меланомы B16. С четвертого дня после трансплантации B16 мыши получали биназу в/б в дозах 1 и 5 мг/кг трижды в неделю в течение двух недель. **А.** ИИМ. **Б.** Гистотопограммы срезов долей легких мышей с B16. Окрашивание гематоксилином и эозином. Границы метастазов обведены линией. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента. Величина  $p$  указывает статистически достоверное отличие по сравнению с контролем, \* - статистически недостоверные отличие.

#### 4.3.3. Влияние биназы на регенераторный потенциал печени мышей-опухоленосителей

Поскольку биназа проявляет противоопухолевое действие в миллиграммовых, т.е., достаточно высоких дозах, и к тому же имеет бактериальное происхождение, то есть обладает достаточно высокой степенью ксеногенности для организма млекопитающих, необходимым являлось изучить влияние биназы на печень мышей-опухоленосителей. В эксперименте анализировали долю нормальной паренхимы печени, долю деструктивных изменений и некрозов, а также число двуядерных гепатоцитов, отражающих регенераторный

потенциал печени, на моделях LLC, RLS<sub>40</sub> и метастатической модели меланомы B16 после введения животным-опухоленосителям биназы в/м и в/б.

В печени контрольных животных-опухоленосителей, получавших инъекции физ/раствора, были обнаружены тяжелые деструктивные изменения, которые составили  $71.5 \pm 3.4\%$ ,  $77.9 \pm 0.9\%$  и  $70.7 \pm 1.6\%$  от общей паренхимы печени животных с опухолями LLC, RLS<sub>40</sub> и B-16, соответственно, и были преимущественно представлены некрозами. Введение биназы приводило к снижению деструктивных изменений в 1.2 - 2.2 раза в печени мышей-опухоленосителей [579].

При введении мышам с RLS<sub>40</sub> биназы или лечения в режиме ПХТ наблюдалось снижение численной плотности двуядерных гепатоцитов в 1.6 раза по сравнению с контролем, при применении комбинированной терапии снижение достигало 4 раз [579]. Такие тяжелые деструктивные изменения могут быть объяснены вкладом нескольких факторов, таких как эндогенная интоксикация вследствие распада первичной опухоли, инфильтрация печени метастазами, воздействием ПХТ и влиянием провоспалительных цитокинов. На метастатической модели меланомы B16 биназа в дозах 1 и 5 мг/кг вызывала снижение регенераторного потенциала печени в 1.7 и 1.3 раз, соответственно [579].

Совершенно другой результат был получен на модели LLC. Биназа приводила к снижению объемной плотности деструктивных изменений, а доля нормальной паренхимы печени увеличивалась с повышением дозы биназы с 0.1 до 1 мг/кг. При введении биназы в/м в дозах 0.1, 0.5 и 1 мг/кг доля нормальной паренхимы возрастала до 38.8, 49.2 и 64.2%, соответственно. При применении биназы в дозе 1 мг/кг в ткани печени наблюдалось значительное снижение доли деструктивных изменений: 30.8% против 72.1% в контрольной группе. Такое снижение деструктивных изменений и увеличение доли нормальной паренхимы печени хорошо коррелирует с противоопухолевым эффектом на модели LLC.

При в/б введении биназы также было отмечено снижение деструктивных изменений в печени мышей с LLC, однако, изменения были более выраженными. Так, уже при применении биназы в дозе 0.1 мг/кг доля нормальной паренхимы печени возрастала с 22.3% до 56.8%. Увеличение дозы биназы до 1 мг/кг оказывало незначительный эффект: доля нормальной паренхимы возрастала до 64.2%, то есть до такого же уровня, что и при в/м введении биназы. При применении биназы происходило снижение доли некрозов паренхимы печени в 2.2-2.6 раз по сравнению с контролем.

Численная плотность двуядерных гепатоцитов представлена в Таблице 14. Прогрессирование опухоли в отсутствие лечения приводило к снижению численной плотности в 3.3 раза, что отражало токсическую нагрузку опухоли на печень. Введение

биназы в/м во всем диапазоне доз не влияло на изменение численной плотности двуядерных гепатоцитов. Однако, введение биназы в/б в дозах 0.1, 0.5 и 1 мг/кг вызывало увеличение численной плотности двуядерных гепатоцитов в 1.8, 2.3 и 3.2 раза, соответственно, и, в итоге, достигался уровень регенерации, соответствующий уровню для здоровых животных.

Таким образом, биназа наряду с проявляемой ее противоопухолевой и антиметастатической активностью на модели LLC способна оказывать гепатопротекторный эффект, заключающийся в значительном снижении дистрофических изменений паренхимы и возрастании числа двуядерных гепатоцитов, отражающих регенераторный потенциал печени.

**Таблица 14.** Численная плотность двуядерных гепатоцитов в печени здоровых мышей C57bl/6J и мышей с LLC, получавших биназу.

Группы	Биназа, мг/кг	Двуядерные гепатоциты, Nv
мыши с LLC	–	2 ± 0.4
	1	3.6 ± 0.4*
мыши с LLC / физ/раствора	–	0.6 ± 0.2
мыши с LLC / биназа в/м	0.1	0.8 ± 0.2
	0.5	0.9 ± 0.2
	1	0.7 ± 0.2
мыши с LLC / биназа в/б	0.1	1.1 ± 0.1**
	0.5	1.4 ± 0.2** <sup>#</sup>
	1	1.9 ± 0.3** <sup>#</sup>

Nv – численная плотность двуядерных гепатоцитов; \* - статистически достоверные отличия по сравнению со здоровыми животными с  $p \leq 0.05$ ; \*\* - статистически достоверные отличия по сравнению с мышами C57Bl/6J с LLC, получавшими инъекции физ/раствора, с  $p \leq 0.05$ ; <sup>#</sup> - статистически достоверные отличия по сравнению с мышами C57Bl/6J с LLC, получавшими инъекции биназы в/м, с  $p \leq 0.05$ . Данные приведены как Mean±SEM.

#### 4.4. Заключение

Впервые нами был продемонстрирован противоопухолевый потенциал РНКазы А на двух опухолевых моделях, карциноме легких Льюис и гепатоме HA-1, в дозах (0.35 – 50 мг/кг), значительно меньших по сравнению с использованными ранее (10-1000 мг/кг), при которых исследователи наблюдали противоречивые результаты. РНКазы А в дозах 0.35 - 1 мг/кг при ежедневном внутримышечном введении в течение двух недель приводила к подавлению роста первичной опухоли на 25 – 30% и ингибированию метастазов на 60%. Наблюдаемые эффекты РНКазы А в диапазоне низких доз и их отсутствие в высоких дозах

согласно данным других исследователей позволяют заключить, что либо РНКазы А в низких дозах по какой-то причине избегают инактивации под действием рибонуклеазного ингибитора внутри опухолевой клетки, либо, что более вероятно, ее механизм противоопухолевой активности не является механизмом прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки, а реализуется на системном уровне.

Впервые был показан антиметастатический потенциал ДНКазы I на трех опухолевых моделях – карциноме легких Льюис, гепатоме А-1 и меланоме В16. Следует отметить, что работ по исследованию противоопухолевой активности ДНКазы I на моделях опухолей животных крайне мало – это модели рака поджелудочной железы, спонтанного лимфолейкоза и рака печени L5178Y-ML [520, 521], и лишь в нескольких из них показано антиметастатическое действие ДНКазы I. Впервые было показано снижение миграционной активности меланомы *in vitro* под действием ДНКазы I, что и объясняет такой высокий антиметастатический эффект (до 70% ингибирования метастазов) на модели меланомы *in vivo*.

Внимание к исследованию противоопухолевой активности РНКаз микробного происхождения объясняется их способностью избегать инактивации под действием внутриклеточного рибонуклеазного ингибитора и селективно запускать апоптоз в опухолевых клетках. Ранее цитотоксическая активность микробных РНКаз, включая биназу, была продемонстрирована *in vitro* на различных типах опухолевых клеток [479-581], однако до сих пор никогда не исследовалась *in vivo*. Впервые нами на трех опухолевых моделях различного гистогенеза, имеющих гомологию с опухолями человека, была продемонстрирована способность биназы замедлять рост первичной опухоли и рост метастазов. Биназа при введении в дозе 1 мг/кг замедляла рост первичных опухолей на 45% на моделях LLC и RLS<sub>40</sub>, и подавляла развитие метастазов на 50%. На модели меланомы В16 антиметастатический эффект был более выражен и достигал 70%. Сходная противоопухолевая и антиметастатическая активность биназы на модели LLC и модели RLS<sub>40</sub> с фенотипом МЛУустойчивости подчеркивают высокий терапевтический потенциал биназы.

Известно, что терапевтический системный эффект препарата *in vivo* зависит от гистологического типа опухоли и степени ее злокачественности, чрезвычайно высокой в случае меланомы. Тем не менее, антиметастатическая активность ДНКазы I и биназы на модели меланомы была сравнима с эффектами других экспериментальных химиопрепаратов, например, ингибитора киназ сигнального пути MAPK [582], химерного проапоптотического индуктора дииндолметана [583], антител против онкобелка PRL-3 [584] и ингибиторов

HSP90 [585], которые продемонстрировали способность подавлять рост опухоли и метастазов на модели ксенографта меланомы.

Нами было проведено сравнение противоопухолевой эффективности РНКазы А и биназы *in vivo* с эффектами других цитотоксических РНКаз. На крысиной модели карциномы легких Льюис BS-РНКазы в дозах 10 - 20 мг/кг при трехкратном введении в неделю в течение 20 дней вызывала подавление роста первичной опухоли с эффективностью 30 и 66% и снижала количество метастазов на 52% [586]. На ксенографтах опухоли простаты человека у мышей линии nude онконаза в дозе 10 мг/кг приводила к замедлению роста опухоли на 50% [30]. РНКазы А и биназы вызывали сходные эффекты: 30-45% ингибирование роста первичной опухоли при значительно меньших дозах – в случае РНКазы А на три порядка (0.7 мкг/кг), а биназы – на порядок (0.5 - 1 мг/кг).

Таким образом, исследованные природные нуклеазы обладают высоким противоопухолевым и антиметастатическим потенциалом и являются кандидатными препаратами для исследования в пре-клинических и клинических исследованиях.

## **ГЛАВА 5. Иммуномодулирующее действие ДК-вакцин, РНКазы А, ДНКазы I и биназы**

Парадигма иммунного надзора за опухолью предполагает, что большинство клеток в состоянии пред-перерождения или на ранней стадии злокачественного перерождения могут быть устранены (или, по крайней мере, контролируются) клетками иммунной системы. Критической особенностью, которая отличает опухолевые клетки, является их способность уклоняться от иммунного контроля. Как следствие, подавляющее большинство существующих опухолей слабо иммуногенны и не индуцируют активацию АПК в организме, способных запускать Т-клеточный иммунный ответ, так же как и гуморальное звено противоопухолевого ответа, обеспечивающего правильный профиль цитокинов для их элиминации. Более того, прямая супрессия пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов опухолью или опухолевым окружением и подавление дифференцировки ДК составляют важный механизм ухода опухоли от действия иммунной системы. Таким образом, потенцирование иммунной системы, заключающееся в активации Т-клеточного звена и индукции синтеза цитокинов, крайне важно для терапии онкологических заболеваний.

Задачей настоящей главы являлось изучение иммуномодулирующего действия ДК-вакцин, РНКазы А, ДНКазы I и биназы *in vivo*, вносящего вклад в противоопухолевый ответ.

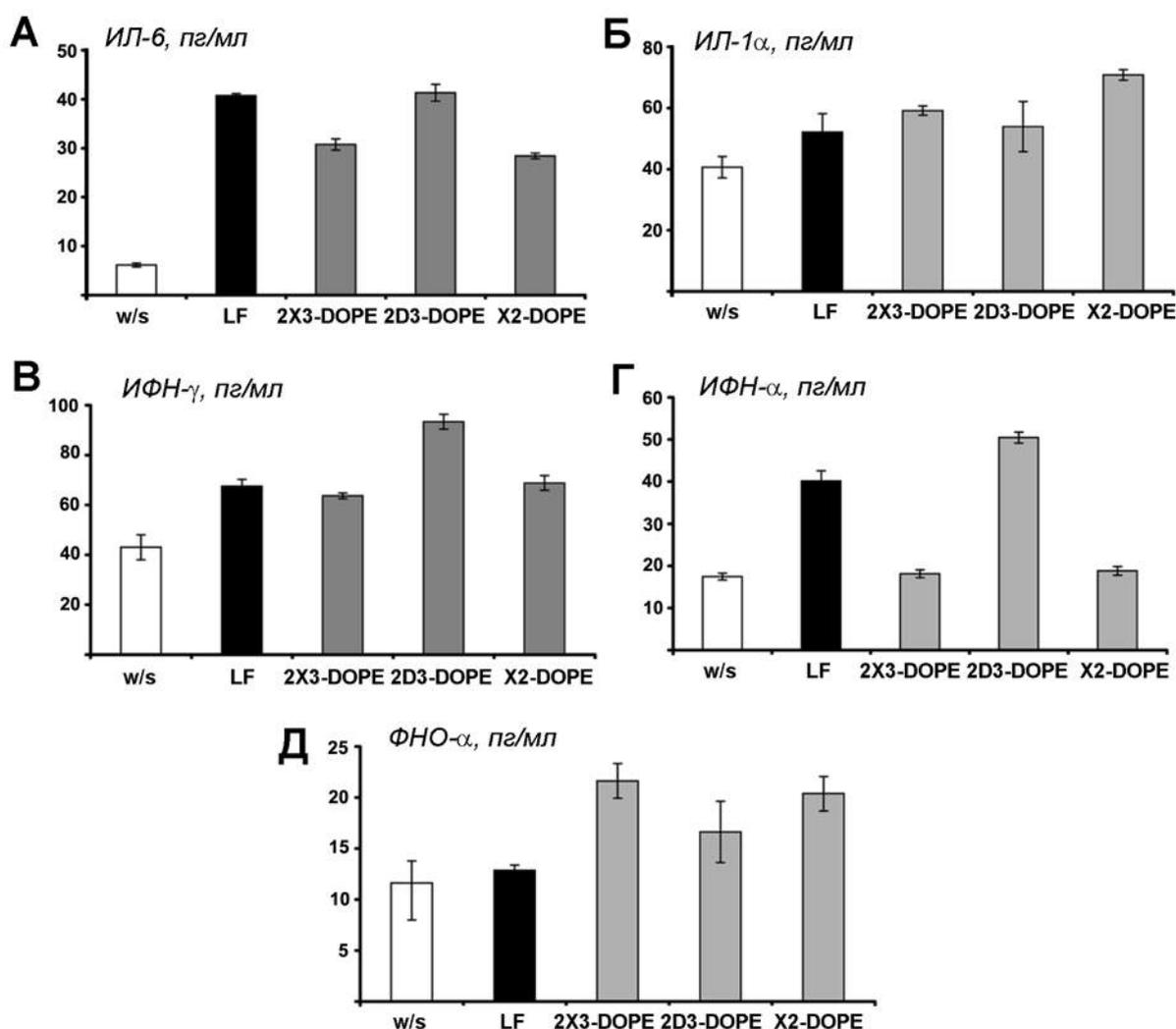
### **5.1. Иммуномодулирующее действие ДК-вакцин**

#### **5.1.1. Влияние комплексов липосом серии N-DOPE с РНК-B16 на иммуномодулирующие свойства ДК *in vitro* и *in vivo***

ДК играют ключевую роль в индукции антиген-специфического противоопухолевого Т-клеточного ответа. Следует ожидать, что наблюдаемый антиметастатический эффект ДК, нагруженных комплексами липосом с РНК-B16, опосредуется специфическими клонами ЦТЛ, праймированными этими ДК *in vivo*. Однако сами молекулы РНК, а также высокая концентрация положительного заряда липоплексов могут инициировать продукцию ДК провоспалительных цитокинов и интерферонов, что в итоге может привести к запуску нежелательного системного воспалительного ответа после введения таких ДК в организм [556]. Поскольку системный воспалительный ответ может обладать негативным влиянием на потенциал активированных ЦТЛ, был исследован уровень провоспалительных цитокинов в культуральной среде на этапе нагрузки ДК *ex vivo* комплексами липосом с РНК и в сыворотке крови экспериментальных животных с метастатической меланомой В16 после введения ДК-вакцин.

Продукция ДК провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-6, являющегося также маркером стимуляции ДК) и интерферонов (ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$ ) была оценена в ростовой среде, в которой культивировали ДК, через 48 ч после нагрузки ДК РНК-В16 в комплексе с катионными липосомами N-DOPE (Рис. 28). Уровни продукции цитокинов нестимулированными ДК, ДК, обработанных липосомами, и ДК, нагруженных комплексами LF/РНК-В16, использовали в качестве контролей.

Единственным цитокином, чья продукция значительно увеличивалась после трансфекции ДК всеми исследованными липосомальными композициями являлся ИЛ-6: его уровень возрастал в 6-8 раз по сравнению с ДК без стимуляции (Рис. 28, А). Уровень ИЛ-1 $\alpha$  повышался в 1.6 раз в случае липоплексов X2-DOPE/РНК-В16 и незначительно повышался в

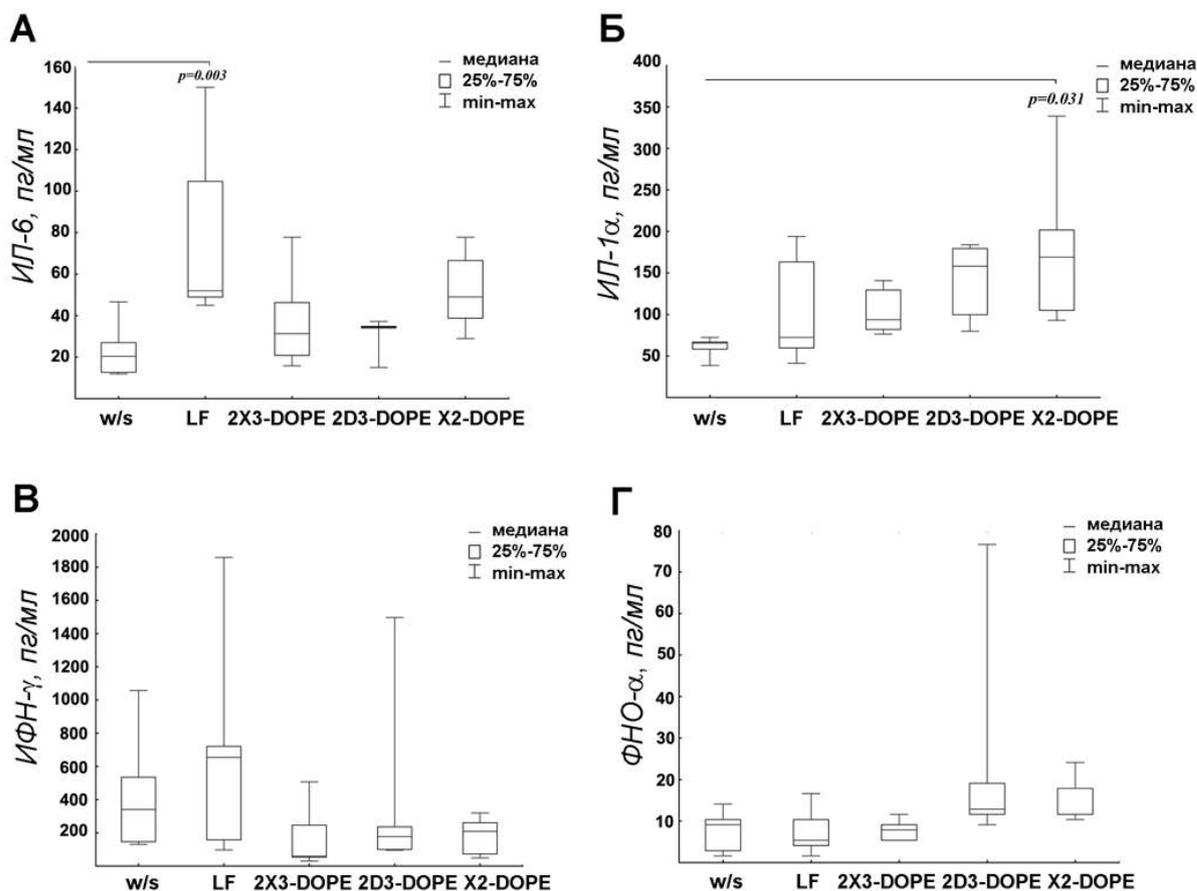


**Рис. 28.** Уровень цитокинов в культуральной среде через 48 ч после трансфекции ДК РНК-В16 в комплексах с LF, 2X3-DOPE, 2D3-DOPE и X2-DOPE. w/s – нестимулированные ДК. Измерение цитокинов проводили с помощью наборов ELISA. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента.

случае остальных липоплексов. После обработки ДК липоплексами с 2D3-DOPE наблюдалось повышение уровня ИФН- $\gamma$  в 2.3 раза, в случае других липосом – в 1.6 раз относительно нестимулированных ДК. После обработки ДК исследуемыми липоплексами также увеличились уровни ФНО- $\alpha$  в 1.5-1.8 раз и ИФН- $\alpha$  в 2-3 раза по сравнению с нестимулированными ДК. Следует отметить, что в случае ИФН- $\alpha$  только липоплексы LF/РНК-В16 и 2D3-DOPE/РНК-В16 стимулировали его продукцию (в 2.3 и 3 раза, соответственно), тогда как другие липоплексы не оказывали никакого эффекта (Рис. 28, Г). Обработка ДК пустыми липосомами приводила к незначительному увеличению уровня исследуемых цитокинов в ростовой среде, однако их величины достоверно не отличались от уровня цитокинов для нестимулированных ДК (первичные данные не приведены).

Уровни этих же цитокинов были определены в сыворотке крови животных с метастатической меланомой после введения ДК, нагруженных комплексами катионных липосом серии N-DOPE и РНК В16 (Рис. 29). Инъекции ДК, нагруженных липоплексами, не вызывали достоверного повышения уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$ , а также ИФН- $\gamma$  (Рис. 29, А, В, Г). Введение ДК, нагруженных комплексами 2Х3-DOPE/РНК-В16, 2D3-DOPE/РНК-В16 и Х2-DOPE/РНК-В16, приводило к увеличению уровня ИЛ-1 $\alpha$  в 1.4, 2.4 и 2.6 раза, соответственно, по сравнению с контрольной группой, однако статистически достоверное повышение было отмечено только для комплексов Х2-DOPE/РНК-В16 (Рис. 29, Б). Введение ДК, нагруженных липоплексами, не влияло на уровень интерферонов (данные для ИФН- $\gamma$  представлены на Рис. 29, В, данные для ИФН- $\alpha$  не представлены, средний уровень ИФН- $\alpha$  составлял 45 пг/мл и не отличался между группами).

Мы попытались оценить корреляцию между продукцией цитокинов ДК, нагруженными различными липоплексами, *in vitro* и системным ответом у мышей, получавших инъекции таких же ДК. В условиях *in vitro* нагрузка ДК липоплексами приводила к повышению продукции ДК ИЛ-6. ИЛ-6, помимо того, что является одним из главных провоспалительных цитокинов, также служит маркером ответа ДК на стимулы созревания/активации [587, 588]. Нагрузка ДК липоплексами 2Х3-DOPE/РНК-В16 и 2D3-DOPE/РНК-В16 приводила к 1.2-кратному увеличению продукции ИЛ-1 $\alpha$ . Следует отметить, что ДК, нагруженные этими липоплексами, *in vivo* также индуцируют повышение уровня сывороточного ИЛ-1 $\alpha$ . ИЛ-1 $\alpha$  помимо того, что является провоспалительным цитокином, играет роль сигнала, способствующего миграции ДК из периферических тканей в лимфатические узлы [589], что является положительной функцией ИЛ-1 $\alpha$  по отношению к ДК. Уровень другого важного индикатора провоспалительного ответа



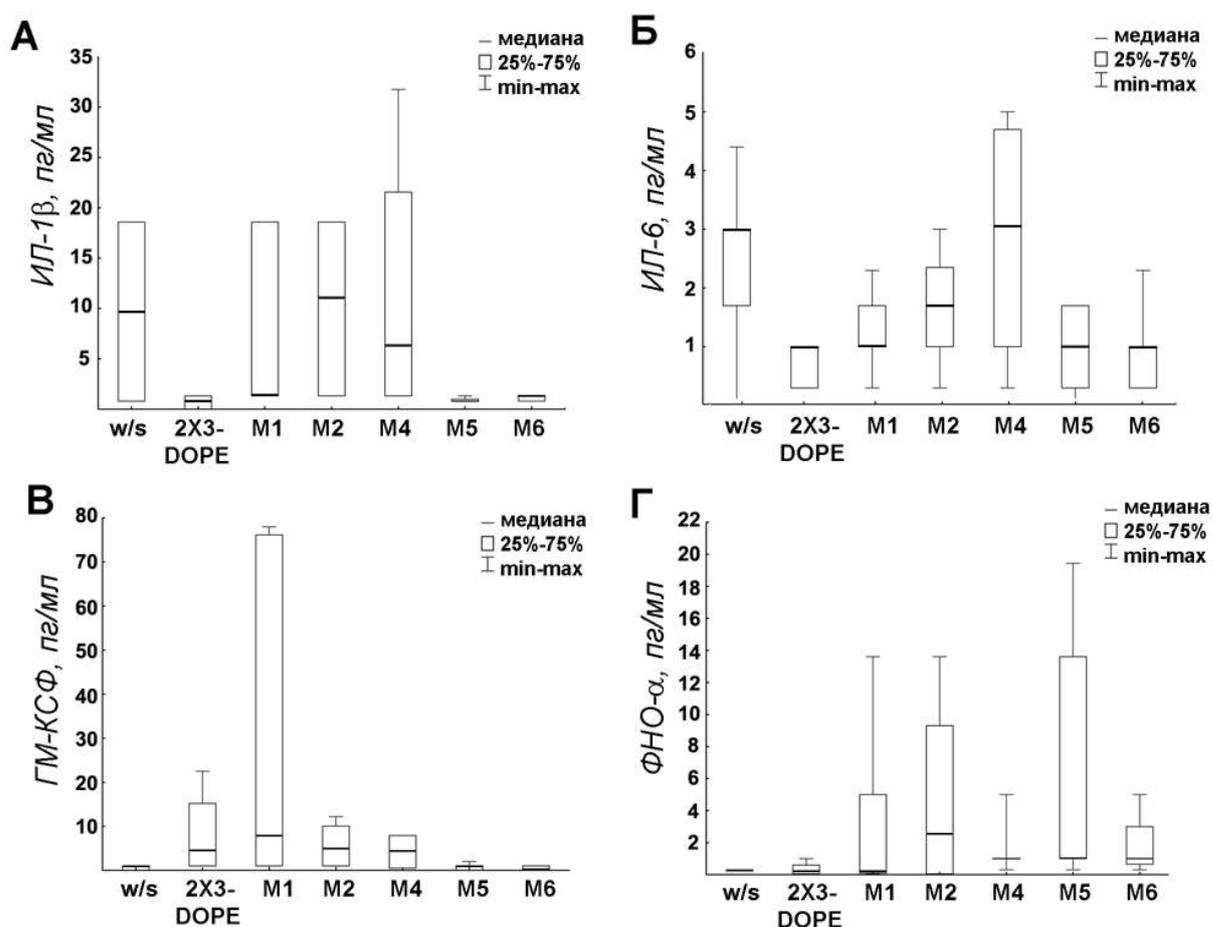
**Рис. 29.** Уровень цитокинов в сыворотке крови животных с метастатической меланомой B16 после введения ДК, нагруженных РНК-B16 в комплексах с LF, 2X3-DOPE, 2D3-DOPE и X2-DOPE. Сыворотку крови животных-опухоленосителей, не получавших ДК, использовали в качестве контроля. Измерение цитокинов проводили с помощью наборов ELISA. Статистический анализ был проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки. Значение  $p$  отражает статистически достоверные отличия по сравнению с контролем.

ФНО- $\alpha$  практически оставался неизменным как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, липоплексы 2D3-DOPE/РНК-B16 стимулировали *in vitro* сильное повышение продукции ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$ , хотя таких эффектов и не наблюдалось *in vivo*. Таким образом, как *in vitro*, так и *in vivo* наблюдаемое изменение профиля цитокинов имеет позитивное влияние на активацию и миграцию ДК, и, следовательно, на индуцируемый ДК противоопухолевый ответ.

### 5.1.2. Влияние липоплексов РНК-B16/липосомы серии МЛ на активацию иммунного ответа в организме-опухоленосителе

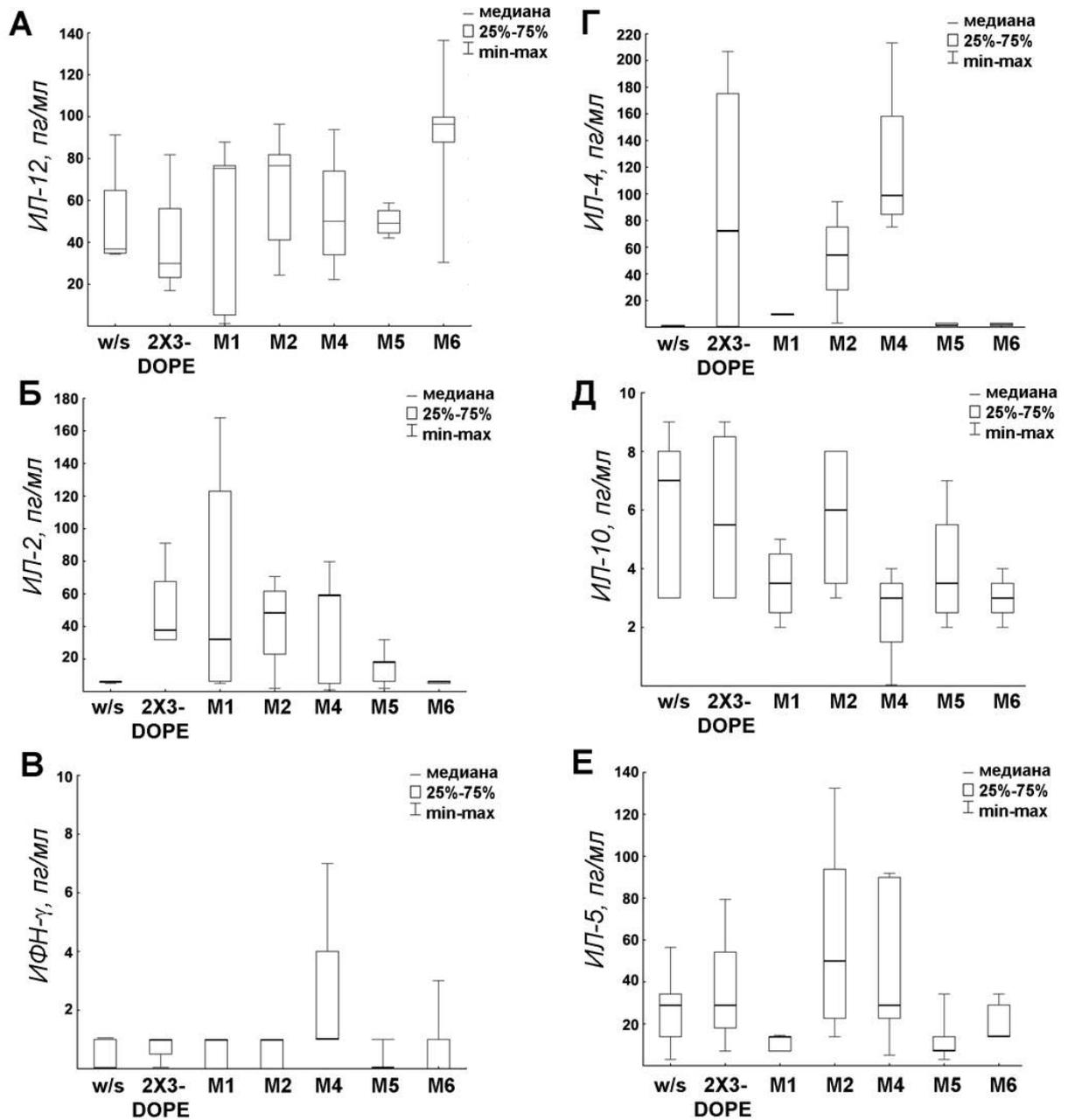
Поскольку маннозилированные липосомы содержали в своем составе остатки маннозы и химические модификации, отличающие их от коровых липосом 2X3-DOPE, было важным исследовать их способность влиять на уровень индукции провоспалительных цитокинов в организме мышей после введения ДК, нагруженных такими липоплексами.

Концентрации провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ГМ-КСФ и ФНО- $\alpha$ ) и цитокинов, определяющих тип Т-хелперного ответа, определяли в сыворотке крови мышей с метастатической меланомой В16 после однократной в/в инъекции ДК. Как видно из представленных данных, введение ДК не индуцировало продукцию цитокинов ИЛ-6, ФНО- $\alpha$  и ГМ-КСФ (Рис. 30, Б, В, Г). Уровень ИЛ-1 $\beta$  в контроле и группах М2 и М4 составил порядка 10 пг/мл, тогда как в группах 2Х3-DOPE, М5 и М6 наблюдалось снижение уровня этого цитокина практически до нуля (Рис. 30, А).



**Рис. 30.** Уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови животных с метастатической меланомой В16 после введения ДК, нагруженных липopleксами МЛ/РНК-В16. **А.** ИЛ-1 $\beta$ . **Б.** ИЛ-6. **В.** ГМ-КСФ. **Г.** ФНО- $\alpha$ . Сыворотку крови животных-опухоленосителей, не получавших ДК, использовали в качестве контроля. Статистические данные обрабатывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки, отличия при  $p < 0.05$  считали статистически достоверными.

Далее были исследованы три важных звена иммунного ответа – Т хелперный ответ 1 типа (Th1), Т хелперный ответ 2 типа (Th2) и провоспалительный ответ. Исследование поляризации Т-хелперного ответа 1 типа показало, что для групп М1, М2, М4, М5 и М6



**Рис. 31.** Уровень цитокинов в сыворотке крови животных с метастатической меланомой В16 после введения ДК, нагруженных липоплексами МЛ/РНК-В16. Т-хелперный ответ 1 типа: (А) ИЛ-12, (Б) ИЛ-2, (В) ИФН- $\gamma$ . Т-хелперный ответ 2 типа: (Г) ИЛ-4, (Д) ИЛ-10, (Е) ИЛ-5. Сыворотку крови животных-опухоленосителей, не получавших ДК, использовали в качестве контроля. Статистические данные обрабатывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки, отличия при  $p < 0.05$  считали статистически достоверными.

наблюдается повышение уровня ИЛ-12 в 1.3 – 2.6 раз (Рис. 31, А), а для групп 2X3-DOPE, M1, M2, M4 и M5 – повышение уровня ИЛ-2 в 2.8 – 9.4 раза (Рис. 31, Б). Ни для одной из липосомальных композиций не было выявлено изменения уровня ИФН- $\gamma$  (Рис. 31, В). В случае цитокинов, специфических для Т-хелперного ответа 2 типа, для групп 2X3-DOPE, M2 и M4 наблюдалось повышение уровня ИЛ-4 в 50 – 100 раз (Рис. 31, Г), для группы M2 –

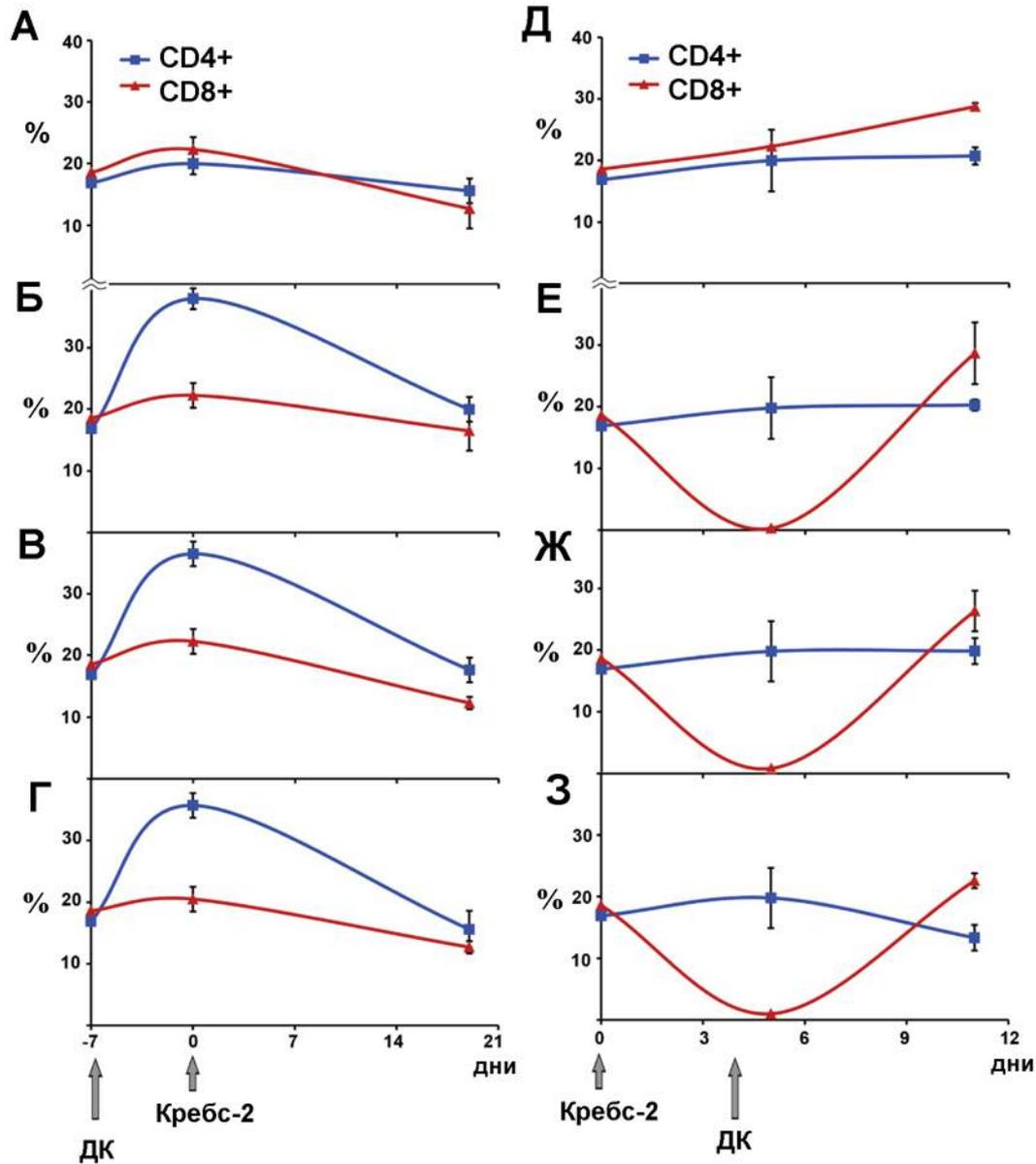
повышение уровня ИЛ-5 в 1.7 раз (Рис. 31, Е). Изменения уровня ИЛ-10 выявлено не было (Рис. 31, Д). Таким образом, для ДК, нагруженных липоплексами М1, М4 и М5, характерна поляризация Т-хелперного ответа 1 типа, тогда как для ДК, нагруженных липоплексами М2 –Т-хелперного ответа как 1 так и 2 типа.

ДК в селезенке животных подразделяются на CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> и CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> ДК. CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> ДК индуцируют Th1-ответ, тогда как CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> ДК - Th2 ответ. Th1 ответ, в большей степени, ответственен за дифференцировку CD8<sup>+</sup> цитотоксических лимфоцитов и является более предпочтительным по сравнению с другими Т-хелперными ответами. Th1 клетки активируют макрофаги, NK клетки, и CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-клетки, эффективно элиминирующие патогены в чистом виде, клетки, инфицированные патогенами, и опухолевые клетки. Индукция Th1-ответа CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> ДК происходит благодаря продукции большого количества ИЛ-12p70 CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> ДК. В противоположность этому, CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> ДК индуцируют Th2-ответ за счет продукции цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10, хотя точный механизм активации Th2-ответа под действием CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> ДК неизвестен [590]. Известно, что Т-хелперные ответы 1 и 2 типов находятся в постоянном балансе друг с другом, дифференцировка Th1 и Th2 клеток является антагонистической. Поэтому можно предполагать, что снижение уровней Th2-специфических цитокинов в сыворотке крови мышей с меланомой В16, получавших профилактические ДК вакцины, указывает на поляризацию Т-хелперного ответа 1 типа с последующей активацией противоопухолевого цитотоксического Т-клеточного ответа.

### **5.1.3. Иммунологические характеристики организма-опухоленосителя после применения ДК вакцин по профилактической и терапевтической схемам**

Нами было исследовано соотношение CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> клеток в селезенках животных с Кребс-2, получавших профилактические и терапевтические ДК вакцины, которое отражало баланс между Т-хелперным и цитотоксическим Т-клеточными ответами (Рис. 32). Количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток в точках *-7 день* (Рис. 32, А-Г) и *0 день* (Рис. 32, Д-З) измеряли до введения ДК вакцин и трансплантации опухоли, таким образом, данные показатели отражали количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток в селезенках здоровых мышей, которое составило CD4<sup>+</sup> (18%)/CD8<sup>+</sup> (19%).

Количество CD4<sup>+</sup> клеток в контрольной группе профилактической схемы (животные с Кребс-2, получавшие инъекции физ/раствора, 19 день развития опухоли) слабо изменялось в ходе прогрессии опухоли (Рис. 32, А). Все профилактические вакцины 1/LF, 1/LF/PHK, 1/лизат вызывали двукратное увеличение содержания CD4<sup>+</sup> клеток на седьмой день после



**Рис. 32.** Количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток в селезенках животных с Кребс-2, получавших профилактические и терапевтические ДК вакцины. **А.** w/t, контроль, мыши с Кребс-2, получавшие инъекции физ/раствора, 19 день развития опухоли. **Б, В и Г.** Мыши, получавшие профилактические ДК вакцины 1/LF, 1/LF/PNK и 1/лизат, соответственно. **Д.** w/t, контроль, мыши с Кребс-2, получавшие инъекции физ/раствора, 11 день развития опухоли. **Е, Ж и З.** Мыши, получавшие терапевтические ДК вакцины 2/LF, 2/LF/PNK и 2/лизат, соответственно. Количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток в точке -7 день отражает содержание клеток в селезенках здоровых мышей. Тип ДК вакцины представлен в виде С-И/Т/А, где С – схема (1 – профилактическая, 2 - терапевтическая), И – количество иммунизаций, Т – трансфектант, А – источник антигена. Данные представлены как MEAN±S.E.M.

введения ДК вакцин (день трансплантации опухоли) вне зависимости от источника антигена (Рис. 32, Б, В, Г). К окончанию эксперимента (день 19) количество CD4<sup>+</sup> клеток снижалось до уровня животных из контрольной группы и находилось в пределах 18-22% (Рис. 32, А).

Количество CD8<sup>+</sup> клеток слабо снижалось с 19% (базовый уровень) до 13-17% на 19 день развития опухоли во всех экспериментальных группах, включая контроль (Рис. 32, А - Г).

Количество CD4<sup>+</sup> клеток в контрольной группе терапевтической схемы (животные с Кребс-2, получавшие инъекции физ/раствора, 11 день развития опухоли) слабо увеличивалось с 17% (базовый уровень) до 21% в ходе развития опухоли (Рис. 32, Д). Терапевтические ДК вакцины 2/LF и 2/LF/PHK не влияли на содержание CD4<sup>+</sup> клеток (Рис. 32, Е, Ж). В случае ДК вакцины 2/лизат количество CD4<sup>+</sup> клеток падало до 13% к концу эксперимента (Рис. 32, З).

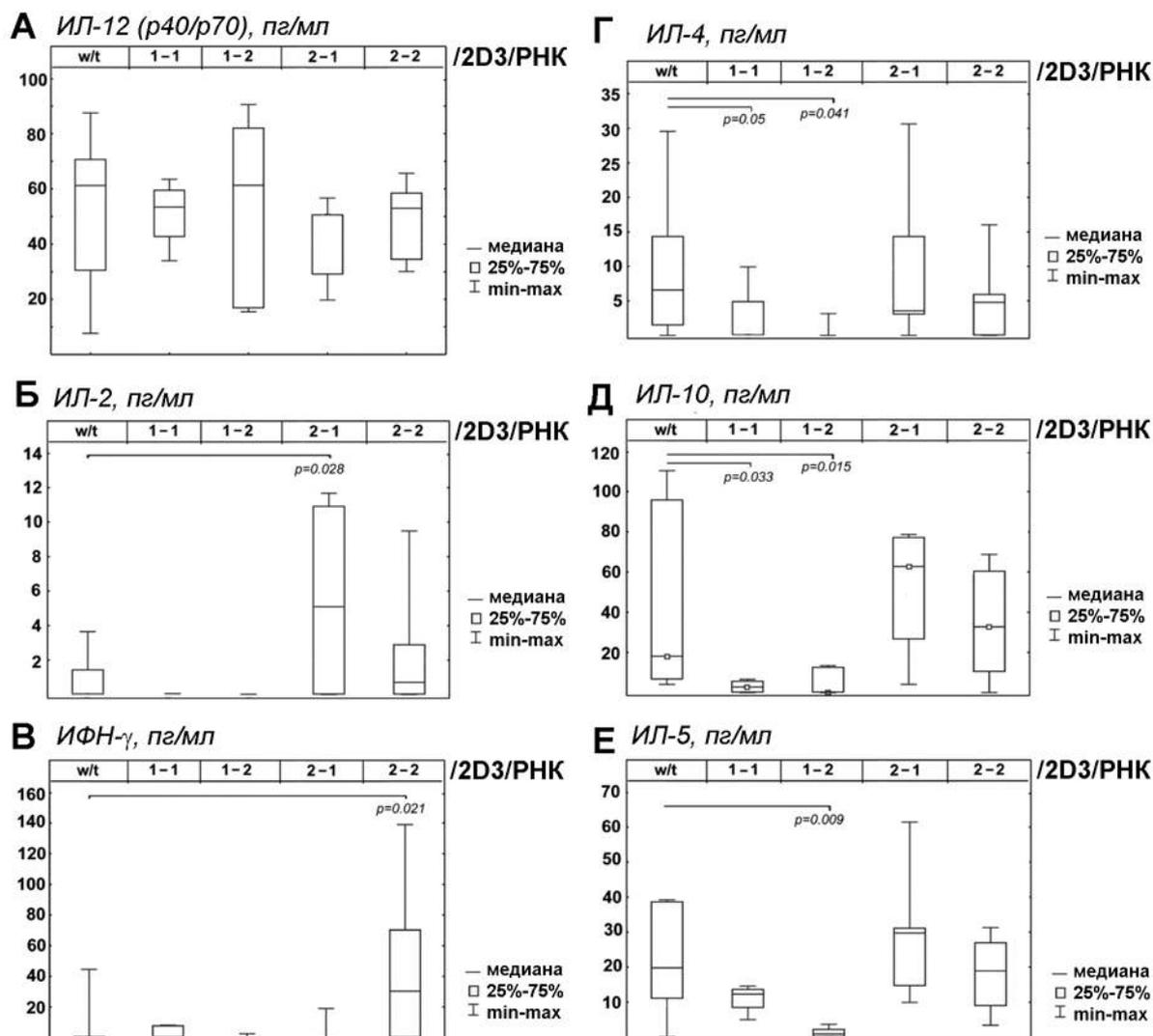
Количество CD8<sup>+</sup> клеток в контрольной группе терапевтической схемы значительно росло с 19% (базовый уровень) до 29% к 11 дню (Рис. 32, Д). Все терапевтические ДК вакцины 2/LF, 2/LF/PHK и 2/лизат вызывали практически полное исчезновение CD8<sup>+</sup> клеток в первый день после введения ДК вакцин (5 день после трансплантации опухоли) (Рис. 32, Е, Ж, З). Тем не менее, на 7 день после иммунизации мышей ДК (11 день после трансплантации опухоли) количество CD8<sup>+</sup> клеток в группах 2/LF и 2/LF/PHK возвратилось к контрольному уровню (29%). В группе 2/лизат также наблюдалось увеличение содержания CD8<sup>+</sup> клеток, но в меньшей степени по сравнению с терапевтическим контролем (22% и 29%, соответственно).

Мы ожидали, что эффективность ДК-вакцин, то есть противоопухолевый и антиметастатический ответ, будет зависеть от соотношения CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> клеток в селезенке мышей-опухоленосителей и будет коррелировать с Th1 и Th2 ответами. Значительное уменьшение размера первичной опухоли под действием терапевтической ДК-вакцины на модели Кребс-2 сопровождалось существенным снижением CD8<sup>+</sup> клеток. По всей вероятности, это связано с рекрутированием CD8<sup>+</sup> клеток ДК в лимфоузлах, в связи с чем наблюдается значительное снижение их количества в селезенке. В случае применения профилактической ДК-вакцины на модели Кребс-2 не было отмечено снижения скорости роста первичной опухоли, при этом в селезенке наблюдалось повышение количества CD4<sup>+</sup> клеток и незначительное снижение CD8<sup>+</sup> клеток. Очевидно, что не происходило рекрутирования CD8<sup>+</sup> клеток ДК, и, как следствие, не было запуска Т-киллерного ответа и уменьшения размера опухоли.

На следующем этапе для оценки иммунного статуса экспериментальных животных с меланомой В16, получавших профилактические и терапевтические ДК вакцины, были исследованы три важных звена иммунного ответа – Т хелперный ответ 1 типа (Th1), Т хелперный ответ 2 типа (Th2) и провоспалительный ответ. Концентрацию специфических цитокинов измеряли в сыворотке крови экспериментальных животных на 15 день развития

опухоли (см. Рис. 15, Б). Было показано, что вакцинация мышей ДК по профилактической схеме не приводила к статистически значимым изменениям в профилях цитокинов специфических для Th1 типа (Рис. 33, А, Б, В). В случае терапевтической схемы наблюдалось увеличение уровней ИЛ-2 и ИЛ-12 (p40/p70) в группах 2-1/2D3/PHK и 2-2/2D3/PHK, соответственно.

Тем не менее, в группах животных, получавших профилактические ДК вакцины, наблюдалось падение уровня цитокинов, специфичных для Th2 ответа (Рис. 33, Г, Д, Е).



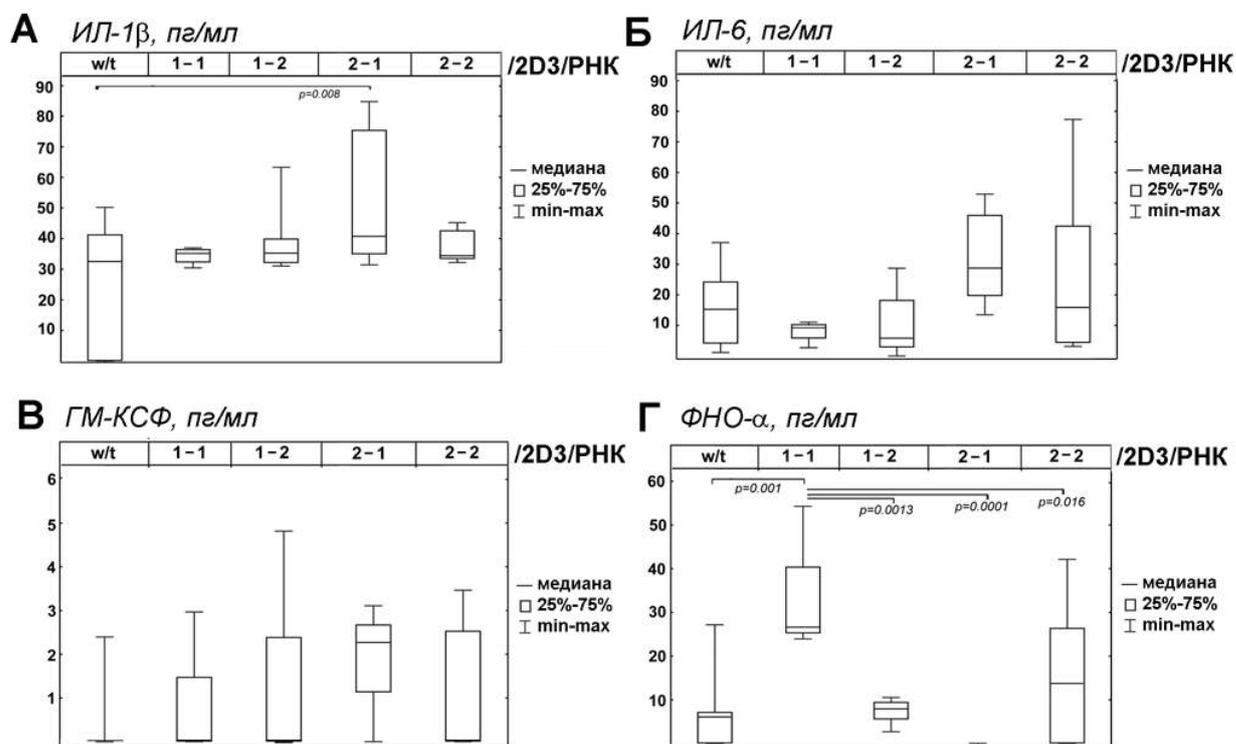
**Рис. 33.** Уровень Th1- и Th2-цитокинов в сыворотке крови мышей с меланомой B16 после профилактической и терапевтической ДК вакцинации. Th1-специфические цитокины: (А) ИЛ-12 (p40/p70); (Б) ИЛ-2; (В) ИФН- $\gamma$ . Th2-специфические цитокины: (Г) ИЛ-4; (Д) ИЛ-10; (Е) ИЛ-5. w/t – контроль, мыши с метастатической меланомой B16, получавшие инъекции физ/раствора. Тип ДК вакцины приведен как С-И/Т/А, где С – схема (1- профилактическая, 2 – терапевтическая), И – количество иммунизаций, Т – трансфектант, А – источник антигена. Статистическая обработка данных была проведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием наименьшей значимости Фишера. Значение  $p$  отражает статистически достоверные отличия по сравнению с контролем.

Можно отметить практически полное исчезновение ИЛ-4 ( $p=0.05$  и  $p=0.041$  для групп 1-1/2D3/РНК и 1-2/2D3/РНК, соответственно, Рис. 33, Г), полное падение уровня ИЛ-10 для 1-2/2D3/РНК и шестикратное падение уровня ИЛ-10 ( $p=0.033$  для группы 1-1/2D3/РНК, Рис. 32, Д). Также следует отметить 1.6-кратное снижение концентрации ИЛ-5 в группе 1-1/2D3/РНК (Рис. 33, Е) и практически полное исчезновение ИЛ-5 в группе 1-2/2D3/РНК ( $p=0.009$ , Рис. 33, Е). В сыворотке крови животных, получавших терапевтические ДК вакцины 2-1/2D3/РНК и 2-2/2D3/РНК, изменений в концентрациях цитокинов, специфичных для Th2 ответа, обнаружено не было. Известно, что Т-хелперные ответы 1 и 2 типов находятся в постоянном балансе друг с другом, дифференцировка Th1 и Th2 клеток является антагонистической. В случае ухода опухоли от иммунного надзора баланс смещается в направлении  $Th2 > Th1$ , тогда как в случае нахождения опухоли под иммунным надзором –  $Th1 > Th2$ . Поэтому можно предположить, что снижение уровней Th2-специфических цитокинов в сыворотке крови мышей с меланомой В16, получавших профилактические ДК вакцины, указывает на поляризацию Т-хелперного ответа 1 типа со сдвигом равновесия  $Th1 > Th2$  с последующей активацией противоопухолевого цитотоксического Т-клеточного ответа.

Анализ провоспалительных цитокинов в сыворотке крови экспериментальных животных показал, что только в двух случаях наблюдается повышение их уровня: 1.3-кратное повышение уровня ИЛ-1 $\beta$  в группе 2-1/2D3/РНК (Рис. 34, А) и трехкратное повышение уровня ФНО- $\alpha$  в группе 1-1/2D3/РНК (Рис. 34, Г). Высокие концентрации таких цитокинов как ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  часто связаны с системным воспалением при опухолевой прогрессии и повышение синтеза данных цитокинов является плохим прогностическим признаком. Отсутствие активации провоспалительного ответа под действием ДК, нагруженных липосомальными композициями с опухолевой РНК, является важным результатом, поскольку свидетельствует об иммунологической безопасности используемых ДК-вакцин.

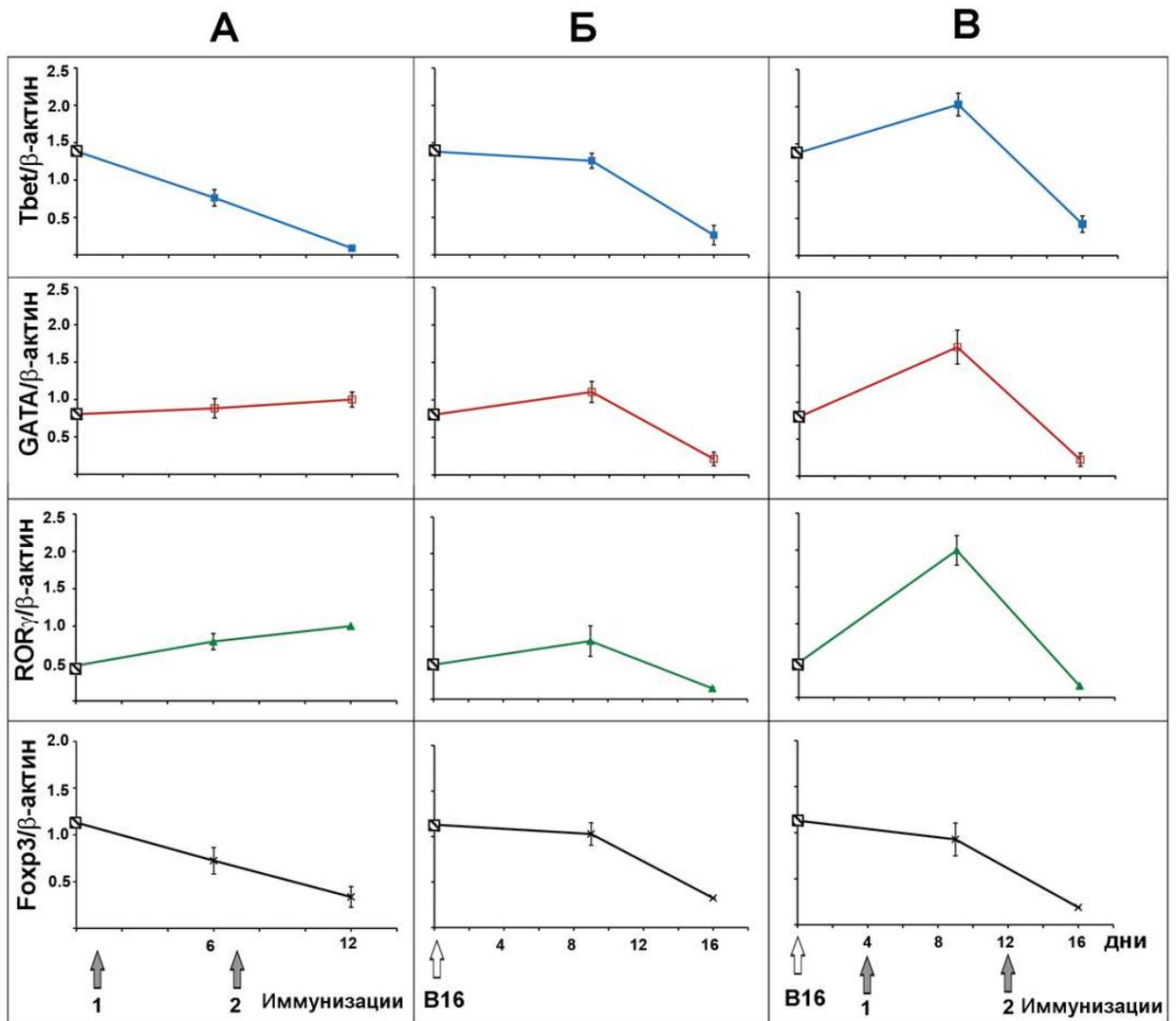
#### **5.1.4. Оценка экспрессии транскрипционных факторов Tbet, ROR $\gamma$ , GATA3 и Foxp3, специфичных для Т-хелперных ответов**

Анализ уровней Th1- и Th2-специфичных цитокинов в сыворотке крови мышей с меланомой после ДК вакцинации по профилактической и терапевтической схемам не позволил достоверно определить тип Т-хелперного ответа. Поэтому мы провели оценку уровня экспрессии транскрипционных факторов Tbet (специфичен для Th1 ответа), GATA3 (специфичен для Th2 ответа), ROR $\gamma$  (специфичен для Th17 ответа) и маркера Т-регуляторных клеток Foxp3 в спленоцитах мышей с метастатической меланомой В16, получавших ДК



**Рис. 34.** Уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови мышей с меланомой В16 после профилактической и терапевтической ДК вакцинации. **А.** ИЛ-1β. **Б.** ИЛ-6. **В.** ГМ-КСФ. **Г.** ФНО-α. w/t – контроль, мыши с метастатической меланомой В16, получавшие инъекции физ/раствора. Тип ДК вакцины приведен как С-И/Т/А, где С – схема (1 – профилактическая, 2 – терапевтическая), И – количество иммунизаций, Т – трансфектант, А – источник антигена. Статистическая обработка данных была проведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием наименьшей значимости Фишера. Значение *p* отражает статистически достоверные отличия по сравнению с контролем.

вакцины, с помощью qПЦР (Рис. 35). Для этого использовали метастатическую модель меланомы В16 с одно- и двукратной иммунизацией ДК (Рис. 15, Б). Оказалось, что как однократная, так и двукратная профилактическая ДК вакцина не оказывала эффекта на уровень GATA3 (Рис. 35, А): уровень экспрессии данного гена не отличался от базовой линии (здоровые животные, точка пересечения с осью Y, Рис. 35, А-В) и контрольной группы (w/t, мыши с метастатической меланомой В16, не получавшие ДК вакцины, Рис. 35, Б). Увеличение количества профилактических ДК иммунизаций привело к исчезновению Tbet ( $p=0.0018$ ) и двукратному увеличению уровня RORγ ( $p=0.04$ ), с чем может быть связано отсутствие эффективности двукратной профилактической ДК вакцины, поскольку поляризация Th17-ответа свидетельствует о развитии аутоиммунных и провоспалительных реакций в организме. Кроме этого, наблюдалось трехкратное снижение уровня Foxp3 по сравнению с базовой линией (здоровые животные), однако отличия являлись статистически недостоверными (Рис. 35, А).



**Рис. 35.** Уровни экспрессии Tbet, GATA3, RORγ и Foxp3 в спленоцитах мышей после ДК вакцинации (данные qПЦР). **А.** Профилактическая схема: здоровые мыши получали ДК вакцины 1-1/2D3/РНК и 1-2/2D3/РНК (однократная и двукратная иммунизация, соответственно). **Б.** Мыши с метастатической меланомой, получавшие инъекции физ/раствора. **В.** Терапевтическая схема: мыши с метастатической меланомой получали ДК вакцины 2-1/2D3/РНК и 2-2/2D3/РНК (однократная и двукратная иммунизация, соответственно). Перечеркнутый квадрат на оси Y отражает уровень экспрессии генов в здоровых интактных мышах (базовая линия). Тип ДК вакцины указан как С-И/Т/А, где С – схема применения 1 (профилактическая) или 2 (терапевтическая), И – количество иммунизаций, Т – трансфектант, А – источник антигена. Экспрессию генов в группе, не получавшей ДК-вакцины (контроль), определяли на девятый и 16 дни развития опухоли. Экспрессию генов в группах, получавших профилактические и терапевтические ДК вакцины, измеряли через пять дней после каждой иммунизации. Данные представлены в виде  $MEAN \pm S.E.M.$  Статистический анализ был проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием наименьшей значимости Фишера (Fisher LSD).

Однократная терапевтическая иммунизация мышей-опухоленосителей ДК вакциной приводила к увеличению уровня экспрессии Tbet, GATA3 и RORγ по сравнению с базовой линией и группой w/t (Рис. 35, В и Б). Уровни Tbet и GATA3 увеличивались в 1.3 и 2 раза

относительно группы w/t, но статистически недостоверно. Уровень ROR $\gamma$  увеличивался в 5 раз по сравнению с группой w/t ( $p=0.019$ ). Таким образом, увеличение уровней экспрессии ROR $\gamma$  и Tbet вместе с повышением уровня некоторых Th1-специфичных цитокинов в сыворотке крови мышей может указывать на то, что однократная терапевтическая вакцинация модифицированными ДК приводит к поляризации Th1/Th17 ответа. Следует отметить, что уровни экспрессии Tbet, GATA3 и ROR $\gamma$  после второй терапевтической ДК иммунизации не отличались от уровней в группе w/t (Рис. 35, В и Г). Уровень экспрессии Foxp3 снижался во всех группах животных, но статистически недостоверно, что, тем не менее, указывает на отсутствие индукции Т-регуляторных клеток.

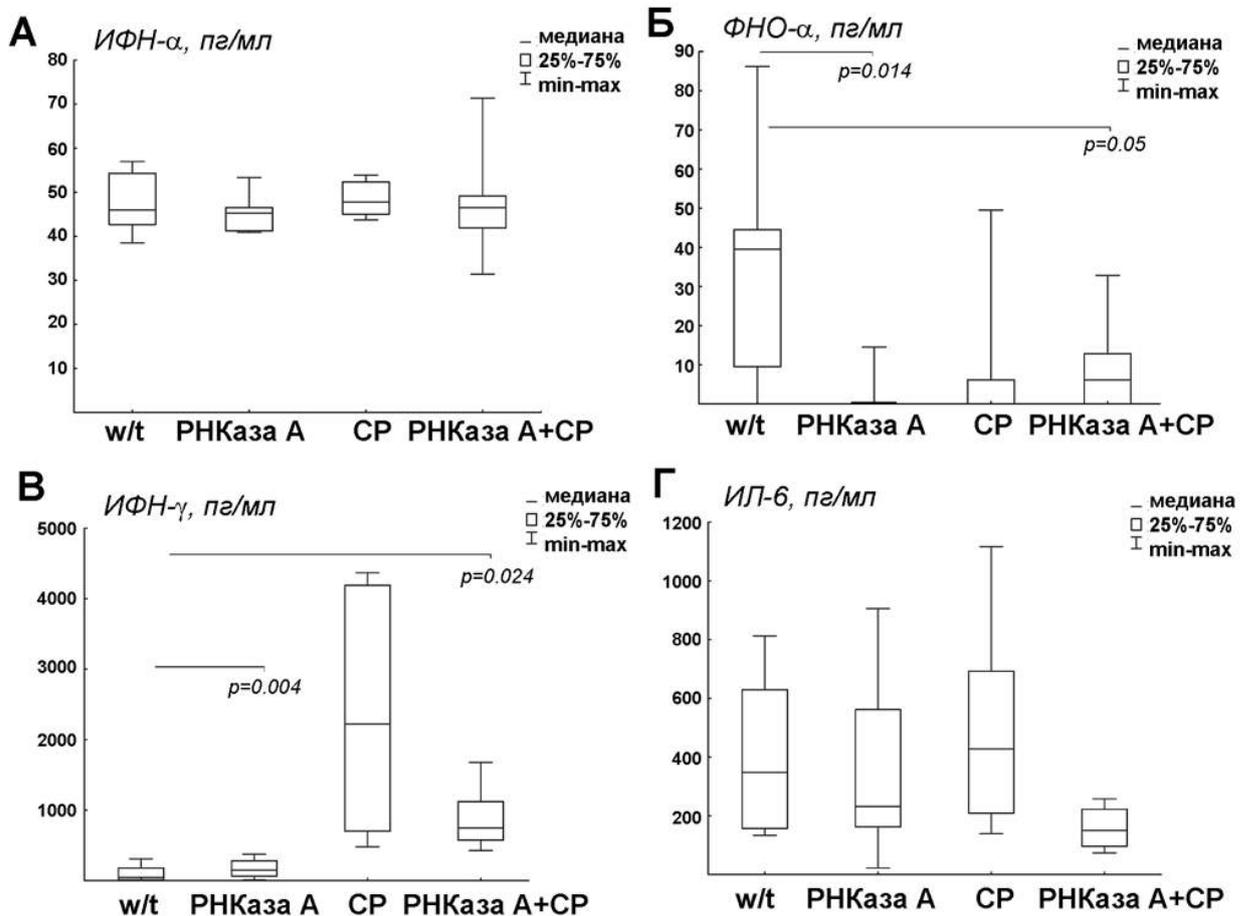
Таким образом, мы показали, что подавление метастазирования на модели метастатической меланомы под действием однократной профилактической ДК-вакцинации сопровождалось лишь незначительным снижением уровня Th2-специфических цитокинов в сыворотке крови экспериментальных животных, тем не менее, уровень экспрессии мастер-регуляторов Th1/Th2/Th17 не изменялся. Двукратная ДК-вакцинация по профилактической схеме не приводила к подавлению метастазирования и характеризовалась 2-кратным повышением мастер-регулятора Th17-ответа ROR $\gamma$ . Поляризация Th17-ответа, ассоциированного с аутоиммунным и провоспалительным ответом, по всей вероятности, и является объяснением неэффективности двукратной иммунизации ДК в отношении подавления метастазирования. В случае однократной терапевтической вакцинации ДК было отмечено повышение уровня экспрессии ROR $\gamma$  и Tbet параллельно с повышением в сыворотке крови животных-опухоленосителей уровня некоторых цитокинов, специфичных для Th1-ответа, что свидетельствует о поляризации Th1/Th17 ответов. И, хотя статистически достоверного ингибирования метастазирования не было показано, тем не менее, тенденция к поляризации Th1-ответа, наиболее эффективного с точки зрения противоопухолевого ответа, свидетельствует о потенциале ДК и в качестве терапевтических вакцин.

## **5.2. Иммуномодулирующее действие природных нуклеаз РНКазы А, ДНКазы I и биназы**

### **5.2.1. Иммуномодулирующий эффект монотерапии РНКазой А и комбинированной терапии РНКазой А и циклофосфамидом**

Для выявления иммуномодулирующего эффекта монотерапии РНКазой А и комбинированной терапии с циклофосфамидом в сыворотке крови животных с LLC были определены уровни ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$ , играющих ключевую роль в противоопухолевом иммунном ответе [591], и уровни провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  (Рис. 36). Было обнаружено, что ни РНКазы А, ни циклофосфамид, как в составе монотерапии, так и в

составе комбинированной терапии, не оказывают влияния на уровень ИФН- $\alpha$  (Рис. 36, А). Монотерапия РНКазой А приводила к 2-кратному повышению уровня ИФН- $\gamma$  ( $163 \pm 47$  пг/мл), тогда как монотерапия циклофосфамидом повышала его уровень в 20 раз ( $2365 \pm 665$  пг/мл) по сравнению с контролем ( $93 \pm 42$  пг/мл) (Рис. 36, В). Комбинированная терапия РНКазой А и циклофосфамидом вызывала 8-кратное повышение уровня ИФН- $\gamma$  по сравнению с контролем. Уровень ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови мышей с LLC составил 33 пг/мл и соответствовал уровню данного цитокина для условно здоровых животных. Как монотерапия РНКазой А, так и комбинированная терапия, приводила к 2-кратному снижению уровня ФНО- $\alpha$  по сравнению с контрольной группой (Рис. 36, Б). Уровни ИЛ-6 в сыворотке мышей, получавших монотерапию как РНКазой А, так и циклофосфамидом, были близки к уровню контрольной группы, однако комбинированная терапия приводила к 3-кратному снижению уровня ИЛ-6 по сравнению с контролем (Рис. 36, Г), что



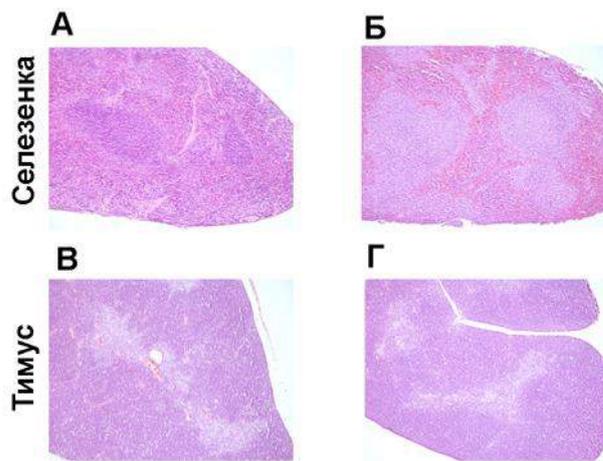
**Рис. 36.** Изменение уровня цитокинов в сыворотке крови мышей с LLC после монотерапии РНКазой А, монотерапии циклофосфамидом (СР) или комбинированной терапии РНКазой А и СР. **А.** ИФН- $\alpha$ . **Б.** ФНО- $\alpha$ . **В.** ИФН- $\gamma$ . **Г.** ИЛ-6. Уровни цитокинов в сыворотке крови определяли с помощью ELISA. Статистические данные обрабатывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки, отличия при  $p < 0.05$  считали статистически достоверными.

свидетельствует о значительном уменьшении воспаления в организме животных-опухоленосителей.

Комбинированная терапия мышей с LLC РНКазой А и циклофосфамидом приводила к значительному замедлению роста первичной опухоли (до 85%) и полному подавлению развития метастазов в легких по сравнению с монотерапией РНКазой А или циклофосфамидом. Было обнаружено, что РНКазы А сама по себе обладает некоторым иммуномодулирующим действием, заключающимся в повышении уровня интерферонов и снижении уровня провоспалительных цитокинов. В составе комбинированной терапии с циклофосфамидом мы наблюдали значительно более выраженный иммуномодулирующий эффект. Таким образом, РНКазы А наряду с противоопухолевым и антиметастатическим действием способна вызывать снижение уровня провоспалительного ответа и усиливать иммунный ответ против опухоли, что свидетельствует о ее высоком потенциале в качестве агента адьювантной терапии для лечения опухолей.

#### **5.2.2. Исследование способности ДНКазы I вызывать неспецифическую антигенную стимуляцию в организме животных-опухоленосителей**

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. С целью оценки влияния ДНКазы I на морфофункциональное состояние органов иммунной системы (селезенки, тимуса) мышей с меланомой В16 проведено морфологическое и морфометрическое исследование гистологических срезов этих органов. При морфологическом исследовании выявлено, что селезенка мышей с меланомой В16, получавших инъекции физ/раствора (контрольная группа), имела типичное строение: белая пульпа умеренно развита и представлена лимфоидными фолликулами, большая часть которых лежала изолированно; герминативные центры фолликулов не сформированы (Рис. 37, А). После введения мышам-опухоленосителям ДНКазы I в дозе 1.2 мг/кг в селезенке обнаружили признаки значительной антигенной стимуляции: увеличение размеров и числа фолликулов, их слияние между собой, появление в фолликулах герминативных центров (Рис. 37, Б). При морфометрическом исследовании выявлено, что ДНКазы I приводит к увеличению объемной плотности белой пульпы и диаметра лимфоидных фолликулов селезенки у мышей с меланомой В16 по сравнению с контрольными животными в 2 и 1.9 раз соответственно (Таблица 15).



**Рис 37.** Морфологические изменения в селезенке и тимусе мышей с меланомой В16 (А, В) и после применения ДНКазы I в дозе 1.2 мг/кг (Б, Г). Окраска гематоксилином и эозином; увеличение  $\times 100$ .

**Таблица 15.** Морфофункциональные изменения в селезенке и тимусе мышей с меланомой В16 до и после введения ДНКазы I<sup>а</sup>.

Орган	Определяемые параметры	Контроль <sup>б</sup>	ДНКазы I <sup>в</sup>
Селезенка	Объемная плотность белой пульпы, Vv, %	32.2 ± 4.4	63.8 ± 1.9
	Объемная плотность красной пульпы, Vv, %	62.5 ± 5.0	34.6 ± 1.8
	Диаметр фолликулов, мкм	297.0 ± 24.5	566.0 ± 31.5
Тимус	Объемная плотность коркового вещества, Vv, %	67.8 ± 1.2	83.5 ± 1.4
	Объемная плотность мозгового вещества, Vv, %	32.2 ± 1.2	16.5 ± 1.4
	Корково-мозговой индекс, КМИ	2.3 ± 0.1	7.1 ± 1.3

<sup>а</sup>Результаты представлены как MEAN ± SEM.

<sup>б</sup>Мыши с метастатической меланомой В16, получавшие инъекции физ/раствора в/м.

<sup>в</sup>Мыши с метастатической меланомой В16, получавшие в/м инъекции ДНКазы I в дозе 1.2 мг/кг. Отличия от контроля достоверны ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.2.3. Иммуномодулирующее действие биназы

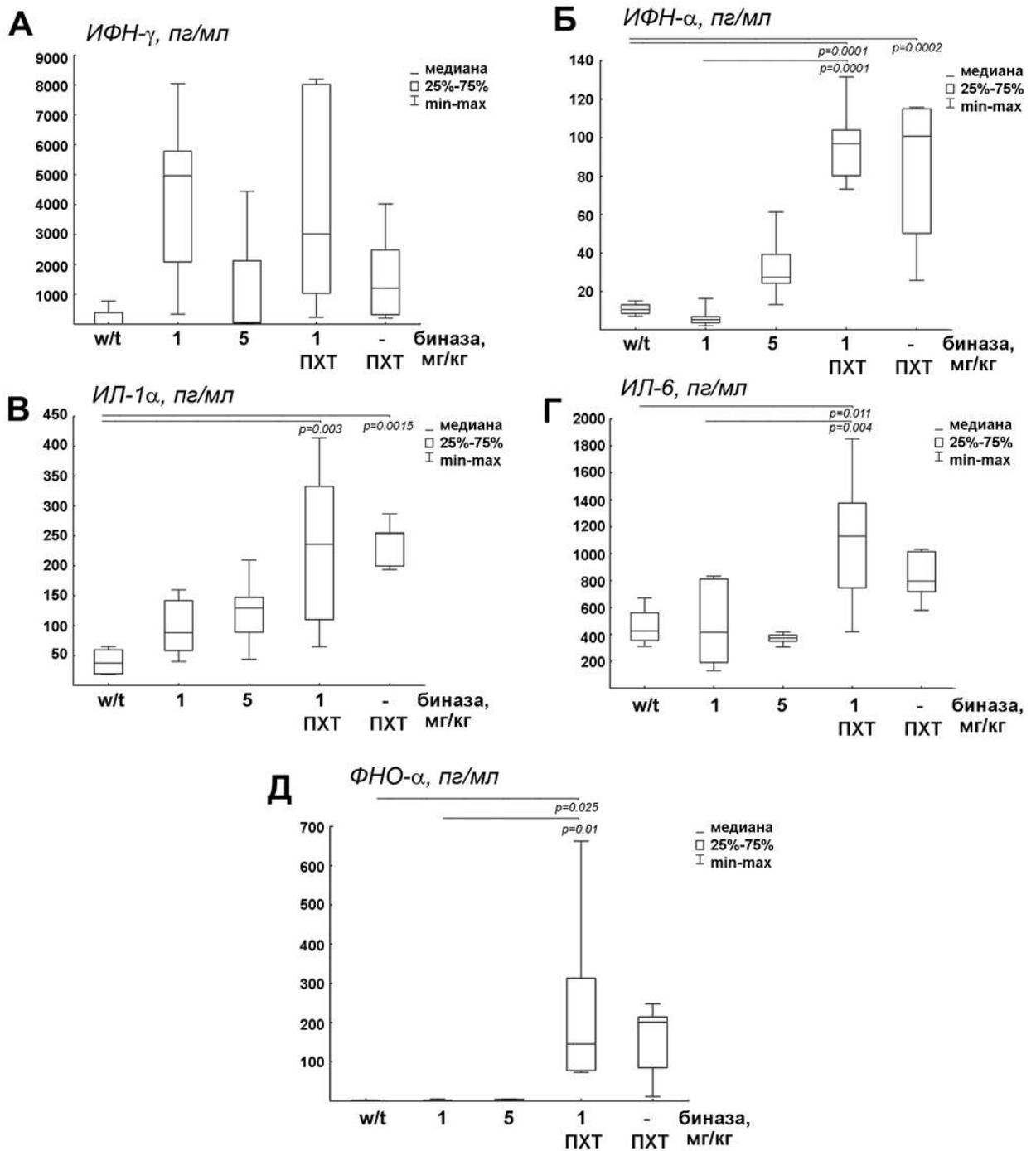
Иммуномодулирующее действие биназы на мышцах C57Bl/6J с в/м трансплантированной LLC исследовали в дозах 0.1, 0.5 и 1 мг/кг при в/б и в/м введении (см. п. 2.2.9.11). Для этого в сыворотке крови экспериментальных животных были определены уровни интерферонов, как маркеров противоопухолевого ответа, а также уровни провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$ . Введение биназы в/м в дозе 1 мг/кг приводило к повышению уровня ИФН- $\gamma$  примерно в три раза по сравнению с контрольной группой (157±13 пг/мл, контроль, и 540±166 пг/мл, биназа 1 мг/кг в/м) (первичные данные не приведены). Введение биназы в/б в той же дозе приводило к двукратному повышению уровня ИФН- $\gamma$  (157±13 пг/мл, контроль, и 302±79 пг/мл, биназа 1 мг/кг, в/б). Статистически достоверное повышение ИЛ-1 $\alpha$  было отмечено только при введении биназы в/б в дозе 1 мг/кг. Во всем диапазоне доз биназа не вызывала изменений уровней ИФН- $\alpha$  ( $< 5$  пг/мл) и ФНО- $\alpha$  ( $< 20$  пг/мл) (первичные данные не приведены).

На Рис. 38 представлено изменение профиля цитокинов в крови животных с RLS<sub>40</sub> после лечения биназой и ПХТ в составе монотерапии и комбинированной терапии. Показано, что биназа в дозе 1 мг/кг вызывает 20-кратное увеличение уровня ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови мышей-опухоленосителей по сравнению с контрольной группой ( $p=0.004$ , Рис. 38, А). Монотерапия в режиме ПХТ также приводит к 8-кратному повышению уровня ИФН- $\gamma$  ( $p=0.04$ , Рис. 44, А). В группе животных, получавших комбинированную терапию биназой в дозе 1 мг/кг и ПХТ, уровень ИФН- $\gamma$  был сравним с его уровнем в сыворотке мышей, получавших монотерапию биназой. Статистически достоверное повышение уровня ИФН- $\alpha$  в 9-10 раз было показано в сыворотке крови мышей, получавших как монотерапию ПХТ, так и комбинированную терапию (Рис. 38, Б). Поскольку сама биназа незначительно повышала уровень ИФН- $\alpha$ , наблюдаемый эффект связан с иммуномодулирующим действием ПХТ.

Монотерапия биназой в дозах 1 и 5 мг/кг приводила к 2- и 3-кратному повышению уровня ИЛ-1 $\alpha$ , соответственно, по сравнению с контрольной группой (Рис. 38, В). Следует отметить, что повышение уровня этого цитокина наблюдалось также на модели LLC при применении биназы в дозе 1 мг/кг (первичные данные не приведены). Монотерапия в режиме ПХТ и комбинированная терапия с биназой приводила к 8-кратному повышению уровня ИЛ-1 $\alpha$  (Рис. 38, В). Поскольку обе опухолевые модели LLC и RLS<sub>40</sub> представляют собой модели с первичным опухолевым узлом, повышение уровня ИЛ-1 $\alpha$  под действием биназы является хорошим прогностическим признаком, поскольку этот цитокин участвует в регуляции Т-клеточного звена противоопухолевого ответа. Уровни провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$ , отражающих воспалительный и некротический процессы в организме (в частности, в первичной опухоли), повышались при терапии в режиме ПХТ (как моно-, так и комбинированной), но не при монотерапии биназой (Рис. 38, Г и Д).

На метастатической модели меланомы биназа в дозе 5 мг/кг приводила к 3-кратному повышению уровней ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ , однако, данные были статистически недостоверны. Во всем диапазоне доз биназа незначительно влияла на уровень ИЛ-1 $\alpha$ , но снижала уровень ИЛ-6 в 4.5 раза (первичные данные не приведены).

Следует отметить, что на модели RLS<sub>40</sub> терапевтического выигрыша комбинированной терапии биназой и ПХТ в сравнении с монотерапией ПХТ не было обнаружено. Однако, позитивным вкладом биназы можно считать повышение уровня ИФН- $\gamma$  в крови и снижение деструктивных и некротических изменений в печени животных-опухоленосителей. ПХТ сама по себе оказывает токсический эффект и индуцирует синтез провоспалительных цитокинов, чего не наблюдается при монотерапии биназой. Биназа не



**Рис. 38.** Изменение профиля цитокинов сыворотки крови мышей с RLS<sub>40</sub> после монотерапии РНКазой А, монотерапии ПХТ и комбинированной терапии РНКазой А и ПХТ. **А.** ИФН- $\gamma$ , **Б.** ИФН- $\alpha$ , **В.** ИЛ-1 $\alpha$ , **Г.** ИЛ-6, **Д.** ФНО- $\alpha$ . Уровень цитокинов определяли с помощью ELISA. Статистические данные обрабатывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки, отличия при  $p < 0.05$  считали статистически достоверными.

вызывала повышения уровней ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  и лишь незначительно повышала уровень ИЛ-1 $\alpha$ . Следует отметить, что на модели метастатической меланомы биназа также повышала уровень ИФН- $\gamma$  и значительно снижала уровень ИЛ-6 (первичные данные не приведены).

### 5.3. Заключение

15-20% случаев злокачественных новообразований связаны с хроническим воспалением. Это опухоли пищевода, желудка, печени, поджелудочной железы, кишечника и т.д. [592]. Медиаторы воспаления могут вырабатываться самими опухолевыми клетками, что приводит к повышению уровней этих цитокинов в крови пациентов с онкологическими заболеваниями. М-КСФ и ИЛ-6, относящийся к провоспалительным цитокинам, являются важными факторами, участвующими в процессе дифференцировки моноцитов [593, 594], а, следовательно, напрямую влияют на ДК и Т-клеточное звено иммунитета. Оба этих цитокина обнаруживаются в сыворотке крови онкологических больных и коррелируют с неблагоприятным прогнозом [595-597]. Повышенный уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  также является характерной чертой модельных опухолей мышей. Для карциномы легких Льюис (LLC) и лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS<sub>40</sub> характерны повышенные уровни ИЛ-6 в сыворотке крови животных-опухоленосителей (300 пг/мл для LLC, Рис. 36, Г, 400 пг/мл для RLS<sub>40</sub>, Рис. 38, Г).

Иммуностимулирующее действие противоопухолевых препаратов, описанное ранее в литературе, было показано, в основном, для препаратов двуцепочечных РНК, например рибомунилы [598], 19-звенной isРНК [599], комплексов конденсированной РНК с протамином [600]. Иммуностимулирующее действие противоопухолевых рибонуклеаз ранее практически не изучалось. Мы впервые показали, что применение РНКазы А и биназы для лечения животных с модельными опухолями сопровождалось положительной модуляцией противоопухолевого иммунного ответа, которая заключалась в снижении уровня провоспалительных цитокинов и повышении уровня интерферонов. Так, на модели LLC было показано, что комбинированная терапия РНКазой А и циклофосфамидом приводит к трехкратному снижению уровня ИЛ-6, при этом сам циклофосфамид не снижал уровень этого цитокина (Рис. 36, Г). На модели RLS<sub>40</sub> биназа в дозе 1 мг/кг в несколько тысяч раз повышала уровень ИФН- $\gamma$  (Рис. 38, А) и приводила к 2-3-кратному повышению уровня ИЛ-1 $\alpha$ , участвующем в регуляции Т-клеточного компонента противоопухолевого ответа.

В нашей работе впервые показано, что ДНКазы 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, АПК.

Исследованные нами 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  $Th1 > Th2$ . Кроме того, введение ДК, нагруженных РНК-B16 в комплексах с липосомами серии N-DOPE, приводило к увеличению уровня ИЛ-1 $\alpha$ , поляризующего Т-клеточный компонент противоопухолевого ответа. Наблюдаемые иммунологические показатели свидетельствуют о специфическом противоопухолевом иммуномодулирующем действии ДК и природных нуклеаз, что позволяет их использовать в качестве противоопухолевых препаратов.

## **ГЛАВА 6. Исследование механизма противоопухолевого и антиметастатического действия РНКазы А: поиск молекулярных мишеней среди регуляторных и кодирующих РНК**

Стабильное изменение уровня циркулирующих нуклеиновых кислот 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.

Проведенные ранее исследования механизма цитотоксического действия природных рибонуклеаз на опухолевые клетки указывают на их возможные молекулярные мишени, среди которых называют как клеточные кодирующие РНК, так и некодирующие РНК, в частности, миРНК [484, 496, 509, 511, 513, 601]. Тем не менее, эти исследования отрывочны и фрагментарны и несут информацию о крайне ограниченном наборе РНК. Кроме того, нет исследований, позволяющих полномасштабно оценить изменения в профилях опухолеспецифических и/или циркулирующих миРНК, а также изменения в уровнях экспрессии их генов-мишеней и сигнальных путей с участием множества генов, что позволило бы выявить связь между событиями, вовлекающими регуляторные и кодирующие РНК, и терапевтической эффективностью рибонуклеаз *in vivo*.

Принимая во внимание высокую рибонуклеазную активность РНКазы А [389] и тот факт, что согласно литературным данным РНКазы А не оказывает прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки путем расщепления внутриклеточных РНК из-за ее инактивации под действием цитозольного рибонуклеазного ингибитора [390, 602], нами было сделано предположение, что фермент оказывает влияние на регуляторные пути канцерогенеза и сигнальные каскады, ответственные за опухолевую прогрессию. Целью данного раздела работы был поиск молекулярных мишеней РНКазы А среди внеклеточных и опухолевых кодирующих и регуляторных РНК, а также выяснение механизма ее противоопухолевого и антиметастатического действия.

### **6.1. Влияние РНКазы А на концентрацию внРНК и суммарную РНКазную активность в плазме крови мышей с LLC и НА-1**

Мы проанализировали концентрацию внРНК в плазме крови здоровых мышей, мышей с LLC или НА-1, получавших инъекции физ/раствора (контроль), и мышей с LLC или НА-1, получавших РНКазу А в дозе 0.7 мкг/кг. Кровь собирали на 12 и 18 дни развития опухоли, что соответствовало 3-4-ой стадии опухолевой прогрессии, через один час после последней

инъекции РНКазы А. Время после инъекции фермента определялось исследованиями *in vitro*, показавшими, что за один час в крови наблюдается оптимальное соотношение между активностью РНКазы А, еще не подвергшейся действию протеолитических ферментов крови, и уровнем расщепления РНК.

Из образцов крови получали плазму (см. п. 2.2.4.2), выделяли внРНК методом адсорбции на мелкодисперсном стекле и определяли ее концентрацию (см. п. 2.2.5.3). Суммарную РНКазную активность плазмы крови исследовали в реакции расщепления [<sup>32</sup>P]-РНК HIV-1 (см. п. 2.2.9.2) и на основании полученных данных рассчитывали эффективные константы скорости расщепления РНК в плазме (см. п. 2.2.11.2). Концентрация внРНК и РНКазная активность плазмы крови представлены в Таблице 16. Как видно из представленных данных, концентрация внРНК в плазме крови здоровых мышей C57Bl/6J составила 54 нг/мл при РНКазной активности  $(4.9 \pm 0.6) \times 10^{-4}$  сек<sup>-1</sup>. В процессе развития LLC у мышей C57Bl/6J происходило увеличение концентрации внРНК до 240 нг/мл (в 4.5 раза по сравнению со здоровыми животными) и падение РНКазной активности до  $(3.6 \pm 0.5) \times 10^{-4}$  сек<sup>-1</sup> (в 1.4 раза) (Таблица 16). Введение мышам с LLC РНКазы А не приводило к достоверному снижению концентрации внРНК в плазме, тем не менее, было отмечено повышение РНКазной активности до  $(4.1 \pm 0.5) \times 10^{-4}$  сек<sup>-1</sup>, однако её уровень всё же не достигал уровня здоровых мышей (Таблица 16). Уровень внРНК у мышей A/Sn не отличался между группами и варьировал от 123 до 168 нг/мл (Таблица 16).

**Таблица 16.** Влияние РНКазы А на концентрацию внРНК и суммарную РНКазную активность в плазме крови мышей C56Bl/6J с LLC и мышей A/Sn с HA-1.

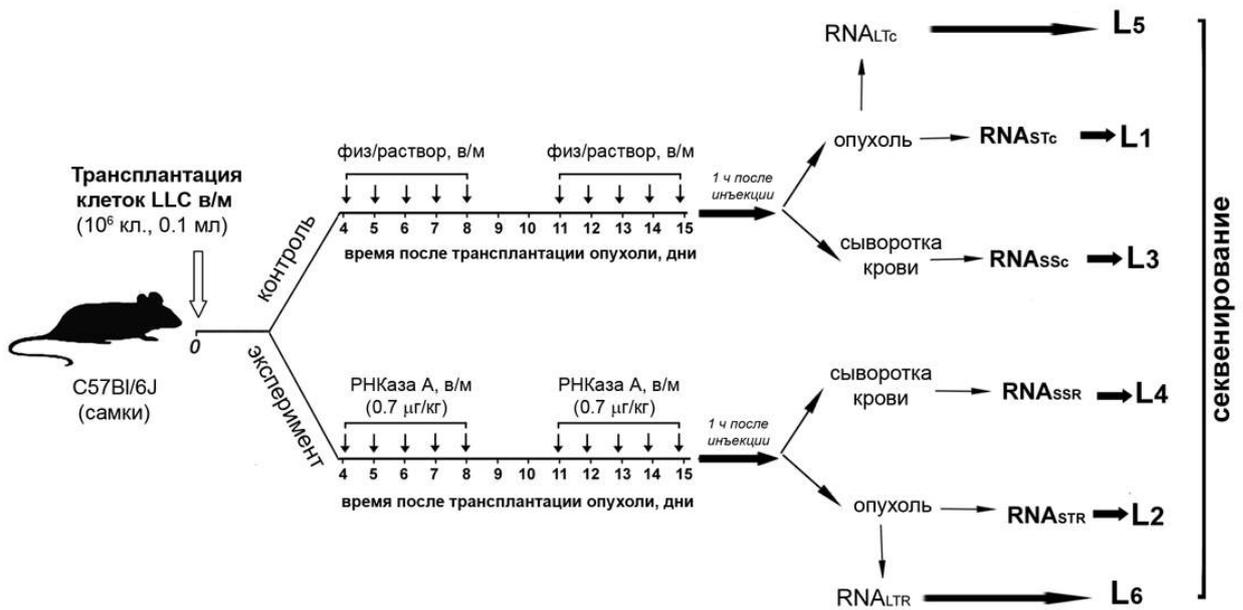
Группа	РНКазная активность плазмы, $K_{\text{eff}}$ сек <sup>-1</sup> , 30°C	Концентрация внРНК в плазме, нг/мл
C57Bl/6	$(4.9 \pm 0.6) \times 10^{-4}$	54±6
C57Bl/6 / LLC	$(3.6 \pm 0.5) \times 10^{-4}$	244±78
C57Bl/6 / LLC / РНКазы А (0.7 мкг/кг)	$(4.1 \pm 0.5) \times 10^{-4}$	248±73
A/Sn	-	168±34
A/Sn / HA-1	-	135±23
A/Sn / HA-1 / РНКазы А (0.7 мкг/кг)	-	123±38

Таким образом, полученные данные указывают на то, что применение РНКазы А приводит к восстановлению РНКазной активности плазмы крови, снижающейся при развитии

LLC, практически до уровня нормы (здоровых животных), хотя при этом мы не наблюдаем снижения повышенного уровня вРНК. Мы предположили, что РНКаза А не столько снижает уровень циркулирующих вРНК, сколько влияет на перераспределение репертуара РНК.

## 6.2. Дизайн эксперимента

С целью поиска молекулярных мишеней РНКазы А среди некодирующих регуляторных РНК мы исследовали 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. 39.



**Рис. 39.** Схема эксперимента для приготовления кДНК-библиотек. Мыши с LLC получали в/м инъекции физ/раствора или РНКазы А в дозе 0.7 мкг/кг в течение 10 дней, начиная с четвертого дня после трансплантации опухоли. Через один 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.

Мышам линии C57Bl/6J трансплантировали LLC в/м и, начиная с четвертого дня после трансплантации, проводили инъекции физ/раствора или РНКазы А в дозе 0.7 мкг/кг, при которой наблюдался заметный противоопухолевый и антиметастатический эффект. После окончания эксперимента через час после последней инъекции РНКазы А образцы опухолевой ткани и крови собирали. Из крови готовили сыворотку и объединяли согласно группам. Опухолевую ткань гомогенизировали и также объединяли согласно группам. Из

опухолевогой ткани и сыворотки крови получали фракции высокомолекулярных (>200 нк) и низкомолекулярных (<200 нк) РНК (см. п. 2.2.11.4).

В результате были получены следующие фракции: фракции опухолеспецифических РНК – (1) фракция высокомолекулярных РНК из опухолевой ткани контрольных мышей, получавших инъекции физ/раствора ( $RNA_{LTc}$ ); (2) фракция высокомолекулярных РНК из опухолевой ткани мышей, получавших инъекции РНКазы А ( $RNA_{LTR}$ ); (3) фракция низкомолекулярных РНК из опухолевой ткани контрольных мышей, получавших инъекции физ/раствора ( $RNA_{STc}$ ); (4) фракция низкомолекулярных РНК из опухолевой ткани мышей, получавших инъекции РНКазы А ( $RNA_{STR}$ ); фракции сывороточных РНК – (5) фракция низкомолекулярных РНК из опухолевой ткани контрольных мышей, получавших инъекции физ/раствора ( $RNA_{SSc}$ ); (6) фракция низкомолекулярных РНК из опухолевой ткани мышей, получавших инъекции РНКазы А ( $RNA_{SSR}$ ). Полученные 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. 39). Библиотеки L1-L4 были секвенированы на платформе SOLiD ABA 3.5 (см. п. 2.2.11.5). Полученные фракции высокомолекулярных РНК  $RNA_{LTc}$  и  $RNA_{LTR}$  были использованы для приготовления библиотек L5 и L6, соответственно. Библиотеки L5 и L6 были секвенированы на платформе SOLiD ABA 5.5 (см. п. 2.2.11.7).

### **6.3. Анализ данных секвенирования миРНК из опухолевой ткани и сыворотки крови мышей с LLC после воздействия РНКазы А**

В Таблице 17 приведена количественная оценка миРНК в исследуемых библиотеках. Всего от 0.6 до 1.4 миллионов прочтений в каждой библиотеке были Классифицированы, как миРНК. В библиотеках, полученных из опухолевой ткани и сыворотки крови, было обнаружено 2089 и 972 дифференциально экспрессирующихся генов (включающих 123 и 139 генов миРНК), соответственно. Опухолеспецифические и сывороточные миРНК, для которых наблюдалось значительное изменение в уровнях после воздействия РНКазы А, представлены на тепловой карте (Рис. 40, Таблица S1 и S2, Приложение 1).

Анализ данных секвенирования показал, что применение РНКазы А приводит к изменению уровней 123 из 615 опухолеспецифических миРНК и 139 из 617 циркулирующих миРНК сыворотки крови (Рис. 40, Таблицы S1 и S2, Приложение 1). Как и ожидалось, РНКазы А приводила к снижению уровня подавляющего большинства сывороточных миРНК: было обнаружено значительное снижение уровней 137 миРНК и повышение уровней только двух миРНК. Однако, в опухолевой ткани под действием РНКазы А были отмечены

**Таблица 17.** Оценка обогащенности миРНК в библиотеках.

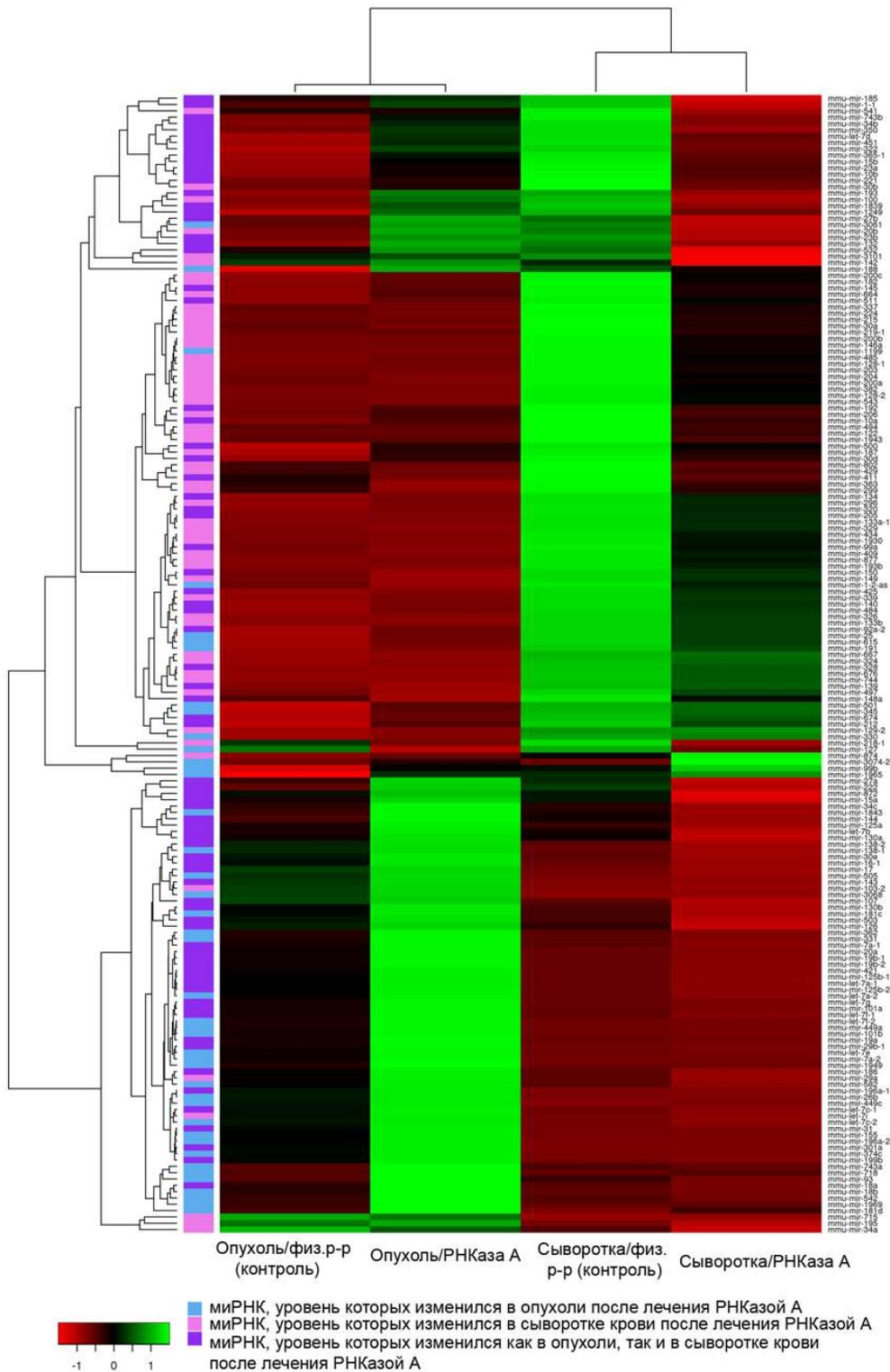
Библиотека	миРНК	мРНК	рРНК	Отфильтрованные*	Картированные	Итого, кол-во ридов
L1	965 017 (1.4%)	31 407 252 (43.8%)	9 348 471 (13%)	6 511 041 (9.1%)	48 231 781 (67.3%)	71 675 921
L2	1 399 612 (2.7%)	21 972 560 (42.8%)	5 783 418 (11.3%)	4 986 000 (9.7%)	34 141 590 (66.5%)	51 371 107
L3	835 664 (2.0%)	20 476 883 (48%)	2 623 843 (6.2%)	8 200 681 (19.3%)	32 137 071 (75.5%)	42 561 316
L4	560 568 (1.0%)	27 024 143 (47.8%)	3 195 154 (5.7%)	8 876 496 (15.7%)	39 656 361 (70.2%)	56 516 886

Список референсных последовательностей: шпилечные миРНК транскрипты, мРНК, рРНК, «отфильтрованные» РНК (тРНК, геномные повторы, адаптерные последовательности системы секвенирования SOLiD). Картирование было произведено с помощью программы Bioscope v.1.3. Библиотеки: L1 – на основе фракции опухолеспецифических низкомолекулярных РНК из опухоли мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора (RNA<sub>STC</sub>); L2 – опухолеспецифических низкомолекулярных РНК из опухоли мышей с LLC, получавших инъекции РНКазы А (RNA<sub>STR</sub>); L3 - сывороточных низкомолекулярных РНК из крови мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора (RNA<sub>SSC</sub>); L4 – сывороточных низкомолекулярных РНК из крови мышей с LLC, получавших инъекции РНКазы А (RNA<sub>SSR</sub>).

противоположные изменения: было обнаружено повышение уровней 116 опухолеспецифических миРНК и снижение уровней только семи миРНК. Следует отметить, что четыре из семи опухолеспецифических миРНК, уровень которых снижался, и две сывороточные миРНК, уровень которых повышался после воздействия РНКазы А, характеризовались крайне низким числом прочтений согласно данным секвенирования (Таблица S1 и S2, Приложение 1). 81 миРНК, уровни которых изменились после воздействия РНКазы А, детектировались как в опухолевой ткани, так и в сыворотке крови (Рис. 40, Таблица S1 и S2, выделены жирным шрифтом). Кроме того, было обнаружено изменение уровня 42 опухолеспецифических миРНК (Рис. 40, отмечены светло-голубым цветом, Таблица S1 и S2, выделены простым шрифтом) и 58 сывороточных миРНК (Рис. 40, отмечены розовым цветом, Таблица S1 и S2, выделены курсивом). Анализ профилей миРНК выявил, что под действием РНКазы А изменялся уровень как онкогенных миРНК, так и миРНК-супрессоров, таких как миРНК семейства let-7, mmi-mir-107, mmi-mir-155, mmi-mir-15, mmi-mir-16, mmi-mir-21, mmi-mir-10b, mmi-mir-145, mmi-mir-451a, mmi-mir-29b1, mmi-mir-17, mmi-mir-18a и другие (далее без указания видовой специфичности).

#### **6.4. Валидация данных секвенирования с помощью qПЦР.**

Валидацию изменения профиля миРНК в опухолевой ткани и сыворотке крови мышей с LLC после лечения РНКазой А проводили с использованием stem-loop qПЦР [524, 539].



**Рис. 40.** Тепловая карта, отражающая профили миРНК в сыворотке крови и опухолевой ткани в группе мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора (контроль), и группе мышей с LLC, получавших инъекции РНКазы А. Дендрограммы были получены путем кластеризации генов миРНК или образцов путем попарного среднего сцепления с использованием евклидовых расстояний между значениями масштабированных по ряду или масштабированных по столбцу значений RPKM, соответственно.

Для валидации использовали препараты РНК, на основе которых проводили конструирование библиотек, а также препараты РНК, полученные в независимых экспериментах. Алгоритм выбора миРНК для валидации состоял из нескольких шагов (Таблица 18).

На первом этапе для выбора миРНК для валидации миРНК библиотеки L1 (опухолеспецифические миРНК контрольной группы) и библиотеки L3 (сывороточные миРНК контрольной группы) сортировали по шкале представленности последовательностей (величинам RPKM) в порядке убывания, а для данных библиотек L2 (опухолеспецифические миРНК экспериментальной группы) и L4 (сывороточные миРНК экспериментальной группы) проводили суперпозицию соответственно изменившемуся порядку миРНК. Далее рассчитывали кратность изменения L2/L1 и L3/L4 (первичные данные представлены в Таблицах S1, S2 и 18), отбирали первые 100 миРНК в библиотеках L1 и L2, сортировали по кратности изменения L2/L1 в убывающем порядке и сравнивали с данными кратности изменения L3/L4. На первом этапе отбрасывали сывороточные миРНК, которые не были обнаружены в опухолях. Далее анализировали все миРНК, представленные в библиотеках. Конечный этап отбора заключался в выборе наиболее представленных миРНК, уровень которых наиболее значительно изменился после воздействия РНКазы А, путем расчета соотношения total score (TS)/total fold (TF), где TS= количественный показатель в L1+ количественный показатель в L3, а TF = кратность изменения в L2/L1 + кратность изменения в L3/L4.

Далее миРНК сортировали по соотношению TS/TF в возрастающем порядке. миРНК с высоким TF и TS/TF от 0 до 20 рассматривали в качестве возможных мишеней для валидации. Девять из этих миРНК, как онкомиров, так и онкосупрессоров, были выбраны для валидации с помощью qПЦР: mir-29b, mir-21, 10b, mir-451a, mir-17, mir-18a, mir-145, mir-31 и let-7g (Таблица 18). Выбранные миРНК находились среди первых 50 миРНК согласно нашим критериям отбора. Данные секвенирования выбранных для валидации опухолеспецифических и сывороточных миРНК, а также миРНК семейства let-7, представлены в логарифмических координатах на Рис. 41. Уровень mir-10b, mir-451a, 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. 41, 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. 41, Б). В опухолевой ткани мышей с LLC, получавших РНКазу А, происходило повышение уровня экспрессии выбранных миРНК,

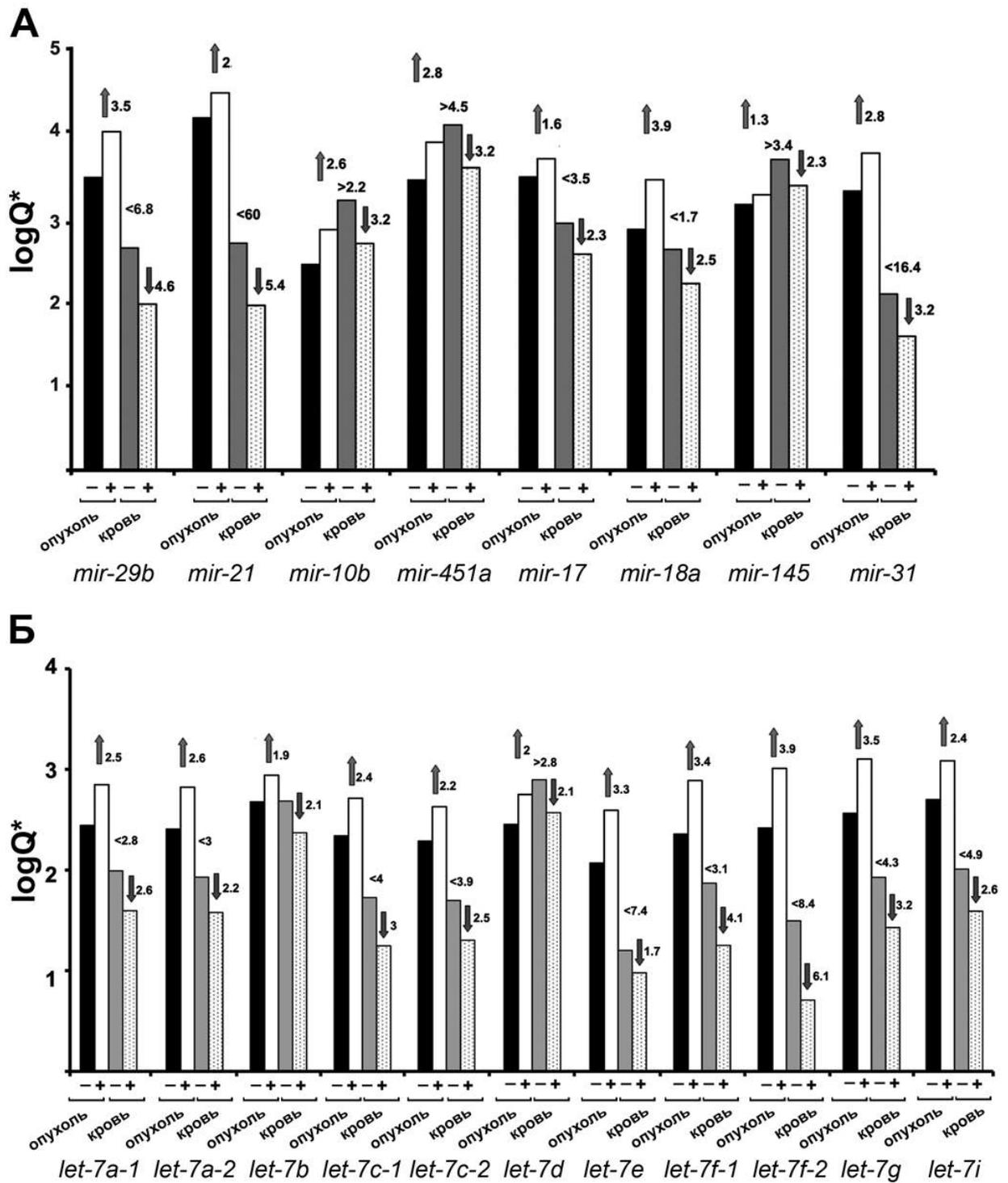
Таблица 18. Критерии отбора миРНК для валидации.

миРНК	Score L1	Score L3	Total score (TS)	fold change L2/L1	fold change L3/L4	Total fold (TF)	TS/TF
<b>mmu-mir-451</b>	2	2	4	3.2	3.6	6.8	0.6
mmu-mir-23a	5	4	9	2.1	2.7	4.8	1.9
mmu-mir-130a	6	7	13	2.1	3.5	5.5	2.4
mmu-mir-125a	3	12	15	2.6	2.6	5.1	2.9
mmu-mir-140	9	3	12	1.6	1.8	3.4	3.6
<b>mmu-mir-145</b>	10	5	15	1.5	2.3	3.8	4.0
mmu-mir-126	7	13	20	1.7	3.2	5.0	4.02
mmu-mir-23b	11	10	21	2.3	2.8	5.0	4.2
<b>mmu-mir-21</b>	1	39	40	2.2	7.0	9.2	4.3
mmu-mir-15b	14	8	22	1.7	2.14	3.8	5.8
mmu-mir-27a	17	16	33	2.1	2.99	5.1	6.5
<b>mmu-mir-10b</b>	29	18	47	3.1	3.7	6.8	6.9
<b>mmu-mir-17</b>	8	31	39	1.8	2.6	4.4	8.96
<b>mmu-mir-18</b>	21	46	67	4.4	3.1	7.5	8.98
mmu-mir-99a	22	9	31	0.6	2.5	3.0	10.1
mmu-mir-20a	33	83	116	3.6	6.8	10.4	11.2
mmu-mir-1839	53	35	88	2.9	4.9	7.7	11.4
mmu-mir-19a	35	92	127	4.9	6.1	10.9	11.62
mmu-mir-130b	20	41	61	2.1	3.1	5.2	11.64
mmu-mir-1-1	75	37	112	2.8	6.5	9.2	12.1
mmu-mir-186	68	111	179	2.9	11.5	14.4	12.5
<b>mmu-mir-31</b>	15	80	95	3.2	4.05	7.3	13.1
mmu-mir-192	74	29	103	2.2	5.3	7.5	13.7
mmu-mir-19b-2	34	68	102	3.4	3.9	7.3	13.95
mmu-mir-125b-1	28	44	72	2.6	2.6	5.1	14.04
mmu-mir-15a	45	59	104	2.2	4.9	7.1	14.6
mmu-mir-320	70	14	84	3.3	2.2	5.5	15.3
mmu-mir-27b	49	47	96	2.3	3.9	6.2	15.5
mmu-mir-30d	52	30	82	2.5	2.6	5.2	15.9
mmu-mir-107	13	45	58	1.5	2.1	3.6	16.0
mmu-mir-144	66	69	135	4.0	4.0	8.0	16.8
mmu-mir-222	30	43	73	2.0	2.3	4.3	16.9
mmu-mir-425	43	17	60	1.6	1.9	3.5	17.0
<b>mmu-mir-29b-1</b>	27	114	141	3.9	4.3	8.2	17.1
mmu-let-7d	48	33	81	2.3	2.4	4.6	17.5
mmu-mir-19b-1	32	77	109	2.5	3.7	6.1	17.8
mmu-mir-421	36	81	117	3.1	3.4	6.5	18.0
mmu-mir-132	41	42	83	2.5	2.0	4.5	18.4
mmu-mir-138-2	24	53	77	2.2	2.0	4.2	18.48
mmu-mir-484	56	15	71	2.1	1.7	3.8	18.8
mmu-mir-322	65	49	114	3.0	2.9	6.0	19.2

Таблица 18 (продолжение). Критерии отбора миРНК для валидации.

миРНК	Score L1	Score L3	Total score (TS)	fold change L2/L1	fold change L3/L4	Total fold (TF)	TS/TF
<i>mmu-mir-101a</i>	84	131	215	4.2	6.8	11.1	19.4
<i>mmu-mir-143</i>	19	87	106	2.0	3.5	5.5	19.5
<i>mmu-let-7b</i>	26	61	87	2.0	2.5	4.4	19.6
<b><i>mmu-let-7g</i></b>	<b>46</b>	<b>100</b>	<b>146</b>	<b>3.5</b>	<b>3.8</b>	<b>7.3</b>	<b>20.0</b>
<i>mmu-mir-92-2</i>	51	22	73	2.1	1.4	3.5	20.7
<i>mmu-mir-10a</i>	67	48	115	1.9	3.6	5.5	20.9
<i>mmu-mir-872</i>	39	54	93	1.6	2.7	4.4	21.3
<i>mmu-mir-199b</i>	25	123	148	3.2	3.5	6.7	22.0
<i>mmu-mir-34b</i>	82	74	156	2.4	4.6	7.0	22.5
<i>mmu-let-7f-1</i>	72	95	167	2.8	4.7	7.4	22.54
<i>mmu-mir-301</i>	23	119	142	2.9	3.4	6.3	22.7
<i>mmu-mir-532</i>	40	50	90	1.5	2.3	3.8	23.9
<i>mmu-mir-125b-2</i>	50	98	148	2.8	3.2	6.1	24.3
<i>mmu-let-7c-1</i>	80	130	210	3.2	5.2	8.4	25.1
<i>mmu-mir-30e</i>	44	90	134	2.3	3.1	5.3	25.14
<i>mmu-mir-365-1</i>	89	70	159	3.6	2.5	6.0	26.4
<i>mmu-mir-185</i>	62	62	124	1.6	3.0	4.5	27.4
<i>mmu-let-7i</i>	37	104	141	2.6	2.4	5.1	27.8
<i>mmu-let-7a-1</i>	79	125	204	2.2	5.0	7.3	28.1
<i>mmu-mir-350</i>	93	97	190	2.2	4.4	6.7	28.6
<i>mmu-mir-150</i>	55	20	75	0.3	2.1	2.4	31.0
<i>mmu-mir-328</i>	98	19	117	2.1	1.6	3.7	31.8
<i>mmu-mir-34c</i>	64	95	159	2.7	2.2	4.9	32.7
<i>mmu-mir-511</i>	95	55	150	2.0	2.5	4.4	34.0
<i>mmu-mir-500</i>	83	65	148	2.3	2.0	4.3	34.4
<i>mmu-mir-674</i>	78	57	135	2.2	1.5	3.7	36.9
<i>mmu-mir-16-1</i>	63	116	179	2.2	2.7	4.8	37.1
<i>mmu-mir-205</i>	96	6	102	0.3	2.5	2.7	37.7
<i>mmu-mir-503</i>	58	85	143	1.6	1.8	3.4	42.2
<i>mmu-mir-139</i>	57	32	89	0.6	1.5	2.1	42.4
<i>mmu-mir-7-1</i>	85	115	200	1.8	2.4	4.2	47.4
<i>mmu-mir-212</i>	87	79	166	1.9	1.5	3.4	49.1
<i>mmu-mir-221</i>	31	225	256	1.6	3.0	4.5	56.4
<i>mmu-mir-148a</i>	91	94	185	0.5	2.2	2.6	70.8

L1: опухолеспецифические миРНК контрольной группы; L2: опухолеспецифические миРНК экспериментальной группы; L3: сывороточные миРНК контрольной группы; L4: сывороточные миРНК экспериментальной группы. Score - номер миРНК в порядке убывания представленности последовательностей (величинам RPKM) в библиотеке; Total score (TS) – сумма Score (L1+L3) или (L2+L4); fold change - кратность изменения L2/L1 и L3/L4, Total fold (TF) – сумма fold change.



**Рис. 41.** 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). «-» – мыши с LLC, получавшие инъекции физ/раствора; «+» - мыши с LLC, получавшие инъекции РНКазы А.

**Таблица 19.** Сравнение изменения уровня миРНК в опухоли и сыворотке крови мышей с LLC под действием РНКазы А по данным qПЦР и данным секвенирования.

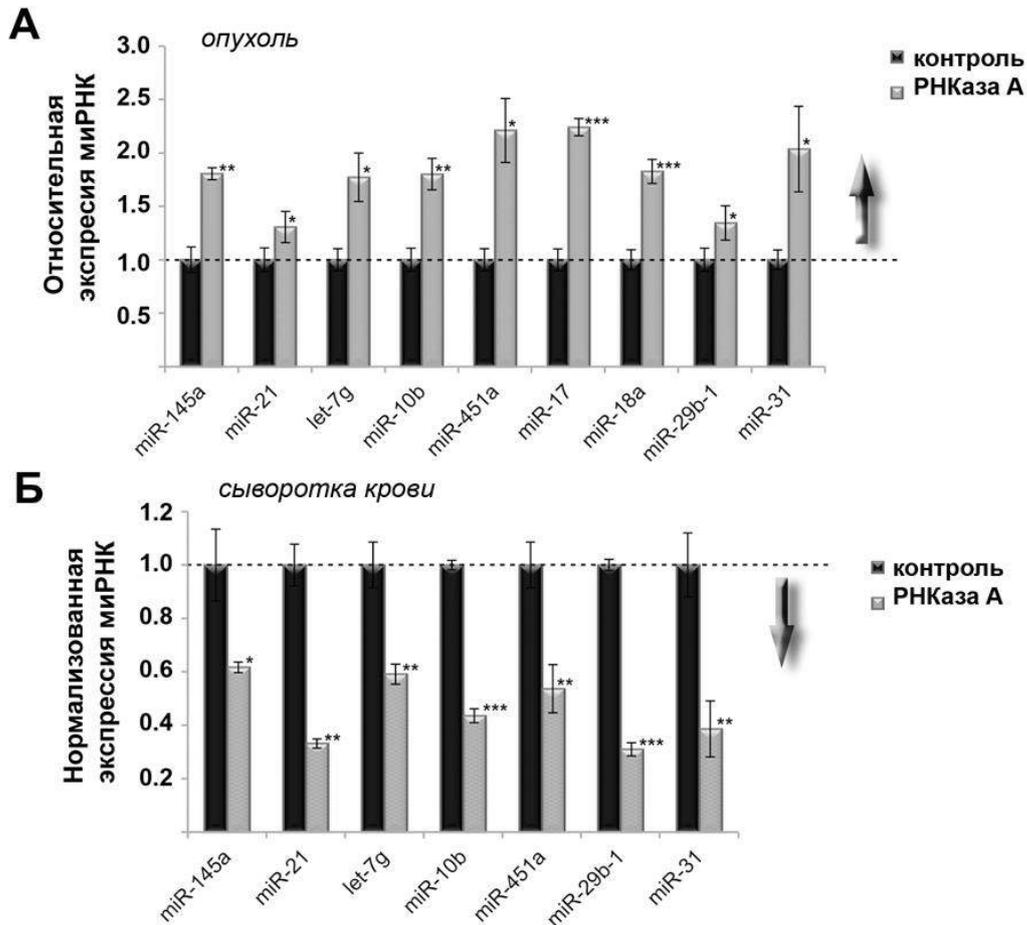
миРНК	Секвенирование* (опухоль/кровь)	qПЦР <i>in vivo</i> * (опухоль/кровь)
<i>mir-29b</i>	3.5↑ / 4.6↓	1.3↑ / 3.3↓
<i>mir-21</i>	2.0↑ / 5.4↓	1.3↑ / 3.3↓
<i>mir-10b</i>	2.6↑ / 3.2↓	1.8↑ / 2.2↓
<i>mir-451a</i>	2.8↑ / 3.2↓	2.2↑ / 2.0↓
<i>mir-17</i>	3.5↑ / 4.6↓	2.2↑ / -
<i>mir-18a</i>	3.9↑ / 2.5↓	1.7↑ /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

\* - определение уровня миРНК во фракциях опухолеспецифических низкомолекулярных РНК RNA<sub>STc</sub> и RNA<sub>STR</sub>, а также фракциях сывороточных низкомолекулярных РНК RNA<sub>SSc</sub> и RNA<sub>SSR</sub>.

которое составило от 1.6 до 3.9 раз (Таблица 19). 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. 41, А) и *let-7g* (3.5 раза, Рис. 41, Б, Таблица 19). Следует отметить, что уровень экспрессии всех миРНК семейства *let-7*, принадлежащих к опухолевым супрессорам, значительно повышался в опухоли после воздействия РНКазы А (Рис. 41, Б).

В сыворотке крови РНКазы 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. 41, Таблица 19).

Далее уровень выбранных миРНК *mir-29b*, *mir-21*, *10b*, *mir-451a*, *mir-17*, *mir-18a*, *mir-145*, *mir-31* и *let-7g* был оценен во фракциях опухолеспецифических низкомолекулярных РНК RNA<sub>STc</sub> и RNA<sub>STR</sub>, а также фракциях сывороточных низкомолекулярных РНК RNA<sub>SSc</sub> и RNA<sub>SSR</sub>, использовавшихся для конструирования библиотек и секвенирования, с помощью qПЦР (Рис. 42). Такие же фракции РНК, полученные в независимых экспериментах, были использованы для оценки уровня выбранных миРНК с целью получения более точных данных. Как видно из полученных результатов, данные qПЦР коррелируют с данными секвенирования: в опухоли мышей с LLC, получавших РНКазу А, наблюдается повышение уровня экспрессии миРНК от 1.3 до 2.2 раз, тогда как в сыворотке крови отмечается



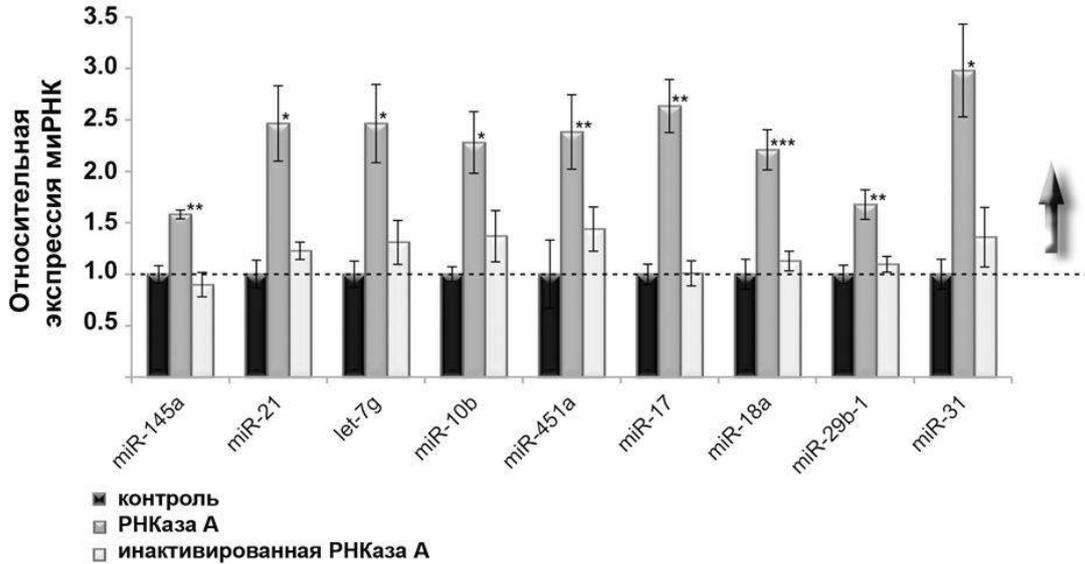
**Рис. 42.** Анализ экспрессии миРНК в опухоли и сыворотке крови мышей с LLC после применения РНКазы А методом stem-loop qПЦР. **А.** Уровень экспрессии миРНК в опухоли. В качестве референсного гена использовали U6. **Б.** Уровень миРНК в сыворотке крови, нормализованный на объем сыворотки. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента. \*, \*\* и \*\*\* указывают на статистически достоверные различия по сравнению с контролем с  $p=0.05$ ,  $p=0.01$  и  $p=0.001$ , соответственно.

снижение уровня этих миРНК, которое составляет от 2 до 3.3 раз (Рис. 42, А, Б, Таблица 19). Таким образом, данные секвенирования отражают истинное изменение профиля миРНК как в опухоли, так и в сыворотке крови.

### 6.5. Влияние РНКазы А на уровень миРНК и генов, участвующих в процессинге миРНК, в клетках LLC при воздействии *in vitro*

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. Кроме того, одним из вопросов нашего исследования было выявление важности каталитической активности РНКазы А для проявляемого ею эффекта воздействия на регуляторные миРНК. Для ответа на поставленные вопросы нами был проведен эксперимент с использованием первичной культуры клеток

LLC, подвергнутых воздействию РНКазы А или РНКазы А, инактивированной с помощью DEPC, в концентрациях, в которых был получен эффект *in vivo*. Исследование показало, что инкубация клеток LLC в присутствии РНКазы А приводила к 2-3-кратному повышению уровня экспрессии миРНК (Рис. 43). 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. 43, Таблица 20).



**Рис. 43.** Уровень экспрессии миРНК в клетках LLC, инкубированных *in vitro* с интактной РНКазой А и РНКазой А, инактивированной с помощью DEPC, в течение 48 ч. В качестве референсных генов использовали U6 и *rp130*. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента. \*, \*\* и \*\*\* указывают на статистически достоверные различия по сравнению с контролем с  $p=0.05$ ,  $p=0.01$  и  $p=0.001$ , соответственно.

**Таблица 20.** Сравнение изменения уровня экспрессии миРНК под действием РНКазы А в клетках LLC по данным qПЦР.

миРНК	qПЦР <i>in vitro</i> *
<i>mir-29b</i>	1.6↑
<i>mir-21</i>	2.5↑
<i>mir-10b</i>	2.2↑
<i>mir-451a</i>	2.4↑
<i>mir-17</i>	2.6↑
<i>mir-18a</i>	2.2↑
<i>mir-145</i>	1.6↑
<i>mir-31</i>	2.8↑
<i>let-7g</i>	2.5↑

\* - определение уровня миРНК в клетках LLC, инкубированных *in vitro* с РНКазой А, в течение 48 ч.

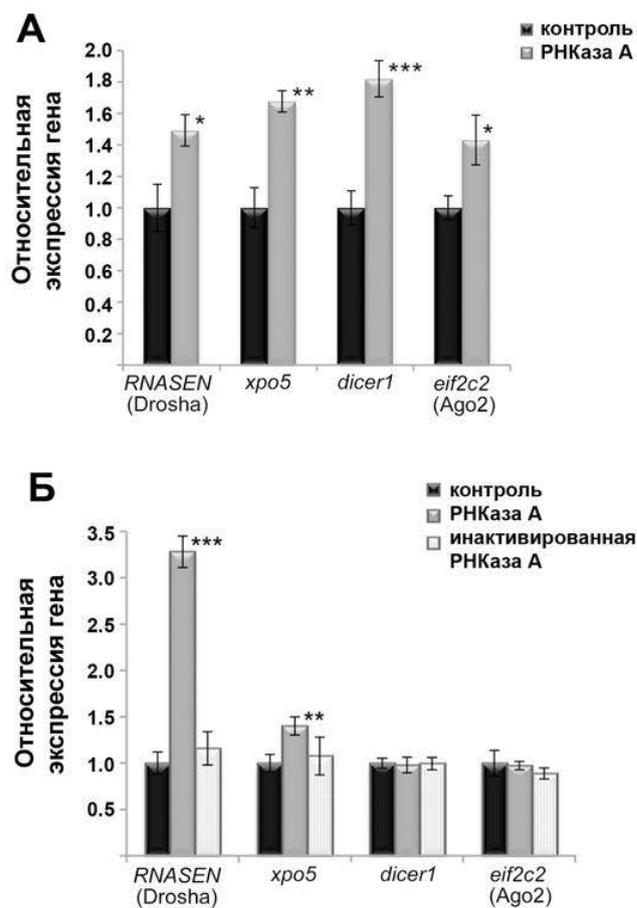
РНКаза А, инактивированная с помощью DEPC (не проявляющая рибонуклеазной активности), вызывала незначительное повышение уровня экспрессии некоторых миРНК, однако, это повышение не было статистически достоверным (Рис. 43). Таким образом, было показано, что повышение экспрессии миРНК в опухоли является результатом воздействия РНКазы А, и рибонуклеазная активность фермента является для этого необходимым условием.

Наблюдаемое повышение уровня экспрессии миРНК в опухолевой ткани может быть связано как с изменением транскрипционной активности генов миРНК, так и с изменением транскрипционной активности генов, участвующих в процессинге миРНК. С целью выяснить, с чем связана индукция синтеза миРНК в опухолевых клетках после воздействия РНКазы А, мы проанализировали экспрессию мРНК, кодирующих ключевые белки, ответственные за процессинг миРНК: RNASEN (*Drosha*), *xpo5*, *dicer1* и *eif2c2* (*Ago2*). Анализ их экспрессии с помощью qПЦР показал, что уровень всех исследуемых мРНК повышался в опухоли в ответ на введение РНКазы А (Рис. 44, А). Исследование экспрессии генов после обработки клеток LLC *in vitro* интактной РНКазой А и РНКазой А, инактивированной с помощью DEPC, показало, что интактная РНКаза А приводит к существенному повышению экспрессии генов *Drosha* и *xpo5* (Рис. 44, Б), в то время как инактивированная РНКаза А не оказывала никакого влияния на компоненты биогенеза миРНК.

Полученные данные показали, что однократное воздействие РНКазы А (до 48 ч) на опухолевые клетки *in vitro* приводит к активации транскрипции ряда генов, кодирующих миРНК, и некоторых мРНК, отвечающих за процессинг миРНК. Многократное воздействие РНКазы А на опухоль *in vivo* (до 10 дней) приводит к активации экспрессии всех ключевых генов, участвующих в биогенезе миРНК, что обеспечивает индукцию синтеза множества миРНК.

Таким образом, впервые было показано, что противоопухолевый эффект РНКазы А связан с повышением уровня экспрессии миРНК в опухолевых клетках и снижением уровня миРНК в кровотоке животных-опухоленосителей, что сопровождается активацией транскрипции мРНК, кодирующих гены, которые участвуют в биогенезе и процессинге миРНК. Рибонуклеазная активность РНКазы А является ключевым элементом в активации как синтеза миРНК, так и генов, вовлеченных в биогенез миРНК.

Следует отметить, что в целом весь репертуар миРНК, индуцируемых под действием РНКазы А в опухоли, не однозначен, потому что мы наблюдали активацию как опухолевых супрессоров (миРНК семейства *let-7*, *mir-451*), так и онкогенных миРНК (*mir-29b*, *mir-21*). Во



**Рис. 44.** Анализ экспрессии генов, кодирующих белки, которые участвуют в процессинге миРНК, методом qПЦР. **А.** Экспрессия генов в опухоли мышей, получавших инъекции физ/раствора и РНКазы А. **Б.** Экспрессия генов в клетках LLC, инкубированных в присутствии интактной РНКазы А или РНКазы А, инактивированной DEPC, в течение 48 ч. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента. \*, \*\* и \*\*\* указывают на статистически достоверные различия по сравнению с контролем с  $p=0.05$ ,  $p=0.01$  и  $p=0.001$ , соответственно. В качестве референсных генов использовали *hprt1* и *gpl30*.

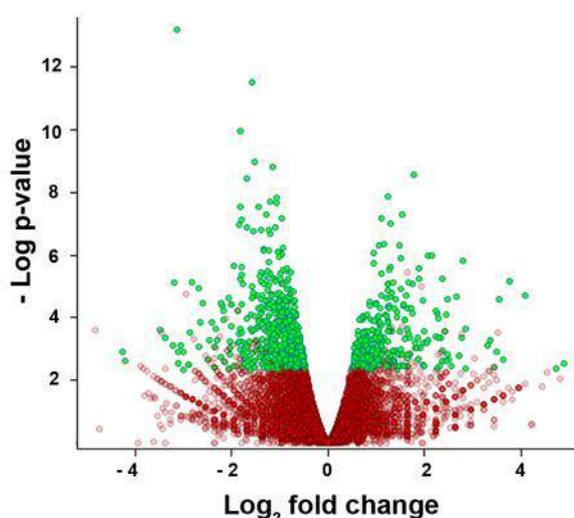
многих раковых клетках первичные транскрипты миРНК семейства *let-7*, которые являются главными негативными регуляторами опухолевой прогрессии, активно транскрибируются, однако уровень продукции зрелых миРНК остается низким. Тем не менее, среди 100 миРНК, уровень экспрессии которых значительно повышался в опухоли при применении РНКазы А, было выявлено 11 из 12 миРНК, принадлежащих к семейству *let-7* (Рис. 41, Б). Таким образом, несмотря на активацию РНКазой А синтеза онкогенных миРНК наряду с опухолевыми супрессорными миРНК, реорганизация паттерна миРНК в опухолевой клетке приводит к снижению злокачественных свойств опухоли, и, в итоге, к ингибированию роста опухоли и метастазов.

## 6.6. Анализ данных секвенирования полного транскриптома опухоли мышей с LLC после воздействия РНКазы А

При анализе профилей миРНК мы обнаружили, что действие РНКазы А *in vivo* приводит к изменению паттернов экспрессии миРНК в опухолевой ткани и сыворотке крови мышей с LLC, и при этом наблюдается ингибирование роста первичной опухоли и снижение уровня метастазирования. Поскольку нет доказательств, что РНКаза А проникает в клетки или избегает инактивации под действием внутриклеточного рибонуклеазного ингибитора, мы предположили, что наблюдаемый ответ является системным и не связан напрямую с деградацией внутриклеточных РНК. Учитывая изменение профилей миРНК, представлялось интересным оценить изменение уровней их генов-мишеней и комплексов генов, вовлеченных в сигнальные пути, которые являются ключевыми для жизнеспособности опухолевых клеток.

Для этого библиотеки L5 и L6, 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™ ABA 5.5 (см. п. 2.2.11.7). Схема эксперимента представлена на Рис. 39. Суммарное количество прочтений для библиотек L5 и L6 составило  $5.3 \times 10^7$  и  $3.1 \times 10^7$ , соответственно.

Гены были картированы на референсный геном *Mus musculus* (версия NCBI37) с использованием Bioscope software v.1.3. (ABI, США). Анализ дифференциальной экспрессии выявил 966 дифференциально экспрессирующихся транскриптов (qFDR < 0.05), уровень 322 из которых был повышен, а 644 – понижен в опухолевой ткани группы мышей с LLC, получавших инъекции РНКазы А (библиотека L6), по сравнению с группой мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора (контроль, библиотека L5) (Рис. 45).



**Рис. 45.** Вулканная диаграмма уровня экспрессии генов по данным секвенирования. Зеленым цветом показаны гены, чей уровень транскрипции существенно отличался между L5 и L6.

С использованием анализа Gene Ontology (GO) (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) (Рис. 46).

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) (Рис. 46).

### **6.7. Интегрирование данных секвенирования полного транскриптома в метаболические процессы, обеспечивающие жизнедеятельность опухолевых клеток, и регуляторные пути, задействованные в опухолевой прогрессии**

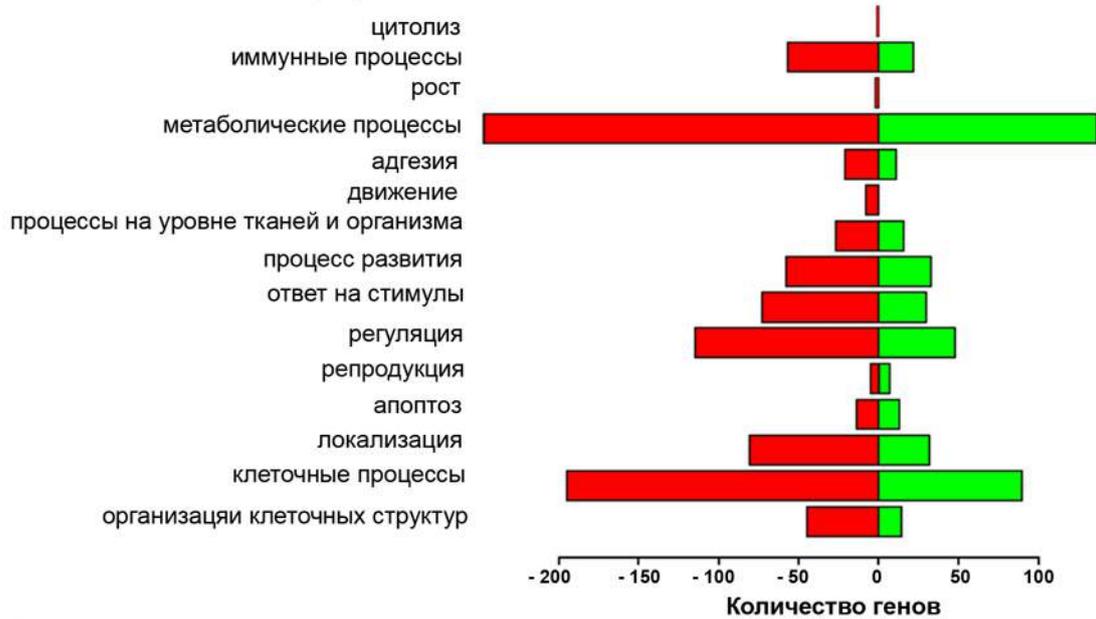
Для наложения данных секвенирования на метаболические пути, важные для опухолевой прогрессии, и регуляторные пути, задействованные в неконтролируемой пролиферации клеток и злокачественной трансформации, мы использовали интернет-ресурсы KEGG Automatic Annotation Server и Gene Card. С помощью данного подхода были идентифицированы опухолевые индукторы и супрессоры, миРНК-ассоциированные гены, активаторы, репрессоры и регуляторы транскрипции, а также транскрипционные факторы (Таблица 21, S3, S4, S5 и S6, приложение). 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 21, Таблицы S3 – S6).

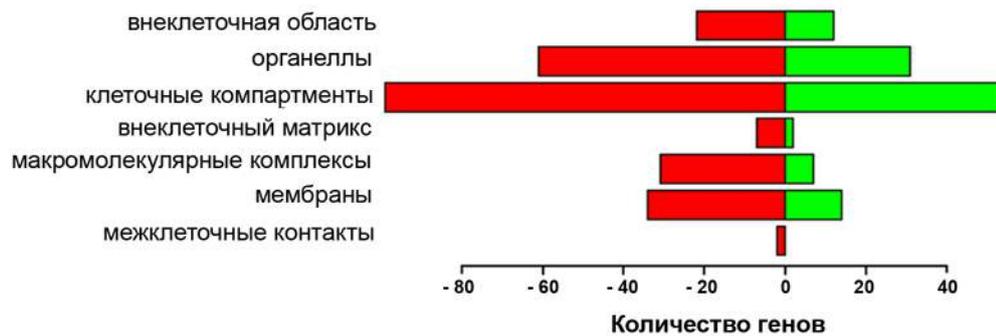
Метаболические пути и каскады. Наиболее существенные изменения экспрессии генов наблюдались для следующих метаболических путей: метаболизм аминокислот и

нуклеотидных сахаров, метаболизм аминокислот и нуклеотидов (повышен уровень

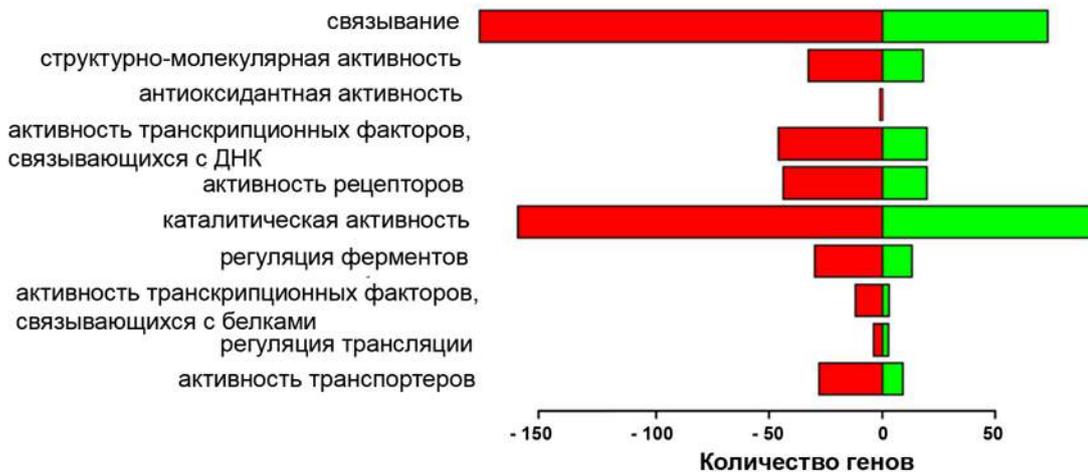
### А Биологические процессы



### Б Клеточные компоненты



### В Молекулярные функции



**Рис. 46.** Функциональная аннотация генов, уровень которых изменился более чем в 1.4 раза в опухоли мышей с LLC после применения РНКазы А, согласно категоризации Gene Ontology. Зеленым цветом показано количество генов с повышенным уровнем экспрессии в L6, красным цветом – с пониженным уровнем экспрессии в L6.

**Таблица 21.** События и сигнальные пути, наиболее изменившиеся при снижении инвазивного потенциала LLC под действием РНКазы А

Событие или сигнальный путь	Гены с повышенным уровнем экспрессии <sup>а</sup>	Гены с пониженным уровнем экспрессии <sup>б</sup>	p-value
<b>Метаболические пути</b>			
Метаболизм аминокислот и нуклеотидных сахаров, метаболизм аминокислот и нуклеотидов	<b>4:</b> <i>Uap111, Mtap, Cant1, Impdh2</i>	<b>8:</b> <i>Nos2, Dguok, Adprm, Twistnb, Setdb2, Hal, Amdhd1, Gnpnat1</i>	9.373E-4
Метаболизм углеводов	<b>9:</b> <i>Pgls, Gaa, Bpgm, Mcee, B4galt2, Xylb, Pdk4, Aldoc, Lalba</i>	<b>8:</b> <i>Eno3, Galnt3, Alg10b, Csgalnact2, Alg6, Ndst2, Gxylt1, Xylt1</i>	1.427E-13
P450-опосредованный метаболизм	<b>1:</b> <i>Akr7a5</i>	<b>3:</b> <i>Hsd11b1, Cyp27b1, Cyp26b1</i>	2.075E-4
Метаболизм инозитол фосфата	<b>5:</b> <i>Impa1, Gpaal, Ip6k2, Plcd1, Pigb</i>	<b>1:</b> <i>Pi4k2b</i>	
Метаболизм жирных кислот и липидов	<b>11:</b> <i>Ech1, Hadh, Eci2, Acadvl, Pld3, Cbr4, Acat2, Phospho1, Plxcd2, Acsbg1, St3gal5</i>	<b>7:</b> <i>Agpat2, Cd5l, Mcat, Elovl6, Lipt1, B4galt6, B3galnt1</i>	2.848E-11
Окислительное фосфорилирование	<b>6:</b> <i>Ndufv3, Cox8a, Foxred1, Ndufb11, Bcs1l, Cox18</i>	<b>3:</b> <i>Cox7b, Ndufa5, Atp8b4</i>	7.042E-9
Метаболизм никотината и никотиламида	<b>2:</b> <i>Nmnat3, Art5</i>	<b>1:</b> <i>Bst1</i>	5.239E-6
Метаболизм глутатиона	<b>2:</b> <i>Chac1, Haghl</i>	<b>3:</b> <i>Gclm, Gss, Gpx7</i>	2.322E-7
<b>События, важные для опухолевой прогрессии</b>			
Ангиогенез	<b>2:</b> <i>Adamts10, Robo4</i>	<b>4:</b> <i>Cxcl5, Filip1l, Smoc2, Angptl1</i>	- <sup>d</sup>
Апоптоз	<b>8:</b> <i>Pcbp4, Steap3, Ctsh, Faim, Pycard, Plekhf1, Nol3, Dapk1</i>	<b>12:</b> <i>Lcn2, Ctsc, Gzmb, Hipk3, Phlda1, Bcl2l2, Casp9, Ctso, Casp12, Coro2a</i>	4.643E-9
Клеточная адгезия, миграция и инвазия	<b>8:</b> <i>Rap2a, Myl12b, Emp2, Ptpn14, Vcas3, Abi3, Ajap1, Jup</i>	<b>12:</b> <i>S100a4, Colla1, Cav2, Rab1, Thbs1, Rasgrf1, Shc4, Lrg1, Cxcl5, Itga7, Smoc2, Ccnd2</i>	1.024E-11
Контроль клеточного цикла, трансформация	<b>4:</b> <i>Usp10, Mad2l2, Cdc26, Rnf122</i>	<b>5:</b> <i>S100a9, Nedd8, Incenp, Cenpw, Nudt6</i>	2.000E-3
<b>Сигнальные пути, участвующие в злокачественной трансформации</b>			
PI3K/АКТ	<b>3:</b> <i>Angpt2, Il2rb, Hsp90aa1</i>	<b>12:</b> <i>Colla1, Thbs1, Il4ra, Csf3, Jak2, Tnc, Jak3, Itga7, Csf3r, Il7r, Ccnd2, Itga4</i>	2.827E-24
RAS	<b>4:</b> <i>Rras, Grap, Angpt2, Rgs14</i>	<b>4:</b> <i>Rasgrf1, Kras, Shc4, Pld1</i>	9.345E-10
MAPK	<b>6:</b> <i>Rras, Trib3, Map3k6, Hspa1b, Lamtor1, Dok4</i>	<b>11:</b> <i>Ccl7, Dusp6, Il1b, Cd14, Rasgrf1, Stk24, Il1r2, Ccl5, Map2k4, Hspa2, Itgax</i>	1.869E-13
TGF-β	<b>2:</b> <i>Fam89b, Fmod</i>	<b>6:</b> <i>Ccl7, Thbs1, Ccl5, Acvr1b, Rbx1, Fst</i>	2.863E-8

**Таблица 21 (продолжение).** События и сигнальные пути, наиболее изменившиеся при снижении инвазивного потенциала LLC под действием РНКазы А

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

<sup>а</sup>Данные представлены в Таблице S3.

<sup>б</sup>Данные представлены в Таблице S4.

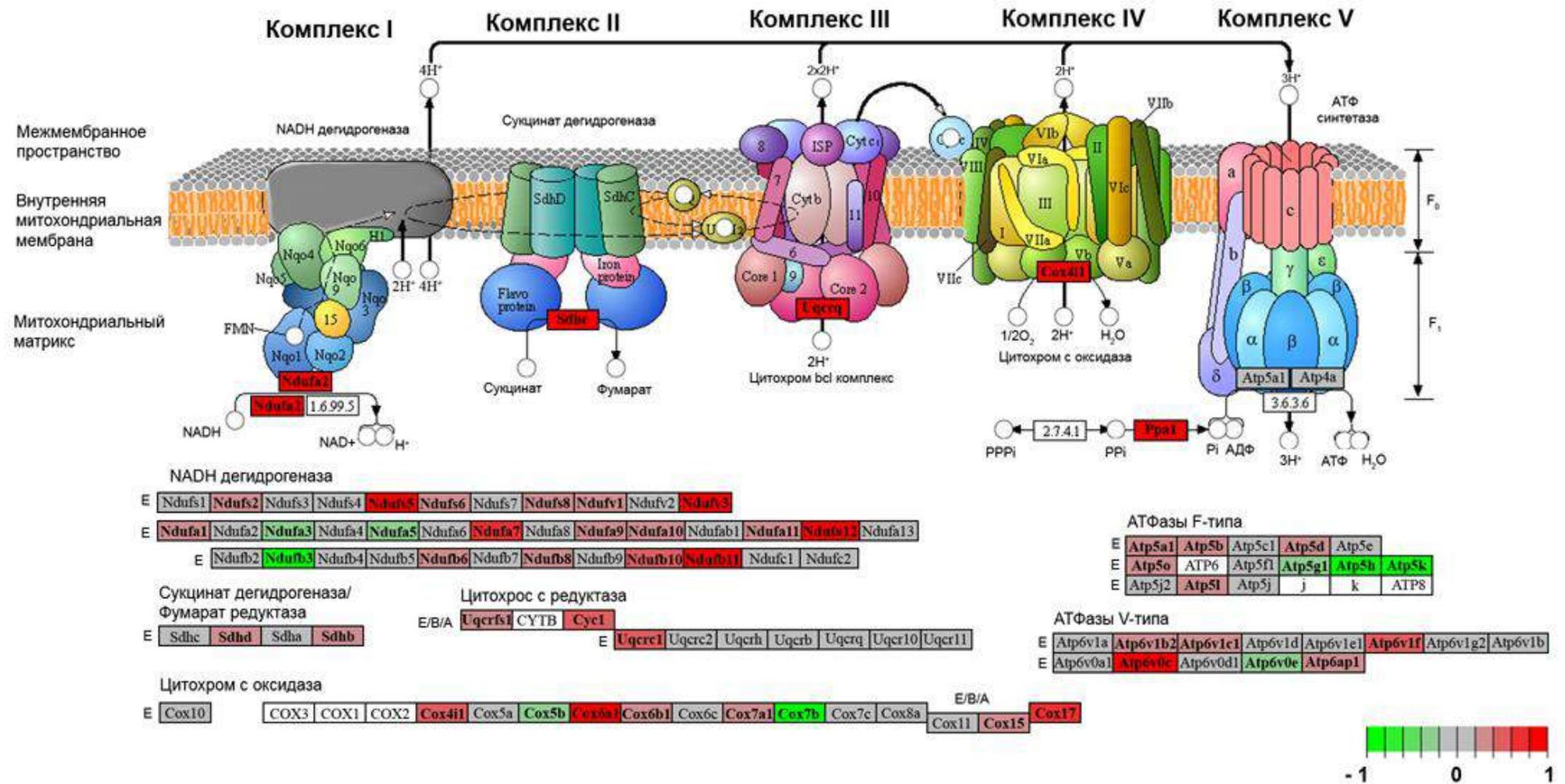
<sup>с</sup>p-value рассчитывали с помощью инструмента для аннотации транскриптома ToppFun (<https://toppgene.cchmc.org>).

<sup>д</sup>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.

экспрессии четырех генов, понижен – восьми генов, Таблица 21); метаболизм углеводов (повышен уровень экспрессии девяти генов, понижен – восьми генов, Таблица 21); метаболизм жирных кислот и липидов (повышен уровень экспрессии 11 генов, понижен – семи генов, Таблица 21). Окислительное фосфорилирование (повышен уровень экспрессии шести генов, понижен – трех генов, Таблица 21, Рис. 47) и метаболизм инозитол фосфата (повышен уровень экспрессии пяти генов, понижен – одного гена, Таблица 21) также подвергались изменениям после воздействия РНКазы А.

Среди ключевых компонентов метаболизма инозитол фосфата мы наблюдали повышение уровня гена *Imra 1*, кодирующего инозитол(мио)-1(или 4)-монофосфатазу 1. Этот фермент дефосфорилирует мио-инозитол монофосфат с образованием свободного мио-инозитола, предшественника фосфатидинозитола, и, таким образом, является важным модулятором внутриклеточной передачи сигнала (Таблица 21).



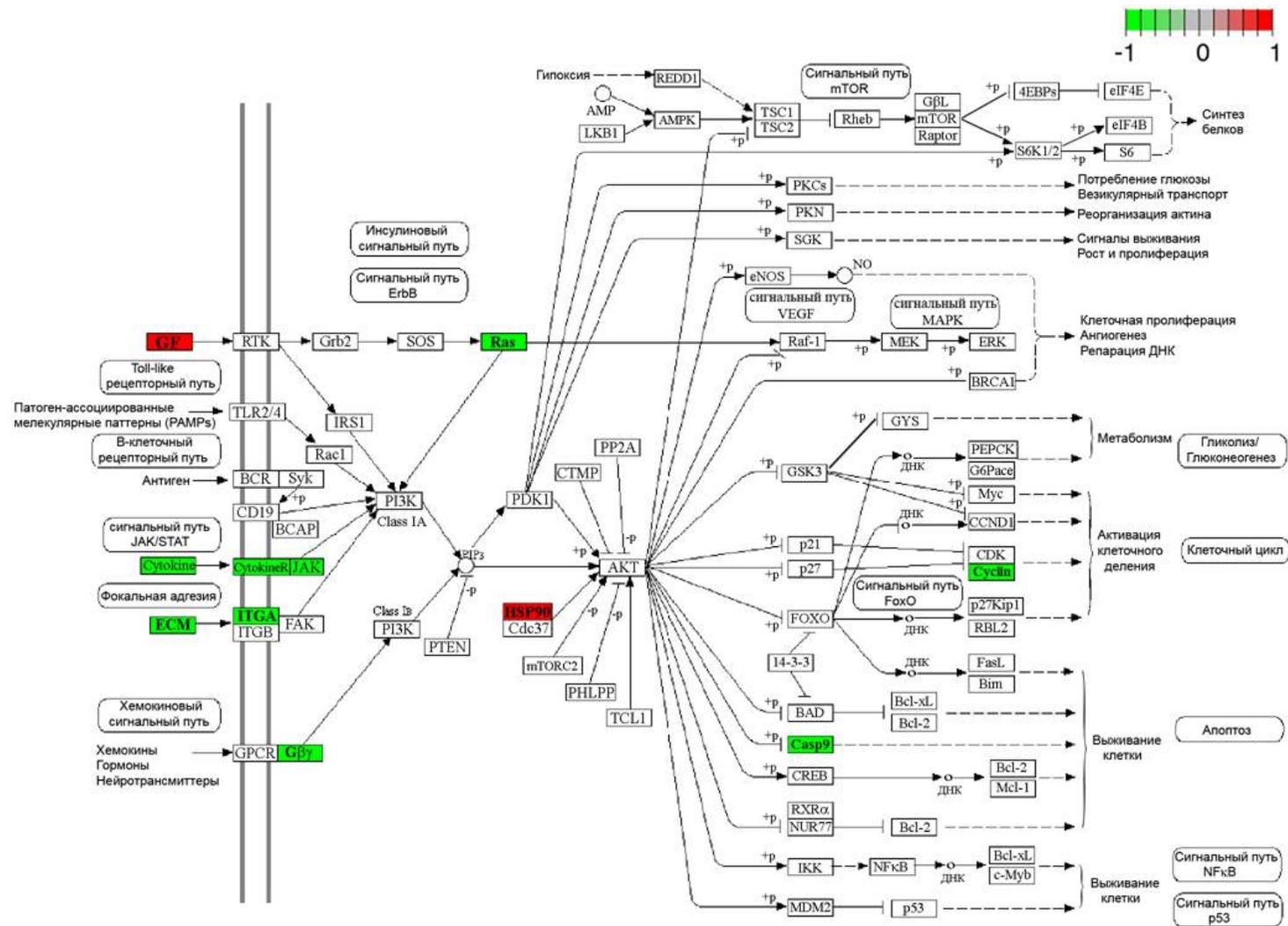
**Рис. 47.** Гены и комплексы, вовлеченные в окислительное фосфорилирование. Цветовая кодировка: (0) – (-1) – снижение экспрессии; (0) – (+1) – повышение экспрессии.

Нами также было обнаружено изменение цитохром P450-ассоциированного метаболизма (повышен уровень экспрессии одного гена, понижен – трех генов, Таблица 21), метаболизма никотината и никотинамида (повышен уровень экспрессии двух генов, понижен – одного гена, Таблица 21) и метаболизма глутатиона (повышен уровень экспрессии двух генов, понижен – трех генов, Таблица 21).

События, связанные с опухолевой прогрессией. Среди таких событий, которые связаны с прогрессией опухоли, ее диссеминацией и выживаемостью, нами было обнаружено изменение в экспрессии генов, вовлеченных в ангиогенез (повышен уровень двух генов, понижен – четырех генов, Таблица 21), апоптоз (повышен уровень восьми генов, понижен – 12 генов, Таблица 21), а также контроль клеточного цикла и трансформацию (повышен уровень четырех генов, понижен – пяти генов, Таблица 21). Событиями, претерпевшими наибольшие изменения после воздействия РНКазы А, были клеточная адгезия, миграция и инвазия (повышен уровень экспрессии восьми генов, понижен – 12 генов, Таблица 21). Среди восьми генов с повышенным уровнем экспрессии мы обнаружили три гена, участвующих в позитивной регуляции клеточной адгезии и негативной регуляции диссеминации опухоли (*Ptpn14*, *Myl12b* и *Emp2*) (Таблицы 21 и S3). Среди генов с пониженным уровнем экспрессии был выявлен *Smoc2*, содействующий пролиферации и миграции. Среди генов с повышенной экспрессией, вовлеченных в апоптоз, было обнаружено пять генов, кодирующих белки, которые функционируют как позитивные индукторы апоптоза, как каспазного, так и митохондриального (*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. Нами было показано, что воздействие РНКазы А на опухоль приводит к негативной регуляции некоторых сигнальных путей, напрямую участвующих в опухолевой прогрессии: PI3K/АКТ (повышен уровень экспрессии трех генов, понижен – 12 генов), TGF- $\beta$  (повышен уровень двух генов, понижен – шести генов), JAK/STAT (повышен уровень экспрессии двух генов, понижен – 11 генов) и канонический WNT путь (повышен уровень шести генов, понижен – 11 генов, Таблица S3 и S4, Рис. 48 – Рис. 50).

Из генов, ассоциированных с сигнальным путем TGF- $\beta$ , следует отметить значительное повышение уровня экспрессии гена *Fam89b*, являющегося супрессором пути TGF- $\beta$  (Таблица 21, S3 и S4, Рис. 50). Некоторые изменения также были отмечены для MAPK пути (повышен уровень шести генов, понижен – 11 генов, Рис. 51), а также пути RAS и сигнального кальциевого пути (Таблица 21, S3 и S4).



**Рис. 48.** Гены, вовлеченные в сигнальный путь PI3K-AKT. Цветовая кодировка: (0) – (-1) – снижение экспрессии; (0) – (+1) – повышение экспрессии.

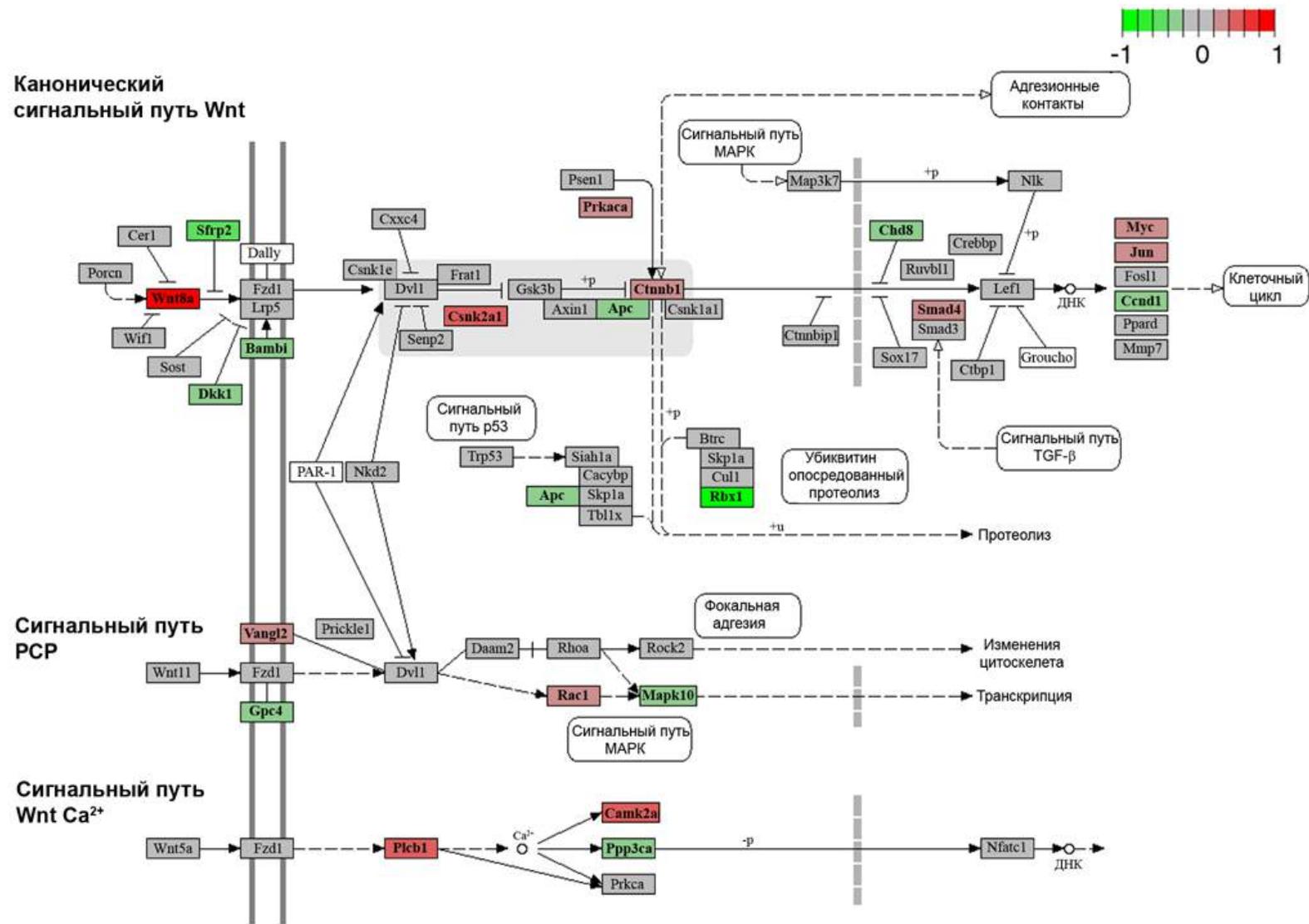


Рис. 49. Гены, вовлеченные в сигнальный путь Wnt. Цветовая кодировка: (0) – (-1) – снижение экспрессии; (0) – (+1) – повышение экспрессии.

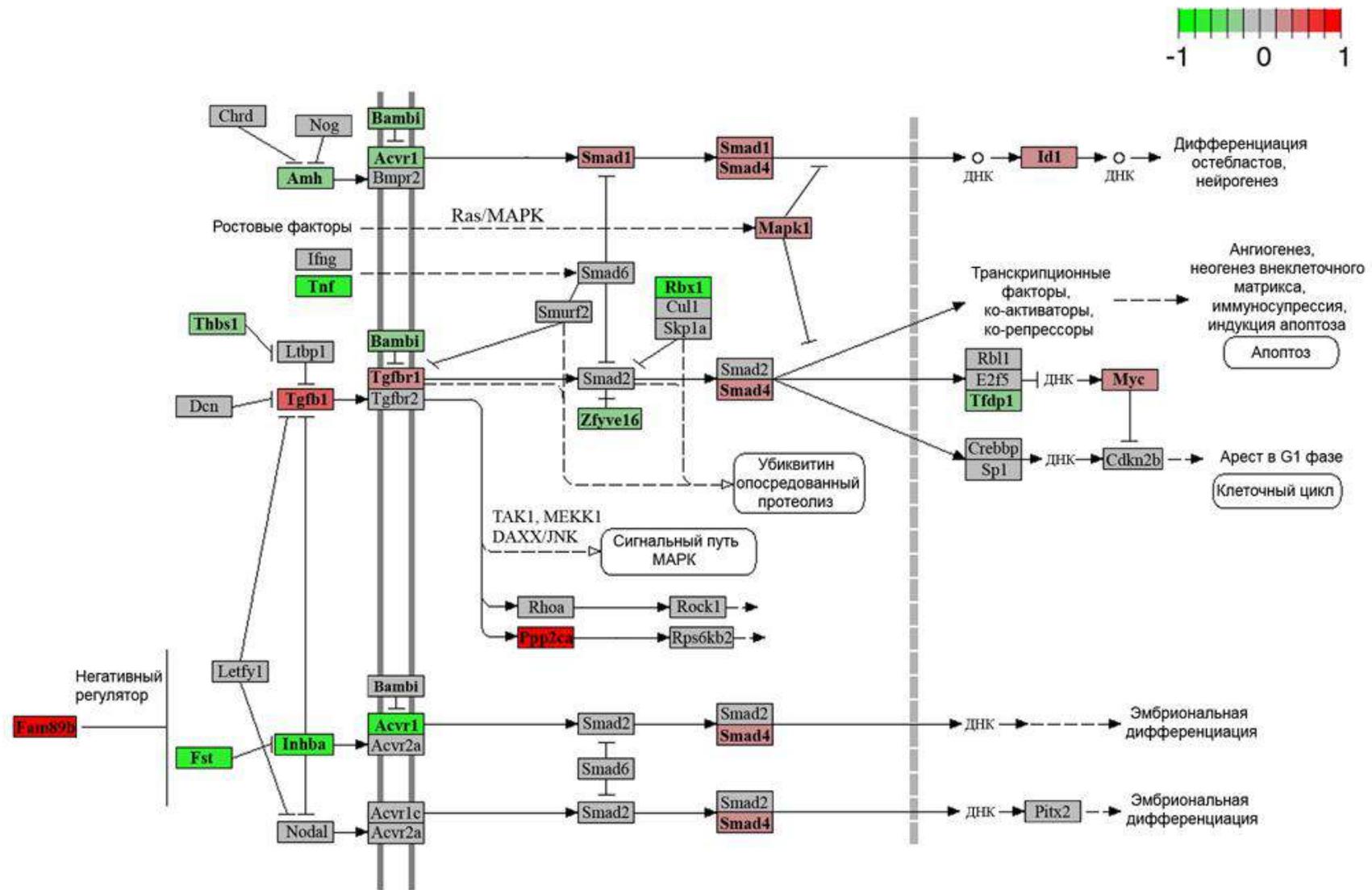
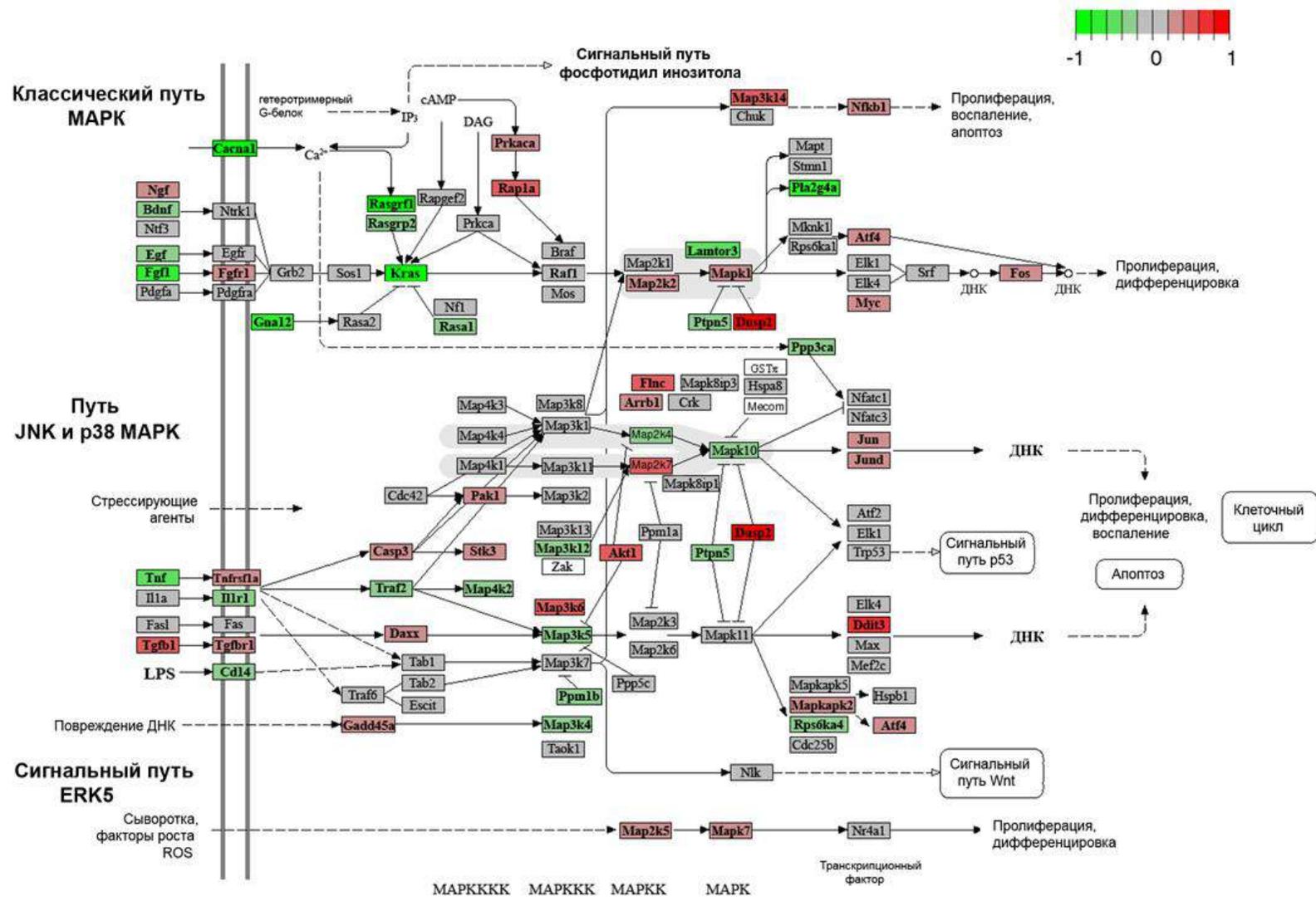


Рис. 50. Гены, вовлеченные с сигнальный путь TGF-β. Цветовая кодировка: (0) – (-1) – снижение экспрессии; (0) – (+1) – повышение экспрессии.



Опухоль-ассоциированные гены и опухолевые супрессоры. Нами также было детектировано изменение уровня экспрессии генов, которые ассоциируют с развитием того или иного опухолевого заболевания. В клетках опухоли LLC после воздействия РНКазы А было обнаружено снижение уровня экспрессии 12 таких генов, а также перераспределение в паттерне опухолевых супрессоров (повышен уровень экспрессии трех генов, снижен – четырех, Таблица 21, S3 и S4).

Гены, ассоциированные с биогенезом миРНК. В предыдущем разделе по исследованию механизма противоопухолевой активности РНКазы А нами было показано, что один из механизмов ингибирования роста опухоли и метастазов связан с изменениями в профилях миРНК сыворотки крови и опухоли. При исследовании влияния РНКазы А на полный транскриптом опухолевой клетки было выявлено пять генов со сниженным уровнем экспрессии, включая гены *Lin28a*, *Zcchc6* и *Zcchc11*, выступающих в роли супрессоров биогенеза миРНК семейства let-7 и терминального процессинга предшественников миРНК (Таблица 21 и S4).

Гены, вовлеченные в регуляцию транскрипции. Интересным фактом было обнаружение влияния РНКазы А на транскрипционную активность опухолевой клетки. Было показано, что воздействие РНКазы А приводит к существенным изменениям уровня экспрессии генов, кодирующих компоненты транскрипционной машины опухолевых клеток: регуляторы транскрипции (повышен уровень пяти генов, понижен – 24 генов), транскрипционные факторы (повышен уровень 16 генов, понижен – 13 генов), транскрипционные активаторы и ко-активаторы (повышен уровень трех генов, понижен – трех генов), репрессоры и ко-репрессоры (повышен уровень пяти генов, понижен – четырех генов, Таблицы S4 и S5).

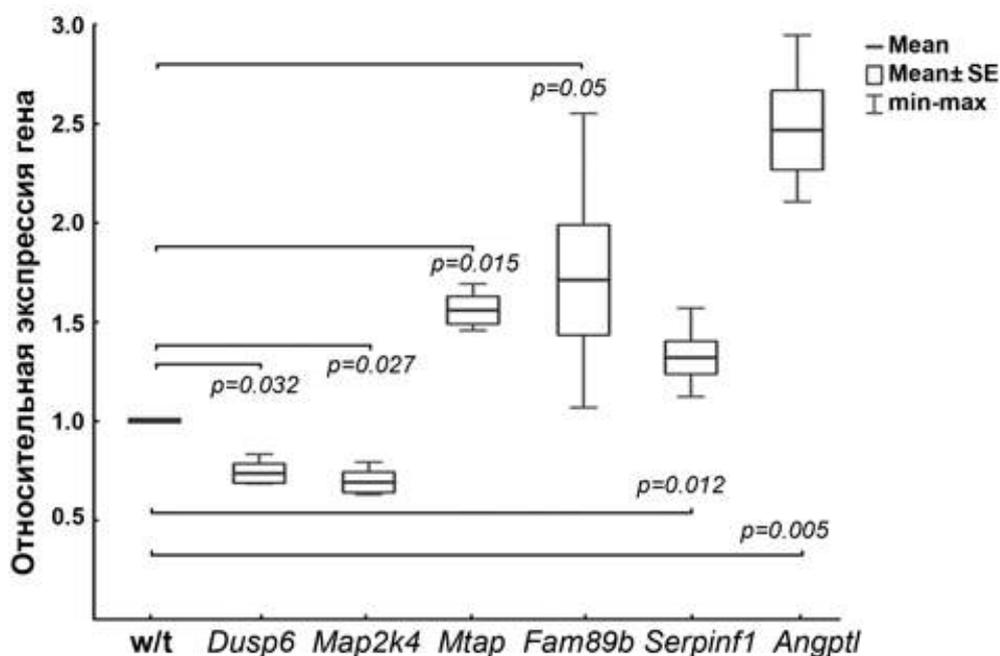
### **6.8. Валидация экспрессии генов – ключевых участников сигнальных путей, изменившихся после воздействия РНКазы А**

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 с повысившимся и понизившимся уровнями экспрессии, вовлеченные в различные сигнальные пути. В результате были выбраны следующие гены: *Mtap* (метаболизм аминокислот, нуклеотидных сахаров, аминокислот и нуклеотидов); *Angptl4* (ангиогенез); *Fam89b* (негативный регулятор сигнального пути TGF- $\beta$ ); *Serpinf1* (сигнальный путь Wnt); *Dusp6* и *Map2k4* (сигнальный путь MAPK). В эксперименте были использованы образцы суммарной РНК из опухолевой ткани мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора и РНКазы А, очищенные от рибосомальных РНК.

Было обнаружено, что уровень экспрессии генов *Dusp6* и *Map2k4* после применения РНКазы А снижались в 1.3 и 1.5 раз, соответственно (Рис. 52), что полностью совпадает с данными секвенирования (Таблица 22). 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. 52), что также коррелирует с данными секвенирования (Таблица 22).

**Таблица 22.** Сравнение изменения уровней экспрессии генов по данным qПЦР и данным секвенирования.

Ген	Данные qПЦР	Данные секвенирования
<i>Mtap</i>	↑1.6	↑1.6
<i>Angptl4</i>	↑2.5	↑1.5
<i>Fam89b</i>	↑1.7	↑1.6
<i>Serpinf1</i>	↑1.3	↑1.9
<i>Dusp6</i>	↓1.3	↓1.5
<i>Map2k4</i>	↓1.5	↓1.6



**Рис. 52.** 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.

## **6.9. Механизм противоопухолевого действия РНКазы А на основании данных секвенирования регуляторных и кодирующих РНК**

Рибонуклеазы (РНКазы) проявляют цитотоксичность за счет своей способности деградировать РНК, и, следовательно, ингибировать синтез белков на уровне транскрипции и трансляции. Цитотоксические эффекты РНКаз связывают с: (1) каталитическим расщеплением доступных внутриклеточных РНК, включая тРНК, рРНК, мРНК и некодирующих РНК (в частности, миРНК), что приводит к изменению экспрессии генов опухолевой клетки [508, 511, 513, 603]; (2) электростатическим взаимодействием РНКаз с компонентами клетки [604]; (3) модуляцией активности мембранных кальций-зависимых калиевых каналов и функций *ras*-онкогена [605, 606]; (4) индукцией апоптоза [451, 458] и (5) регуляцией сигнальных путей, взаимодействующих между собой [483, 607].

При анализе полного транскриптома опухоли после воздействия РНКазы А мы обнаружили 966 дифференциально экспрессирующихся транскриптов, вовлеченных в метаболические и сигнальные пути, важные для регуляции пролиферации опухоли, ее выживания и поддержания злокачественности (Таблицы 21, S3 – S6). Также было обнаружено некоторое изменение активности транскрипционной машины, связанное с изменением спектра транскрипционных активаторов, репрессоров, регуляторов и факторов транскрипции (Таблицы S5 и S6).

Среди метаболических путей, подвергнувшихся наибольшему влиянию, следует выделить метаболизм аминокислот и нуклеотидных сахаров, метаболизм аминокислот и нуклеотидов, метаболизм углеводов, а также жирных кислот и липидов. Воздействие РНКазы А приводило к значительному повышению функционирования окислительного фосфорилирования (Рис. 47) и метаболизма фосфатидил инозитола.

За последние пять лет было накоплено много данных о биоэнергетике раковых клеток, что привело к лучшему пониманию регуляции энергетического метаболизма при опухолевой прогрессии. Так, в опухолевых клетках для адаптации производства энергии к изменениям микроокружения, а также к изменениям в энергетических потребностях опухолевой клетки и/или ее биосинтетической активности, существует перекрестное взаимодействие между гликолизом и окислительным фосфорилированием. Такая метаболическая гибкость используется клеткой для выживания в условиях гипоксии. В некоторых исследованиях было показано снижение активности окислительного фосфорилирования во множестве типов опухолей, в то время как в других исследованиях было показано повышение его функционирования [2]. Для многих типов опухолей характерно отсутствие дыхательной активности, несмотря на присутствие высоких

концентраций кислорода (известно, как эффект Варбурга) [608]. Это связано с ослаблением функционирования митохондрий [3], что и приводит в результате к ингибированию процесса окислительного фосфорилирования. В нашем исследовании было показано повышение функциональной активности окислительного фосфорилирования после воздействия РНКазы А (Таблицы 21, S3 и S4, Рис. 47). Было обнаружено также некоторое повышение функционирования метаболизма NADPH после воздействия РНКазы А, который отличается у трансформированных и нормальных клеток [609].

Наблюдаемое повышение метаболизма углеводов, жирных кислот и липидов, пептидов и нуклеиновых кислот, так же, как и повышение функциональной активности окислительного фосфорилирования и метаболизма инозитолфосфата, свидетельствуют об изменении энергетических потребностей опухолевой клетки и переключении ее с энергетических путей, характерных для раковой клетки, на нормальное функционирование. Полученные данные коррелируют с данными для других рибонуклеаз. Так, например, было обнаружено, что модифицированная панкреатическая рибонуклеаза PE5 вызывает подавление экспрессии ряда генов, вовлеченных в метаболические пути, в раковых клетках [610].

После применения РНКазы А в опухоли также было отмечено изменение некоторых событий и путей, включая ангиогенез, апоптоз, контроль клеточного цикла, формирование клеточных контактов, что привело в результате к повышению клеточной адгезии и подавлению диссеминации опухоли. Положительным событием в регуляции клеточной адгезии является увеличение экспрессии гена *Ptpn14*, участвующего в регуляции межклеточной адгезии, адгезии между клетками и внеклеточным матриксом, клеточного роста и миграции. Белок, кодируемый *Ptpn14*, вовлечен в регуляцию экспрессии гена TGF- $\beta$ , и, таким образом, в модулирование эпителиально-мезенхимального перерождения [611, 612]. Также показана способность *Ptpn14* функционировать в качестве опухолевого супрессора [4].

Еще двумя положительными событиями клеточной адгезии является повышение уровня экспрессии гена *Emp2*, который регулирует экспрессию на плазматической мембране интегриновых гетеродимеров *Itga6-Itgb1*, *Itga5-Itgb3* и *Itga5-Itgb1*, модулируя, таким образом, адгезию между клетками и внеклеточным матриксом [5], и гена *Myl12b*, который участвует в фокальной адгезии и формировании плотных контактов [6]. Важным результатом является обнаружение снижения экспрессии гена *Smoc2*, который стимулирует клеточную пролиферацию, миграцию и ангиогенез [7].

В литературе существуют данные, указывающие на возможное участие рибонуклеаз в контроле клеточной пролиферации и миграции. Так, было показано, что мутации в гене

РНКазы L, основная функция которой заключается в запуске ИФН-индуцируемого противовирусного иммунитета, могут усиливать клеточную миграцию и метастазирование, а выключение этого гена приводит к усилению опухолевого роста и метастазирования *in vivo* [613, 614]. Секретируемая рибонуклеаза RNASET2 человека участвует в контроле сборки актинового цитоскелета [615, 616], клеточной подвижности и миграции [617].

Изменение экспрессии генов, участвующих в событиях апоптоза, позволяет сделать вывод об активации внутреннего митохондриального пути апоптоза в клетках опухоли после воздействия РНКазы А. Нами было обнаружено повышение экспрессии генов *Pycard*, *Plekhf1* и *Dapk1*, активирующих митохондриальный путь апоптоза. Повышение экспрессии гена *Faim*, чей белок ингибирует запуск апоптоза через рецепторы клеточной смерти [8], также указывает на изменение в функционировании внутреннего митохондриального пути апоптоза. Также наблюдается снижение экспрессии гена *Gzmb*, который кодирует белок, участвующий в активации каспаз -3, -7, -9 и 10, и, таким образом, в развитии каспазного пути апоптоза. Из важных событий контроля клеточного цикла следует отметить повышение экспрессии гена *Pcbp4*, подавляющего клеточную пролиферацию путем индукции апоптоза и ареста клеточного цикла в фазе G(2)-М, а также способного подавлять рост легочных опухолей легких [9].

Важным результатом нашей работы было обнаружение того, что системное воздействие РНКазы А на организм-опухоленоситель приводит в опухоли к отрицательной регуляции сигнальных путей, участвующих в злокачественной трансформации: PI3K/АКТ, TGF- $\beta$ , JAK/STAT и канонического пути WNT (Рис. 48 – Рис. 50, Таблица S3 и S4). MAPK и PI3K/АКТ вовлечены в фундаментальные физиологические процессы, такие как клеточная пролиферация, дифференцировка, метаболизм, организацию цитоскелета, а также выживание и клеточную смерть. Активация этих сигнальных путей является признаком дисрегуляции и развития опухолевых заболеваний и связана с инициацией, прогрессией и метастазированием при раке легких [10]. Сигнальный путь JAK/STAT является ключевым каскадом при развитии различных типов опухолей, таких как рак желудка [11], рак поджелудочной железы [12] и гематологических новообразований [13]). Среди генов, участвующих в путях JAK/STAT и PI3K/АКТ, было обнаружено снижение уровня экспрессии генов, кодирующих Januse киназы *Jak2* и *Jak3*, которые участвуют в активации белков семейства STAT, и, таким образом, способствуют опухолевой прогрессии [618].

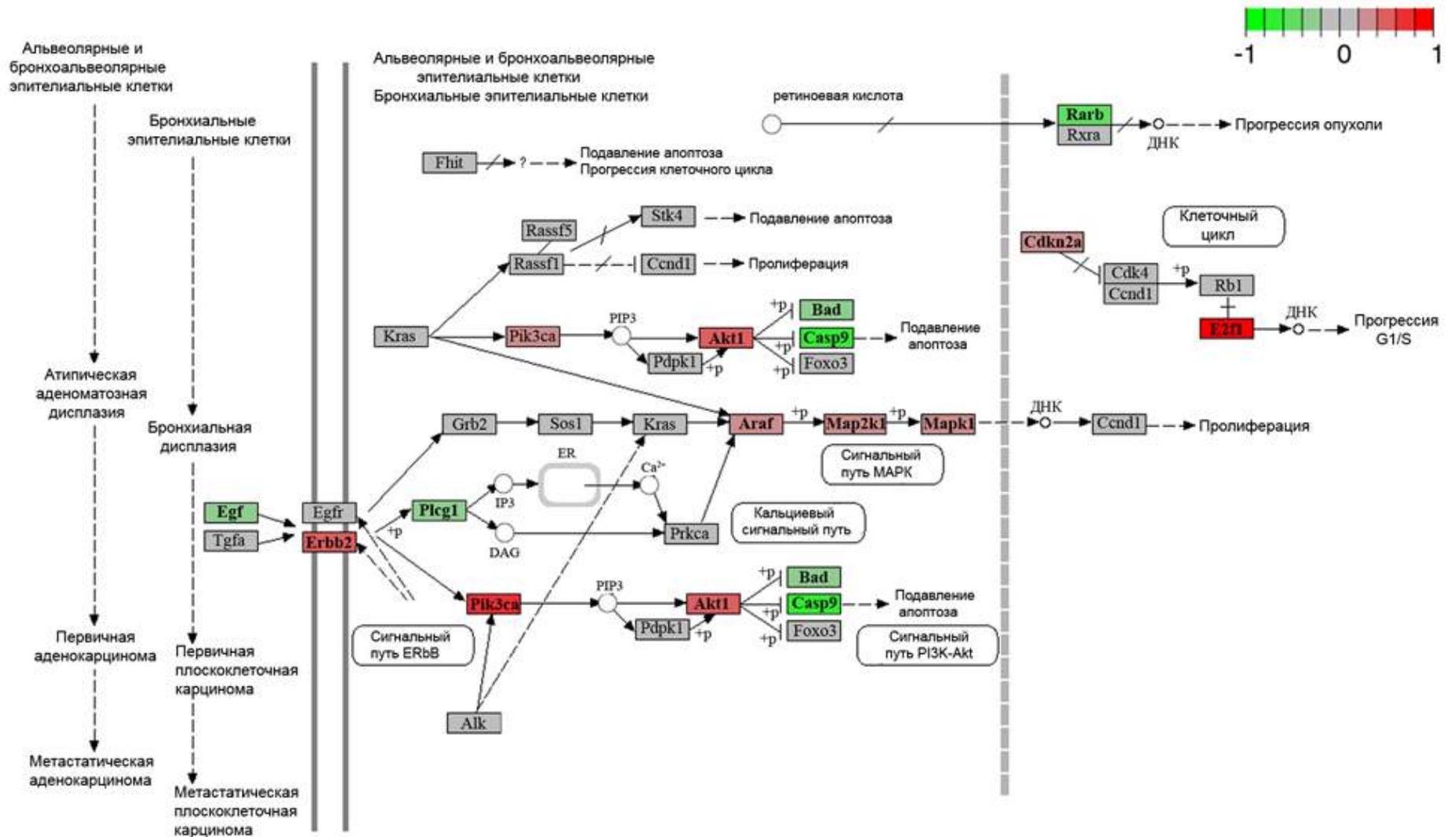
Наши данные не позволили сделать однозначного заключения об активации или ингибировании сигнального пути MAPK под действием РНКазы А (Рис. 51, Таблица S3 и S4). Было выявлено повышение экспрессии гена *Rras*, участвующего в опухоль-

ассоциированных каскадах, и снижение экспрессии гена *Dusp6*, участвующего в инактивации MAP киназ (Таблица 21). Тем не менее, было обнаружено снижение экспрессии гена *Trib3*, который регулирует активность MAP киназ [619] и блокирует Akt киназы, участвующие в клеточной пролиферации и выживании [620]. Также было показано снижение экспрессии гена *Map2k4* (Таблица 21), высокая экспрессия которого обнаруживается при развитии остеосарком и связана с плохим ответом на лечение, опухолевой прогрессией и плохой выживаемостью [621]. Можно заключить, что РНКазы А оказывают влияние на сигнальный путь MAPK путем активации или ингибирования его отдельных ветвей, что, в итоге, приводит к изменению его активности.

Сигнальный путь TGF- $\beta$  способен оказывать как опухолесупрессивный, так и опухолестимулирующий эффекты в зависимости от типа и стадии опухолевого заболевания [14]. На поздней стадии опухолевой прогрессии путь TGF- $\beta$  стимулирует метастазирование, связанное с эпителиально-мезенхимальным перерождением, модулированием опухолевого микроокружения и компонентов внеклеточного матрикса, воспалением и иммуносупрессией [622]. В нашей работе было показано ингибирование сигнального пути TGF- $\beta$  в опухоли после воздействия РНКазы А, что связано с повышением экспрессии гена *Fam89b* (согласно данным базы UniProt, по гомологии последовательности), являющимся супрессором каскада TGF- $\beta$ .

Значительное повышение функционирования сигнального пути Wnt было отмечено при развитии различных раковых опухолей: желудочно-кишечных опухолей, лейкемии, меланоме и раке молочной железы [623]. Нами после воздействия РНКазы А на организм-опухоленоситель было обнаружено в опухоли снижение экспрессии гена *Lrrfip2*, который является активатором канонического сигнального пути Wnt [624]. Наряду с этим происходит повышение экспрессии гена *Shisa2*, который участвует в ингибировании сигнального пути Wnt, что вместе приводит к ослаблению функционирования пути Wnt в клетках опухоли.

Карцинома легких Льюис (LLC) имеет эпителиальное происхождение и гомологична немелкоклеточному раку легких человека (NSCLC) [625]. В связи с этим было проанализировано кросс-взаимодействие между сигнальными путями, участвующими в злокачественной трансформации, и путем развития NSCLC (Рис. 53). Согласно данным секвенирования под действием РНКазы А в опухоли происходило ослабление функционирования таких сигнальных путей, как PI3K/AKT, MAPK и кальциевый сигнальный путь, которые напрямую вовлечены в прогрессию NSCLC (Рис. 53). Снижение активности или ингибирование функционирования этих сигнальных путей приводило к



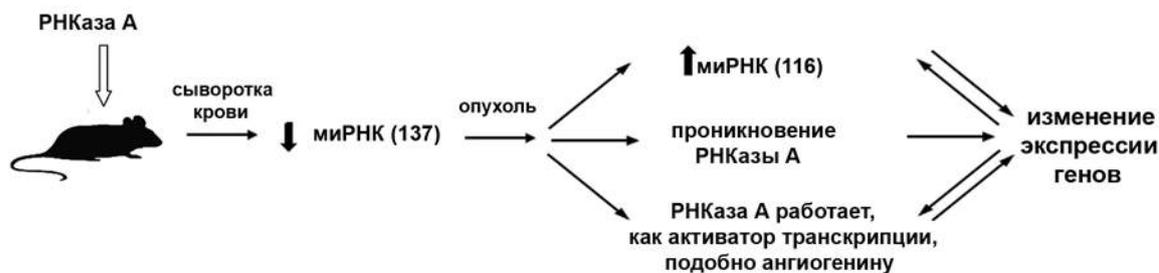
**Рис. 53.** Гены, вовлеченные в прогрессию немелкоклеточного рака легкого. Цветовая кодировка: (0) – (-1) – снижение экспрессии; (0) – (+1) – повышение экспрессии.

замедлению прогрессии LLC, что выражалось в замедлении роста первичной опухоли и снижении уровня метастазирования у мышей с LLC под действием РНКазы А.

Другим важным результатом нашего исследования являлось обнаружение подавления экспрессии генов – супрессоров биогенеза миРНК (*Lin28a*, *Zcchc6* и *Zcchc11*) (Таблица 21, S4). *Lin28a* предотвращает терминальный процессинг миРНК семейства *let-7* [626]. *Zcchc6* и *Zcchc11* выступают в роли супрессоров биогенеза миРНК, опосредуя терминальное уридилирование некоторых предшественников миРНК, включающих *pre-let-7* (при участии *Zcchc6* и *Zcchc11*), а также *mir-107*, *mir-143* и *mir-200c* (при участии *Zcchc11*) [627]. Полученные данные объясняют наблюдаемое повышение в опухолевой ткани уровней широкого спектра миРНК, включая и миРНК семейства *let-7*, под действием РНКазы А.

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 числе и миРНК. С этой гипотезой коррелирует падение уровня подавляющего большинства миРНК в крови животных-опухоленосителей после применения РНКазы А. 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 нашем случае мы наблюдали изменение экспрессии 922 транскриптов. Положительно заряженная РНКаза А способна связываться с отрицательно заряженной мембраной опухолевых клеток [478]. Мы не можем исключить прямого цитотоксического действия РНКазы А на опухолевые клетки несмотря на множество литературных данных, указывающих на ее нейтрализацию в клетке за счет связывания с рибонуклеазным ингибитором (RI) [628].

Предполагаемый механизм противоопухолевого действия РНКазы А представлен на Рис. 54.



**Рис. 54.** Механизм противоопухолевой активности РНКазы А.

Повышение экспрессии большинства миРНК в опухоли и повышение экспрессии генов, кодирующих белки, которые участвуют в процессинге миРНК, может быть результатом активации специфических транскрипционных факторов. 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 [629, 630]. Можно предположить, что после проникновения в клетку РНКазы А или ее ангиогенин-подобный фрагмент, образовавшийся в результате протеолиза *in vivo*, способны действовать в качестве транскрипционного фактора. Ранее было показано, что ангиогенин связывается с промоторной областью рибосомальной ДНК (рДНК) и стимулирует транскрипцию рРНК и синтез белков [323]. Повышенная экспрессия 18S рРНК в опухолевой ткани (первичные данные не приведены), наблюдавшаяся после многократных инъекций РНКазы А животным-опухоленосителям, а также повышение экспрессии ряда генов позволяет предположить возможную роль РНКазы А в качестве активатора транскрипции.

Гиперпродукция ангиогенина часто рассматривается, как негативное событие в опухолевой прогрессии, в связи с его способностью запускать неоваскуляризацию [631, 632], способствовать клеточной пролиферации [349] и миграции [633]. Одним из важных структурных различий между РНКазой А и ангиогенином является отсутствие в структуре ангиогенина четырех дисульфидных связей [634], что имеет функциональное значение – придает способность стимулировать неоваскуляризацию [635-637]. Таким образом, РНКазы А не обладая способностью стимулировать ангиогенез, однако, вполне может играть роль транскрипционного активатора.

Наши данные показали важность рибонуклеазной активности РНКазы А для противоопухолевой активности. Так было показано, что инактивированная РНКазы А не индуцирует синтез миРНК в опухолевых клетках и не влияет на экспрессию генов, вовлеченных в биогенез миРНК. В подтверждение нашим данным есть исследования, проведенные на различных вариантах ангиогенина, которые продемонстрировали важность его рибонуклеазной активности для проявления активности ангиогенной [239, 638]. В экспериментах *in vivo* инактивированная РНКазы А снижает уровень метастазирования с эффективностью в 2 - 3 раза меньшей по сравнению с интактной РНКазой А.

Недавние исследования показали, что глобальные нарушения процессинга миРНК приводят к злокачественному перерождению клетки и опухолевой прогрессии [234]. Значительное снижение содержания зрелых форм миРНК было выявлено при различных типах рака [639, 640]. Karube с коллегами обнаружили снижение экспрессии Drosha и Dicer у

пациентов с NSCLC, что коррелировало с плохо дифференцируемым статусом опухоли и укороченной пост-операционной выживаемостью [235]. Таким образом, повышение экспрессии зрелых миРНК в опухолевой клетке, опосредуемое РНКазой А, является позитивным событием, оказывающим влияние на супрессию опухоли и снижение ее злокачественности. Следует отметить, что спектр опухолевых миРНК, для которых наблюдалось повышение экспрессии, неоднозначен, поскольку мы наблюдали активацию как миРНК-супрессоров опухоли (миРНК семейства let-7, miR-451), так и онкогенных миРНК (miR-29b, miR-21). Однако, среди первых 100 опухолевых миРНК, уровень которых значительно повышался после воздействия РНКазы А, были миРНК-супрессоры, такие как миРНК семейства let-7 (11 из 12, Рис. 47), которые являются сильными негативными регуляторами опухолевой прогрессии [641, 642] и важны для выживаемости пациентов с различными типами рака легких [643].

### **6.10. Заключение**

Впервые было 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 РНКазы 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.

## **ГЛАВА 7. Исследование механизма противоопухолевого и антиметастатического действия ДНКазы I: поиск молекулярных мишеней среди внеклеточных опухоль-ассоциированных ДНК**

внДНК в последние два десятилетия рассматривается в качестве важного компонента плазмы крови, и повышенный уровень внДНК в крови является характерной особенностью пациентов с онкологическими заболеваниями и часто ассоциируется с тяжелой опухолевой прогрессией и плохим прогнозом [72, 73, 644]. 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 [645-648]. 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.

Исследование дезоксирибонуклеаз в качестве противоопухолевых препаратов пока в самом начале, и по этой причине в очень небольшом количестве работ предпринимались попытки изучить механизм их противоопухолевого действия. Существует ряд работ, в которых была показана связь противоопухолевого действия ДНКазы I с разрушением так называемых нейтрофильных ловушек, которые представляют собой сеть ДНК нейтрофилов с интегрированными в нее белками и используется опухолью для встраивания собственных внДНК, укрепления этой сети и повышенной миграции. Однако, фактически нет работ, в которых проводили поиск корреляций между противоопухолевым действием дезоксирибонуклеаз и циркулирующими внДНК, которые могут вносить вклад в диссеминацию опухоли.

Целью данного раздела работы был поиск молекулярных мишеней ДНКазы I среди опухоль-ассоциированных циркулирующих внДНК, а также выяснение механизма ее антиметастатического действия.

### **7.1. Определение концентрации внДНК и суммарной ДНКазной активности в плазме крови мышей с LLC и HA-1 до и после введения ДНКазы I**

Вначале мы проанализировали концентрацию внДНК в плазме крови в группе здоровых мышей, в группе мышей с LLC или с HA-1, получавших инъекции физ/раствора, в группе мышей с LLC или с HA-1, получавших ДНКазу I в дозе 0.12 мг/кг. Кровь собирали на 12 и 18 дни развития опухоли, что соответствовало 3-4-ой стадии опухолевой прогрессии, через один час после последней инъекции ДНКазы I. Из образцов крови получали плазму (см.

п. 2.2.4.2), выделяли из плазмы вДНК методом адсорбции на мелкодисперсном стекле и определяли ее концентрацию (см. 2.2.5.3). Суммарную ДНКазную активность плазмы крови определяли в реакции расщепления [<sup>32</sup>P]-ДНК<sub>59</sub> и рассчитывали эффективные константы скорости расщепления ДНК в плазме (см. п. 2.2.11.2, Таблица 23).

**Таблица 23.** Концентрация вДНК и суммарная ДНКазная активность в плазме крови мышей C57Bl/6J с LLC и мышей A/Sn с HA-1.

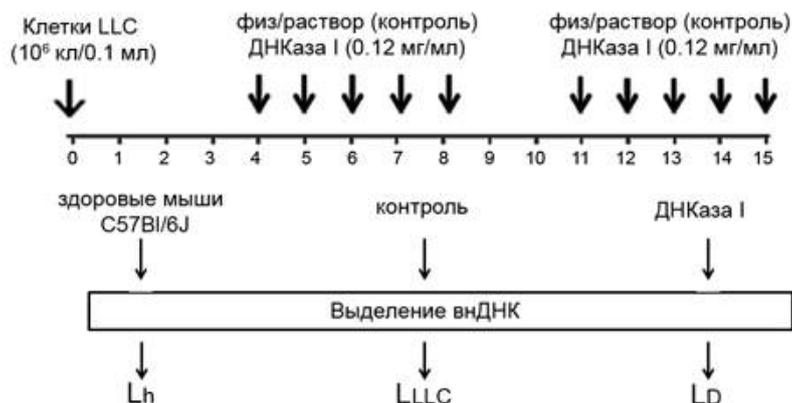
Группа	ДНКазная активность плазмы $K_{\text{eff}}$ сек <sup>-1</sup> , 30°C	Концентрация вДНК в плазме, нг/мл
C57Bl/6	$(2.71 \pm 0.15) \times 10^{-4}$	104 ± 7.0
C57Bl/6 / LLC	$(0.42 \pm 0.03) \times 10^{-4}$	131 ± 12.0
C57Bl/6 / LLC / ДНКазы I (0.12 мг/кг)	$(3.92 \pm 1.40) \times 10^{-4}$	101 ± 16.0
A/Sn	-	134 ± 5.9
A/Sn / HA-1	-	150 ± 8.5
A/Sn / HA-1 / ДНКазы I (0.12 мг/кг)	-	105 ± 12.6

Концентрация вДНК в плазме крови здоровых мышей C57Bl/6J составила 104 нг/мл при ДНКазной активности  $(2.71 \pm 0.15) \times 10^{-4}$  сек<sup>-1</sup>. При прогрессии LLC было отмечено увеличение концентрации вДНК в 1.3 раза по сравнению со здоровыми животными и значительное падение ДНКазной активности до  $(0.42 \pm 0.03) \times 10^{-4}$  сек<sup>-1</sup> (в 6.5 раз) (Таблица 23). Введение мышам C57Bl/6J с LLC ДНКазы I приводило к снижению уровня вДНК в плазме до уровня здоровых животных, при этом происходило повышение ДНКазной активности плазмы крови до  $(3.92 \pm 1.40) \times 10^{-4}$  (в 9.3 раза по сравнению с животными без лечения), что даже превышало уровень ДНКазной активности плазмы крови здоровых животных (Таблица 23). Концентрация вДНК в плазме крови здоровых животных A/Sn составила 134 нг/мл, а при прогрессировании HA-1 наблюдалось ее незначительное повышение до 150 нг (в 1.1 раза) (Таблица 23). Введение мышам A/Sn с HA-1 ДНКазы I приводило к выраженному снижению концентрации вДНК в плазме, даже ниже уровня вДНК у здоровых животных (Таблица 23).

## 7.2. Дизайн эксперимента

С целью поиска молекулярных мишеней ДНКазы I среди циркулирующих вДНК мы проанализировали профиль вДНК крови мышей с LLC после введения ДНКазы I с

помощью массового параллельного секвенирования. Схема эксперимента представлена на Рис. 55.



**Рис. 55.** Схема эксперимента для получения библиотек вДНК. Клетки LLC (10<sup>6</sup> клеток, 0.1 мл) трансплантировали в/м мышам C57Bl/6J. Начиная с четвертого дня после трансплантации опухоли, животные получали в/м инъекции физ/раствора (контроль) или ДНКазы I (0.12 мг/кг) в течение двух недель. На 15 день через один час после последней инъекции ДНКазы I кровь собирали и получали сыворотку. вДНК выделяли из сыворотки и использовали для конструирования ДНК-библиотек. Библиотеки секвенировали на платформе SOLiD 5.5.

Клетки LLC трансплантировали в/м в правую бедренную мышцу мышей C57Bl/6J и, начиная с четвертого дня после трансплантации, мыши получали инъекции физ/раствора (контроль) или ДНКазы I (0.12 мг/кг) в течение двух недель. Доза ДНКазы I была выбрана в соответствии с наблюдаемым антимагистатическим эффектом на модели LLC. На 15 день эксперимента через один час после последней инъекции ДНКазы I кровь собирали, получали сыворотку, объединяли согласно группам и выделяли из сыворотки вДНК (п. 2.2.5.3).

На всех этапах контролировали концентрацию вДНК в образцах сыворотки крови. Измерение концентрации вДНК в образцах сыворотки показало, что в крови здоровых животных уровень вДНК составил 77 нг/мл. Развитие опухоли приводило к двукратному повышению уровня вДНК (до 162 нг/мл), в то время как введение ДНКазы I животным-опухоленосителям приводило к снижению уровня вДНК (до 110 нг/мл) близко к значениям, характерным для здоровых животных (Таблица 24).

ДНК библиотеки готовили по модифицированному протоколу ABS SOLiD™ Fragment Library Construction Kit (см. п. 2.2.12.7). Технология секвенирования позволяла с максимальной эффективностью секвенировать фрагменты длиной 50 п.н. Поскольку для образцов сыворотки крови основное содержание составляли ДНК фрагменты длиной 150-200 п.н., а количество ДНК фрагментов длиной 400-10000 п.н. было в два-три раза меньше, первой модификацией протокола было озвучивание образцов вДНК с целью унификации

**Таблица 24.** Концентрация внДНК и ДНК-библиотек на разных стадиях конструирования.

Стадия конструирования ДНК-библиотеки	Тип библиотеки		
	$L_h^1$	$L_{LLC}^1$	$L_D^1$
<sup>2</sup> Концентрация внДНК в сыворотке, нг/мл	$77 \pm 2$	$162 \pm 5$	$110 \pm 4$
Стартовое количество ДНК для конструирования библиотеки, нг	230	244	220
Итоговое количество ДНК-библиотеки, нг	31.8	54.8	10.2

$L_{h2}$  – здоровые мыши;  $L_{LLC}$  – мыши с LLC, получавшие инъекции физ/раствора;  $L_D$  – мыши с LLC, получавшие инъекции ДНКазы I (0.12 мг/кг).

<sup>2</sup> Данные статистически анализировали с использованием t-теста критерия Стьюдента. Данные представлены как mean  $\pm$  SEM. Величины статистически достоверно различались с  $p < 10^{-12}$  ( $L_h$  vs  $L_{LLC}$ ),  $p < 10^{-7}$  ( $L_D$  vs  $L_{LLC}$ ) и  $p < 10^{-7}$  ( $L_h$  vs  $L_D$ ).

длины фрагмента до 50 п.н. Второй модификацией протокола конструирования ДНК библиотек было снижение количества циклов ПЦР до шести, что позволило, с одной стороны, избежать перепредставленности фрагментов, а с другой стороны, получить достаточное количество материала для запуска секвенирования.

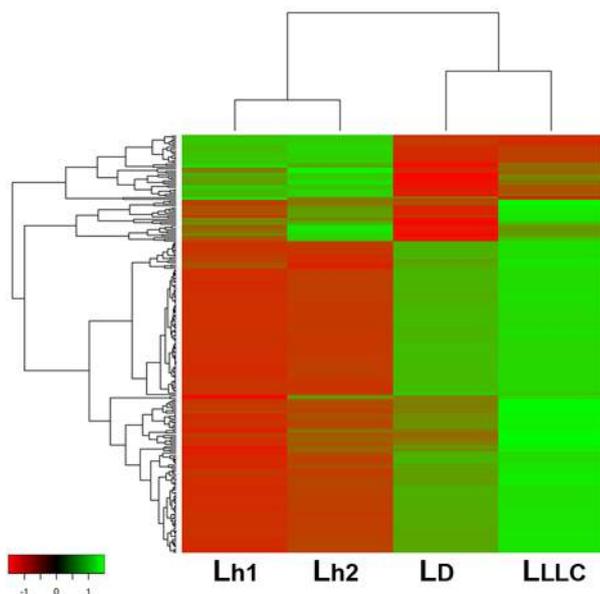
В результате были получены следующие библиотеки:  $L_{h1}$  и  $L_{h2}$  – внДНК сыворотки крови здоровых мышей (два технических репликата);  $L_{LLC}$  – внДНК сыворотки крови животных с LLC, получавших инъекции физ/раствора;  $L_D$  – внДНК сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции ДНКазы I. Количество ДНК-библиотек, готовых для секвенирования, составило 31.8, 54.8 и 10.2 нг для библиотек  $L_h$ ,  $L_{LLC}$  и  $L_D$ , соответственно (Таблица 24). Секвенирование библиотек проводили на платформе ABS SOLiD™ 5.500.

### 7.3. Анализ данных секвенирования внДНК сыворотки крови мышей с LLC после воздействия ДНКазы I

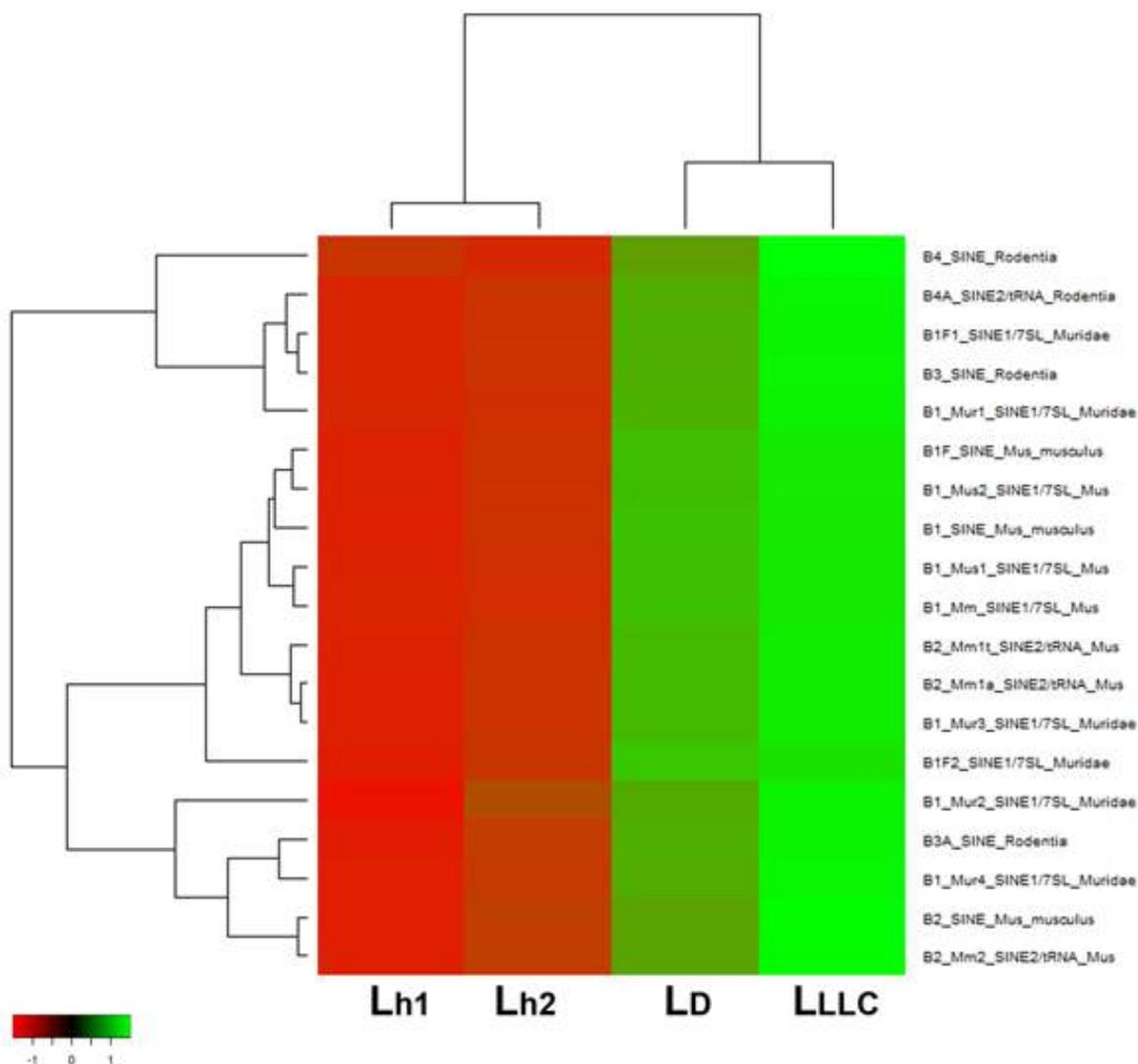
Для каждой библиотеки внДНК было получено в среднем от 55 до 67 млн прочтений. Данные секвенирования были предварительно обработаны с помощью инструментария Trimmomatic 0.32 к.б.н. Курильщиком А.М (Лаборатория молекулярной микробиологии, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) с целью исключить адаптерные последовательности и последовательности с низким качеством. После качество последовательностей было оценено с помощью программного обеспечения FastQC, и полученные последовательности были картированы на референсный геном *Mus musculus* (MM9, Ensemble release 67) с помощью программного обеспечения Bowtie version 1. Степень картирования варьировала от 6.95% до 8.33%, что соответствует количеству прочтений от 3.8 до 5.6 млн.

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  $L_{LLC}$ . На Рис. 56, 57 и 58 представлены тепловые карты с иерархической кластеризацией, которые показывают, что расстояние между техническими репликатами контрольных групп очевидно меньше, чем расстояние между группами мышей, получавших инъекции физ/раствора, и группами, получавшими инъекции ДНКазы I.

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  $3 \times 10^6$  GC-обедненных последовательностей (0-2% общего содержания). ДНКазы I (библиотека  $L_D$ , мыши с LLC, получавшие инъекции ДНКазы I) приводила к снижению содержания GC-обедненных последовательностей до  $1.0 \times 10^6$ , что было близко по величине к содержанию последовательностей в библиотеке внДНК здоровых животных ( $0.5-1.0 \times 10^6$ ,  $L_h$ ).

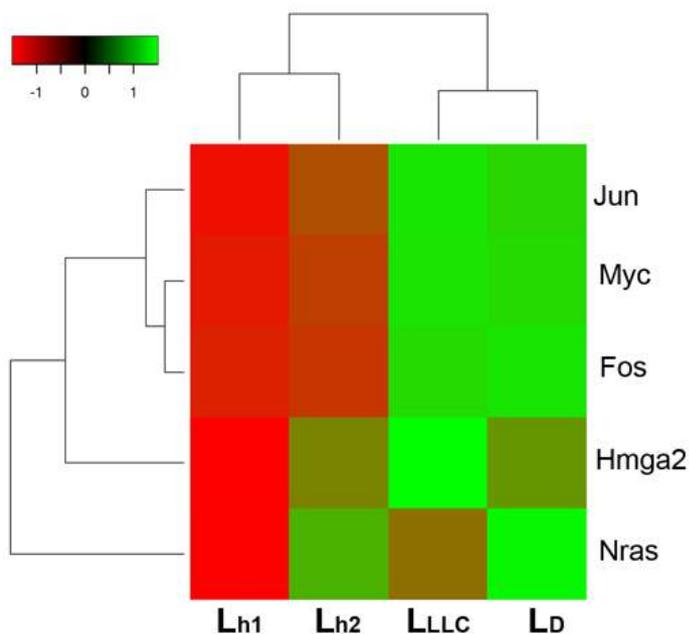


**Рис. 56.** Тепловая карта представленности тандемных повторов в ДНК-библиотеках  $L_{h1}$ ,  $L_{h2}$ ,  $L_{LLC}$  и  $L_D$ .  $L_{h1}$  и  $L_{h2}$  – здоровые мыши;  $L_{LLC}$  – мыши с LLC, получавшие инъекции физ/раствора;  $L_D$  – мыши с LLC, получавшие инъекции ДНКазы I (0.12 мг/кг). Повышение и снижение представленности уровня тандемных повторов показано диапазоном красного и зеленого цветов, соответственно. Дендрограммы были получены с помощью кластеризации тандемных повторов или образцов с использованием Евклидовых расстояний между нормированными логарифмическими величинами RPM, соответственно.



**Рис. 57.** Тепловая карта представленности tandemных повторов В-семейства, гомологичных ALU-повторам человека, в ДНК-библиотеках  $L_{h1}$ ,  $L_{h2}$ ,  $L_{LLC}$  и  $L_D$ .  $L_{h1}$  и  $L_{h2}$  – здоровые мыши;  $L_{LLC}$  – мыши с LLC, получавшие инъекции физ/раствора;  $L_D$  – мыши с LLC, получавшие инъекции ДНКазы I (0.12 мг/кг). Повышение и снижение представленности уровня tandemных повторов показано диапазоном красного и зеленого цветов, соответственно. Дендрограммы были получены с помощью кластеризации tandemных повторов или образцов с использованием Евклидовых расстояний между нормированными логарифмическими величинами RPM, соответственно.

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 вДНК особое внимание было обращено именно на tandemные повторы. Наиболее значительные различия между библиотеками  $L_{LLC}$ ,  $L_D$  и  $L_h$  наблюдались для tandemных повторов: вДНК сыворотки крови мышей с LLC характеризовалась



**Рис. 58.** Тепловая карта представленности фрагментов, кодирующих опухоль-ассоциированные гены *Hmga2*, *Fos*, *Myc*, *Nras* и *Jun* в ДНК-библиотеках  $L_{h1}$ ,  $L_{h2}$ ,  $L_{LLC}$  и  $L_D$ .  $L_{h1}$  и  $L_{h2}$  – здоровые мышцы;  $L_{LLC}$  – мышцы с LLC, получавшие инъекции физ/раствора;  $L_D$  – мышцы с LLC, получавшие инъекции ДНКазы I (0.12 мг/кг). Повышение и снижение представленности уровня tandemных повторов показано диапазоном красного и зеленого цветов, соответственно. Дендрограммы были получены с помощью кластеризации tandemных повторов или образцов с использованием Евклидовых расстояний между нормированными логарифмическими величинами RPM, соответственно.

присутствием большого количества tandemных повторов по сравнению с вДНК здоровых животных (Таблица 25).

Был проведен сравнительный анализ 980 типов tandemных повторов, представленных в геноме *Mus musculus*. Для дальнейшего анализа было выбрано 250 типов tandemных повторов с представленностью не менее одной последовательности на 1 млн последовательностей библиотеки, характеризующихся сильными различиями между группами (Таблица 25, Рис. 56). Было обнаружено, что при развитии LLC вДНК характеризовались высокой представленностью 204 типов tandemных повторов по сравнению со здоровыми животными ( $L_{LLC}$  vs  $L_{h1}$ ,  $L_{h2}$ , Таблица 25, Рис. 56). Представленность 158 типов tandemных 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 25, Рис. 56). ДНКазы I вызывала снижение представленности tandemных повторов, перепредставленных в крови мышей-опухоленосителей, получавших инъекции физ/раствора: было отмечено 1.5-кратное снижение представленности tandemных повторов в  $L_D$  по сравнению с  $L_{LLC}$ .

**Таблица 25.** Представленность 250 типов тандемных повторов в ДНК-библиотеках.

	Типы тандемных повторов, количество	Представленность, RPM <sup>1</sup>			
		L <sub>LLC</sub>	L <sub>D</sub>	L <sub>h1</sub>	L <sub>h2</sub>
L <sub>LLC</sub> > L <sub>h</sub> : 204	158*	53193	43612	34469	36318
	46 <sup>#</sup>	10221	8341	3635	3859
L <sub>LLC</sub> < L <sub>h</sub> : 46	39 <sup>□</sup>	17827	15726	28777	30996
	7 <sup>£</sup>	431	504	1502	1489
Total	250	81674	68186	38104	40176

\*типы повторов, представленность которых выросла в 1.5 - 2 раза при развитии LLC (библиотека L<sub>LLC</sub>) и упала после введения ДНКазы I (библиотека L<sub>D</sub>).

<sup>#</sup>типы повторов, представленность которых выросла в 2.5 – 3 раза при развитии LLC (библиотека L<sub>LLC</sub>) и упала после введения ДНКазы I (библиотека L<sub>D</sub>).

<sup>□</sup> типы повторов, представленность которых упала в 1.5 – 2 раза при развитии LLC (библиотека L<sub>LLC</sub>) и еще более значительно упала после введения ДНКазы I (библиотека L<sub>D</sub>).

<sup>£</sup> типы повторов, представленность которых упала в 3 раза при развитии LLC (библиотека L<sub>LLC</sub>) и выросла после введения ДНКазы I (библиотека L<sub>D</sub>).

<sup>1</sup>RPM – количество фрагмент-специфичных прочтений на млн прочтений в библиотеке.

В 30% случаев снижение представленности повторов достигало значений, характерных для L<sub>h1</sub> и L<sub>h2</sub> (Таблица 25, Рис. 56).

Представленность 46 типов тандемных повторов в L<sub>LLC</sub> была в 1.5-2 раза ниже, чем в L<sub>h1</sub> и L<sub>h2</sub> (L<sub>LLC</sub> < L<sub>h</sub>, Таблица 25). 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 25, Рис. 56). Содержание вДНК сыворотки крови мышей с LLC характеризовалось повышенной представленностью тандемных повторов, принадлежащих к 15 главным подсемействам, по сравнению со здоровыми животными (Таблица 26). После применения ДНКазы I мы наблюдали снижение представленности этих повторов на 15-25% (Таблица 26). Следует отметить, что после применения ДНКазы I представленность повторов, принадлежащих к подсемействам ERVB, L1 и RLTR, достигала значений, характерных для здоровых животных (L<sub>D</sub> vs L<sub>h1</sub> и L<sub>h2</sub>, Таблица 26).

Другие тенденции наблюдались в случае повторов, принадлежащих к подсемействам Lx, MMERV и RMER. Представленность 14, пяти 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 (Таблица 26), а после применения ДНКазы I наблюдалось снижение представленности этих повторов на 30-50% по сравнению с содержанием повторов для здоровых животных (Таблица 26).

**Таблица 26.** Представленность тандемных повторов, принадлежащих к 11 главным подсемействам, в ДНК-библиотеках.

Подсемейства	Типы повторов в внДНК, количество	Представленность, RPM <sup>1</sup>			
		L <sub>LLC</sub>	L <sub>D</sub>	L <sub>h1</sub>	L <sub>h2</sub>
B	19*	7548	6156	3326	3541
ERVВ	11*	930	770	693	688
IAP	24*	6682	5583	3104	3272
L1	19*	27508	23523	23984	25066
LTRIS	5*	373	308	177	192
Lx	14*	3471	2861	2076	2222
	2 <sup>#</sup>	51	46	55	59
MERV	5*	1461	1247	995	1032
MMERV	5*	812	688	451	482
	2 <sup>#</sup>	80	72	98	103
ORR	14*	2158	1785	1237	1317
RLTR	52*	10201	7603	5877	6380
RMER	22*	895	1119	667	753
	7 <sup>□</sup>	1518	1934	1916	2713
RSINE	3*	201	178	132	123

\*типы повторов, представленность которых увеличивалась при развитии LLC (библиотека L<sub>LLC</sub>) и снижалась после введения ДНКазы I (библиотека L<sub>D</sub>).

<sup>#</sup>типы повторов, представленность которых снижалась при развитии LLC (библиотека L<sub>LLC</sub>) и еще более снижалась после введения ДНКазы I (библиотека L<sub>D</sub>).

<sup>□</sup>типы повторов, представленность которых снижалась при развитии LLC (библиотека L<sub>LLC</sub>) и увеличивалась после введения ДНКазой I (библиотека L<sub>D</sub>).

<sup>1</sup>RPM – количество фрагмент-специфичных прочтений на млн прочтений в библиотеке.

ДНКазы I до уровня представленности у здоровых животных (Таблица 26).

Отдельно было рассмотрено 19 типов повторов, принадлежащих к подсемействам B1, B2, B3 и B4, которые имеют высокую гомологию с ALU-повторами человека (Рис. 57). При развитии LLC представленность таких повторов среди внДНК крови двукратно возрастала по сравнению со здоровыми животными ( $7.5 \times 10^3$  RPM в L<sub>LLC</sub> против  $3.4 \times 10^3$  RPM в L<sub>h1</sub> и L<sub>h2</sub>). ДНКазы I вызывала снижение представленности таких повторов на 20% ( $6.1 \times 10^3$  RPM в L<sub>D</sub>). При этом для повторов подсемейства B1, имеющего максимальную гомологию с ALU-повторами человека, было показано увеличение представленности в 2.5 раза при развитии

опухоли ( $4.9 \times 10^3$  RPM в  $L_{LLC}$  против  $1.9 \times 10^3$  RPM в  $L_{h1}$  и  $L_{h2}$ ) и снижение до уровня здоровых животных после введения ДНКазы I ( $2.0 \times 10^3$  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 рака [649-653] (Таблица 27, Рис. 57). Среди вДНК здоровых мышей представленность таких фрагментов была низка: суммарная представленность не превышала 6.87–10.78 RPM ( $L_{h1}$  и  $L_{h2}$ , Таблица 27). Было показано, что большая часть фрагментов (около 50%) кодировала ген *Myc*, и, таким образом, представленность *Myc*-специфических фрагментов была в 4-5 раз выше по сравнению с фрагментами, кодирующими другие гены ( $L_{h1}$  и  $L_{h2}$ , Таблица 27). При развитии LLC представленность фрагментов, кодирующих опухолеспецифические гены, возрастала в 10 раз по сравнению со здоровыми животными ( $L_{LLC}$  против  $L_{h1}$  и  $L_{h2}$ , Таблица 27), при этом 90% от всех фрагментов приходилось на долю гена *Myc*. Представленность фрагментов, кодирующих гены *Hmga2*, *Fos*- и *Jun*, возрастала в 2 - 3 раза по сравнению со здоровыми животными, в то время как представленность фрагмента, кодирующего ген *Nras*, не изменялась (Таблица 27).

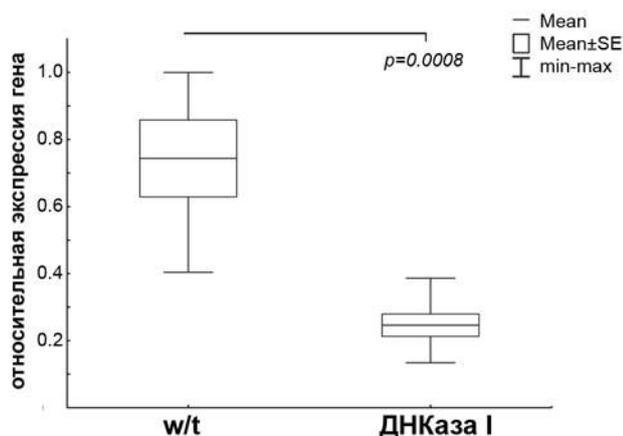
**Таблица 27.** Представленность фрагментов, кодирующих опухолеспецифические гены *Hmga2*, *Fos*, *Myc*, *Nras* и *Jun*, в ДНК-библиотеках.

Опухолеспецифические гены	Представленность, RPM <sup>1</sup>			
	$L_{LLC}$	$L_D$	$L_{h1}$	$L_{h2}$
<i>Hmga2</i>	1.90	1.35	1.27	0.82
<i>Fos</i>	2.74	2.93	0.95	0.84
<i>Myc</i>	86.14	73.38	6.40	3.62
<i>Nras</i>	1.14	1.39	1.25	0.97
<i>Jun</i>	2.16	1.39	0.90	0.62
<i>Total</i>	94.08	81.00	10.78	6.87

<sup>1</sup>RPM – количество фрагмент-специфичных прочтений на млн прочтений в библиотеке.

При применении ДНКазы I наблюдалось снижение представленности опухолеспецифических фрагментов *Myc* и *Jun* в 1.5-2 раза, снижение представленности фрагмента, кодирующего ген *Hmga2* достигало практически уровня здоровых животных, то время как представленность *Fos*-специфического фрагмента незначительно повышалась (Таблица 27).

Валидацию представленности генов проводили с помощью qПЦР на примере фрагмента, кодирующего ген *Мус*. Ген *Мус* был выбран по причине его высокой представленности среди других фрагментов, кодирующих опухолеспецифические гены. Было проведено исследование шести образцов от каждой группы мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора (контроль) и инъекции ДНКазы I, которые были использованы для секвенирования. Полученные данные показали повышение уровня *Мус*-специфических фрагментов среди вДНК сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора (Рис. 59). После применения ДНКазы I мы наблюдали примерно 3-кратное снижение представленности *Мус*-специфичных фрагментов среди вДНК, что коррелирует с данными секвенирования (Рис. 59).

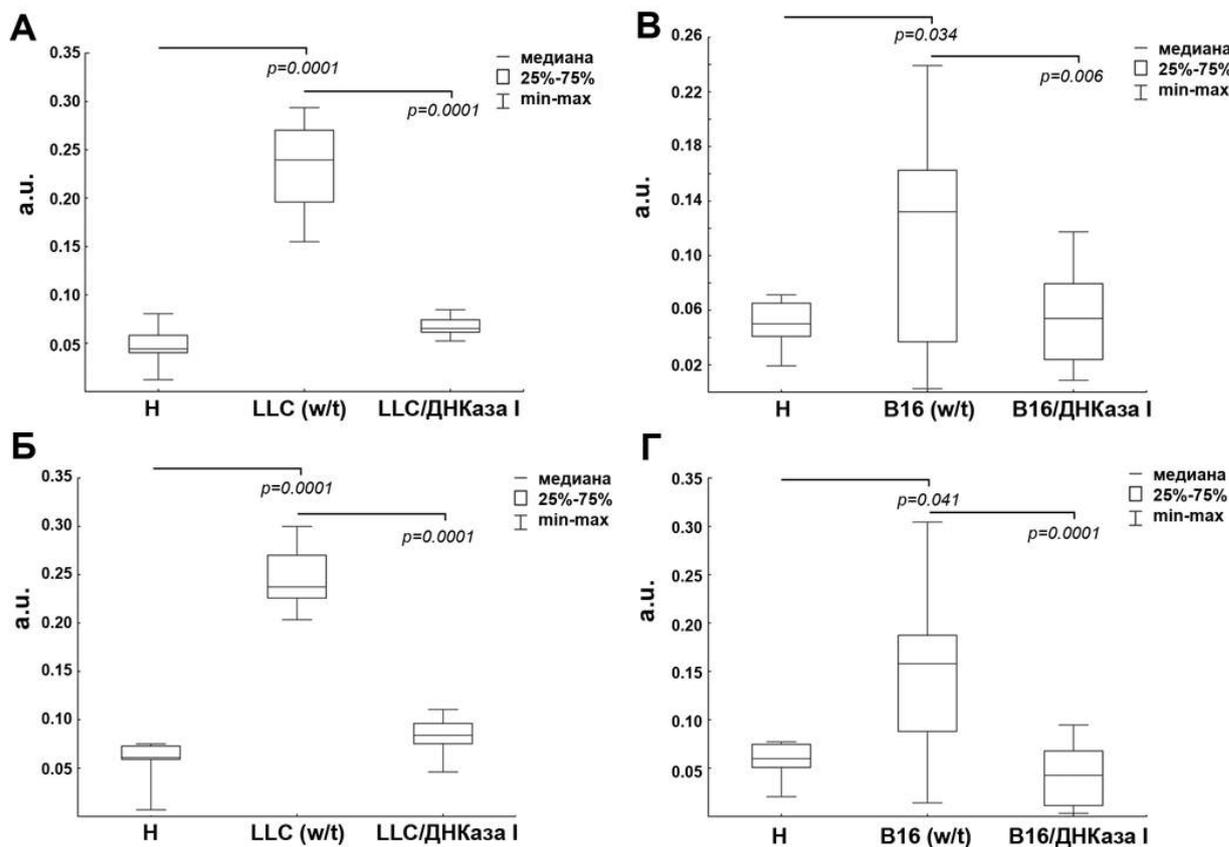


**Рис. 59.** Уровень *Мус*-специфических фрагментов в вДНК сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора (контроль) и ДНКазы I (данные qПЦР). Уровень *Мус* определяли во вДНК, на основе которой конструировали библиотеки  $L_{LLC}$  и  $L_D$ . Уровень *Мус* нормализовали на уровень  $\beta$ -актина. Данные статистически анализировали с помощью дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Фишера. Данные представлены как mean  $\pm$  SE.

#### 7.4. Исследование уровня SINE и LINE элементов в крови мышей с LLC и метастатической меланомой B16 и их изменения под действием ДНКазы I

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 метастатической меланомой B16, получавших и не получавших ДНКазу I, с помощью qПЦР. Для этого была использована вДНК, выделенная из сыворотки крови: (1) здоровых мышей C57Bl/6J; (2) мышей с LLC; (3) мышей с LLC, получавших ДНКазу I в дозе 0.12 мг/кг (см. п. 2.2.9.6); (4) мышей с меланомой B16; (5) мышей с меланомой B16, получавших ДНКазу I в дозе 0.12 мг/кг (см. п. 2.2.9.10). На Рис. 60 представлены данные qПЦР SINE и LINE элементов для двух опухолевых моделей.

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 приводит к 5-кратному возрастанию B1-повторов и 4-кратному возрастанию L1-повторов (Рис. 60, А, Б). В случае метастатической модели меланомы также происходило увеличение представленности этих типов повторов: B1- и L1-повторы возрастали в 2.6 раза (Рис. 60, В, Г). При применении ДНКазы I мы наблюдали снижение уровня tandemных повторов обоого типа до уровня здоровых животных.



**Рис. 60.** 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.  $a.u. = [\text{SINE элементы}] / [\text{внДНК}]$ . **Б, Г.** Уровень LINE элементов.  $a.u. = [\text{LINE элементы}] / [\text{внДНК}]$ . H – здоровые мыши C57Bl/6J; LLC(wt) – мыши C57Bl/6J с LLC; LLC/ДНКазы I – мыши C57Bl/6J с LLC, получавшие ДНКазу I в дозе 0.12 мг/кг, B16(wt) – мыши C57Bl/6J с меланомой B16; B16/ДНКазы I – мыши C57Bl/6J с меланомой B16, получавшие ДНКазу I в дозе 0.12 мг/кг. Данные статистически анализировали с помощью дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Фишера.

## 7.5. Механизм противоопухолевого действия ДНКазы I на основании данных секвенирования циркулирующих внДНК

Присутствие большого количества внДНК в плазме крови пациентов с различными типами рака было описано несколько десятилетий назад [654]. Было показано, что большая часть таких внДНК имеет опухолевое происхождение и появляется в крови в результате

некроза или апоптоза опухолевых клеток [59]. Неоднократно предпринимались попытки использовать вДНК в качестве источника онкомаркеров [655-657], однако, исследователи посчитали более значимым использовать в качестве онкомаркеров изменение профиля вДНК. При разных типах онкологических заболеваний у пациентов среди вДНК были обнаружены мутантные последовательности [66], содержащие точечные мутации (SNP) [78, 81, 658], микросателлиты [659, 660] и гиперметилированные последовательности [661], а также последовательности с потерей аллельных вариантов онкосупрессоров [662, 663]. Более того, обнаруживались мутантные последовательности митохондриальной ДНК [656]. Биологическая роль появления таких опухолеспецифических вДНК пока не до конца ясна.

Группой Garcia-Olmo была выдвинута гипотеза участия вДНК в метастазировании (так называемая генометастатическая гипотеза), которая предполагает горизонтальный перенос опухолеспецифических вДНК из первичных опухолевых клеток в здоровые клетки органов-мишеней [100, 101, 664]. Другие авторы предполагают, что онкоген-содержащие вДНК могут действовать наподобие онковирусам, что является альтернативным путем распространения метастазов.

Эта гипотеза была адаптирована другими авторами в качестве модели, объясняющей противоречивость экспериментальных данных, касающихся метастазирования. В 2010 г. Garcia-Olmo с коллегами показали, что вДНК из опухолевых клеток участвует в злокачественной трансформации здоровых клеток. Способность опухолеспецифической вДНК трансформировать здоровые клетки была доказана путем детекции мутантного фрагмента *K-ras* в клетках мышцы NIH-3T3 после их культивирования в присутствии плазмы крови пациентов, обогащенной этим фрагментом [101].

Согласно другой гипотезе вДНК способна формировать комплексы с различными белками (гистонами, актином, пероксидазами и другими белками, генерирующими реактивные формы кислорода, интерлейкинами и т.д.), что приводит к образованию нейтрофильных ловушек (NET) [665]. NET используются нейтрофилами для улавливания патогенов и миграции иммунных клеток к месту локализации патогенов. Было показано, что опухолевые клетки способны встраивать свои собственные опухолеспецифические вДНК в NET и, таким образом, содействовать диссеминации опухолевых клеток [666].

В связи со способностью ДНКазы I приводить к деградации вДНК в кровотоке животных-опухоленосителей, можно заключить, что она оказывает непосредственное влияние на канцерогенез, опосредуемый опухоль-ассоциированными ДНК. Целью нашего исследования было детальное выяснение того, как ДНКазы I меняет профиль вДНК сыворотки крови при снижении инвазивного потенциала LLC мыши, гомологичной немелкоклеточному раку легкого человека. Мы провели сравнение профиля вДНК крови

мышей с LLC, получавших и не получавших ДНКазу I, с помощью секвенирования и выяснили ключевые последовательности среди вДНК, изменившиеся после введения фермента. И хотя следовало предположить неспецифическую деградацию всех циркулирующих вДНК в кровотоке после воздействия ДНКазы I, однако, мы наблюдали неслучайные изменения профиля вДНК.

Мы показали, что прогрессирование LLC приводит к повышению в крови представленности GC-обедненных последовательностей, tandemных повторов, включая повторы подсемейств B1-B4, гомологичных ALU-повторам человека, и фрагментов, кодирующих опухолеспецифические гены. Повышение содержания фрагментов, принадлежащих к tandemным повторам и опухолеспецифическим генам, в вДНК крови было показано при различных заболеваниях, включая онкологические, в то время как содержание GC-обедненных последовательностей вДНК крови, по мнению большинства исследований, было сниженным [667]. Повышение содержания GC-обедненных последовательностей при прогрессировании LLC, являющихся нестабильными и чувствительными к деградации дезоксирибонуклеазами крови, коррелирует со сниженной ДНКазной активностью крови согласно данным нашего исследования и данным о снижении ДНКазной активности крови пациентов с онкологическими заболеваниями [668, 669]. Снижение представленности GC-обедненных последовательностей в крови мышей с LLC после введения ДНКазы I коррелирует с повышением ДНКазной активности крови.

При прогрессировании LLC мы наблюдали увеличение представленности многих типов tandemных повторов, которые имеют отношение к мобильным генетическим элементам, таким как ретротранспозоны. Большая часть повторов относится к длинным концевым повторам, тем не менее, также представлены LINE и SINE элементы и другие короткие концевые повторы (RMER, ORR, IAP).

На сегодня роль ретротранспозонов в патогенезе онкологических заболеваний остается открытой, тем не менее, существуют некоторые гипотезы, подкрепленные большим количеством данных об инсерциях SINE и LINE элементов, обнаруживаемых в геноме опухолевых клеток [19-21]. Так было показано, что микровезикулы, секретлируемые опухолевыми клетками, обогащены фрагментами генов, которые содержат инсерции LINE-1 и Alu элементов [85]. В некоторых исследованиях доказано, что развитие неоплазии может быть инициировано ретротранспозон-опосредованной инативацией гена путем соматической инсерции [670] и инсерции в гены-супрессоры опухолей [671, 672]. Так инсерция полноразмерного фрагмента SVA (ретротранспозонов человека SINE-VNTR-Alu) в 8-ой интрон гена каспазы-8 (CASP8) ассоциировано с развитием базально-клеточной карциномы кожи и рака молочной железы [673]. Сегодня наиболее частыми маркерами канцерогенеза

являются ALU повторы [674-676], высокая представленность которых была обнаружена у пациентов с раком молочной железы и колоректальным раком [659, 660, 674-677]. Кроме того, было показано, что прогрессирование различных типов онкологических заболеваний сопровождается увеличением представленности SINE и LINE элементов среди циркулирующих вДНК [83, 84].

Нами при развитии карциномы легких Льюис было показано повышение представленности повторов В-подсемейства, гомологичных ALU повторам человека [678], в кровотоке животных-опухоленосителей. Кроме того, следует отметить значительное повышение представленности Lx элементов при прогрессировании LLC, из чего можно заключить, что Lx элементы могут также служить маркерами развития опухолей, по крайней мере, эпителиального происхождения. По данным секвенирования ДНКазы I в крови мышей с LLC вызывала падение представленности повторов В-подсемейства на 20%. Кроме того, наблюдалось снижение представленности L1 элементов и значительное снижение представленности Lx элементов. Принимая во внимание роль таких мобильных элементов в канцерогенезе можно предположить, что снижение их представленности в крови животных-опухоленосителей под действием ДНКазы I определяет интенсивность процесса метастазирования, что отражается в снижении как количества, так и площади метастазов.

Существует ряд доказательств, что участки геномной ДНК, кодирующей опухолеспецифические гены, дублированы в опухолевых клетках различного гистогенеза. Так, например, было показано, что для остеосаркомы характерна дупликация гена *c-Myc* [679]. В качестве маркеров канцерогенеза также известны мутантные формы генов *K-Ras*, *p53* и *N-Myc* [66, 72, 73, 78, 680, 681].

Было обнаружено, что при развитии LLC в кровотоке животных-опухоленосителей детектируется повышенная представленность фрагментов, кодирующих опухоль-ассоциированные гены *Hmga2*, *Fos*, *Myc* и *Jun*. Принимая во внимание представленность *Jun*- и *Fos*-специфичных фрагментов среди вДНК крови мышей с LLC и сниженный в 2.5-3 раза уровень этих фрагментов в крови здоровых мышей, можно предложить эти гены в качестве возможных маркеров канцерогенеза, в частности, в качестве маркеров немелкоклеточного рака легких. ДНКазы I приводила к снижению представленности всех фрагментов за исключением *Fos*-специфического фрагмента. Исходя из геномметастатической гипотезы, можно предположить прямую корреляцию между снижением представленности фрагментов опухоль-специфических генов в кровотоке животных-опухоленосителей и снижением метастазирования.

## 7.6. Заключение

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 tandemных повторов подсемейств В1 и L1, уровень которых повышен в кровотоке животных-опухоленосителей. Наиболее важным результатом является то, что в кровотоке мышей-опухоленосителей ДНКазы I снижает уровень tandemных повторов В-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, tandemных 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 сквартного 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 антиметастатический 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. РНКазы 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- $\beta$ , 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.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю признательность коллективу Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН за ценные советы и поддержку во время выполнения работы. Особую благодарность автор выражает коллективу, принимавшему участие в экспериментах *in vivo*: к.б.н., профессору Поповой Нелли Александровне, к.б.н. Каледину Василию Ивановичу, к.м.н. Николину Валерию Петровичу (ИЦиГ СО РАН); к.б.н. Патутиной Ольге Александровне, к.б.н. Маркову Олегу Владимировичу и к.м.н. Сеньковой Александре Васильевне (ИХБФМ СО РАН). Отдельную благодарность автор выражает зав. виварием ИХБФМ СО РАН Можной Александре Григорьевне за помощь в работе с животными. Автор отдельно багодарит к.б.н. Бреннера Евгения Владиславовича (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) за ценные советы по конструированию ДНК-библиотек. Также отдельная благодарность к.б.н. Курильщикову Александру Михайловичу (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) за ценные консультации по вторичному анализу данных секвенирования.

Отдельную благодарность автор выражает коллегам из Лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и при патологии (ИМБ РАН) академику Макарову Александру Александровичу, к.х.н. Митькевичу Владимиру Александровичу и к.ф.-м.н. Петрушанко Ирине Юрьевне за инициацию исследований противоопухолевых свойств биназы и плодотворное сотрудничество. Отдельную благодарность автор также выражает к.х.н. Шмендель Елене Васильевне и д.х.н., профессору Маслову Михаилу Александровичу (МИРЭА, Москва) за конструирование и синтез поликатионных липосом серии N-DOPE и МЛ.

Особую благодарность автор выражает научному руководителю института академику Власову Валентину Викторовичу (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) за ценные научные советы и внимание к данной работе.

Особую благодарность автор выражает зав. лабораторией биохимии нуклеиновых кислот научному консультанту д.б.н., профессору Зенковой Марине Аркадьевне (ИХБФМ СО РАН) за всестороннюю поддержку, искреннее внимание к данной работе, активное участие в обсуждении полученных результатов и подготовке всех публикаций автора.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell*. – 2011. – V. 144. – №. 5. – P. 646–674.
2. Zheng J. Energy metabolism of cancer: glycolysis versus oxidative phosphorylation // *Oncol. Lett.* – 2012. – V. 4. – P. 1151–1157.
3. Pedersen P.L. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells // *Prog. Exp. Tumor Res.* – 1978. – V. 22. – P. 190–274.
4. Liu X., Yang N., Figel S.A., Wilson K.E., Morrison C.D., Gelman I.H., et al. PTPN14 interacts with and negatively regulates the oncogenic function of YAP // *Oncogene*. – 2013. – V. 32. – P. 1266–1273.
5. Wadehra M., Forbes A., Pushkarna N., Goodglick L., Gordon L.K., Williams C.J., et al. Epithelial membrane protein-2 regulates surface expression of alphavbeta3 integrin in the endometrium // *Dev. Biol.* – 2005. – V. 287. – P. 336–345.
6. Suizu F., Ueda K., Iwasaki T., Murata-Hori M., Hosoya H. Activation of actin-activated MgATPase activity of myosin II by phosphorylation with MAPK-activated protein kinase-1b (RSK-2) // *J. Biochem.* – 2000. – V. 128. – P. 435–440.
7. Rocnik E.F., Liu P., Sato K., Walsh K., Vaziri C. The novel SPARC family member SMOC-2 potentiates angiogenic growth factor activity // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281. – P. 22855–22864.
8. Segura M.F., Sole C., Pascual M., Moubarak R.S., Perez-Garcia M.J., Gozzelino R., et al. The long form of Fas apoptotic inhibitory molecule is expressed specifically in neurons and protects them against death receptor-triggered apoptosis // *J. Neurosci.* – 2007. – V. 27. – P. 11228–11241.
9. Yan W., Scoumanne A., Jung Y.S., Xu E., Zhang J., Zhang Y., et al. Mice deficient in poly(C)-binding protein 4 are susceptible to spontaneous tumors through increased expression of ZFP871 that targets p53 for degradation // *Genes Dev.* – 2016. – V. 30. – P. 522–534.
10. Ciuffreda L., Incani U.C., Steelman L.S., Abrams S.L., Falcone I., Curatolo A.D., et al. Signaling intermediates (MAPK and PI3K) as therapeutic targets in NSCLC // *Curr. Pharm. Des.* – 2014. – V. 20. – P. 3944–3957.
11. Ouyang J., Pan X., Lin H., Hu Z., Xiao P., Hu H. GKN2 increases apoptosis, reduces the proliferation and invasion ability of gastric cancer cells through down-regulating the JAK/STAT signaling pathway // *Am. J. Transl. Res.* – 2017. – V. 9. – P. 803–811.
12. Doi T., Ishikawa T., Okayama T., Oka K., Mizushima K., Yasuda T., et al. The JAK/STAT pathway is involved in the upregulation of PD-L1 expression in pancreatic cancer cell lines // *Oncol. Rep.* – 2017. – V. 37. – P. 1545–1554.
13. Thomas S., Fisher K., Snowden J., Danson S., Brown S., Zeidler M. Effect of methotrexate on JAK/STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasms // *Lancet*. – 2015. – V. 385 Suppl 1. – P. S98.
14. Ikushima H., Miyazono K. TGF $\beta$  signalling: a complex web in cancer progression // *Nature Rev. Cancer*. – 2010. – V. 10. – P. 415–424.
15. Dalmay T., Edwards D.R. MicroRNAs and the hallmarks of cancer // *Oncogene*. – 2006. – V. 25. – P. 6170–6175.
16. Esquela-Kerscher A., Slack F.J. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer // *Nat. Rev. Cancer*. – 2006. – V. 6. – P. 259–269.
17. Garcia-Olmo D., Garcia-Olmo D.C., Ontanon J., Martinez E. Horizontal transfer of DNA and the "genometastasis hypothesis" // *Blood*. – 2000. – V. 95. – № 2. – P. 724–735.
18. Cai J., Wu G., Jose P.A., Zeng C. Functional transferred DNA within extracellular vesicles. *Exp. Cell Res.* – 2016. – V. 349. – № 1. – P. 179–183.

19. Belancio V.P., Roy-Engel A.M., Deininger P.L. All y'all need to know `bout retroelements in cancer // *Semin. Cancer Biol.* – 2010. – V. 20. – P. 200–210.
20. Carreira P.E., Richardson S.R., Faulkner G.J. L1 retrotransposons, cancer stem cells and oncogenesis // *FEBS J.* – 2014. – V. 281. – P. 63–73.
21. Kemp J.R., Longworth M.S. Crossing the LINE toward genomic instability: LINE-1 retrotransposition in cancer // *Front. Chem.* – 2015. – V. 3. – P. 68.
22. Razak N., Elaskalani O., Metharom P. Pancreatic cancer-induced neutrophil extracellular traps: a potential contributor to cancer-associated thrombosis // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – V. 18. – № 3. – P. pii: E487.
23. Demers M., Krause D.S., Schatzberg D., Martinod K., Voorhees J.R., Fuchs T.A., et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2012. – V. 109. – № 32. – P. 13076–13081.
24. Hawes M.C., Wen F., Elquza E. Extracellular DNA: a bridge to cancer // *Cancer Res.* – 2015. – V. 75. – P. 4260–4264.
25. Kotchetkov R., Cinatl J., Krivtchik A.A., Vogel J.U., Matousek J., Pouckova P., et al. Selective activity of BS-RNase against anaplastic thyroid cancer // *Anticancer Res.* – 2001. – V. 21. – P. 1035–1042.
26. Soucek J., Pouckova P., Matousek J., Stockbauer P., Dostal J., Zadinova M. Antitumor action of bovine seminal ribonuclease // *Neoplasma.* – 1996. – V. 43. – № 5. – P. 335–340.
27. Cinatl J.Jr., Cinatl J., Kotchetkov R., Vogel J.U., Woodcock B.G., Matousek J., et al. Bovine seminal ribonuclease selectively kills human multidrug-resistant neuroblastoma cells via induction of apoptosis // *Int. J. Oncol.* – 1999. – V. 15. – № 5. – P. 1001–1009.
28. Pouckova P., Zadinova M., Hlouskova D., Strohalm J., Plocova D., Spunda M., et al. Polymer-conjugated bovine pancreatic and seminal ribonucleases inhibit growth of human tumors in nude mice // *J. Control Release.* – 2004. – V. 95. – № 1. – P. 83–92.
29. Rybak S.M., Pearson J.W., Fogler W.E., Volker K., Spence S.E., Newton D.L., et al. Enhancement of vincristine cytotoxicity in drug-resistant cells by simultaneous treatment with onconase, an antitumor ribonuclease // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1996. – V. 8. – № 11. – P. 747–753.
30. Lee I., Lee Y.H., Mikulski S.M., Lee J., Covone K., Shogen K. Tumoricidal effects of onconase on various tumors // *J. Surg. Oncol.* – 2000. – V. 73. – № 3. – P. 164–171.
31. Costanzi J., Sidransky D., Navon A., Goldsweig H. Ribonucleases as a novel pro-apoptotic anticancer strategy: review of the preclinical and clinical data for ranpirnase // *Cancer Invest.* – 2005. – V. 23. – № 7. – P. 643–650.
32. Ilinskaya O., Decker K., Koschinski A., Dreyer F., Repp H. *Bacillus intermedius* ribonuclease as inhibitor of cell proliferation and membrane current // *Toxicology.* – 2001. – V. 156. – P. 101–107.
33. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V., Fedorova T.V., Kretova O.V., Tchurikov N.A., et al. Sensitivity of acute myeloid leukemia Kasumi-1 cells to binase toxic action depends on the expression of KIT and AML1-ETO oncogenes // *Cell Cycle.* – 2011. – V. 10. – P. 4090–4097.
34. Ledoux L. Action of ribonuclease on two solid tumours in vivo // *Nature.* – 1955. – V. 176. – P. 36–37.
35. Ledoux L. Action of ribonuclease on certain ascites tumours // *Nature.* – 1955. – V. 175. – P. 258–259.
36. Манойлов С.Е., Орлова Е.И., Полосова Р.Г. Влияние рибонуклеазы на рост опухоли (в эксперименте) // *Вопросы онкологии.* – 1966. – Т. 12. – № 1. – С. 64–69.
37. De Lamirande G. Action of deoxyribonuclease and ribonuclease on the growth of Ehrlich ascites carcinoma in mice // *Nature.* – 1961. – V. 192. – P. 52–54.

38. Roth J.S. Ribonuclease activity and cancer: a review // *Cancer Res.* – 1963. – V. 23. – P. 657–666.
39. Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Prassolov V.S., Makarov A.A. Binase induces apoptosis of transformed myeloid cells and does not induce T-cell immune response // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – V. 361. – P. 1000–1005.
40. Fujihara J., Yasuda T., Ueki M., Iida R., Takeshita H. Comparative biochemical properties of vertebrate deoxyribonuclease I // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* – 2012. – V. 163. – P. 263–273.
41. Alcazar-Leyva S., Ceroán E., Masso F., Montaña L.F., Gorocica P., Alvarado-Vásquez N. Incubation with DNase I inhibits tumor cell proliferation // *Med. Sci. Monit.* – 2009. – V. 15. – P. CR51–55.
42. Sugihara S., Yamamoto T., Tanaka H., Kambara T., Hiraoka T., Miyauchi Y. Deoxyribonuclease treatment prevents blood-borne liver metastasis of cutaneously transplanted tumour cells in mice // *Br. J. Cancer.* – 1993. – V. 67. – № 1. – P. 66–70.
43. Tokita K., Sugihara S., Hiraoka T., Miyauchi Y., Kambara T., Yamamoto T. Effects of serine protease and deoxyribonuclease on intravascular tumor cell arrest in rat blood-borne lung metastasis // *Invasion Metastasis.* – 1995. – V. 15. – № 1-2. – P. 46–59.
44. Wen F., Shen A., Choi A., Gerner E.W., Shi J. Extracellular DNA in pancreatic cancer promotes cell invasion and metastasis // *Cancer Res.* – 2013. – V. 73. – P. 4256–4266.
45. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01201018. A single center, open label study for evaluation of the safety and efficacy of oshadi D and oshadi R for cancer treatment - a phase I study. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01201018>
46. Rosner K. DNase1: a new personalized therapy for cancer // *Expert Rev. Anticancer Ther.* – 2011. – V. 11. – P. 981–984.
47. Phuphanich S., Wheeler C.J., Rudnick J.D., Mazer M., Wang H., Nuño M.A., et al. Phase I trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2012. – V. 62. – P. 125–135.
48. Lesterhuis W.J., De Vries I.J., Schreiber G., Schuurhuis D.H., Aarntzen E.H., De Boer A., et al. Immunogenicity of dendritic cells pulsed with CEA peptide or transfected with CEA mRNA for vaccination of colorectal cancer patients // *Anticancer Res.* – 2010. – V. 30. – P. 5091–5098.
49. Oshita C., Takikawa M., Kume A., Miyata H., Ashizawa T., Iizuka A., et al. Dendritic cell-based vaccination in metastatic melanoma patients: phase II clinical trial // *Oncol. Reports.* – 2012. – V. 28. – P. 1131–1138.
50. Mitkevich V.A., Orlova N.N., Petrushanko I.Y., Simonenko O.V., Spirin P.V., Prokofieva M.M., et al. Expression of FLT3-ITD oncogene confers mice progenitor B-cells BAF3 sensitivity to the ribonuclease binase cytotoxic action // *Mol. Biol. (Mosk).* – 2013. – V. 47. – P. 282–285.
51. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Kretova O.V., Zelenikhin P.V., Prassolov V.S., Tchurikov N.A., et al. Oncogenic c-kit transcript is a target for binase // *Cell Cycle.* – 2010. – V. 9. – P. 2674–2678.
52. Griffith F. The significance of pneumococcal types // *J. Hygiene.* – 1928. – V. 27. – № 2. – P. 113–159.
53. Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types – induction of transformation by a deoxyribonucleic-acid fraction isolated from pneumococcus type-III // *J. Exp. Med.* – 1979. – V. 149. – № 2. – P. 137–158.
54. Mandel P., Métails P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme // *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* – 1948. – V. 142. – P. 241–243.

55. Stroun M., Anker P., Maurice P., Gahan P.B. Circulating nucleic acids in higher organisms // *Int. Rev. Cytol.* – 1977. – V. 51. – P. 1–48.
56. Sorenson G.D., Pribish D.M., Valone F.H. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 1994. – V. 3. – P. 67–71.
57. Vasioukhin V., Anker V., Maurice P., Lyautey J., Lederrey C., Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia // *Br. J. Haematol.* – 1994. – V. 86. – P. 774–779.
58. Hiorns L.R., Nicholls J., Sloane J.P., Horwich A., Ashley S., Brada M. Peripheral blood involvement in non-Hodgkin's lymphoma detected by clonal gene rearrangement as a biological prognostic marker // *Br. J. Cancer.* – 1994. – V. 69. – № 2. – P. 347–351.
59. Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F.O., Hesch R.D., et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61. – P. 1659–1665.
60. Choi J.J., Reich C.F., Pisetsky D.S. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells // *Immunology.* – 2005. – V. 115. – P. 55–62.
61. Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Y., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., et al. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* – 2004. – V. 23. – P. 879–883.
62. Lam N.Y., Rainer T.H., Chan L.Y., Joynt G.M., Lo Y.M. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients // *Clin. Chem.* – 2003. – V. 49. – № 8. – P. 1286–1291.
63. Stroun M., Lyautey J., Lederrey C., Olson-Sand A., Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release // *Clinica Chimica Acta.* – 2001. – V. 313. – P. 139–142.
64. Deligezer U., Yaman F., Erten N., Dalay N. Frequent copresence of methylated DNA and fragmented nucleosomal DNA in plasma of lymphoma patients // *Clinica Chimica Acta.* – 2003. – V. 335. – P. 89–94.
65. Gerasimova Y.V., Alekseyeva I.V., Bogdanova T.G., Erchenko I.A., Kudryashova N.V., Chelobanov B.P., et al. Affinity separation of polyribonucleotide-binding human blood proteins // *Bioorg. Med. Chem.* – 2006. – V. 16. – P. 5526–5529.
66. Fleischhacker M., Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – a survey // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – V. 1775. – P. 181–232.
67. Holdenrieder S., Stieber P. Therapy control in oncology by circulating nucleosomes // *Ann. NY Acad. Scie.* – 2004. – V. 1022. – P. 211–216.
68. Jeronimo C., Nomoto S., Caballero O.L., Usadel H., Henrique R., Varzim G., et al. Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids // *Oncogene.* – 2001. – V. 20. – P. 5195–5198.
69. Nomoto S., Yamashita K., Koshikawa K., Nakao A., Sidransky D. Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma // *Clin. Cancer Res.* – 2002. – V. 8. – P. 481–487.
70. Frickhofen N., Muller E., Sandherr M., Binder T., Bangerter M., Wiest C., et al. Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia // *Blood.* – 1997. – V. 90. – P. 4953–4960.
71. Rhodes C.H., Honsinger C., Sorenson G.D. Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 1994. – V. 53. – P. 364–368.

72. Combaret V., Audouy C., Iacono I., Favrot M.C., Schell M., Bergeron C., et al. Circulating MYCN DNA as a tumor-specific marker in neuroblastoma patients // *Cancer Res.* – 2002. – V. 62. – P. 3646–3648.
73. Gotoh T., Hosoi H., Iehara T., Kuwahara Y., Osone S., Tsuchiya K., et al. Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative polymerase chain reaction // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – V. 23. – P. 5205–5210.
74. Dabritz J., Hanfler J., Preston R., Stieler J., Oettle H. Detection of Ki-ras mutations in tissue and plasma samples of patients with pancreatic cancer using PNA-mediated PCR clamping and hybridisation probes // *Br. J. Cancer.* – 2005. – V. 92. – P. 405–412.
75. Dai M.H., Zhao Y.P., Cai L.X., Zhu Y. Combined detection of K-ras mutation and CA19-9 level in plasma of patients with pancreatic cancer // *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* – 2003. – V. 41. – P. 332–335.
76. Ramirez J.L., Sarries C., de Castro P.L., Roig B., Queralt C., Escuin D., et al. Methylation patterns and K-ras mutations in tumor and paired serum of resected non-small-cell lung cancer patients // *Cancer Lett.* – 2003. – V. 193. – P. 207–216.
77. Anker P., Lefort F., Vasioukhin V., Lyautey J., Lederrey C., Chen X.Q., et al. K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer // *Gastroenterology.* – 1997. – V. 112. – P. 1114–1120.
78. Ryan B.M., Lefort F., McManus R., Daly J., Keeling P.W., Weir D.G., et al. A prospective study of circulating mutant KRAS2 in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up // *Gut.* – 2003. – V. 52. – P. 101–108.
79. Dong-Dong L., Xi-Ran Z. Plasma 249Ser p53 mutation in patients with hepatocellular carcinoma residing in a high risk area // *J. Cell. Mol. Med.* – 2003. – V. 7. – P. 89–92.
80. Huang X.H., Sun L.H., Lu D.D., Sun Y., Ma L.J., Zhang X.R., et al. Codon 249 mutation in exon 7 of p53 gene in plasma DNA: maybe a new early diagnostic marker of hepatocellular carcinoma in Qidong risk area China // *World J. Gastroenterol.* – 2003. – V. 9. – P. 692–695.
81. Otsuka J., Okuda T., Sekizawa A., Amemiya S., Saito H., Okai T., et al. Detection of p53 mutations in the plasma DNA of patients with ovarian cancer // *Int. J. Gynecol. Cancer.* – 2004. – V. 14. – P. 459–464.
82. Garcia J.M., Garcia V., Silva J., Pena C., Dominguez G., Sanchez A., et al. Extracellular tumor DNA in plasma and overall survival in breast cancer patients // *Genes Chromosomes Cancer.* – 2006. – V. 45. – P. 692–701.
83. Park S.Y., Seo A.N., Jung H.Y., Gwak J.M., Jung N., Cho N.Y., et al. Alu and LINE-1 hypomethylation is associated with HER2 enriched subtype of breast cancer // *PLoS One.* – 2014. – V. 9. – P. e100429.
84. Akers S.N., Moysich K., Zhang W., Collamat Lai G., Miller A., Lele S., et al. LINE1 and Alu repetitive element DNA methylation in tumor and white blood cells from epithelial ovarian cancer patients // *Gynecol. Oncol.* – 2014. – V. 132. – P. 462–467.
85. Balaj L., Lessard R., Dai L., Cho Y.-J., Pomeroy S.L., Breakefield X.O., et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences // *Nat. Commun.* – 2011. – V. 2. – P. 180.
86. Lake J.A., Jain R., Rivera M.C. Mix and match in the tree of life // *Science.* – 1999. – V. 283. – P. 2027–2028.
87. Ochman H., Lawrence J.G., Groisman E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation // *Nature.* – 2000. – V. 405. P. 299–304.
88. Stegemann S., Bock R. Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts // *Science.* – 2009. – V. 324. – P. 649–651.

89. Bhargava P.M., Shanmugam G. Uptake of nonviral nucleic acids by mammalian cells // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 1971. – V. 11. – P. 103–192.
90. Gahan P.B., Stroun M. The biology of circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) // in *Extracellular nucleic acids: Nucleic acids and molecular biology* (eds) Y. Kikuchi and E. Rykova. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag). – 2010. – V. 25. – P. 167–189.
91. Karpfel Z., Šlotová J., Paleček E. Chromosome aberrations produced by deoxyribonucleic acids in mice // *Exp. Cell. Res.* – 1963. – V. 32. – P. 147–148.
92. Kok I.P. *Dopov. Akad. Nauk Ukr RSR.* – 1959. – V. 12. – P. 1211.
93. Szybalska E.H., Szybalski W. Genetics of human cell lines. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1962. – V. 48. – P. 2026–2034.
94. Szybalski W., Szybalska E.H., Ragni G. Genetic studies with human cell lines // *Natl. Cancer Inst. Monogr.* – 1962. – V. 7. – P. 75–89.
95. Stroun M., Anker P. Nucleic acids spontaneously released by living frog auricles // *Biochem. J.* – 1972. – V. 128, – № 3. – P. 100P–101P.
96. Anker P., Stroun M. Bacterial ribonucleic acid in the frog brain after a bacterial peritoneal infection // *Science.* – 1972. – V. 178. – P. 621–623.
97. Stroun M., Anker P. In vitro synthesis of DNA spontaneously released by bacteria or frog auricles // *Biochimie.* – 1972. – V. 54. – P. 1443–1452.
98. Gahan P.B., Stroun M. The virtosome—a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger // *Cell. Biochem. Funct.* – 2010. – V. 28. – P. 529–538.
99. García-Olmo D., García-Olmo D.C., Ontañón J., Martínez E., Vallejo M. Tumour DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomestasis // *Histol. Histopathol.* – 1999. – V. 14. – P. 1159–1164.
100. Bergsmedh A., Szeles A., Henriksson M., Bratt A., Folkman M.J., Spetz A.L., et al. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2001. – V. 98. – № 11. – P. 6407–6411.
101. García-Olmo D.C., Domínguez C., García-Arranz M., Anker P., Stroun M., García-Verdugo J.M., et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells // *Cancer Res.* – 2010. – V. 70. – P. 560–567.
102. Shih C., Padhy L.C., Murray M., Weinberg R.A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts // *Nature.* – 1981. – V. 290. – P. 261–264.
103. Trejo-Becerril C., Pérez-Cárdenas E., Taja-Chayeb L., Anker P., Herrera-Goepfert R., Medina-Velázquez L.A., et al. Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – № 12. P. e52754.
104. Hariton-Gazal E., Rosenbluh J., Graessmann A., Gilon C., Loyer A. Direct translocation of histone molecules across cell membranes // *J. Cell Sci.* – 2003. – V. 116. – P. 4577–4586.
105. Watson K., Gooderham N.J., Davies D.S., Edwards R.J. Nucleosomes bind to cell surface proteoglycans // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – P. 21707–21713.
106. Dalpke A., Frank J., Peter M., Heeg K. Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species // *Infect. Immun.* – 2006. – V. 74. – P. 940–946.
107. Xu J., Zhang X., Pelayo R., Monestier M., Ammollo C.T., Semeraro F., et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis // *Nat. Med.* – 2009. – V. 15. – P. 1318–1321.
108. Mouliere F., Thierry A.R. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2012. – V. 12(S1). – P. S209–S215.

109. D'Souza-Schorey C., Clancy J.W. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers // *Genes Dev.* – 2012. – V. 26. – № 12. – P. 1287–1299.
110. Lee Y., El Andaloussi S., Wood M.J.A. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy // *Hum. Mol. Genet.* – 2012. – V. 21(R1). – P. R125–134.
111. Turturici G., Tinnirello R., Sconzo G., Geraci F. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2014. – V. 306. – P. C621–633.
112. Kim J., Bae J.-S. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment // *Mediators Inflamm.* – 2016. – V. 2016. – P. 6058147.
113. Berger-Achituv S., Brinkmann V., Abed U.A., Kühn L.I., Ben-Ezra J., Elhasid R., et al. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting // *Front. Immunol.* – 2013. – V. 4. – P. 48.
114. Mishalian I., Bayuh R., Levy L., Zolotarov L., Michaeli J., Fridlender Z.G. Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2013. – V. 62. – № 11. – P. 1745–1756.
115. Fridlender Z.G., Albelda S.M. Tumor associated neutrophils: friend or foe? // *Carcinogenesis.* – 2012. – doi:10.1093/carcin/bgs123
116. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science.* – 2004. – V. 303. – № 5663. – P. 1532–1535.
117. Branzk N., Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease // *Semin. Immunopathol.* – 2013. – V. 35. – № 4. – P. 513–530.
118. Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps // *J. Cell. Biol.* – 2010. – V. 191. – № 3. – P. 677–691.
119. Cools-Lartigue J., Spicer J., McDonald B., Gowing S., Chow S., Giannias B., et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis // *J. Clin. Invest.* – 2013. – doi:10.1172/JCI67484
120. Cooper P.R., Palmer L.J., Chapple I.L.C. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? // *Periodontol.* – 2013. – V. 63. – № 1. – P. 165–197.
121. Luo L., Zhang S., Wang Y., Rahman M., Syk I., Zhang E., et al. Proinflammatory role of neutrophil extracellular traps in abdominal sepsis // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2014. – V. 307. – № 7. – P. L586–596.
122. Kopeski M.S., Benko F.A., Kwak L.W., Gocke C.D. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma // *Clin. Cancer Res.* – 1999. – V. 5. – P. 1961–1965.
123. Wiczorek A.J., Sitaramam V., Machleidt W., Rhyner K., Perruchoud A.P., Block L.H. Diagnostic and prognostic value of RNA-proteolipid in sera of patients with malignant disorders following therapy: first clinical evaluation of a novel tumor marker // *Cancer Res.* – 1987. – V. 47. – P. 6407–6412.
124. Vlassov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers // *Curr. Mol. Med.* – 2010. – V. 10. – P. 142–165.
125. Savelyeva A.V., Kuligina E.V., Bariakin D.N., Kozlov V.V., Ryabchikova E.I., Richter V.A., et al. Variety of RNAs in peripheral blood cells, plasma, and plasma fractions // *Biomed. Res. Int.* – 2017. – V. 2017. – P. 7404912.

126. Savelyeva A.V., Baryakin D.N., Chikova E.D., Kuligina E.V., Richter V.A, Semenov D.V. Vesicular and extra-vesicular RNAs of human blood plasma // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2016. – V. 924. – P. 117–119.
127. Gal S., Fidler C., Lo Y.M., Chin K., Moore J., Harris A.L., et al. Detection of mammaglobin mRNA in the plasma of breast cancer patients // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2001. – V. 945. – P. 192–194.
128. Lledo S.M., Garcia-Granero E., Dasi F., Ripoli R., Garcia S.A., Cervantes A., et al. Real time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in patients with colorectal cancer // *Colorectal Dis.* – 2004. – V. 6. – P. 236–242.
129. Silva J.M., Rodriguez R., Garcia J.M., Munoz C., Silva J., Dominguez G., et al. Detection of epithelial tumour RNA in the plasma of colon cancer patients is associated with advanced stages and circulating tumour cells // *Gut.* – 2002. – V. 50. – P. 530–534.
130. Hasselmann D.O., Rappl G., Rossler M., Ugurel S., Tilgen W., Reinhold U. Detection of tumor-associated circulating mRNA in serum, plasma and blood cells from patients with disseminated malignant melanoma // *Oncol. Rep.* – 2001. – V. 8. – P. 115–118.
131. Hoon D.S., Bostick P., Kuo C., Okamoto T., Wang H.J., Elashoff R., et al. Molecular markers in blood as surrogate prognostic indicators of melanoma recurrence // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – P. 2253–2257.
132. Papadopoulou E., Davilas E., Sotiriou V., Koliopoulos A., Aggelakis F., Dardoufas K., et al. Cell-free DNA and RNA in plasma as a new molecular marker for prostate cancer // *Oncol. Res.* – 2004. – V. 14. – P. 439–445.
133. Chen X.Q., Bonnefoi H., Pelte M.F., Lyautey J., Lederrey C., Movarekhi S., et al. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients // *Clin. Cancer Res.* – 2000. – V. 6. – P. 3823–3826.
134. Novakovic S., Hocevar M., Zgajnar J., Besic N., Stegel V. Detection of telomerase RNA in the plasma of patients with breast cancer, malignant melanoma or thyroid cancer // *Oncol. Rep.* – 2004. – V. 11. – P. 245–252.
135. Miura N., Maeda Y., Kanbe T., Yazama H., Takeda Y., Sato R., et al. Serum human telomerase reverse transcriptase messenger RNA as a novel tumor marker for hepatocellular carcinoma // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – V. 11. – P. 3205–3209.
136. Silva J.M., Dominguez G., Silva J., Garcia J.M., Sanchez A., Rodriguez O., et al. Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics // *Clin. Cancer Res.* – 2001. – V. 7. – P. 2821–2825.
137. Nicolini A., Ferrari P., Duffy M.J. Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: past, present and future // *Semin. Cancer Biol.* – 2017. – pii: S1044-579X(17)30052-4.
138. Lianidou E.S., Markou A., Strati A. The role of CTCs as tumor biomarkers // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2015. – V. 867. – P. 341–367.
139. Fleischhacker M., Beinert T., Ermitsch M., Seferi D., Possinger K., Engelmann C., et al. Detection of amplifiable messenger RNA in the serum of patients with lung cancer // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2001. – V. 945. – P. 179–188.
140. Sueoka E., Sueoka N., Iwanaga K., Sato A., Suga K., Hayashi S., et al. Detection of plasma hnRNP B1 mRNA, a new cancer biomarker, in lung cancer patients by quantitative real-time polymerase chain reaction // *Lung Cancer.* – 2005. – V. 48. – P. 77–83.
141. Kopreski M.S., Benko F.A., Gocke C.D. Circulating RNA as a tumor marker: detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2001. – V. 945. – P. 172–178.

142. Golan-Gerstl R., Cohen M., Shilo A., Suh S.S., Bakacs A., Coppola L.I. Splicing factor hnRNP A2/B1 regulates tumor suppressor gene splicing and is an oncogenic driver in glioblastoma // *Cancer Res.* – 2011. – V. 71. – P. 4464–4472.
143. Zech V.F., Dlaska M., Tzankov A., Hilbe W. Prognostic and diagnostic relevance of hnRNP A2/B1, hnRNP B1 and S100 A2 in non-small cell lung cancer // *Cancer Detect. Prev.* – 2006. – V. 30. – № 5. – P. 395–402.
144. Shilo A., Ben Hur V., Denichenko P., Stein I., Pikarsky E., Rauch J., et al. Splicing factor hnRNP A2 activates the Ras-MAPK-ERK pathway by controlling A-Raf splicing in hepatocellular carcinoma development // *RNA.* – 2014. – V. 20. – № 4. – P. 505–515.
145. Chim S.S., Shing T.K., Hung E.C., Leung T.Y., Lau T.K., Chiu R.W., et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma // *Clin. Chem.* – 2008. – V. 54. – P. 482–490.
146. Lawrie C.H., Gal S., Dunlop H.M., Pushkaran B., Liggins A.P., Pulford K., et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma // *Br. J. Haematol.* – 2008. – V. 141. – P. 672–675.
147. Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M., Fritz B.R., Wyman S.K., Pogosova-Agadjanyan E.L., et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2008. – V. 105. – P. 10513–10518.
148. Chen X., Ba Y., Ma L., Cai X., Yin Y., Wang K., et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases // *Cell Res.* – 2008. – V. 18. – P. 997–1006.
149. Ambros V. The functions of animal microRNAs // *Nature.* – 2004. – V. 431. – P. 350–355.
150. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // *Cell.* – 2004. – V. 116. – P. 281–297.
151. Pillai R.S., Bhattacharyya S.N., Artus C.G., Zoller T., Cougot N., Basyuk E., et al. Inhibition of translational initiation by let-7 microRNA in human cells // *Science.* – 2005. – V. 309. – P. 1573–1576.
152. Huang V., Zheng J., Qi Z., Wang J., Place R.F., Yu J., et al. Ago1 Interacts with RNA polymerase II and binds to the promoters of actively transcribed genes in human cancer cells // *PLoS Genet.* – 2013. – V. 9. – e1003821.
153. Gagnon K.T., Li L., Chu Y., Janowski B.A., Corey D.R. RNAi factors are present and active in human cell nuclei // *Cell Rep.* – 2014. – V. 6. – P. 211–221.
154. Croce C.M., Calin G.A. miRNAs, cancer, and stem cell division // *Cell.* – 2005. – V. 122. – P. 6–7.
155. Calin G.A., Croce C.M. MicroRNA signatures in human cancers // *Nat. Rev. Cancer.* – 2006. – V. 6. – P. 857–866.
156. Turchinovich A., Weiz L., Langheinz A., Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39. – № 16. – P. 7223–7233.
157. Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – V. 9. – P. 654–659.
158. Hunter M.P., Ismail N., Zhang X., Aguda B.D., Lee E.J., Yu L., et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles // *PLoS ONE.* – 2008. – V. 3. – e3694.
159. Zerneck A., Bidzhekov K., Noels H., Shagdarsuren E., Gan L., Denecke B., et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection // *Sci. Signal.* – 2009. – V. 2. – ra81.

160. Arroyo J.D., Chevillet J.R., Kroh E.M., Ruf I.K., Pritchard C.C., Gibson D.F., et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2011. – V. 108. – P. 5003–5008.
161. Turchinovich A., Tonevitsky A.G., Burwinkel B. Extracellular miRNA: a collision of two paradigms // *Trends Biochem. Sci.* – 2016. – V. 41. – № 10. – P. 883–892.
162. Iguchi H., Kosaka N., Ochiya T. Secretory microRNAs as a versatile communication tool // *Commun. Integr. Biol.* – 2010. – V. 3. – P. 478–481.
163. Kosaka N., Iguchi H., Yoshioka Y., Takeshita F., Matsuki Y., Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – P. 17442–17452.
164. Wentz-Hunter K.K., Potashkin J.A. The role of miRNAs as key regulators in the neoplastic microenvironment // *Mol. Biol. Int.* – 2011. – V. 2011. – P. 839872.
165. Schöler N., Langer C., Kuchenbauer F. Circulating micro-RNAs as biomarkers - true blood? // *Genome Med.* – 2011. – V. 3. – P. 72.
166. Yáñez-Mó M., Siljander P.R., Andreu Z., Zavec A.B., Borràs F.E., Buzas E.L., et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions // *J. Extracell. Vesicles.* – 2015. – V. 4. – ID27066, 2015.
167. Arraud N., Linares R., Tan S., Gounou C., Pasquet J.M., Mornet S., et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration // *J. Thromb. Haemost.* – 2014. – V. 12. – № 5. – P. 614–627.
168. Boudreau L.H., Duchez A.-C., Cloutier N., Soulet D., Martin N., Bollinger J., et al. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation // *Blood.* – 2014. – V. 124. – № 14. – P. 2173–2183.
169. Nolte T, Hoen E.N.M., Buermans H.P.J., Waasdrorp M., Stoorvogel W., Wauben M.H.M., 'T Hoen P.A.C. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – V. 40. – № 18. – P. 9272–9285.
170. Vickers K.C., Palmisano B.T., Shoucri B.M., Shamburek R.D., Remaley A.T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins // *Nature Cell Biol.* – 2011. – V. 13. – № 4. – P. 423–435.
171. Kolodny G.M. Evidence for transfer of macromolecular RNA between mammalian cells in culture // *Exp. Cell Res.* – 1971. – V. 65. – P. 313–324.
172. Kolodny G.M., Culp L.A., Rosenthal L.J. Secretion of RNA by normal and transformed cells // *Exp. Cell Res.* – 1972. – V. 73. – P. 65–72.
173. Benner S.A. Extracellular 'communicator RNA' // *FEBS Lett.* – 1988. – V. 233. – P. 225–228.
174. Wieczorek A.J., Rhyner C., Block L.H. Isolation and characterization of an RNA-proteolipid complex associated with the malignant state in humans // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1985. – V. 82. – № 10. – P. 3455–3459.
175. Bhoopalam N., Yakulis V., Giacomoni D., Heller P. Surface immunoglobulins of lymphocytes in mouse plasmacytoma. IV. Evidence for the persistence of the effect of plasmacytoma-RNA on the surface immunoglobulins of normal lymphocytes in vivo and in vitro // *Clin. Exp. Immunol.* – 1976. – V. 23. – P. 139–148.
176. Heller P., Bhoopalam N., Cabana V., Costea N., Yakulis V. The role of RNA in the immunological deficiency of plasmacytoma // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 1973. – V. 207. – P. 468–480.
177. Chen Y., Bhoopalam N., Yakulis V., Heller P. Changes in lymphocyte surface immunoglobulins in myeloma and the effect of an RNA containing plasma factor // *Ann. Intern. Med.* – 1975. – V. 83. – P. 625–631.

178. Kolodny G.M. Evidence for en bloc incorporation of exogenous oligonucleotides into HeLa cell RNA // *Nucleic Acids Res.* – 1977. – V. 4. – P. 271–284.
179. Agliullina D.G., Vegner E.O., Lapina L.A., Vinter V.G. Characteristics of nucleic acid secreted by Ehrlich ascites carcinoma cells // *Eksp Onkol.* – 1984. – V. 6. – P. 29–32.
180. Vinter V.G., Agliullina D.G., Andreeva I.N. Specificity of the action of the RNA released by Ehrlich carcinoma cells on the transplantability and growth of a homologous tumor // *Vopr. Onkol.* – 1978. – V. 24. – P. 38–41.
181. Rosenberg-Nicolson N.L., Nicolson G.L. Nucleoprotein complexes from metastatic cells containing oncogenes and tissue-specific genes: a novel method to track genes associated with specific nucleoproteins // *Cancer Detect. Prev.* – 1994. – V. 18. – P. 31–42.
182. Skog J., Würdinger T., van Rijn S., Meijer D.H., Gainche L., Sena-Esteves M., et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers // *Nat. Cell Biol.* – 2008. – V. 10. – P. 1470–1476.
183. Pegtel D.M., Cosmopoulos K., Thorley-Lawson D.A., van Eijndhoven M.A., Hopmans E.S., Lindenberg J.L., et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2010. – V. 107. – P. 6328–6333.
184. Mittelbrunn M., Gutiérrez-Vázquez C., Villarroya-Beltri C., González S., Sánchez-Cabo F., González M.Á., et al. Unidirectional transfer of microRNA loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells // *Nat. Commun.* – 2011. – V. 2. – P. 282.
185. Montecalvo A., Larregina A.T., Shufesky W.J., Stolz D.B., Sullivan M.L., Karlsson J.M., et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes // *Blood.* – 2012. – V. 119. – P. 756–766.
186. Zhou W., Fong M.Y., Min Y., Somlo G., Liu L., Palomares M.R., et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis // *Cancer cell.* – 2014. – V. 25. – P. 501–515.
187. Aucher A., Rudnicka D., Davis D.M. MicroRNAs transfer from human macrophages to hepato-carcinoma cells and inhibit proliferation // *J. Immunol.* – 2013. – V. 191. – P. 6250–6260.
188. Alexander M., Hu R., Runtzsch M.C., Kagele D.A., Mosbrugger T.L., Tolmachova T., et al. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin // *Nat. Commun.* – 2015. – V. 6. – P. 7321.
189. Thomson J.M., Newman M., Parker J.S., Morin-Kensicki E.M., Wright T., Hammond S.M. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer // *Genes Dev.* – 2006. – V. 20. – P. 2202–2207.
190. Wienholds E., Plasterk R.H. MicroRNA function in animal development // *FEBS Lett.* – 2005. – V. 579. – P. 5911–5922.
191. Alvarez-Garcia I., Miska E.A. MicroRNA functions in animal development and human disease // *Development.* – 2005. – V. 132. – P. 4653–4662.
192. Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65. – P. 6029–6033.
193. Doyle G.A., Bourdeau-Heller J.M., Coulthard S., Meisner L.F., Ross J. Amplification in human breast cancer of a gene encoding a c-myc mRNA-binding protein1 // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – P. 2756–2759.
194. Cox C., Bignell G., Greenman C., Stabenau A., Warren W., Stephens P., et al. A survey of homozygous deletions in human cancer genomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2005. – V. 102. – P. 4542–4547.

195. Macé K., Aguilar F., Wang J.S., Vautravers P., Gómez-Lechón M., Gonzalez F.J., et al. Aflatoxin B1-induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines // *Carcinogenesis*. – 1997. – V. 18. – P. 1291–1297.
196. Ismail P.M., Lu T., Sawadogo M. Loss of USF transcriptional activity in breast cancer cell lines // *Oncogene*. – 1999. – V. 18. V P. 5582–5591.
197. Pritchard-Jones R.O., Dunn D.B., Qiu Y., Varey A.H., Orlando A., Rigby H., et al. Expression of VEGF(XXX)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma // *Br. J. Cancer*. – 2007. – V. 97. – P. 223–230.
198. Yun K., Fidler A.E., Eccles M.R., Reeve A.E. Insulin-like growth factor II and WT1 transcript localization in human fetal kidney and Wilms' tumor // *Cancer Res*. – 1993. – V. 53. – P. 5166–5171.
199. Audic Y., Hartley R.S. Post-transcriptional regulation in cancer // *Biol. Cell*. – 2004. – V. 96. – P. 479–498.
200. Ross J. mRNA stability in mammalian cells // *Microbiol. Rev*. – 1995. – V. 59. – P. 423–450.
201. Carpenter B., MacKay C., Alnabulsi A., MacKay M., Telfer C., Melvin W.T., et al. The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2006. – V. 1765. – P. 85–100.
202. Valencia-Sanchez M.A., Liu J., Hannon G.J., Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs // *Genes Dev*. – 2006. – V. 20. V P. 515–524.
203. Parker R., Song H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover // *Nat. Struct. Mol. Biol*. – 2004. – V. 11. – P. 121–127.
204. Goldstrohm A.C., Wickens M. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. – 2008. – V. 9. – P. 337–344.
205. Chou C.F., Mulky A., Maitra S., Lin W.J., Gherzi R. Kappes J., et al. Tethering KSRP, a decay-promoting AU-rich element-binding protein, to mRNAs elicits mRNA decay // *Mol. Cell Biol*. – 2006, – V. 26. – P. 3695–3706.
206. Morita M., Suzuki T., Nakamura T., Yokoyama K., Miyasaka T., Yamamoto T. Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth // *Mol. Cell Biol*. – 2007. – V. 27. – P. 4980.
207. Miyasaka T., Morita M., Ito K., Suzuki T., Fukuda H., Takeda S., et al. Interaction of antiproliferative protein Tob with the CCR4-NOT deadenylase complex // *Cancer Sci*. – 2008. – V. 99. – P. 755–761.
208. Lai W.S., Kennington E.A., Blackshea P.J. Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease // *Mol. Cell Biol*. – 2003. – V. 23. – P. 3798–3812.
209. Suswam E., Li Y., Zhang X., Gillespie G.Y., Li X., Shacka J.J., et al. Tristetraprolin down-regulates interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in malignant glioma cells // *Cancer Res*. – 2008. – V. 68. – P. 674–682.
210. Tran H., Maurer F., Nagamine Y. Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 // *Mol. Cell Biol*. – 2003. – V. 23. – P. 7177–7188.
211. Moraes K.C., Wilusz C.J., Wilusz J. CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase // *RNA*. – 2006. – V. 12. – P. 1084–1091.
212. Gherzi R., Lee K.Y., Briata P., Wegmüller D., Moroni C., Karin M., et al. A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery // *Mol. Cell*. – 2004. – V. 14. – P. 571–583.

213. Zhang K., Dion N., Fuchs B., Damron T., Gitelis S., Irwin R., et al. The human homolog of yeast SEP1 is a novel candidate tumor suppressor gene in osteogenic sarcoma // *Gene*. – 2002. – V. 298. – P.121–127.
214. Noonan-Wheeler F.C., Wu W., Roehl K.A., Klim A., Haugen J., Suarez B.K., et al. Association of hereditary prostate cancer gene polymorphic variants with sporadic aggressive prostate carcinoma // *Prostate*. – 2006. – V. 66. – P. 49–56.
215. Rennert H., Zeigler-Johnson C.M., Addya K., Finley M.J., Walker A.H., Spangler E., et al. Association of susceptibility alleles in ELAC2/HPC2, RNASEL/HPC1, and MSR1 with prostate cancer severity in European American and African American men // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2005. – V. 14. – P. 949–957.
216. Shook S.J., Beuten J., Torkko K.C., Johnson-Pais T.L., Troyer D.A., Thompson M., et al. Association of RNASEL variants with prostate cancer risk in Hispanic Caucasians and African Americans // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – V. 13. – P. 5959–5964.
217. Krüger S., Silber A.S., Engel C., Görgens H., Mangold E., Pagenstecher C., et al. German hereditary non-polyposis colorectal cancer consortium, Arg462Gln sequence variation in the prostate-cancer-susceptibility gene RNASEL and age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: a case-control study // *Lancet Oncol.* – 2005. – V. 6. – P. 566–572.
218. Bartsch D.K., Fendrich V., Slater E.P., Sina-Frey M., Rieder H., Greenhalf W., et al. RNASEL germline variants are associated with pancreatic cancer // *Int. J. Cancer*. – 2005. – V. 117. – P. 718–722.
219. Gomez B.P., Riggins R.B., Shajahan A.N., Klimach U., Wang A., Crawford A.C., et al. X-box binding protein-1 confers both estrogen independence and antiestrogen resistance in breast cancer cell lines // *FASEB J.* – 2007. – V. 21. – P. 4013–4027.
220. Davies M.P., Barraclough D.L., Stewart C., Joyce K.A., Eccles R.M., Barraclough R., et al. Expression and splicing of the unfolded protein response gene XBP-1 are significantly associated with clinical outcome of endocrinotreated breast cancer // *Int. J. Cancer*. – 2008. – V. 123. – P. 85–88.
221. Shuda M., Kondoh N., Imazeki N., Tanaka K., Okada T., Mori K., et al. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis // *J. Hepatol.* – 2003. – V. 38. – P. 605–614.
222. Peng Y., Schoenberg D.R. c-Src activates endonuclease-mediated mRNA decay // *Mol. Cell*. – 2007. – V. 25. – P. 779–787.
223. Cunningham K.S., Hanson M.N., Schoenberg D.R. Polysomal ribonuclease 1 exists in a latent form on polysomes prior to estrogen activation of mRNA decay // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29. – P. 1156–1162.
224. Cunningham K.S., Dodson R.E., Nagel M.A., Shapiro D.J., Schoenberg D.R. Vigilin binding selectively inhibits cleavage of the vitellogenin mRNA 3'-untranslated region by the mRNA endonuclease polysomal ribonuclease // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2000. – V. 97. – P. 12498–12502.
225. Sugito N., Ishiguro H., Kuwabara Y., Kimura M., Mitsui A., Kurehara H., et al. RNASEN regulates cell proliferation and affects survival in esophageal cancer patients // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – V. 12. – P. 7322–7328.
226. Muralidhar B., Goldstein L.D., Ng G., Winder D.M., Palmer R.D., Gooding E.L., et al. Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels // *J. Pathol.* – 2007. – V. 212. – P. 368–377.
227. Scotto L., Narayan G., Nandula S.V., Subramaniam S., Kaufmann A.M., Wright J.D., et al. Integrative genomics analysis of chromosome 5p gain in cervical cancer reveals target over-expressed genes, including Drosha // *Mol. Cancer*. – 2008. – V. 17. – P. 58.

228. Chiosea S.I., Barnes E.L., Lai S.Y., Egloff A.M., Sargent R.L., Hunt J.L., et al. Mucoepidermoid carcinoma of upper aerodigestive tract: clinicopathologic study of 78 cases with immunohistochemical analysis of Dicer expression // *Virchows, Arch.* – 2008. – V. 452. – P. 629–635.
229. Chiosea S., Jelezcova E., Chandran U., Luo J., Mantha G., Sobol R.W., et al. Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma // *Cancer Res.* – 2007. – V. 67. – P. 2345–2350.
230. Chiosea S., Jelezcova E., Chandran U., Acquafondata M., McHale T., Sobol R.W., et al. Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma // *Am. J. Pathol.* – 2006. – V. 169. – P. 1812–1820.
231. Flavin R.J., Smyth P.C., Finn S.P., Laios A., O'Toole S.A., Barrett C., et al. Altered eIF6 and Dicer expression is associated with clinicopathological features in ovarian serous carcinoma patients // *Mod. Pathol.* – 2008. – V. 21. – P. 676–684.
232. Kaul D., Sikand K. Defective RNA-mediated c-myc gene silencing pathway in Burkitt's lymphoma // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – V. 313. – P. 552–554.
233. Blenkinson C., Goldstein L.D., Thorne N.P., Spiteri I., Chin S.F., Dunning M.J., et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumour subtype // *Genome Biol.* – 2007. – V. 8. – R214.
234. Kumar M.S., Lu J., Mercer K.L., Golub T.R., Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis // *Nat. Genet.* – 2007. – V. 39. – P. 673–677.
235. Karube Y., Tanaka H., Osada H., Tomida S., Tatematsu Y., Yanagisawa K., et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients // *Cancer Sci.* – 2005. – V. 96. – P. 111–115.
236. Rosell R., Cuello M., Cecere F., Santarpia M., Reguart N., Felip E., et al. Usefulness of predictive tests for cancer treatment // *Bull. Cancer.* – 2006. – V. 93. – P. E101–E108.
237. Kovalchuk O., Filkowski J., Meservy J., Ilnytsky Y., Tryndyak V.P., Chekhun V.F., et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin // *Mol. Cancer Ther.* – 2008. – V. 7. – P. 2152–2159.
238. Adams B.D., Claffey K.P., White B.A. Argonaute-2 expression is regulated by EGFR/MAPK signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells // *Endocrinology.* – 2009. – V. 150. – P. 14–23.
239. Curran T.P., Shapiro R., Riordan J.F.. Alteration of the enzymatic specificity of human angiogenin by site-directed mutagenesis // *Biochemistry.* – 1993. – V. 32. – P. 2307–2313.
240. Katona T.M., Neubauer B.L., Iversen P.W., Zhang S., Baldrige L.A., Cheng L. Elevated expression of angiogenin in prostate cancer and its precursors // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – V. 11. – P. 8358–8363.
241. Chen Y., Zhang S., Chen Y.P., Lin J.Y. Increased expression of angiogenin in gastric carcinoma in correlation with tumor angiogenesis and proliferation // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – V. 12. – P. 5135–5139.
242. Vihinen P., Kallioinen M., Vuoristo M.S., Ivaska J., Syrjänen K.J., Hahka-Kemppinen M., et al. Serum angiogenin levels predict treatment response in patients with stage IV melanoma // *Clin. Exp. Metastasis.* – 2007. – V. 24. – P. 567–574.
243. Irvine K., Stirling R., Hume D., Kennedy D. Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP // *Int. J. Dev. Biol.* – 2004. – V. 48. – P. 1065–1077.
244. Zhang H.Z., Liu J.G., Wei Y.P., Wu C., Cao Y.K., Wang M. Expression of G3BP and RhoC in esophageal squamous carcinoma and their effect on prognosis // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – V. 13. – P. 4126–4130.

245. Tourrière H., Gallouzi I.E., Chebli K., Capony J.P., Mouaikel J., van der Geer P., et al. RasGAP-associated endoribonuclease G3Bp: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization // *Mol. Cell Biol.* – 2001. – V. 21. – P. 7747–7760.
246. Yang Z.Z., Chen X.H., Wang D. Experimental study enhancing the chemosensitivity of multiple myeloma to melphalan by using a tissue-specific APE1-silencing RNA expression vector // *Clin. Lymphoma Myeloma.* – 2007. – V. 7. – P. 296–304.
247. Wang D., Luo M., Kelley M.R. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition // *Mol. Cancer Ther.* – 2004. – V. 3. – P. 679–686.
248. Pardini B., Naccarati A., Novotny J., Smerhovsky Z., Vodickova L., Polakova V., et al. DNA repair genetic polymorphisms and risk of colorectal cancer in the Czech Republic // *Mutat. Res.* – 2008. – V. 638. – P. 146–153.
249. De Ruyck K., Szaumkessel M., De Rudder I., Dehoorne A., Vral A., Claes K., et al. Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk // *Mutat. Res.* – 2007. – V. 631. – P. 101–110.
250. Orii A., Masutani H., Nikaido T., Zhai Y.L., Kato K., Kariya M., et al. Altered post-translational modification of redox factor 1 protein in human uterine smooth muscle tumors // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2002. – V. 87. – P. 3754–3759.
251. Robins P., Pappin D.J., Wood R.D., Lindahl T. Structural and functional homology between mammalian DNase IV and the 5'-nuclease domain of Escherichia coli DNA polymerase I // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – P. 28535–28538.
252. Shen B., Singh P., Liu R., Qiu J., Zheng L., Finger L.D., et al. Multiple but dissectible functions of FEN-1 nucleases in nucleic acid processing, genome stability and diseases // *Bioessays.* – 2005. – V. 27. – P. 717–729.
253. Sato M., Girard L., Sekine I., Sunaga N., Ramirez R.D., Kamibayashi C., et al. Increased expression and no mutation of the Flap endonuclease (FEN1) gene in human lung cancer // *Oncogene.* – 2003. – V. 22. – P. 7243–7246.
254. Lam J.S., Seligson D.B., Yu H., Li A., Eeva M., Pantuck A.J., et al. Flap endonuclease 1 is overexpressed in prostate cancer and is associated with a high Gleason score // *B.J.U. Int.* – 2006. – V. 98. – P. 445–451.
255. Kim W.C., Lee C.H. The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1796. – P. 99–113.
256. Clemens M.J., Williams B.R. Inhibition of cell-free protein synthesis by pppA2' p5'A2'p5'A: a novel oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell extracts // *Cell.* – 1978. – V. 13. – P. 565–572.
257. Sidrauski C., Walter P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response // *Cell.* – 1997. – V. 90. – P. 1031–1039.
258. Zhou A., Molinaro R.J., Malathi K., Silverman R.H. Mapping of the human RNASEL promoter and expression in cancer and normal cells // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2005. – V. 25. – P. 595–603.
259. Baglioni C., De Benedetti A., Williams G.J. Cleavage of nascent reovirus mRNA by localized activation of the 2'-5'-oligoadenylate-dependent endoribonuclease // *J. Virol.* – 1984. – V. 52. – P. 865–871.
260. Li X.L., Blackford J.A., Hassel B.A. RNase L mediates the antiviral effect of interferon through a selective reduction in viral RNA during encephalomyocarditis virus infection // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. – P. 2752–2759.

261. Wreschner D.H., James T.C., Silverman R.H., Kerr I.M. Ribosomal RNA cleavage, nuclease activation and 2-5A(ppp(A2'p)nA) in interferon-treated cells // *Nucleic Acids Res.* – 1981. – V. 9. – P. 1571–1581.
262. Silverman R.H., Skehel J.J., James T.C., Wreschner D.H., Kerr I.M. rRNA cleavage as an index of ppp(A2'p)nA activity in interferon-treated encephalomyocarditis virus-infected cell // *J. Virol.* – 1983. – V. 46. – P. 1051–1055.
263. Le Roy F., Bisbal C., Silhol M., Martinand C., Lebleu B., Salehzada T. The 2-5A/RNase L/RNase L inhibitor (RLI) [correction of (RNI)] pathway regulates mitochondrial mRNAs stability in interferon alpha-treated H9 cells // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 48473–48482.
264. Bisbal C., Silhol M., Laubenthal H., Kaluza T., Carnac G., Milligan L., et al. The 2'-5' oligoadenylate/RNase L/RNase L inhibitor pathway regulates both MyoD mRNA stability and muscle cell differentiation // *Mol. Cell. Biol.* – 2000. – V. 20. – P. 4959–4969.
265. Li X.L., Blackford J.A., Judge C.S., Liu M., Xiao W., Kalvakolanu D.V., et al. RNase-L-dependent destabilization of interferon-induced mRNAs. A role for the 2-5A system in attenuation of the interferon response // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 8880–8888.
266. Wreschner D.H., McCauley W.J., Skehel J.J., Kerr I.M. Interferon action—sequence specificity of the ppp(A2'p)nA-dependent ribonuclease // *Nature.* – 1981. – V. 289. – P. 414–417.
267. Chandrasekaran K., Mehrabian Z., Li X.L., Hassel B. RNase-L regulates the stability of mitochondrial DNA-encoded mRNAs in mouse embryo fibroblasts // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – V. 325. – P. 18–23.
268. Hassel B.A., Zhou A., Sotomayor C., Maran A., Silverman R.H. A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon // *EMBO J.* – 1993. – V. 12. – P. 3297–3304.
269. Malathi K., Dong B., Gale M.Jr., Silverman R.H. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity // *Nature.* – 2007. – V. 448. – P. 816–819.
270. Le Roy F., Silhol M., Salehzada T., Bisbal C. Regulation of mitochondrial mRNA stability by RNase L is translation-dependent and controls IFNalpha-induced apoptosis // *Cell Death Differ.* – 2007. – V. 14. – P. 1406–1413.
271. Bisbal C., Martinand C., Silhol M., Lebleu B., Salehzada T. Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferonregulated 2-5A pathway // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – P. 13308–13317.
272. Dong B., Silverman R.H. 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – P. 4133–4137.
273. Carpten J., Nupponen N., Isaacs S., Sood R., Robbins C., Xu J., et al. Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1 // *Nat. Genet.* – 2002. – V. 30. – P. 181–184.
274. Naito T., Yokogawa T., Kim H.S., Matsuda A., Sasaki T., Fukushima M., et al. An apoptotic pathway of 3'-ethynylcytidine(ECyd) involving the inhibition of RNA synthesis mediated by RNase L // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf).* – 2006. – V. 50. – P. 103–104.
275. Malathi K., Paranjape J.M., Bulanova E., Shim M., Guenther-Johnson J.M., Faber P.W., et al. A transcriptional signaling pathway in the IFN system mediated by 2'-5'-oligoadenylate activation of RNase L // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2005. – V. 102. – P. 14533–14538.
276. Mullan P.B., Hosey A.M., Buckley N.E., Quinn J.E., Kennedy R.D., Johnston P.G., et al. The 2,5 oligoadenylate synthetase/RNaseL pathway is a novel effector of BRCA1- and interferon-gamma-mediated apoptosis // *Oncogene.* – 2005. – V. 24. – P. 5492–5501.
277. Bettoun D.J., Scafanas A., Rutledge S.J., Hodor P., Chen O., Gambone C., et al. Interaction between the androgen receptor and RNase L mediates a cross-talk between the interferon and androgen signaling pathways // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – P. 38898–38901.

278. Liu W., Liang S.L., Liu H., Silverman R., Zhou A. Tumour suppressor function of RNase L in a mouse model // *Eur. J. Cancer.* – 2007. – V. 43. – P. 202–209.
279. Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T., Bouche-careilh M., Pineau R., Nalbantoglu J., et al. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo // *Cancer Res.* – 2007. – V. 67. – P. 6700–6707.
280. Oikawa D., Tokuda M., Iwawaki T. Site-specific cleavage of CD59 mRNA by endoplasmic reticulum-localized ribonuclease, IRE1 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – V. 360. – P. 122–127.
281. Tirasophon W., Lee K., Callaghan B., Welihinda A., Kaufman R.J. The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response // *Genes Dev.* – 2000. – V. 14. – P. 2725–2736.
282. Bernales S., Papa F.R., Walter P. Intracellular signaling by the unfolded protein response // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* – 2006. – V. 22. – P. 487–508.
283. Carrasco D.R., Sukhdeo K., Protopopova M., Sinha R., Enos M., Carrasco D.E., et al. The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis // *Cancer Cell.* – 2007. – V. 11. – P. 349–360.
284. Li B., Gao B., Ye L., Han X., Wang W., Kong L., et al. Hepatitis B virus X protein (HBx) activates ATF6 and IRE1-XBP1 pathways of unfolded protein response // *Virus Res.* – 2007. – V. 124. – P. 44–49.
285. Guichard C., Amaddeo G., Imbeaud S., Ladeiro Y., Pelletier L., Maad I.B., et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma // *Nature Genet.* – 2012. – V. 44. – P. 694–698.
286. Parsons D.W., Jones S., Zhang X., Lin J.C., Leary R.J., Angenendt P., et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme // *Science.* – 2008. – V. 321. – P. 1807–1812.
287. Hetz C., Bernasconi P., Fisher J., Lee A.H., Bassik M.C., Antonsson B., et al. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha // *Science.* – 2006. – V. 312. – P. 572–576.
288. Davenport E.L., Moore H.E., Dunlop A.S., Sharp S.Y., Workman P., Morgan G.J., et al. Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells // *Blood.* – 2007. – V. 110. – P. 2641–2649.
289. Joo J.H., Liao G., Collins J.B., Grissom S.F., Jetten A.M. Farnesol-induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response // *Cancer Res.* – 2007. – V. 67. – P. 7929–7936.
290. Gao B., Lee S.M., Chen A., Zhang J., Zhang D.D., Kannan K., et al. Synoviolin promotes IRE1 ubiquitination and degradation in synovial fibroblasts from mice with collagen-induced arthritis // *EMBO Rep.* – 2008. – V. 9. – P. 480–485.
291. Brown M., Strudwick N., Suwara M., Sutcliffe L.K., Mihai A.D., Ali A.A., et al. An initial phase of JNK activation inhibits cell death early in the endoplasmic reticulum stress response // *J. Cell. Sci.* – 2016. – V. 129. – № 12. – P. 2317–2328.
292. Yang F., Peng Y., Schoenberg D.R. Endonuclease-mediated mRNA decay requires tyrosine phosphorylation of polysomal ribonuclease 1 (PMR1) for the targeting and degradation of polyribosome-bound substrate mRNA // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 48993–49002.
293. Irby R.B., Yeatman T.J. Role of Src expression and activation in human cancer // *Oncogene.* – 2000. – V. 19. – P. 5636–5642.
294. Peng Y., Liu X., Schoenberg D.R. Hsp90 stabilizes the PMR1 mRNA endonuclease to degradation by the 26S proteasome // *Mol. Biol. Cell.* – 2008. – V. 19. – P. 546–552.

295. Calderwood S.K., Khaleque M.A., Sawyer D.B., Ciocca D.R. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis // *Trends Biochem. Sci.* – 2006. – V. 31. – P. 164–172.
296. Gu S.Q., Gallego-Perez D., McClory S.P., Shi J., Han J., Lee L.J., et al. The human PMR1 endonuclease stimulates cell motility by down regulating miR-200 family microRNAs // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44. – № 12. – P. 5811–5819.
297. Bracken C.P., Li X., Wright J.A., Lawrence D.M., Pillman K.A., Salmanidis M., et al. Genome-wide identification of miR-200 targets reveals a regulatory network controlling cell invasion // *EMBO J.* – 2014. – V. 33. – P. 2040–2056.
298. Perdigão-Henriques R., Petrocca F., Altschuler G., Thomas M.P., Le M.T., Tan S.M., et al. miR-200 promotes the mesenchymal to epithelial transition by suppressing multiple members of the Zeb2 and Snail1 transcriptional repressor complexes // *Oncogene.* – 2016. – V. 35. – P. 158–172.
299. Nakamura T., Canaani E., Croce C.M. Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2007. – V. 104. – P. 10980–10985.
300. Davis B.N., Hilyard A.C., Lagna G., Hata A. SMAD proteins control DROSHA mediated microRNA maturation // *Nature.* – 2008. – V. 454. – P. 56–61.
301. Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G., Veronese A., Spizzo R., Sabbioni S., et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65. – P. 7065–7070.
302. Roldo C., Missiaglia E., Hagan J.P., Falconi M., Capelli P., Bersani S., et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – V. 24. – P. 4677–4684.
303. Slaby O., Svoboda M., Fabian P., Smerdova T., Knoflickova D., Bednarikova M., et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer // *Oncology.* – 2007. – V. 72. – P. 397–402.
304. Dillhoff M., Liu J., Frankel W., Croce C., Bloomston M. MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival // *J. Gastrointest. Surg.* – 2008. – V. 12. – P. 2171–2176.
305. Wegert J., Ishaque N., Vardapour R., Geörg C., Gu Z., Bieg M., et al. Mutations in the SIX1/2 pathway and the DROSHA/DGCR8 miRNA microprocessor complex underlie high-risk blastemal type Wilms tumors // *Cancer Cell.* – 2015. – V. 27. – № 2. – P. 298–311.
306. Walz A.L., Ooms A., Gadd S., Gerhard D.S., Smith M.A., Guidry Auvil J.M., et al. Recurrent DGCR8, DROSHA, and SIX homeodomain mutations in favorable histology Wilms tumors // *Cancer Cell.* – 2015. – V. 27. – № 2. – P. 286–297.
307. Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference // *Nature.* – 2001. – V. 409. – P. 363–366.
308. Jing Q., Huang S., Guth S., Zarubin T., Motoyama A., Chen J., et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability // *Cell.* – 2005. – V. 120. – P. 623–634.
309. Takahashi H., Maeda M., Sawa H., Hasegawa H., Moriyama M., Sata T., et al. Dicer and positive charge of proteins decrease the stability of RNA containing the AU-rich element of GM-CSF // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – V. 340. – P. 807–814.
310. Kuehbach A., Urbich C., Zeiher A.M., Dimmeler S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis // *Circ. Res.* – 2007. – V. 101. – P. 59–68.
311. Tokumaru S., Suzuki M., Yamada H., Nagino M., Takahashi T. let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop // *Carcinogenesis.* – 2008. – V. 29. – P. 2073–2077.
312. Liu X., Chen X., Yu X., Tao Y., Bode A.M., Dong Z., et al. Regulation of microRNAs by epigenetics and their interplay involved in cancer // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2013. – V. 32. – P. 96.

313. Hill D.A., Ivanovich J., Priest J.R., Gurnett C.A., Dehner L.P., Desruisseau D., et al. DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma // *Science*. – 2009. – V. 325. – № 5943. – P. 965.
314. Maniataki E., Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA // *Genes Dev*. – 2005. – V. 19. – P. 2979–2990.
315. O'Carroll D., Mecklenbrauker I., Das P.P., Santana A., Koenig U., Enright A.J., et al. A slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway // *Genes Dev*. – 2007. – V. 21. – P. 1999–2004.
316. Vickers T.A., Lima W.F., Nichols J.G., Crooke S.T. Reduced levels of Ago2 expression result in increased siRNA competition in mammalian cells // *Nucleic Acids Res*. – 2007. – V. 35. – P. 6598–6610.
317. Shapiro R., Strydom D.J., Olson K.A., Vallee B.L. Isolation of angiogenin from normal human plasma // *Biochemistry*. – 1987. – V. 26. P. 5141–5146.
318. Spong C.Y., Ghidini A., Sherer D.M., Pezzullo J.C., Ossandon M., Eglinton G.S. Angiogenin: a marker for preterm delivery in midtrimester amniotic fluid // *Am. J. Obstet. Gynecol*. – 1997. – V. 176. – P. 415–418.
319. Skog J., Wurdinger T., van Rijn S., Meijer D.H., Gainche L., Sena-Esteves M., et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers // *Nat. Cell. Biol*. – 2008. – V. 10. – P. 1470–1476.
320. Ilzecka J. Cerebrospinal fluid angiogenin level in patients with amyotrophic lateral sclerosis // *Acta Clin. Croat*. – 2008. – V. 47. – P. 77–79.
321. Russo N., Acharya K.R., Vallee B.L., Shapiro R. A combined kinetic and modeling study of the catalytic center subsites of human angiogenin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 1996. – V. 93. – P. 804–808.
322. Sheng J., Yu W., Gao X., Xu Z., Hu G.F. Angiogenin stimulates ribosomalRNA transcription by epigenetic activation of the ribosomal DNA promoter // *Cell Physiol*. – 2014. – V. 229. – P. 521–529.
323. Xu Z.P., Tsuji T., Riordan J.F., Hu G.F. The nuclear function of angiogenin in endothelial cells is related to rRNA production // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2002. – V. 294. – P. 287–292.
324. Monti D.M., Yu W., Pizzo E., Shima K., Hu M.G., Di Malta C., et al. Characterization of the angiogenic activity of zebrafish ribonucleases // *FEBS J*. – 2009. – V. 276. – P. 4077–4090.
325. Shapiro R., Riordan J.F., Vallee B.L. Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin // *Biochemistry*. – 1986. – V. 25. – P. 3527–3532.
326. Sheng J., Zhengping Xu Z.. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective // *Acta Biochim. Biophys. Sin*. – 2016. – V. 48. – № 5. – P. 399–410.
327. Fu H., Feng J., Liu Q., Sun F., Tie Y., Zhu J., et al. Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells // *FEBS Lett*. – 2009. – V. 583. – P. 437–442.
328. Yamasaki S., Ivanov P., Hu G.F., Anderson P. Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression // *J. Cell Biol*. – 2009. – V. 185. – P 35–42.
329. Czech A., Wende S., Morl M., Pan T., Ignatova Z. Reversible and rapid RNA deactivation as a mechanism of translational repression in stress // *PLoS Genet*. – 2013. – V. 9. – e1003767.
330. Thompson D.M., Lu C., Green P.J., Parker R. tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes // *RNA*. – 2008. – V. 14. – № 10. – P. 2095–2103.
331. Calabrese J.M., Seila A.C., Yeo G.W., Sharp P.A. RNA sequence analysis defines Dicer's role in mouse embryonic stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2007. – V. 104. – № 46. – P. 18097–18102.
332. Lee Y.S., Shibata Y., Malhotra A., Dutta A. A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs) // *Genes Dev*. – 2009. – V. 23. – № 22. – P. 2639–2649.

333. Honda S., Loher P., Shigematsu M., Palazzo J.P., Suzuki R., Imoto I., et al. Sex hormone-dependent tRNA halves enhance cell proliferation in breast and prostate cancers // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2015. – V. 112. – P. E3816–E3825.
334. Ivanov P., Emara M.M., Villen J., Gygi S.P., Anderson P. Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation // *Mol. Cell.* – 2011. – V. 43. – P. 613–623.
335. Hu G.F., Riordan J.F., Vallee B.L. A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1997. – V. 94. – P. 2204–2209.
336. Liu S., Yu D., Xu Z.P., Riordan J.F., Hu G.F. Angiogenin activates Erk1/2 in human umbilical vein endothelial cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – V. 287. – P. 305–310.
337. Ibaragi S., Yoshioka N., Kishikawa H., Hu J.K., Sadow P.M., Li M., et al. Angiogenin-stimulated rRNA transcription is essential for initiation and survival of AKT-induced prostate intraepithelial neoplasia // *Mol. Cancer Res.* – 2009. – V. 7. – P. 415–424.
338. Kim H.M., Kang D.K., Kim H.Y., Kang S.S., Chang S.I. Angiogenin-induced protein kinase B/Akt activation is necessary for angiogenesis but is independent of nuclear translocation of angiogenin in HUVE cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – V. 352. – P. 509–513.
339. Trouillon R., Kang D.K., Park H., Chang S.I., O'Hare D. Angiogenin induces nitric oxide synthesis in endothelial cells through PI-3 and Akt kinases // *Biochemistry.* – 2010. – V. 49. – P. 3282–3288.
340. Peng Y., Li L., Huang M., Duan C., Zhang L., Chen J. Angiogenin interacts with ribonuclease inhibitor regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in bladder cancer cells // *Cell Signal.* – 2014. – V. 26. – P. 2782–2792.
341. Shu J., Huang M., Tian Q., Shui Q., Zhou Y., Chen J. Downregulation of angiogenin inhibits the growth and induces apoptosis in human bladder cancer cells through regulating AKT/mTOR signaling pathway // *J. Mol. Histol.* – 2015. – V. 46. – P. 157–171.
342. Sadagopan S., Veetil M.V., Chakraborty S., Sharma-Walia N., Paudel N., Bottero V., et al. Angiogenin functionally interacts with p53 and regulates p53-mediated apoptosis and cell survival // *Oncogene.* – 2012. – V. 31. – P. 4835–4847.
343. Xia W., Fu W., Cai X., Wang M., Chen H., Xing W., et al. Angiogenin promotes U87MG cell proliferation by activating NF-kappaB signaling pathway and downregulating its binding partner FHL3 // *PLoS One.* – 2015. – V. 10. – e0116983.
344. Sebastia J., Kieran D., Breen B., King M.A., Nettelband D.F., Joyce D., et al. Angiogenin protects motoneurons against hypoxic injury // *Cell Death Differ.* – 2009. – V. 16. – P. 1238–1247.
345. Hartmann A., Kunz M., Kostlin S., Gillitzer R., Toksoy A., Brocker E.B., et al. Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma // *Cancer Res.* – 1999. – V. 59. – P. 1578–1583.
346. Pilch H., Schlenger K., Steiner E., Brockerhoff P., Knapstein P., Vaupel P. Hypoxia-stimulated expression of angiogenic growth factors in cervical cancer cells and cervical cancer-derived fibroblasts // *Int. J. Gynecol. Cancer.* – 2001. – V. 11. – P. 137–142.
347. Li S., Hu G.F. Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions // *J. Cell Physiol.* – 2012. – V. 227. – P. 2822–2826.
348. Song J., Wang J., Yang J., Jiang C., Shen W., Wang L. Influence of angiogenin on the growth of A375 human melanoma cells and the expression of basic fibroblast growth factor // *Melanoma Res.* – 2006. – V. 16. – P. 119–126.
349. Tsuji T., Sun Y., Kishimoto K., Olson K.A., Liu S., Hirukawa S., et al. Angiogenin is translocated to the nucleus of HeLa cells and is involved in ribosomal RNA transcription and cell proliferation // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65. – P. 1352–1360.

350. Yoshioka N., Wang L., Kishimoto K., Tsuji T., Hu G.F. A therapeutic target for prostate cancer based on angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell proliferation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2006. – V. 103. – P. 14519–14524.
351. Barcena C., Stefanovic M., Tutusaus A., Martinez-Nieto G.A., Martinez L., Garcia-Ruiz C., al. Angiogenin secretion from hepatoma cells activates hepatic stellate cells to amplify a self-sustained cycle promoting liver cancer // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5. – P. 7916.
352. Jones M.L., Ewing C.M., Isaacs W.B., Getzenberg R.H. Prostate cancer-derived angiogenin stimulates the invasion of prostate fibroblasts // *J. Cell. Mol. Med.* – 2012. – V. 16. – P. 193–201.
353. Gallouzi E., Parker F., Chebli K., Maurier F., Labourier E., Barlat I., et al. A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability // *Mol. Cell. Biol.* – 1998. – V. 18. – P. 3956–3965.
354. Barnes C.J., Li F., Mandal M., Yang Z., Sahin A.A., Kumar R. Heregulin induces expression, ATPase activity, and nuclear localization of G3BP, a Ras signaling component, in human breast tumors // *Cancer Res.* – 2002. – V. 62. – P. 1251–1255.
355. Gallouzi I.E., Parker F., Chebli K., Maurier F., Labourier E., Barlat I., et al. A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability // *Mol. Cell. Biol.* – 1998. – V. 18. – P. 3956–3965.
356. Prigent M., Barlat I., Langen H., Dargemont C. IkappaBalpha and IkappaBalpha/ NF-kappa B complexes are retained in the cytoplasm through interaction with a novel partner, RasGAP SH3-binding protein 2 // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 36441–36449.
357. Soncini C., Berdo I., Draetta G. Ras-GAP SH3 domain binding protein (G3BP) is a modulator of USP10, a novel human ubiquitin specific protease // *Oncogene.* – 2001. – V. 20. – P. 3869–3879.
358. Kim M.M., Wiederschain D., Kennedy D., Hansen E., Yuan Z.M. Modulation of p53 and MDM2 activity by novel interaction with Ras-GAP binding proteins (G3BP) // *Oncogene.* – 2007. – V. 26. – P. 4209–4215.
359. Atlas R., Behar L., Elliott E., Giszburg I. The insulin-like growth factor mRNA binding-protein imp-1 and the ras-regulatory protein g3bp associate with tau mRNA and hud protein in differentiated p19 neuronal cells // *J. Neurochem.* – 2004. – V. 89. – P. 613–626.
360. Liu Y., Zheng J., Fang W., You J., Wang J., Cui X., et al. Identification of metastasis associated gene G3BP by differential display in human cancer cell sublines with different metastatic potentials G3BP as highly expressed in non-metastatic // *Chin. Med J.* – 2001, – V. 114. – P. 35–38.
361. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer // *Cell.* – 2000. – V. 100. – P. 57–70.
362. Schmitz A.A., Govek E.E., Bottner B., Van Aelst L. Rho gtpases: Signaling, migration and invasion // *Exp. Cell. Res.* – 2000. – V. 261. – P. 1–12.
363. Barnes T., Kim W.C., Mantha A.K., Kim S.E., Izumi T., Mitra S., et al. Identification of Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) as the endoribonuclease that cleaves c-myc mRNA // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – V. 37. – № 12. – P. 3946–3958.
364. Vascotto C., Fantini D., Romanello M., Cesaratto L., Deganuto M., Leonardi A., et al. APE1/Ref-1 interacts with NPM1 within nucleoli and plays a role in the rRNA quality control process // *Mol. Cell. Biol.* – 2009. – V. 29. – P. 1834–1854.
365. Antoniali G., Lirussi L., Poletto M., Tell G. Emerging roles of the nucleolus in regulating the DNA damage response: the noncanonical DNA repair enzyme APE1/Ref-1 as a paradigmatical example // *Antioxid. Redox Signal.* – 2014. – V. 20. – P. 621–639.
366. Antoniali G., Malfatti M.C., Tell G. Unveiling the non-repair face of the Base Excision Repair pathway in RNA processing: A missing link between DNA repair and gene expression? // *DNA Repair (Amst).* – 2017. – V. 56. – P. 65–74.

367. Tell G., Wilson D.M., Lee C.H. Intrusion of a DNA repair protein in the RNome world: is this the beginning of a new era? // *Mol. Cell. Biol.* – 2010. – V. 30. – P. 366–371.
368. Di Maso V., Avellini C., Crocè L.S., Rosso N., Quadrifoglio F., Cesaratto L., et al. Subcellular localization of APE1/Ref-1 in human hepatocellular carcinoma: possible prognostic significance // *Mol. Med.* – 2007. – V. 13. – P. 89–96.
369. Jackson E.B., Theriot C.A., Chattopadhyay R., Mitra S., Izumi T. Analysis of nuclear transport signals in the human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1/Ref1) // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33. – P. 3303–3312.
370. Hadi M.Z., Coleman M.A., Fidelis K., Mohrenweiser H.W., Wilson D.M. Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – V. 28. – P. 3871–3879.
371. Stevens A. Endonucleolytic cleavage of RNA at 5' endogenous stem structures by human flap endonuclease 1 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – V. 251. – P. 501–508.
372. Henneke G., Koundrioukoff S., Hübscher U. Phosphorylation of human Fen1 by cyclin-dependent kinase modulates its role in replication fork regulation // *Oncogene.* – 2003. – V. 22. – P. 4301–4313.
373. Kucherlapati M., Yang K., Kuraguchi M., Zhao J., Lia M., Heyer J., et al. Haploinsufficiency of Flap endonuclease (Fen1) leads to rapid tumor progression // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2002. – V. 99. – P. 9924–9929.
374. Kucherlapati M., Nguyen A., Kuraguchi M., Yang K., Fan K., Bronson R., et al. Tumor progression in Apc(1638N) mice with Exo1 and Fen1 deficiencies // *Oncogene.* – 2007. – V. 26. – P. 6297–6306.
375. Tollervey D. Molecular biology: RNA lost in translation // *Nature.* – 2006. – V. 440. – P. 425–426.
376. Lee H.H., Kim Y.S., Kim K.H., Heo I., Kim S.K., Kim O., et al. Structural and functional insights into Dom34, a key component of no-go mRNA decay // *Mol. Cell.* – 2007. – V. 27. – P. 938–950.
377. Newton D.L., Hansen H.J., Mikulski S.M., Goldenberg D.M., Rybak S.M. Potent and specific antitumor effects of an anti-CD22-targeted cytotoxic ribonuclease: potential for the treatment of non-Hodgkin lymphoma // *Blood.* – 2001. – V. 97. – P. 528–535.
378. Nitta K., Ozaki K., Ishikawa M., Furusawa S., Hosono M., Kawauchi H., et al. Inhibition of cell proliferation by *Rana catesbeiana* and *Rana japonica* lectins belonging to the ribonuclease superfamily // *Cancer Res.* – 1994. – V. 54. – № 4. – P. 920–927.
379. Sevcik J., Urbanikova L., Leland P.A., Raines R.T. X-ray structure of two crystalline forms of a streptomycete ribonuclease with cytotoxic activity // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 49. – P. 47325–47330.
380. Arnold U., Ulbrich-Hofmann R. Natural and engineered ribonucleases as potential cancer therapeutics // *Biotechnol. Lett.* – 2006. – V. 28. – № 20. – P. 1615–1622.
381. Fuchs H.J., Borowitz D.S., Christiansen D.H., Morris E.M., Nash M.L., Ramsey B.W., et al. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis // *N. Engl. J. Med.* – 1994. – V. 331. – P. 637–642.
382. Silverman R.A., Foley F., Dalipia R., Klineb M., Lesserb M. The use of rhDNase in severely ill, non-intubated adult asthmatics refractory to bronchodilators: A pilot study // *Resp. Medicine.* – 2012. – V. 106. – № 8. – P. 1096–1102.
383. Ledoux L. Action of ribonuclease on neoplastic growth. II. Action on Landschutz ascites cells in vitro // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1956. – V. 20. – P. 369–377.

384. Ledoux L., Baltus E. Action de la ribonuclease sur les cellules du carcinoma d' Erlich. // *Experientia*. – 1954. – V. 10. – P. 500–501.
385. Ledoux L., Revell S.H. Action of ribonuclease on neoplastic growth. I. Chemical aspects of normal tumour growth: the Landschutz ascites tumour // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1955. – V. 18. – P. 416–426.
386. Aleksandrowicz J. Intracutaneous ribonuclease in chronic myelocytic leukemia // *Lancet*. – 1958. – V. 2. – P. 420.
387. Aleksandrowicz J., Urbanczyk J., Ostrowska A., Sierko J. Further research on the activity of ribonucleases in the blood and urine of patients suffering from proliferative hemocytopenia // *Blood*. – 1958. – V. 13. – P. 652–664.
388. Telford I.R., Kemp J.F., Taylor E.F., Yeaman M.W. Effect of ribonuclease on survival of ascites tumor bearing mice // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1959. – V. 100. – P. 829–831.
389. Raines R.T. Ribonuclease A // *Chem. Rev.* – 1998. – V. 98. – № 3. – P. 1045–1066.
390. Johnson R.J., McCoy J.G., Bingman C.A., Phillips Jr. G.N., Raines R.T. Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein // *J. Mol. Biol.* – 2007. – V. 368. – P. 434–449.
391. Rybak S.M., Saxena S.K., Ackerman E.J., Youle R.J. Cytotoxic potential of ribonuclease and ribonuclease hybrid proteins // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. – P. 21202–21207.
392. Newton D.L., Ilercil O., Laske D.W., Oldfield E., Rybak S.M., Youle R.J. Cytotoxic ribonuclease chimeras. Targeted tumoricidal activity in vitro and in vivo // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. – P. 19572–19578.
393. Psarras K., Ueda M., Yamamura T., Ozawa S., Kitajima M., Aiso S., et al. Human pancreatic RNase1-human epidermal growth factor fusion: an entirely human 'immunotoxin analog' with cytotoxic properties against squamous cell carcinomas // *Protein Eng.* – 1998. – V. 11. – P. 1285–1292.
394. Futami J., Seno M., Ueda M., Tada H., Yamada H. Inhibition of cell growth by a fused protein of human ribonuclease 1 and human basic fibroblast growth factor // *Protein Eng.* – 1999. – V. 12. – P. 1013–1019.
395. Suzuki M., Saxena S.K., Boix E., Prill R.J., Vasandani V.M., Ladner J.E., et al. Engineering receptor-mediated cytotoxicity into human ribonucleases by steric blockade of inhibitor interaction // *Nat. Biotechnol.* – 1999. – V. 17. – P. 265–270.
396. Leland P.A., Staniszewski K.E., Kim B.M., Raines R.T. Endowing human pancreatic ribonuclease with toxicity for cancer cells // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 43095–43102.
397. Rutkoski T.J., Kurten E.L., Mitchell J.C., Raines R.T. Disruption of shape-complementarity markers to create cytotoxic variants of ribonuclease A // *J. Mol. Biol.* – 2005. – V. 354. – P. 41–54.
398. Fuchs S.M., Rutkoski T.J., Kung V.M., Groeschl R.T., Raines R.T. Increasing the potency of a cytotoxin with an arginine graft // *Protein Eng. Des. Sel.* – 2007. – V. 20. – P. 505–509.
399. Rutkoski T.J., Kink J.A., Strong L.E., Raines R.T. Site-specific PEGylation endows a mammalian ribonuclease with antitumor activity // *Cancer Biol. Ther.* – 2011. – V. 12. – P. 208–214.
400. Di Donato A., Cafaro V., D'Alessio G. Ribonuclease A can be transformed into a dimeric ribonuclease with antitumor activity // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – P. 17394–17396.
401. Ercole C., Colamarino R.A., Pizzo E., Fogolari F., Spadaccini R., Picone D. Comparison of the structural and functional properties of RNase A and BS-RNase: a stepwise mutagenesis approach // *Biopolymers*. – 2009. – V. 91. – P. 1009–1017.

402. Piccoli R., Di Gaetano S., De Lorenzo C., Grauso M., Monaco C., Spalletti-Cernia D., et al. A dimeric mutant of human pancreatic ribonuclease with selective cytotoxicity toward malignant cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1999. – V. 96. – P. 7768–7773.
403. Yun T.K., Kim Y.K., Kim B.S., Park H.K., Park S.S., Koh C.S., et al. Clinical studies on the carcinolytic action of bovine pancreatic ribonuclease // *J. Korean Cancer Res. Assoc.* – 1972. – V. 7. – P. 23–481.
404. Soucek J., Poucková P., Strohalm J., Plocová D., Hlousková D., Zadinová M., et al. Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] conjugates of bovine pancreatic ribonuclease (RNase A) inhibit growth of human melanoma in nude mice // *J. Drug Target.* – 2002. – V. 10. – № 3. – P. 175–183.
405. Bosch M., Benito A., Ribo M., Puig T., Beaumelle B., Vilanova M. A nuclear localization sequence endows human pancreatic ribonuclease with cytotoxic activity // *Biochemistry.* – 2004. – V. 43. – № 8. – P. 2167–2177.
406. Vert A., Castro J., Ruiz-Martínez S., Tubert P., Escribano D., Ribó M., et al. Generation of new cytotoxic human ribonuclease variants directed to the nucleus // *Mol. Pharm.* – 2012. – V. 9. – №10. – P. 2894–902.
407. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02134990. A phase IIa, open-label, single-center study to assess the activity of oshadi D and oshadi R in combination with docetaxel, as 2nd line therapy for metastatic non small cell lung cancer. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02134990>
408. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01627795. A single-center, open label study for evaluation of the safety and efficacy of oshadi D and oshadi R for malignant mesothelioma treatment - a phase IIa study. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01627795>
409. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02007317. A single center, open label study for evaluation of the safety and efficacy of oshadi D and oshadi R in patients with basal cell carcinoma (BCC) prior to tumor excision- a phase II study. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02007317>
410. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02462265. A phase II, open-label, single-center study to assess the activity of oshadi D and oshadi R in combination with salvage chemotherapy for relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML) or lymphoid leukemia (ALL) patients. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02462265>
411. Ardelt W., Mikulski S.M., Shogen K. Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 26. – P. 245–251.
412. Ardelt W., Lee H.-S., Randolph G., Viera A., Mikulski S.M., Shogen K. Enzymatic characterization of onconase, a novel ribonuclease with antitumor activity // *Prot. Sci.* – 1994. – V. 3 (Suppl. 1). – P. 137.
413. Boix E., Wu Y.-N., Vasandani V.M., Saxena S.K., Ardelt W., Ladner J., et al. Role of the N-terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity // *J. Mol. Biol.* – 1996. – V. 257. – P. 992–1007.
414. Darzynkiewicz Z., Carter S.P., Mikulski S.M., Ardelt W., Shogen K. Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent // *Cell Tissue Kinet.* – 1988. – V. 21. – P. 169–182.
415. Smolewski P., Witkowska M., Zwolinska M., Cebula-Obrzut B., Majchrzak A., Jeske A., et al. Cytotoxic activity of the amphibian ribonucleases onconase and r-amphinase on tumor cells from B cell lymphoproliferative disorders // *Int. J. Oncol.* – 2014. – V. 45. – № 1. – P. 419–425.
416. Turcotte R.F., Lavis L.D., Raines R.T. Onconase cytotoxicity relies on the distribution of its positive charge // *FEBS J.* – 2009. – V. 276. – № 14. – P. 3846–3857.
417. Mikulski S.M., Viera A., Ardelt W., Menduke H., Shogen K. Tamoxifen and trifluoroperazine (Stelazine) potentiate cytostatic/cytotoxic effects of P-30 protein, a novel protein possessing anti-tumor activity // *Cell. Tissue Kinet.* – 1990. – V. 23. – P. 237–346.

418. Ita M., Halicka H.D., Tanaka T., Kurose A., Ardelt B., Shogen K., et al. Remarkable enhancement of cytotoxicity of onconase and cepharanthine when used in combination on various tumor cell lines // *Cancer Biol. Ther.* – 2008. – V. 7. – P. 1104–1108.
419. Mikulski S.M., Viera A., Darzynkiewicz Z., Shogen K. Synergism between a novel amphibian oocyte ribonuclease and lovastatin in inducing cytostatic and cytotoxic effects in human lung and pancreatic carcinoma cell lines // *Br. J. Cancer.* – 1992. – V. 66. – P. 304–310.
420. Deptala A., Halicka H.D., Ardelt B., Ardelt W., Mikulski S.M., Shogen K., et al. Potentiation of tumor necrosis factor induced apoptosis by onconase // *Int. J. Oncol.* – 1998. – V. 13. – P. 11–16.
421. Tang C.H., Hu C.C., Wei C.W., Wang J.J. Synergism of *Rana catesbeiana* ribonuclease and IFN-gamma triggers distinct death machineries in different human cancer cells // *FEBS Lett.* – 2005. – V. 579. – P. 265–270.
422. Tsai S.Y., Hsieh T.C., Ardelt B., Darzynkiewicz Z., Wu J.M. Combined effects of onconase and IFN-beta on proliferation, macromolecular syntheses and expression of STAT-1 in JCA-1 cancer cells // *Int. J. Oncol.* – 2002. – V. 20. – P. 891–896.
423. Lee I., Kim D.H., Sunar U., Magnitsky S., Shogen K. The therapeutic mechanisms of ranpirnase-induced enhancement of radiation response on A549 human lung cancer // *In Vivo.* – 2007. – V. 21. – P. 721–728.
424. Halicka H.D., Murakami T., Papageorgio C.N., Mittelman A., Mikulski S.M., Shogen K., et al. Induction of differentiation of leukaemic (HL-60) or prostate cancer (LNCaP, JCA-1) cells potentiates apoptosis triggered by Onconase // *Cell. Prolif.* – 2000. – V. 33. – P. 407–417.
425. Lee I., Lee Y.H., Mikulski S.M., Shogen K. Effect of ONCONASE +/- tamoxifen on ASPC-1 human pancreatic tumors in nude mice // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2003. – V. 530. – P. 187–196.
426. Halicka H.D., Ardelt B., Shogen K., Darzynkiewicz Z. Mild hyperthermia predisposes tumor cells to undergo apoptosis upon treatment with Onconase // *Int. J. Oncol.* – 2007. – V. 30. – P. 841–847.
427. Mikulski S.M., Ardelt W., Shogen K., Bernstein E.H., Menduke H. Striking increase of survival of mice bearing M109 Madison carcinoma treated with a novel protein from amphibian embryos // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1990. – V. 82. – P. 151–153.
428. Nasu M., Carbone M., Gaudino G., Ly B.H., Bertino P., Shimizu D., et al. Ranpirnase interferes with NF- $\kappa$ B pathway and MMP9 activity, inhibiting malignant mesothelioma cell invasiveness and xenograft growth // *Genes Cancer.* – 2011. – V. 2. – № 5. – P. 576–584.
429. Shen R., Li J., Ye D., Wang Q., Fei J. Combination of onconase and dihydroartemisinin synergistically suppresses growth and angiogenesis of non-small-cell lung carcinoma and malignant mesothelioma // *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai).* – 2016. – V. 48. – № 10. – P. 894–901.
430. Newton D.L., Stockwin L.H., Rybak S.M. Anti-CD22 Onconase: preparation and characterization // *Methods Mol. Biol.* – 2009. – V. 525. – P. 425–443.
431. Rybak S.M. Antibody-onconase conjugates: cytotoxicity and intracellular routing // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2008. – V. 9. – № 3. – P. 226–230.
432. Wang X., Guo Z. Anti-gliomas effect of chlorotoxin-conjugated onconase at high dose // *Cell Biochem. Biophys.* – 2015. – V. 73. – № 2. – P. 389–392.
433. Fagagnini A., Pica A., Fasoli S., Montioli R., Donadelli M., Cordani M., et al. Onconase dimerization through 3D domain swapping: structural investigations and increase of the apoptotic effect in cancer cells // *Biochem. J.* – 2017. – pii: BCJ20170541.
434. Altomare D.A., Rybak S.M., Pei J., Maizel J.V., Cheung M., Testa J.R., et al. Onconase responsive genes in human mesothelioma cells: implications for an RNA damaging therapeutic agent // *BMC Cancer.* – 2010. – V. 10. – P. 34.

435. Mikulski S.M., Costanzi J.J., Vogelzang N.J., McCachren S., Taub R.N., Chun H., et al. Phase II trial of a single weekly intravenous dose of ranpirnase in patients with unresectable malignant mesothelioma // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – V. 20. – P. 274–281.
436. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01184287. A phase II trial of addition of ranpirnase(ONCONASE®) to perimetrex plus carboplatin in patients with non-squamous non-small cell lung cancer. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01184287>
437. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00003034. ONCONASE plus doxorubicin versus doxorubicin for patients with malignant pleural or peritoneal mesothelioma who have had no more than one prior chemotherapy regimen. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00003034>
438. Hosokawa S., Irie M. Purification and properties of seminal vesicle ribonucleases // *J. Biochem. (Tokyo)*. – 1971. – V. 69. – P. 683–697.
439. D'Alessio G., Floridi A., De Prisco R., Pinero A., Leone E. Bull semen ribonucleases 1. Purification and physico-chemical properties of the major component // *Eur. J. Biochem.* – 1972. – V. 26. – P. 153–161.
440. Dostal J., Matousek J. Purification of aspermatogenic substance (AS) from bull seminal vesicle fluid // *J. Reprod. Fertil.* – 1972. – V. 31. – № 31. – P. 273–275.
441. D'Alessio G., Di Donato A., Parente A., Piccoli R. Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease family // *Trends Biochem. Sci.* – 1991. – V. 16. – P. 104–106.
442. Beintema J.J., Schuller C., Irie M., Carsana A. Molecular evolution of the ribonuclease superfamily // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 1988. – V. 151. – P. 165–192.
443. Dyer K.D., Rosenberg H.F. The RNase a superfamily: generation of diversity and innate host defense // *Mol. Divers.* – 2006. – V. 10. – P. 585–597.
444. Di Donato A., D'Alessio G. Interchain disulfide bridges in ribonuclease BS-1 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1973. – V. 55. – P. 919–928.
445. Piccoli R., Tamburini M., Picialli G., Di Donato A., Parente A., D'Alessio G. The dual-mode quaternary structure of seminal RNase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1992. – V. 89. – P. 1870–1874.
446. Kim J.S., Soucek J., Matousek J., Raines R.T. Catalytic activity of bovine seminal ribonuclease is essential for its immunosuppressive and other biological activities // *Biochem. J.* – 1995. – V. 308. – P. 547–550.
447. Vestia S., Tramontano D., Augusti-Tocco G., D'Alessio G. In vitro studies on selective inhibition of tumors cell growth by seminal ribonuclease // *Cancer Res.* – 1980. – V. 40. – P. 3740–3744.
448. Kim J.S., Soucek J., Matousek J., Raines R.T. Structural basis for the biological activities of bovine seminal ribonuclease // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – P. 10525–10530.
449. Murthy B.S., Sirdeshmukh R. Sensitivity of monomeric and dimeric forms of bovine seminal ribonuclease to human placental ribonuclease inhibitor // *Biochem. J.* – 1992. – V. 281 (Pt 2). – P. 343–348.
450. Mancheño J.M., Gasset M., Oñaderra M., Gavilanes J.G., D'Alessio G. Bovine seminal ribonuclease destabilizes negatively charged membranes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – V. 199. – № 1. – P. 119–124.
451. Spalletti-Cernia D., Sorrentino R., Di Gaetano S., Arciello A., Garbi C., Piccoli R., et al. Antineoplastic ribonucleases selectively kill thyroid carcinoma cells via caspase-mediated induction of apoptosis // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – V. 88. – P. 2900–2907.
452. Antignani A., Naddeo M., Cubellis M.V., Russo A., D'Alessio G. Antitumor action of seminal ribonuclease, its dimeric structure, and its resistance to the cytosolic ribonuclease inhibitor // *Biochemistry.* – 2001. – V. 40. – P. 3492–3496.

453. Marinov I., Soucek J. Bovine seminal ribonuclease induces in vitro concentration dependent apoptosis in stimulated human lymphocytes and cells from human tumor cell lines // *Neoplasma*. – 2000. – V. 47. – P. 294–298.
454. Michaelis M., Matousek J., Vogel J.U., Slavik T., Langer K., Cinatl J., et al. Bovine seminal ribonuclease attached to nanoparticles made of polylactic acid kills leukemia and lymphoma cell lines in vitro // *Anticancer Drugs*. – 2000. – V. 11. – № 5. – P. 369–376.
455. Soucek J., Poucková P., Zadinová M., Hlousková D., Plocová D., Strohalm J., et al. Polymer conjugated bovine seminal ribonuclease inhibits growth of solid tumors and development of metastases in mice // *Neoplasma*. – 2001. – V. 48. – № 2. – P. 127–132.
456. Yoshida H. The ribonuclease T1 family // *Methods Enzymol.* – 2001. – P. 341: 28–41.
457. Kao R., Shea J.E., Davies J., Holden D.W. Probing the active site of mitogillin, a fungal ribotoxin // *Mol. Microbiol.* – 1998. – V. 29. – № 4. – P. 1019–1027.
458. Olmo N., Turnay J., de Buitrago G.G., de Silanes I.L., Gavilanes J.G., Lizarbe M.A. Cytotoxic mechanism of the ribotoxin asarcin induction of cell death via apoptosis // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – V. 268. – P. 2113–2123.
459. Lacadena J., Alvarez-Garcia E., Carreras-Sangra N., Herrero-Galan E., Alegre-Cebollada J., Garcia-Ortega L., et al. Fungal ribotoxins: molecular dissection of a family of natural killers // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2007. – V. 31. – P. 212–237.
460. Rutkoski T.J., Raines R.T. Evasion of ribonuclease inhibitor as a determinant of ribonuclease cytotoxicity // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2008. – V. 9. – P. 185–189.
461. Aphanasenko G.A., Dudkin S.M., Kaminir L.B., Leshchinskaya I.B., Severin E.S. Primary structure of ribonuclease from *Bacillus intermedius* 7P // *FEBS Lett.* – 1979. – V. 97. – P. 77–80.
462. Hartley R.W., Barker E.A. Amino-acid sequence of extracellular ribonuclease (barnase) of *Bacillus amyloliquefaciens* // *Nature*. – 1972. – V. 235. – P. 15–16.
463. Edelweiss E., Balandin T.G., Ivanova J.L., Lutsenko G.V., Leonova O.G., Popenko V.I., et al. Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells // *PLoS ONE*. – 2008. – V. 3. – P. e2434.
464. Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. Antitumor activity and toxicity of anti-HER2 immunoRNase scFv 4D5-dibarnase in mice bearing human breast cancer xenografts // *Invest. New Drugs*. – 2011. – V. 29. – P. 22–32.
465. Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. Protein-assisted self-assembly of multifunctional nanoparticles // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2010. – V. 107. – P. 5827–5832.
466. Prior T., Kunwar S., Pastan I. Studies on the activity of barnase toxins in vitro and in vivo // *Bioconjugate Chem.* – 1996. – V. 7. – P. 23–29.
467. Mitkevich V.A., Burnysheva K.M., Ilinskaya O.N., Pace C.N., Makarov A.A. Cytotoxicity of RNase Sa to the acute myeloid leukemia Kasumi-1 cells depends on the net charge // *Oncoscience*. – 2014. – V. 1. – № 11. – P. 738–744.
468. Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Y., Burnysheva K.M., Sosin D.V., Simonenko O.V., et al. Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells // *Biochimie*. – 2013. – V. 95. – № 6. – P. 1344–1349.
469. Garipov A.R., Nesmelov A.A., Cabrera-Fuentes H.A., Ilinskaya O.N. *Bacillus intermedius* ribonuclease (BINASE) induces apoptosis in human ovarian cancer cells // *Toxicon*. – 2014. – V. 92. – P. 54–59.
470. Cabrera-Fuentes H.A., Aslam M., Saffarzadeh M., Kolpakov A., Zelenikhin P., Preissner K.T., et al. Internalization of *Bacillus intermedius* ribonuclease (BINASE) induces human alveolar adenocarcinoma cell death // *Toxicon*. – 2013. – V. 69. – P. 219–226.

471. Zhou W.-W., Niu T.-G. Purification and some properties of an extracellular ribonuclease with antiviral activity against tobacco mosaic virus from *Bacillus cereus* // *Biotechnol. Lett.* – 2009. – V. 31. – P. 101–105.
472. Madan T., Arora N., Sarma P.U. Ribonuclease activity dependent cytotoxicity of Asp fl, a major allergen of *A. fumigatus* // *Mol. Cell. Biochem.* – 1997. – V. 175. – P. 21–27.
473. Olson B.H., Jennings J.C., Roga V., Junek A.J., Schuurmans D.M. Alpha sarcin, a new antitumor agent // *Appl. Microbiol.* – 1965. – V. 13. – № 3. – P. 322–326.
474. Conde F.P., Orlandi R., Canevari S., Mezzanzanica D., Ripamonti M., Muroz S.M., et al. The *Aspergillus* toxin restrictocin is a suitable cytotoxic agent for generation of immunoconjugates with monoclonal antibodies directed against human carcinoma cells // *Eur. J. Biochem.* – 1989. – V. 178. – P. 795–802.
475. Better M., Bernhard S.L., Lei S.-P., Fishwild D.M., Carroll S.F. Activity of recombinant mitogillin and mitogillin immunoconjugates // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. – № 23. – P. 16712–16718.
476. Hames E.E., Demir T. Microbial ribonucleases (RNases): production and application potential // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – V. 31. – P. 1853–1862.
477. Kojima K. Molecular aspects of the plasma membrane in tumor cells // *Nagoya J. Med. Sci.* – 1993. – V. 56. – № 1-4. – P. 1–18.
478. Ran S., Downes A., Thorpe P.E. Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels // *Cancer Res.* – 2002. – V. 62. – № 21. – P. 6132–6140.
479. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents // *Bioessays.* – 2008. – V. 30. – № 8. – P. 781–790.
480. Chao T.Y., Lavis L.D., Raines R.T. Cellular uptake of ribonuclease A relies on anionic glycans // *Biochemistry.* – 2010. – V. 49. – № 50. – P. 10666–10673.
481. Johnson R.J., Chao T.Y., Lavis L.D., Raines R.T. Cytotoxic ribonucleases: the dichotomy of Coulombic forces // *Biochemistry.* – 2007. – V. 46. – P. 10308.
482. Ilinskaya O.N., Koschinski A., Mitkevich V.A., Repp H., Dreyer F., Pace C.N., et al. Cytotoxicity of RNases is increased by cationization and counteracted by K<sup>+</sup> channels // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – V. 314. – P. 550–554.
483. Ильинская О.Н., Макаров А.А. Почему рибонуклеазы вызывают гибель раковых клеток // *Мол. биология.* – 2005. – V. 39. – № 1. – P. 3–13.
484. Mastronicola M.R., Piccoli R., D'Alessio G. Key extracellular and intracellular steps in the antitumor action of seminal ribonuclease // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – V. 230. – № 1. – P. 242–249.
485. Sills R.C., Boorman G.A., Neal J.E., Hong H.L., Devereux T.R. Mutations in ras genes in experimental tumours of rodents // *IARC Sci. Publ.* – 1999. – V. 146. – P. 55–86.
486. Scharovsky O.G., Rozados V.R., Gervasoni S.I., Matar P. Inhibition of ras oncogene: a novel approach to antineoplastic therapy // *J. Biomed. Sci.* – 2000. – V. 7. – № 4. – P. 292–298.
487. Haigis M.C., Raines R.T. Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway // *J. Cell Sci.* – 2003. – V. 116(Pt 2). – P. 313–324.
488. Rodriguez M., Torrent G., Bosch M., Dubremetz J.-F., Ribo M., Benito A., et al. Intracellular pathway of Onconase that enables its delivery to the cytosol // *J. Cell Sci.* – 2007. – V. 120. – P. 1405–1411.
489. Chao T.Y., Raines R.T. Mechanism of ribonuclease A endocytosis: analogies to cell-penetrating peptides // *Biochemistry.* – 2011. – V. 50. – № 39. – P. 8374–8382.
490. Wu Y.N., Mikulski S.M., Ardelt W., Ryback S.M., Youle R.J. A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – № 14. – P. 10686–10693.

491. Leland P.A., Schultz L.W., Kim B.M., Raines R.T. Ribonuclease A variant with potent cytotoxic activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1998. – V. 95. – № 18. – P. 10407–10412.
492. Naddeo M., Vitagliano L., Russo A., Gotte G., D'Alessio G., Sorrentino S. Interactions of the cytotoxic RNase A dimers with the cytosolic ribonuclease inhibitor // *FEBS Lett.* – 2005. – V. 579. – № 12. – P. 2663–2668.
493. Bracale A., Spalletti-Cernia D., Mastronicola M., Castaldi F., Mannucci R., Nitsch L., et al. Essential stations in the intracellular pathway of cytotoxic bovine seminal ribonuclease // *Biochem. J.* – 2002. – V. 362. – № 3. – P. 553–560.
494. Liao Y.D., Huang H.C., Chan H.J., Kuo S.J. Large-scale preparation of a ribonuclease from *Rana catesbeiana* (bullfrog) oocytes and characterization of its specific cytotoxic activity against tumor cells // *Protein Exp. Purif.* – 1996. – V. 7. – № 2. – P. 194–202.
495. Saxena S., Gravell M., Mikulski S.M., Shogen K., Ardelt W., Youle R.J. Inhibition of HIV-1 production and selective degradation of viral RNA by an amphibian ribonuclease // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – № 34. – P. 20783–20788.
496. Iordanov M.S., Ryabinina O.P., Wong J., Dinh T.H., Newton D.L., Rybak S.M., et al. Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease Onconase: evidence for cytotoxic mechanisms different from inhibition of protein synthesis // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – № 7. – P. 1983–1994.
497. Benito A., Ribo M., Vilanova M. On the track of antitumour ribonucleases // *Mol. Biosyst.* – 2001. – V. 1. – № 4. – P. 294–302.
498. Sorrentino S., Naddeo M., Russo A., D'Alessio G. Degradation of double-stranded RNA by human pancreatic ribonuclease: crucial role of noncatalytic basic amino acid residues // *Biochemistry.* – 2003. – V. 42. – № 34. – P. 10182–10190.
499. Blaszczyk J., Gan J., Tropea J.E., Court D.L., Waugh D.S., Ji X. Noncatalytic assembly of ribonuclease III with double-stranded RNA // *Structure.* – 2004. – V. 12. – № 3. – P. 457–466.
500. Deptala A., Halicka K.D., Ardelt B., Ardelt W., Mikulski S.M., Shogen K., et al. Potentiation of tumor necrosis factor induced apoptosis by onconase // *Int. J. Oncol.* – 1998. – V. 13. – № 1. – P. 11–16.
501. Iordanov M.S., Wong J., Newton D.L., Ryback S.M., Bright R.K., Flavell R.A., et al. Differential requirement for the stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase in RNA damage-induced apoptosis in primary and in immortalized fibroblasts // *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* – 2000. – V. 4. – № 2. – P. 122–128.
502. Grabarek J., Ardelt B., Du L., Darzynkiewicz Z. Activation of caspases and serine proteases during apoptosis induced by Onconase (Ranpirnase) // *Exp. Cell Res.* – 2000. – V. 278. – № 1. – P. 61–71.
503. Castro J., Ribo M., Navarro S., Nogués M.V., Vilanova M., Benito A. A human ribonuclease induces apoptosis associated with p21WAF1/CIP1 induction and JNK inactivation // *BMC Cancer.* – 2011. – V. 11. – P. 9.
504. Chang C.H., Gupta P., Michel R., Loo M., Wang Y., Cardillo T.M. Ranpirnase (frog RNase) targeted with a humanized, internalizing, anti-Trop-2 antibody has potent cytotoxicity against diverse epithelial cancer cells // *Mol. Cancer Ther.* – 2010. – V. 9. – P. 2276–2286.
505. Rybak S.M., Arndt M.A., Schirrmann T., Dübel S., Krauss J. Ribonucleases and immunoRNases as anticancer drugs // *Curr. Pharm. Des.* – 2009. – V. 15. – P. 2665–2675.
506. Beck A.K., Pass H.I., Carbone M., Yang H. Ranpirnase as a potential antitumor ribonuclease treatment for mesothelioma and other malignancies // *Future Oncol.* – 2008. – V. 4. – P. 341–349.
507. Ardelt B., Juan G., Burfeind P., Salomon T., Wu J.M., Hsieh T.C. Onconase, an antitumor ribonuclease suppresses intracellular oxidative stress // *Int. J. Oncol.* – 2007. – V. 31. – P. 663–669.

508. Ardelt W., Ardelt B., Darzynkiewicz Z. Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy // *Eur. J. Pharmacol.* – 2009. – V. 625. – P. 181–189.
509. Goparaju C.M., Blasberg J.D., Volinia S., Palatini J., Ivanov S., Donington J.S., et al. Onconase mediated NF $\kappa$ B downregulation in malignant pleural mesothelioma // *Oncogene.* – 2011. – V. 30. – P. 2767–2777.
510. Kim J.S., Soucek J., Matousek J., Raines R.T. Mechanism of ribonuclease cytotoxicity // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – P. 31097–31102.
511. Mitkevich V.A., Tchurikov N.A., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Y., Makarov A.A., Ilinskaya O.N. Binase cleaves cellular noncoding RNAs and affects coding mRNAs // *FEBS J.* – 2010. – V. 277. – P. 186–196.
512. Saxena A., Saxena S.K., Shogen K. Effect of onconase on double-stranded RNA in vitro // *Anticancer Res.* – 2009. – V. 29. – P. 1067–1071.
513. Zhao H., Ardelt B., Ardelt W., Shogen K., Darzynkiewicz Z. The cytotoxic ribonuclease onconase targets RNA interference (siRNA) // *Cell Cycle.* – 2008. – V. 7. – P. 3258–3261.
514. Suck D. DNA recognition by DNase I // *J. Mol. Recognit.* – 1994. – V. 7. – № 2. – P. 65–70.
515. Napirei M., Karsunky H., Zevnik B., Stephan H., Mannherz H.G., Moroy T. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice // *Nat. Genetics.* – 2000. – V. 25. – P. 177–181.
516. Napirei M., Wulf S., Mannherz H.G. Chromatin breakdown during necrosis by serum Dnase1 and the plasminogen system // *Arthritis Rheum.* – 2004. – P. 50. – P. 1873–1883.
517. Lacks S.A. Deoxyribonuclease I in mammalian tissues. Specificity of inhibition by actin // *J. Biol. Chem.* – 1981. – V. 256. – P. 2644–2648.
518. Delamirande G. Action of deoxyribonuclease and ribonuclease on growth of Ehrlich ascites carcinoma in mice // *Nature.* – 1961. – V. 192. – P. 52.
519. Belyaeva M.I., Kyune M.F., Nuzhina A.M. Effect of bacterial deoxyribonuclease on Ehrlich's ascites carcinoma cells in vitro // *Fed. Proc. Transl. Suppl.* – 1964. – V. 23. – P. 345–348.
520. Salganik R.I., Martynova R.P., Matienko N.A., Ronichevskaya G.M. Effect of deoxyribonuclease on the course of lymphatic leukaemia in AKR mice // *Nature.* – 1967. – V. 214. – P. 100–102.
521. Sugihara S., Yamamoto T., Tanaka H., Kambara T., Hiraoka T., Miyauchi Y. Deoxyribonuclease treatment prevents blood-borne liver metastasis of cutaneously transplanted tumour cells in mice // *Brit. J. Cancer.* – 1993. – V. 67. – P. 66–70.
522. Karli R. DNase1: a new personalized therapy for cancer? // *Exp. Rev. Anticancer Ther.* – 2011. – V. 11. – № 7. – P. 981–984.
523. Schulga A., Kurbanov F., Kirpichnikov M., Protasevich I., Lobachov V., Ranjbar B., et al. Comparative study of binase and barnase: experience in chimeric ribonucleases // *Protein Eng.* – 1998. – V. 11. – P. 775–782.
524. Varkonyi-Gasic E., Wu R., Wood M., Walton E.F., Hellens R.P. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs // *Plant Methods.* – 2007. – V. 3. – P. 12.
525. Kong W., Yen J.H., Ganea D. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation, inhibits antigen-specific Th1/Th17 differentiation and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis // *Brain Behav. Immun.* – 2011. – V. 25. – P. 872–882.
526. Begum-Haque S., Sharma A., Kasper I.R., Foureau D.M., Mielcarz D.W., Haque A., et al. Downregulation of IL-17 and IL-6 in the central nervous system by glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis // *J. Neuroimmunol.* – 2008. – V. 204. – P. 58–65.

527. Schmittgen T.D., Jiang J., Liu Q., Yang L. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – P. e43.
528. Каледин В.И., Николин В.П., Агеева Т.А., Тимофеева О.А., Филипенко М.Л., Роничевская Г.М. и др. Циклофосфамид-индуцированный апоптоз клеток мышинной лимфосаркомы в условиях *in vivo* // *Вопр. онкологии.* – 2000. – Т. 46. – № 5. – С. 588–593.
529. Каледин В.И., Поляченко В.М. Новый перевиваемый штамм мышинной гепатомы («гепатома А») // *Экспериментальные животные в медицинских исследованиях.* – 1974. – С. 50–52.
530. Silberklang M., Gillum A.M., RhajBhandary U.L. Use of *in vitro* <sup>32</sup>P labeling in the sequence analysis of nonradioactive tRNAs // *Methods Enzymol.* – 1979. – V. 59. – P. 58–109.
531. Tamkovich S.N., Laktionov P.P., Rykova E.Y., Vlassov V.V. Simple and rapid procedure suitable for quantitative isolation of low and high molecular weight extracellular nucleic acids // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* – 2004. – V. 23. – № 6-7. – P. 873–877.
532. Labarca C., Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure // *Annal Biochem.* – 1980. – V. 102. – № 2. – P. 344–352.
533. Tomayko M.M., Reynolds C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 1989. – V. 24. – № 3. – P. 148–154.
534. Ozono S., Miyao N., Igarashi T., Marumo K., Nakazawa H., Fukuda M., et al. Tumor doubling time of renal cell carcinoma measured by CT: collaboration of Japanese Society of renal cancer // *Jpn. J. Clin. Oncol.* – 2004. – V. 34. – P. 82–85.
535. Engel A., Chatterjee S.K., Al-arifi A., Riemann D., Langner J., Nuhn P. Influence of spacer length on interaction of mannosylated liposomes with human phagocytic cells // *Pharm Res.* – 2003. – V. 20. – № 1. – P. 51–57.
536. Park J.G., Kramer B.S., Steinberg S.M., Carmichael J., Collins J.M., Minna J.D., et al. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay // *Cancer Res.* – 1987. – V. 47. – № 22. – P. 5875–5879.
537. Ting R., Thomas J.M., Lerner L., Perrin D.M. Substrate specificity and kinetic framework of a DNAzyme with an expanded chemical repertoire: a putative RNaseA mimic that catalyzes RNA hydrolysis independent of a divalent metal cation // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – № 22. – P. 6660–6672.
538. Trapnell C., Roberts A., Goff L., Pertea G., Kim D., Kelley D.R., et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks // *Nat. Protocols.* – 2012. – V. 7. – № 3. – P. 562–578.
539. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33. – P. e179.
540. Liang C.C., Park A.Y., Guan J.L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro* // *Nat. Protocols.* – 2007. – V. 2. – P. 329–333.
541. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics.* – 2014. – V. 30. – P. 2114–2120.
542. Palucka K., Ueno H., Fay J., Banchereau J. Dendritic cells and immunity against cancer // *J. Intern. Med.* – 2011. – V. 269. – P. 64–73.
543. Bajaj A., Mishra S., Kondaiah P., Bhattacharya S. Effect of the headgroup variation on the gene transfer properties of cholesterol based cationic lipids possessing ether linkage // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – V. 1778. – P. 1222–1236.

544. Ciania L., Ristori S., Salvati A., Calamai L., Martini G. DOTAP/DOPE and DC-Chol/DOPE lipoplexes for gene delivery: zeta potential measurements and electron spin resonance spectra // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – V. 1664. – P. 70–79.
545. Gao S., Chen J., Dong L., Ding Z., Yang Y.-H., Zhang J. Targeting delivery of oligonucleotide and plasmid DNA to hepatocyte via galactosylated chitosan vector // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2005. – V. 60. – P. 327–334.
546. Maslov M.A., Kabilova T.O., Petukhov I.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A., Vlassov V.V., et al. Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA // *J. Control Release.* – 2012. – V. 160. – № 2. – P. 182–193.
547. Kirby A.J., Camilleri P., Engberts J.B.F.N., Feiters M.C., Nolte R.J.M., et al. Gemini surfactants: new synthetic vectors for gene transfection // *Angew Chem. Int. Ed.* – 2003. – V. 42. – P. 1448–1457.
548. Martinez-Pomares L. The mannose receptor // *J. Leukoc. Biol.* – 2012. – V. 92. – № 6. – P. 1177–1186.
549. Perche F., Gosset D., Mével M., Miramon M.L., Yaouanc J.J., Pichon C., et al. Selective gene delivery in dendritic cells with mannosylated and histidylated lipopolyplexes // *J. Drug Target.* – 2011. – V. 19. – № 5. – P. 315–325.
550. Carrillo-Conde B., Song E.H., Chavez-Santoscoy A., Phanse Y., Ramer-Tait A.E., Pohl N.L., et al. Mannose-functionalized "pathogen-like" polyanhydride nanoparticles target C-type lectin receptors on dendritic cells // *Mol. Pharm.* – 2011. – V. 8. – № 5. – P. 1877–1886.
551. Pichon C., Midoux P. Mannosylated and histidylated LPR technology for vaccination with tumor antigen mRNA // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – V. 969. – P. 247–274.
552. Tang C.K., Lodding J., Minigo G., Pouniotis D.S., Plebanski M., Scholzen A., et al. Mannan-mediated gene delivery for cancer immunotherapy // *Immunology.* – 2007. – V. 120. – № 3. – P. 325–335.
553. Mauceri A., Borocci S., Galantini L., Giansanti L., Mancini G., Martino A., et al. Recognition of concanavalin A by cationic glucosylated liposomes // *Langmuir.* – 2014. – V. 30. – № 38. – P. 11301–11306.
554. Muller C.D., Schuber F. Neo-mannosylated liposomes: synthesis and interaction with mouse Kupffer cells and resident peritoneal macrophages // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1989. – V. 986. – № 1. – P. 97–105.
555. Palucka K., Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells // *Nat. Rev. Cancer.* – 2012. – V. 12. – P. 265–277.
556. Lonz C., Vandenbranden M., Ruyschaert J.M. Cationic lipids activate intracellular signaling pathways // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2012. – V. 64. – P. 1749–1758.
557. McNeil S.E., Vangala A., Bramwell V.W., Hanson P.J., Perrie Y. Lipoplexes formulation and optimisation: in vitro transfection studies reveal no correlation with in vivo vaccination studies // *Curr. Drug Deliv.* – 2010. – V. 7. – № 2. – P. 175–187.
558. Ahmed M.S., Bae Y.S. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: past, present and future // *Clin. Exp. Vaccine Res.* – 2014. – V. 3. – P. 113–116.
559. Palucka K., Banchereau J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines // *Immunity.* – 2013. – V. 39. – P. 38–48.
560. Xie J., Xiong L., Tao X., Li X., Su Y., Hou X., et al. Antitumor effects of murine bone marrow-derived dendritic cells infected with xenogeneic livin alpha recombinant adenoviral vectors against Lewis lung carcinoma // *Lung Cancer.* – 2010. – V. 68. – P. 338–345.

561. Pandey V.K., Shankar B.S., Sanis K.B. G1-4 A, an arabinogalactan polysaccharide from *Tinospora cordifolia* increases dendritic cell immunogenicity in a murine lymphoma model // *Int. Immunopharmacol.* – 2012. – V. 14. – P. 641–649.
562. Oda Y., Suzuki R., Otake S., Nishiie N., Hirata K., Koshima R., et al. Prophylactic immunization with Bubble liposomes and ultrasound-treated dendritic cells provided a four-fold decrease in the frequency of melanoma lung metastasis // *J. Control Release.* – 2012. – V. 160. – P. 362–366.
563. Matheoud D., Perié L., Hoeffel G., Vimeux L., Parent I., Marañón C., et al. Cross-presentation by dendritic cells from live cells induces protective immune responses in vivo // *Blood.* – 2010. – V. 115. – P. 4412–4420.
564. Rizzo M.M., Alaniz L., Mazzolini G. Ex vivo loading of autologous dendritic cells with tumor antigens // *Methods Mol. Biol.* – 2014. – V. 1139. – P. 41–44.
565. Pan K., Zhao J.J., Wang H., Li J.J., Liang X.T., Sun J.C., et al. Comparative analysis of cytotoxic T lymphocyte response induced by dendritic cells loaded with hepatocellular carcinoma-derived RNA or cell lysate // *Int. J. Biol. Sci.* – 2010. – V. 6. – P. 639–648.
566. Medin J.A., Liang S.B., Hou J.W., Kelley L.S., Peace D.J., Fowler D.H. Efficient transfer of PSA and PSMA cDNAs into DCs generates antibody and T cell antitumor responses in vivo // *Cancer Gene Ther.* – 2005. – V. 12. – P. 540–551.
567. Metharom P., Ellem K.A., Schmidt C., Wei M.Q. Lentiviral vector-mediated tyrosinase-related protein 2 gene transfer to dendritic cells for the therapy of melanoma // *Hum. Gene Ther.* – 2001. – V. 12. – P. 2203–2213.
568. Andre F., Mir L.M. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications // *Gene Ther.* – 2004. – V. 11. – P. 33–42.
569. Chen D., Koropatnick J., Jiang N., Zheng X., Zhang X., Wang H.K., et al. Targeted siRNA silencing of indoleamine 2, 3-dioxygenase in antigen-presenting cells using mannose-conjugated liposomes: a novel strategy for treatment of melanoma // *J. Immunother.* – 2014. – V. 37. – P. 123–134.
570. Lu Y., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M. Development of an antigen-presenting cell-targeted DNA vaccine against melanoma by mannosylated liposomes // *Biomaterials.* – 2007. – V. 28. – P. 3255–3262.
571. Mendoza L., Bubeník J., Símová J., Jandlová T., Vonka V., Mikysková R. Prophylactic, therapeutic and anti-metastatic effects of BMDC and DC lines in mice carrying HPV 16-associated tumours // *Int. J. Oncol.* – 2003. – V. 23. – P. 243–247.
572. Vietsch E.E., van Eijck C.H., Wellstein A. Circulating DNA and micro-RNA in patients with pancreatic cancer // *Pancreat. Disord. Ther.* – 2015. – V. 5. – P. 156.
573. El Messaoudi S., Mouliere F., Du Manoir S., Bascoul-Mollevi C., Gillet B., Nouaille M., et al. Circulating DNA as a strong multimarker prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care // *Clin. Cancer Res.* – 2016. – V. 22. – P. 3067–3077.
574. Akiyama S., Fojo A., Hanover J.A., Pastan I., Gottesman M.M. Isolation and genetic characterization of human KB cell lines resistant to multiple drugs // *Somat. Cell Mol. Genet.* – 1985. – V. 11. – № 2. – P. 117–126.
575. Matousek J. Ribonucleases and their antitumor activity // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* – 2001. – V. 129. – P. 175–191.
576. Trejo-Becerril C., Pérez-Cardenas E., Gutiérrez-Díaz B., De La Cruz-Sigüenza D., Taja-Chayeb L., González-Ballesteros M., et al. Antitumor effects of s DNase I and proteases in an in vivo model // *Integr. Cancer Ther.* – 2016. – V. 4. – P. 1–9.

577. Mironova N.L., Pyshnyi D.V., Ivanova E.M., Zenkova M.A., Gross H.J., Vlassov V.V. Covalently attached oligodeoxyribonucleotides induce RNase activity of a short peptide and modulate its base specificity // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – № 6. – P. 1928–1936.
578. Mironova N.L., Petrushanko I.Y., Patutina O.A., Sen'kova A.V., Simonenko O.V., Mitkevich V.A., et al. Ribonuclease binase inhibits primary tumor growth and metastases via apoptosis induction in tumor cells // *Cell Cycle.* – 2013. – V. 12. – № 13. – P. 2120–2131.
579. Sen'kova A.V., Mironova N.L., Patutina O.A., Mitkevich V.A., Markov O.V., Petrushanko I.Y., et al. Ribonuclease binase decreases destructive changes of the liver and restores its regeneration potential in mouse lung carcinoma model // *Biochimie.* – 2014. – V. 101. – P. 256–9.
580. Leland P.A., Raines R.T. Cancer chemotherapy–ribonucleases to the rescue // *Chem. Biol.* – 2001. – V. 8. – P. 405–413.
581. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets // *FEBS Lett.* – 2003. – V. 540. – P. 15–20.
582. Konicek B.W., Stephens J.R., McNulty A.M., Robichaud N., Peery R.B., Dumstorf C.A., et al. Therapeutic inhibition of MAP kinase interacting kinase blocks eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and suppresses outgrowth of experimental lung metastases // *Cancer Res.* – 2011. – V. 71. – P. 1849–1857.
583. Kandala P.K., Srivastava S.K. Regulation of macroautophagy in ovarian cancer cells in vitro and in vivo by controlling glucose regulatory protein 78 and AMPK // *Oncotarget.* – 2012. – V. 3. – P. 435–449.
584. Guo K., Tang J.P., Jie L., Al-Aidaros A.Q., Hong C.W., Tan C.P., et al. Engineering the first chimeric antibody in targeting intracellular PRL-3 oncoprotein for cancer therapy in mice // *Oncotarget.* – 2012. – V. 3. – P. 158–171.
585. Eccles S.A., Massey A., Raynaud F.I., Sharp S.Y., Box G., Valenti M., et al. NVP-AUY922: a novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis // *Cancer Res.* – 2008. – V. 68. – P. 2850–2860.
586. Laccetti P., Spalletti-Cernia D., Portella G., De Corato P., D'Alessio G., Vecchio G. Seminal ribonuclease inhibits tumor growth and reduces the metastatic potential of Lewis lung carcinoma // *Cancer Res.* – 1994. – V. 54. – P. 4253–4256.
587. Jonuleit H., Kühn U., Müller G., Steinbrink K., Paragnik L., Schmitt E., et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions // *Eur. J. Immunol.* – 1997. – V. 27. – № 12. – P. 3135–3142.
588. Akira S., Taga T., Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine // *Adv. Immunol.* – 1993. – V. 54. – P. 1–78.
589. Dieu M.C., Vanbervliet B., Vicari A., Bridon J.M., Oldham E., Ait-Yahia S., et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites // *J. Exp. Med.* – 1998. – V. 188. – P. 373–386.
590. Maldonado-López R., De Smedt T., Michel P., Godfroid J., Pajak B., Heirman C., et al. CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> and CD8 $\alpha$ <sup>–</sup> subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo // *J. Exp. Med.* – 1999. – V. 189. – P. 587–592.
591. Dunn G., Koebel C., Schreiber R. Interferons, immunity and cancer immunoediting // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – V. 6. – P. 836–848.
592. Mantovani A., Pierotti M.A. Cancer and inflammation: A complex relationship // *Cancer Lett.* – 2008. – V. 267. – P. 180–181.
593. Stanley E.R., Berg K.L., Einstein D.B., Lee P.S., Pixley F.J., Wang Y., et al. Biology and action of colony-stimulating factor-1 // *Mol. Reprod. Dev.* – 1997. – V. 46. – P. 4–10.

594. Jansen J.H., Kluin-Nelemans J.C., Van Damme J., Wientjens G.J., Willemze R., Fibbe W.E. Interleukin 6 is a permissive factor for monocytic colony formation by human hematopoietic progenitor cells // *J. Exp. Med.* – 1992. – V. 175. – P. 1151–1154.
595. Suzuki M., Ohwada M., Sato I., Nagatomo M. Serum level of macrophage colony-stimulating factor as a marker for gynecologic malignancies // *Oncology.* – 1995. – V. 52. – P. 128–133.
596. Seguchi T., Yokohawa K., Sugao H., Nakano E., Sonoda T., Okuyama A. Interleukin-6 activity in urine and serum in patients with bladder carcinoma // *J. Urol.* – 1992. – V. 148. – P. 791–794.
597. Yoshida N., Ikemoto S., Narita K., Sugimura K., Wada S., Yasumoto R., et al. Interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin-1beta in patients with renal carcinoma // *Br. J. Cancer.* – 2002. – V. 86. – P. 1396–1400.
598. Herberhold S., Coch C., Zillinger T., Hommertgen B., Busch N., Schuberth C., et al. Delivery with polycations extends the immunostimulant Ribomunyl into a potent antiviral Toll-like receptor 7/8 agonist // *Antivir. Ther.* – 2011. – V. 16. – № 5. – P. 751–758.
599. Kabilova T.O., Sen'kova A.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Zenkova M.A., Vlassov V.V., et al. Antitumor and antimetastatic effect of small immunostimulatory RNA against B16 melanoma in mice // *PLoS ONE.* – 2016. – V. 11. – № 3. – P. e0150751.
600. Scheel B., Teufel R., Probst J., Carralot J.P., Geginat J., Radsak M., et al. Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA // *Eur. J. Immunol.* – 2005. – V. 35. – № 5. – P. 1557–1566.
601. Qiao M., Zu L.D., He X.H., Shen R.L., Wang Q.C., Liu M.F. Onconase downregulates microRNA expression through targeting microRNA precursors // *Cell Res.* – 2012. – V. 22. – P. 1199–1202.
602. Haigis M.C., Kurten E.L., Raines R.T. Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 3. – P. 1024–1032.
603. Saxena S.K., Sirdeshmukh R., Ardelt W., Mikulski S.M., Shogen K., Youle R.J. Entry into cells and selective degradation of tRNAs by a cytotoxic member of the RNase A family // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 15142–15146.
604. Notomista E., Mancheño J.M., Crescenzi O., Di Donato A., Gavilanes J., D'Alessio G. The role of electrostatic interactions in the antitumor activity of dimeric RNases // *FEBS J.* – 2006. – V. 273. – P. 3687–3697.
605. Ilinskaya O.N., Koschinski A., Repp H., Mitkevich V.A., Dreyer F., Scholtz J.M., et al. RNase-induced apoptosis: fate of calcium-activated potassium channels // *Biochimie.* – 2008. – V. 90. – P. 717–725.
606. Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G. Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase) // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2016. – V. 1863(7 Pt A). – P.1559–1567.
607. Iordanov M.S., Paranjape J.M., Zhou A., Wong J., Williams B.R., Meurs E.F., et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase by double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus: involvement of RNase L, protein kinase R, and alternative pathways // *Mol. Cell Biol.* – 2000. – V. 20. – P. 617–627.
608. Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation // *Science.* – 2009. – V. 324. – P. 1029–1033.
609. Chakrabarti G., Gerber D.E., Boothman D.A. Expanding antitumor therapeutic windows by targeting cancer-specific nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-biogenesis pathways // *Clin. Pharmacol.* – 2015. – V. 7. – P. 57–68.

610. Vert A., Castro J., Ribo M., Benito A., Vilanova M. A nuclear-directed human pancreatic ribonuclease (PE5) targets the metabolic phenotype of cancer cells // *Oncotarget*. – 2016. – V. 7. – P. 18309–18324.
611. Wadham C., Gamble J.R., Vadas M.A., Khew-Goodall Y. Translocation of protein tyrosine phosphatase Pez/PTPD2/PTP36 to the nucleus is associated with induction of cell proliferation // *J. Cell Sci.* – 2000. – V. 113. – P. 3117–3123.
612. Wyatt L., Wadham C., Crocker L.A., Lardelli M., Khew-Goodall Y. The protein tyrosine phosphatase Pez regulates TGFbeta, epithelial-mesenchymal transition, and organ development // *J. Cell Biol.* – 2007. – V. 178. – P. 1223–1235.
613. Banerjee S., Li G., Li Y., Gaughan C., Baskar D., Parker Y., et al. RNase L is a negative regulator of cell migration // *Oncotarget*. – 2015. – V. 6. – P. 44360–44372.
614. Dayal S., Zhou J., Manivannan P., Siddiqui M.A., Ahmad O.F., Clark M., et al. RNase L suppresses androgen receptor signaling, cell migration and matrix metalloproteinase in prostate cancer cells // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – V. 18. – P. pii: E529.
615. Smirnoff P., Roiz L., Angelkovitch B., Schwartz B., Shoseyov O. A recombinant human RNASET2 glycoprotein with antitumorigenic and antiangiogenic characteristics // *Cancer*. – 2006. – V. 107. – P. 2760–2769.
616. Roiz L., Smirnoff P., Bar-Eli M., Schwartz B., Shoseyov O. ACTIBIND, a fungal T2-RNase with antiangiogenic and anticarcinogenic characteristics // *Cancer*. – 2006. – V. 106. – P. 2295–2308.
617. Lualdi M., Pedrini E., Rea K., Monti L., Scaldaferrri D., Gariboldi M., et al. Pleiotropic modes of action in tumor cells of RNASET2, an evolutionary highly conserved extracellular RNase // *Oncotarget*. – 2015. – V. 6. – P. 7851–7865.
618. Jenkins B.J. Transcriptional regulation of pattern recognition receptors by Jak/STAT signaling, and the implications for disease pathogenesis // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2014. – V. 34. – P. 750–758.
619. Kiss-Toth E., Bagstaff S.M., Sung H.Y., Jozsa V., Dempsey C., Caunt J.C., et al. Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 42703–42708.
620. Heron-Milhavet L., Khouya N., Fernandez A., Lamb N.J. Akt1 and Akt2: differentiating the action // *Histol. Histopathol.* – 2011. – V. 26. – P. 651–662.
621. Tesser-Gamba F., Petrilli A.S., de Seixas Alves M.T., Filho R.J., Juliano Y., Toledo S.R. MAPK7 and MAP2K4 as prognostic markers in osteosarcoma // *Hum. Pathol.* – 2012. – V. 43. – P. 994–1002.
622. Thiery J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression // *Nature Rev. Cancer*. – 2002. – V. 2. – P. 442–454.
623. Zhan T., Rindtorff N., Boutros M. Wnt signaling in cancer // *Oncogene*. – 2017. – V. 36. – № 11. – P. 1461–1473.
624. Liu J., Bang A.G., Kintner C., Orth A.P., Chanda S.K., Ding S., et al. Identification of the Wnt signaling activator leucine-rich repeat in Flightless interaction protein 2 by a genome-wide functional analysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2005. – V. 102. – P. 1927–1932.
625. Nakanishi H., Takenaga K., Oguri K., Yoshida A., Okayama M. Morphological characteristics of tumours formed by Lewis lung carcinoma-derived cloned cell lines with different metastatic potentials: structural differences in their basement membranes formed in vivo // *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* – 1992. – V. 420. – P. 163–170.
626. Heo I., Joo C., Cho J., Ha M., Han J., Kim V.N. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA // *Mol. Cell*. – 2008. – V. 32. – P. 276–284.

627. Thornton J.E., Chang H.M., Piskounova E., Gregory R.I. Lin28-mediated control of let-7 microRNA expression by alternative TUTases Zcchc11 (TUT4) and Zcchc6 (TUT7) // *RNA*. – 2012. – V. 18. – P. 1875–1885.
628. Lee F.S., Shapiro R., Vallee B.L. Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor // *Biochemistry*. – 1989. – V. 28. – P. 225–230.
629. Kurachi K., Davie E.W., Strydom D.J., Vallee H.L. Sequence of the cDNA and gene for Angiogenin, a human angiogenic factor // *Biochemistry*. – 1985. – V. 24. – P. 5494–5499.
630. Strydom D.J., Fett J.W., Lobb R.R., Alderman E.M., Bethune J.L., Riordan J.F., et al. Amino acid sequence of tumour derived Angiogenin // *Biochemistry*. – 1985. – V. 24. – P. 5486–5494.
631. Olson K.A., Fett J.W., French T.C., Key M.E., Vallee B.L. Angiogenin antagonists prevent tumor growth in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 1995. – V. 92. – P. 442–446.
632. Olson K.A., Byers H.R., Key M.E., Fett J.W. Prevention of human prostate metastasis in athymic mice by antisense targeting of human angiogenin // *Clin. Cancer Res*. – 2001. – V. 7. – P. 3598–3605.
633. Wei S., Gao X., Du J., Su J., Xu Z. Angiogenin enhances cell migration by regulating stress fiber assembly and focal adhesion dynamics // *PLoS One*. – 2011. – V. 6. – P. e28797.
634. Beintema J.J., Hofsteenge J., Iwama M., Morita T., Ohgi K., et al. Amino acid sequence of the nonsecretory ribonuclease of human urine // *Biochemistry*. – 1988. – V. 27. – P. 4530–4538.
635. Bond M.D., Vallee B.L. Isolation and sequencing of mouse angiogenin DNA // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 1990. – V. 171. – P. 988–995.
636. Vallee B.L., Riordan J.F. Organogenesis and angiogenin // *Cell Mol. Life Sci*. – 1997. – V. 53. – P. 803–815.
637. Tello-Montoliu A., Patel J.V., Lip G.Y. Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications // *J. Thromb. Haemost*. – 2006. – V. 4. – P. 1864–1874.
638. Shapiro R., Vallee B.L. Site-directed mutagenesis of histidine-13 and histidine-114 of human angiogenin. Alanine derivatives inhibit angiogenin-induced angiogenesis // *Biochemistry*. – 1989. – V. 28. – P. 7401–7408.
639. Lu J., Qian J., Chen F., Tang X., Li C., Cardoso W.V. Differential expression of components of the microRNA machinery during mouse organogenesis // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2005. – V. 334. – P. 319–323.
640. Barbarotto E., Schmittgen T.D., Calin G.A. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile // *Int. J. Cancer*. – 2008. – V. 122. – P. 969–977.
641. Johnson S.M., Grosshans H., Shingara J., Byrom M., Jarvis R., Cheng A., et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family // *Cell*. – 2005. – V. 120. – P. 635–647.
642. Trang P., Medina P.P., Wiggins J.F., Ruffino L., Kelnar K., Homer R., et al. Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA // *Oncogene*. – 2009. – V. 29. – P. 1580–1587.
643. Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K., Tomida S., Osada H., Endoh H., et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival // *Cancer Res*. – 2004. – V. 64. – P. 3753–3756.
644. Widschwendter M., Jones P.A. DNA methylation and breast carcinogenesis // *Oncogene*. – 2002. – V. 35. – P. 5462–5482.
645. Johnson P.J., Lo Y.M. Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease // *Clin. Chem*. – 2002. – V. 48. – P. 1186–1193.
646. Anker P., Mulcahy H., Chen X.Q., Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients // *Cancer Metastasis Rev*. – 1999. – V. 18. – P. 65–73.

647. Taback B., O'Day S.J., Hoon D.S. Quantification of circulating DNA in the plasma and serum of cancer patients // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 2004. – V. 1022. – P. 17–24.
648. Taback B., Hoon D.S. Circulating nucleic acids and proteomics of plasma/serum: clinical utility // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 2004. – V. 1022. – P. 1–8.
649. Lee T.H., Chennakrishnaiah S., Audemard E., Montermini L., Meehan B., Rak J. Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2014. – V. 451. – P. 295–301.
650. Casadio V., Calistri D., Salvi S., Gunelli R., Carretta E., Amadori D., et al. Urine cell-free DNA integrity as a marker for early prostate cancer diagnosis: a pilot study // *Biomed. Res. Int.* – 2013. – V. 2013. – P. 270457.
651. Salvi S., Gurioli G., Martignano F., Foca F., Gunelli R., Cicchetti G., et al. Urine cell-free DNA integrity analysis for early detection of prostate cancer patients // *Dis. Markers.* – 2015. – V. 2015. – P. 574120.
652. Winter N., Neumann A., Bullerdiek J. Cell-free DNA in amniotic fluid remains to be attached to HMGA2-implications for noninvasive prenatal diagnosis // *Prenat. Diagn.* – 2008. – V. 28. – P. 1126–1130.
653. Qin J., Alt J.R., Hunsley B.A., Williams T.L., Fernando M.R. Stabilization of circulating tumor cells in blood using a collection device with a preservative reagent // *Cancer Cell. Int.* – 2014. – V. 14. – P. 23.
654. Stroun M., Anker P., Maurice P., Lyautey J., Lederrey C., Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients // *Oncology.* – 1989. – V. 46. – P. 318–322.
655. Gautschi O., Bigosch C., Huegli B., Jermann M., Marx A., Chassé E., et al. Circulating deoxyribonucleic acid as prognostic marker in nonsmall-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy // *J. Clin. Oncol.* – 2004. – V. 22. – P. 4157–4164.
656. Schwarzenbach H., Chun F.K., Lange I., Carpenter S., Gottberg M., Erbersdobler A., et al. Detection of tumor-specific DNA in blood and bone marrow plasma from patients with prostate cancer // *Int. J. Cancer.* – 2007. – V. 120. – P. 1465–1471.
657. Hao T.B., Shi W., Shen X.J., Qi J., Wu X.H., Wu Y., et al. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer // *Br. J. Cancer.* – 2014. – V. 111. – P. 1482–1489.
658. Jackson P.E., Kuang S.Y., Wang J.B., Strickland P.T., Muñoz A., Kensler T.W., et al. Prospective detection of codon 249 mutations in plasma of hepatocellular carcinoma patients // *Carcinogenesis.* – 2003. – V. 24. – P. 1657–1663.
659. El-Gayar D., El-Abd N., Hassan N., Ali R. Increased free circulating DNA integrity index as a serum biomarker in patients with colorectal carcinoma // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2016. – V. 17. – P. 939–944.
660. Iqbal S., Vishnubhatla S., Raina V., Sharma S., Gogia A., Deo S.S., et al. Circulating cell-free DNA and its integrity as a prognostic marker for breast cancer // *Springerplus.* – 2015. – V. 4. – P. 265.
661. Rawson J.B., Manno M., Mrkonjic M., Daftary D., Dicks E., Buchanan D.D., et al. Promoter methylation of Wnt antagonists DKK1 and SFRP1 is associated with opposing tumor subtypes in two large populations of colorectal cancer patients // *Carcinogenesis.* – 2011. – V. 32. – P. 741–747.
662. Zhu Y.H., Fu L., Chen L., Qin Y.R., Liu H., Xie F., et al. Downregulation of the novel tumor suppressor DIRAS1 predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma // *Cancer Res.* – 2013. – V. 73. – P. 2298–2309.

663. Ma X., Edmonson M., Yergeau D., Muzny D.M., Hampton O.A., Rusch M., et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia // *Nat. Commun.* – 2015. – V. 6. – P. 6604.
664. Gaiffe E., Pr  tet J.L., Launay S., Jacquin E., Saunier M., Hetzel G., et al. Apoptotic HPV positive cancer cells exhibit transforming properties // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – P. e36766.
665. Healy L.D., Puy C., Itakura A., Chu T., Robinson D.K., Bylund A., et al. Colocalization of neutrophils, extracellular DNA and coagulation factors during NETosis: Development and utility of an immunofluorescence-based microscopy platform // *J. Immunol. Methods.* – 2016. – V. 435. – P. 77–84.
666. Demers M., Wong S.L., Martinod K., Gallant M., Cabral J.E., Wang Y., et al. Priming of neutrophils toward NETosis promotes tumor growth // *Oncoimmunology.* – 2016. – V. 5. – P. e1134073.
667. Kostyuk S., Smirnova T., Kameneva L., Porokhovnik L., Speranskij A., Ershova E., et al. GC-rich extracellular DNA induces oxidative stress, double-strand DNA breaks, and DNA damage response in human adipose-derived mesenchymal stem cells // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2015. – V. 2015. – P. 782123.
668. Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Kolesnikova E.V., Rykova E.Y., Pyshnyi D.V., Vlassov V.V., et al. Circulating DNA and DNase activity in human blood // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 2006. – V. 1075. – P. 191–196.
669. Marchenko M.M., Kopyl'chuk H.P., Shmarakov I.O. Extracellular DNA fragments and DNase activity in blood serum of rats with transplanted Guerin's carcinoma after multiple exposures to low doses of X-irradiation. // *Ukr. Biokhim. Zh.* (1999). – 2004. – V. 76. – P. 131–135.
670. Helman E., Lawrence M.L., Stewart C., Sougnez C., Getz G., Meyerson M. Somatic retrotransposition in human cancer revealed by whole-genome and exome sequencing // *Genome Res.* – 2014. – V. 24. – P. 1053–1063.
671. Rodriguez-Martin C., Cidre F., Fernandez-Teijeiro A., Gomez-Mariano G., de la Vega L., Ramos P., et al. Familial retinoblastoma due to intronic LINE-1 insertion causes aberrant and noncanonical mRNA splicing of the RB1 gene // *J. Hum. Genet.* – 2016. – V. 7. – P. 9.
672. Roberts S.A., Lawrence M.S., Klimczak L.J., Grimm S.A., Fargo D., Stojanov P., et al. An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers // *Nat. Genet.* – 2013. – V. 45. – № 9. – P. 970–976.
673. Stacey S.N., Kehr B., Gudmundsson J., Zink F., Jonasdottir A., Gudjonsson S.A., et al. Insertion of an SVAE retrotransposon into the CASP8 gene is associated with protection against prostate cancer // *Hum. Mol. Genet.* – 2016. – V. 25. – P. 1008–1018.
674. Gallegos-Arreola M.P., Figuera L.E., Flores-Ramos L.G., Puebla-Pe  rez A.M., Zu  niga-Gonz  lez G.M. Association of the Alu insertion polymorphism in the progesterone receptor gene with breast cancer in a Mexican population // *Arch. Med. Sci.* – 2015. – V. 11. – P. 551–660.
675. Kitada K., Aikawa S., Aida S. Alu-Alu fusion sequences identified at junction sites of copy number amplified regions in cancer cell lines // *Cytogenet. Genome Res.* – 2013. – V. 139. – P. 1–8.
676. Sunami E., Vu A.T., Nguyen S.L., Giuliano A.E., Hoon D.S. Quantification of LINE1 in circulating DNA as a molecular biomarker of breast cancer // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 2008. – V. 1137. – P.171–174.
677. Lin X., Stenvang J., Rasmussen M.H., Zhu S., Jensen N.F., Tarpgaard L.S., et al. The potential role of Alu Y in the development of resistance to SN38 (Irinotecan) or oxaliplatin in colorectal cancer // *BMC Genomics.* – 2015. – V. 16. – P. 404.
678. Roman A.C., Gonzalez-Rico F.J., Fernandez-Salguero P.M. B1-SINE retrotransposons: Establishing genomic insulatory networks // *Mob. Genet. Elements.* – 2011. – V. 1. – P. 66–70.

679. Squire J.A., Pei J., Marrano P., Beheshti B., Bayani J., Lim G., et al. High-resolution mapping of amplifications and deletions in pediatric osteosarcoma by use of CGH analysis of cDNA microarrays // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2003. – V. 38. – № 3. – P. 215–225.
680. Dianxu F., Shengdao Z., Tianquan H., Yu J., Ruoqing L., Zurong Y., et al. A prospective study of detection of pancreatic carcinoma by combined plasma K-ras mutations and serum CA19-9 analysis // *Pancreas*. – 2002. – V. 25. – P. 336–341.
681. Lindfors U., Zetterquist H., Papadogiannakis N., Olivecrona H. Persistence of K-ras mutations in plasma after colorectal tumor resection // *Anticancer Res*. – 2005. – V. 25. – P. 657–661.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

**Таблица S1.** Представленность миРНК в кДНК-библиотеках L1 и L2, сконструированных на основе фракций низкомолекулярных РНК из опухолевой ткани мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора и РНКазы А, соответственно.

Score in L1	миРНК**	value_L1, RPKM*	value_L2, RPKM*	Fold change <sup>#</sup>
1	<b>mmu-mir-21a</b>	663960	1.5·10 <sup>6</sup>	2.2
2	<b>mmu-mir-451a</b>	197175	629581	3.2
3	<b>mmu-mir-125a</b>	193444	496480	2.6
4	mmu-mir-191	148778	244460	1.6
5	<b>mmu-mir-23a</b>	144962	307627	2.2
6	<b>mmu-mir-130a</b>	142445	294427	2.1
7	<b>mmu-mir-126</b>	139759	242306	1.7
8	<b>mmu-mir-17</b>	112977	197623	1.7
9	<b>mmu-mir-140</b>	110787	175576	1.6
10	<b>mmu-mir-145</b>	110102	161281	1.5
11	<b>mmu-mir-23b</b>	89367.7	201004	2.3
12	mmu-mir-99b	71637	131304	1.8
13	<b>mmu-mir-107</b>	69363.5	106212	1.5
14	<b>mmu-mir-15b</b>	63458.2	104735	1.7
15	<b>mmu-mir-31</b>	59155.6	189672	3.2
16	mmu-mir-93	46018	86762.8	1.9
17	<b>mmu-mir-27a</b>	45753.6	97540.6	2.1
18	mmu-mir-25	34458.6	71508.4	2.1
19	<b>mmu-mir-143</b>	29087	57932	2.0
20	<b>mmu-mir-130b</b>	28336.5	60497.8	2.1
21	<b>mmu-mir-18a</b>	27846	122258	4.4
22	<b>mmu-mir-99a</b>	23767	13807.7	-1.7 <sup>##</sup>
23	<b>mmu-mir-301</b>	21209.2	61342.4	2.9
24	<b>mmu-mir-138-2</b>	21075.8	45326.3	2.2
25	<b>mmu-mir-199b</b>	20850.2	67454	3.2
26	<b>mmu-let-7b</b>	19200.2	37405.3	2.0
27	<b>mmu-mir-29b-1</b>	17499	68431	3.9
28	<b>mmu-mir-125b-1</b>	17042.3	43897.3	2.6
29	<b>mmu-mir-10b</b>	16617.6	51173.4	3.1
30	<b>mmu-mir-222</b>	16506.6	33401.2	2.0
31	<b>mmu-mir-221</b>	15996	24781	1.6
32	<b>mmu-mir-19b-1</b>	15450.7	38213.2	2.5
33	<b>mmu-mir-20a</b>	14924.3	53026	3.6
34	<b>mmu-mir-19b-2</b>	14630.7	50329.6	3.5
35	<b>mmu-mir-19a</b>	13171.3	64012	4.9
36	<b>mmu-mir-421</b>	12988.4	40445	3.1

Таблица S1 (продолжение).

Score in L1	миРНК**	value_L1, RPKM*	value_L2, RPKM*	Fold change <sup>#</sup>
37	<b>mmu-let-7i</b>	12197.8	32186.3	2.6
38	mmu-mir-138-1	10474	18905	1.8
39	<b>mmu-mir-872</b>	1019.6	16588.2	1.6
40	<b>mmu-mir-532</b>	1015.8	15340.4	1.5
41	<b>mmu-mir-132</b>	9561	24092.3	2.5
42	<b>mmu-mir-193</b>	9463.8	34518.6	3.7
43	<b>mmu-mir-425</b>	8486.8	13615.4	1.6
44	<b>mmu-mir-30e</b>	8041.7	18100	2.3
45	<b>mmu-mir-15a</b>	7801.5	17192.8	2.2
46	<b>mmu-let-7g</b>	7419.8	26008.2	3.5
47	mmu-mir-155	7309	24016.8	3.3
48	<b>mmu-let-7d</b>	6891.6	15629	2.3
49	<b>mmu-mir-27b</b>	6857.8	15717.7	2.3
50	<b>mmu-mir-125b-2</b>	6692	19013.5	2.8
51	<b>mmu-mir-92-2</b>	6437.5	13638.7	2.1
52	<b>mmu-mir-30d</b>	5909	14944	2.5
53	<b>mmu-mir-1839</b>	5802.8	16659.7	2.9
54	mmu-mir-3068	5793	10973.8	1.9
55	<b>mmu-mir-150</b>	5699	1799.3	-3.2 <sup>##</sup>
56	<b>mmu-mir-484</b>	5377.3	11458.6	2.1
57	<b>mmu-mir-139</b>	4883.6	3010.2	-1.6 <sup>##</sup>
58	<b>mmu-mir-503</b>	4788.2	7623	1.6
59	mmu-let-7f-2	4485	23047.8	5.1
60	mmu-mir-3074-2	4287.7	7042.4	1.6
61	mmu-let-7e	4118.3	16809	4.1
62	<b>mmu-mir-185</b>	4114.5	6454	1.6
63	<b>mmu-mir-16-1</b>	4070.2	8785.5	2.1
64	<b>mmu-mir-34c</b>	3494.3	9473	2.7
65	<b>mmu-mir-322</b>	3280	9857.4	3.0
66	<b>mmu-mir-144</b>	3211.4	12921.2	4.0
67	<b>mmu-mir-10a</b>	3137.7	5849.3	1.9
68	<b>mmu-mir-186</b>	3134.5	8918	2.9
69	mmu-mir-374c	3052	22359	7.3
70	<b>mmu-mir-320</b>	2827.6	9247.6	3.3
71	mmu-mir-1949	2777.7	11060	4.0
72	<b>mmu-let-7f-1</b>	2742.3	7558	2.8
73	mmu-mir-345	2583.4	4807	1.9

Таблица S1 (продолжение)

Score in L1	миРНК**	value_L1, RPKM*	value_L2, RPKM*	Fold change <sup>#</sup>
74	<b>mmu-mir-192</b>	2473.6	5501.8	2.2
75	<b>mmu-mir-1-1</b>	2369	6504	2.7
76	mmu-mir-26b	2076	4461.6	2.2
77	mmu-mir-362	1907.5	6949.5	3.6
78	<b>mmu-mir-674</b>	1614	3536.2	2.2
79	<b>mmu-let-7a-1</b>	1573.7	3512.2	2.2
80	<b>mmu-let-7c-1</b>	1519.5	4805.6	3.2
81	mmu-mir-101b	1518	5813.6	3.8
82	<b>mmu-mir-34b</b>	1453	3490	2.4
83	<b>mmu-mir-500</b>	1430.4	3284	2.3
84	<b>mmu-mir-101a</b>	1417.5	5993	4.2
85	<b>mmu-mir-7-1</b>	1242.4	2262.4	1.8
86	mmu-mir-127	1161.4	148	-7.8 <sup>##</sup>
87	<b>mmu-mir-212</b>	1111.7	2071	1.9
88	mmu-mir-542	1022	4083	4.0
89	<b>mmu-mir-365-1</b>	1017.4	3633.5	3.6
90	mmu-mir-449a	836	3482.2	4.2
91	<b>mmu-mir-148a</b>	817.8	370.5	-2.2 <sup>##</sup>
92	mmu-mir-188	817.6	2164.6	2.7
93	<b>mmu-mir-350</b>	798	1772.4	2.2
94	mmu-mir-196a-2	699.2	2601.3	3.7
95	<b>mmu-mir-511</b>	681.5	1335.2	2.0
96	<b>mmu-mir-205</b>	663	169	-3.9 <sup>##</sup>
97	mmu-mir-331	651.3	2182	3.4
98	<b>mmu-mir-328</b>	538.6	1124.2	2.1
99	mmu-let-7c-2	464.3	1008.7	2.2
100	mmu-let-7a-2	448.7	1229.4	2.7
101	mmu-mir-615	432.4	802	1.9
102	mmu-mir-582	418.8	1141.8	2.7
103	mmu-mir-181c	417	1021	2.5
104	mmu-mir-18b	406.7	2436.4	6.0
105	mmu-mir-449c	390.6	1057	2.7
106	mmu-mir-330	385.5	911	2.4
107	<b>mmu-mir-196a-1</b>	373.6	844.2	2.3
108	mmu-mir-505	339.5	875	2.6
109	<b>mmu-mir-411</b>	302	74	-4.1 <sup>##</sup>
110	mmu-mir-1843	260	1574	6.1

Таблица S1 (продолжение)

Score in L1	миРНК**	value_L1, RPKM*	value_L2, RPKM*	Fold change <sup>#</sup>
111	mmu-mir-7-2	140	481.8	3.4
112	<b>mmu-mir-1249</b>	135.3	455.5	3.4
113	<b>mmu-mir-134</b>	96	588.7	6.1
114	mmu-mir-181d	92	478.3	5.2
115	mmu-mir-1-2	68.7	190.3	2.8
116	mmu-mir-501	57.2	291.6	5.1
117	mmu-mir-1199	28.5	141.5	5.0
118	mmu-mir-718	27.4	312.3	11.4
119	mmu-mir-1965	8.8	58.4	6.8
120	mmu-mir-1969	0	71.2	
121	mmu-mir-3061	0	79	
122	mmu-mir-743	0	956.8	
123	<b>mmu-mir-743b</b>	0	226.6	

\*\*Представлены миРНК, статистически достоверно отличающиеся в группе мышей с LLC, получавшей инъекции РНКазы А, от группы мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора.

\*RPKM (reads per kb per million)=number of reads of specific miRNA/(size of miRNA(kb) x total number of reads in library(mln))

<sup>#</sup>Fold change=RPKM\_L2/RPKM\_L1, <sup>##</sup>Fold change= RPKM\_L1/RPKM\_L2.

миРНК, специфические как для опухоли, так и для сыворотки крови, выделены жирным шрифтом. Опухолеспецифические миРНК выделены простым шрифтом.

**Таблица S2.** Представленность миРНК в кДНК-библиотеках L3 и L4, сконструированных на основе фракций низкомолекулярных РНК из сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора и РНКазы А, соответственно.

Score in L3	миРНК**	value_L3, RPKM*	value_L4, RPKM*	Fold change <sup>#</sup>
1	<i>mmu-mir-29a</i>	1309760	307410	4.3
2	<b>mmu-mir-451a</b>	1043800	287144	3.6
3	<b>mmu-mir-140</b>	869954	486671	1.8
4	<b>mmu-mir-23a</b>	604959	222958	2.7
5	<b>mmu-mir-145</b>	384463	168195	2.3
6	<b>mmu-mir-205</b>	277686	113413	2.5
7	<b>mmu-mir-130a</b>	215001	62320.4	3.5
8	<b>mmu-mir-15b</b>	198555	92987.2	2.1
9	<b>mmu-mir-99a</b>	191884	77512.6	2.5
10	<b>mmu-mir-23b</b>	184451	67119	2.8
11	<i>mmu-mir-142</i>	162985	40459	4.0
12	<b>mmu-mir-125a</b>	157965	61373.7	2.6
13	<b>mmu-mir-126</b>	118654	36665.4	3.24
14	<b>mmu-mir-320</b>	96308.6	43308.5	2.2
15	<b>mmu-mir-484</b>	75419	45546	1.7
16	<b>mmu-mir-27a</b>	71993	24095.8	3.0
17	<b>mmu-mir-425</b>	71773	37168.4	1.9
18	<b>mmu-mir-10b</b>	66826.3	17919	3.7
19	<b>mmu-mir-328</b>	61512.4	38717.2	1.6
20	<b>mmu-mir-150</b>	55039.4	26210.6	2.1
21	<i>mmu-mir-149</i>	51604.6	36499.9	1.4
22	<b>mmu-mir-92-2</b>	50772.8	35829	1.4
23	<i>mmu-mir-122a</i>	49724.5	4639.8	10.7
24	<i>mmu-mir-146</i>	48906.6	13791.3	3.6
25	<b>mmu-mir-221</b>	45156.6	15086	3.0
26	<i>mmu-mir-193b</i>	38864.2	8607.4	4.5
27	<i>mmu-mir-30b</i>	35615	16592	2.2
28	<i>mmu-mir-187</i>	33816	23889	1.4
29	<b>mmu-mir-192</b>	32576	6177.4	5.3
30	<b>mmu-mir-30d</b>	32070	12171.4	2.6
31	<b>mmu-mir-17</b>	29981.7	11510.7	2.6
32	<b>mmu-mir-139</b>	26245.2	17700.3	1.5
33	<b>mmu-let-7d</b>	25963.8	11034	2.4
34	<b>mmu-mir-193</b>	23551	5842.7	4.0
35	<b>mmu-mir-1839</b>	23244.5	4769.5	4.9
36	<i>mmu-mir-100</i>	23156.7	6785.6	3.4

Таблица S2 (продолжение)

Score in L3	миРНК**	value_L3, RPKM*	value_L4, RPKM*	Fold change <sup>#</sup>
37	<b>mmu-mir-1-1</b>	22102.2	3409.5	6.5
38	<i>mmu-mir-203</i>	21734.6	5454.4	4.0
39	<b>mmu-mir-21a</b>	21474.8	3075	7.0
40	<i>mmu-mir-133b</i>	19414	10169.6	1.9
41	<b>mmu-mir-130b</b>	18726	6026	3.1
42	<b>mmu-mir-132</b>	17366.5	8764	2.0
43	<b>mmu-mir-222</b>	16909.5	7355.8	2.3
44	<b>mmu-mir-125b-1</b>	16862.7	6609.8	2.6
45	<b>mmu-mir-107</b>	15092.3	7257	2.1
46	<b>mmu-mir-18a</b>	14349	4672	3.1
47	<b>mmu-mir-27b</b>	14197	3626.8	3.9
48	<b>mmu-mir-10a</b>	13777.2	3779.8	3.6
49	<b>mmu-mir-322</b>	13569.8	4633.8	2.9
50	<b>mmu-mir-532</b>	13510	5970.2	2.3
51	<i>mmu-mir-339</i>	13407	8014.8	1.7
52	<i>mmu-mir-409</i>	12585	5488	2.3
53	<b>mmu-mir-138-2</b>	11341.2	5623.3	2.0
54	<b>mmu-mir-872</b>	10867	3978.6	2.7
55	<b>mmu-mir-511</b>	10284.3	4197.8	2.5
56	<i>mmu-mir-744</i>	10105	6509.8	1.6
57	<b>mmu-mir-674</b>	9783.3	6661.8	1.5
58	<i>mmu-mir-30a</i>	9385.8	3667.4	2.6
59	<b>mmu-mir-15a</b>	9160.5	1863.2	4.9
60	<i>mmu-mir-543</i>	8982.8	2814.5	3.2
61	<b>mmu-let-7b</b>	8553.3	3434.2	2.5
62	<b>mmu-mir-185</b>	7588	2563.3	3.0
63	<i>mmu-mir-200b</i>	6999.9	1763	4.0
64	<i>mmu-mir-128-2</i>	6815.6	2923.6	2.3
65	<b>mmu-mir-500</b>	6596	3289.5	2.0
66	<b>mmu-mir-676</b>	5784.2	3206.5	1.8
67	<i>mmu-mir-382</i>	5747.7	2138	2.7
68	<b>mmu-mir-19b-2</b>	5682.8	1468.4	3.9
69	<b>mmu-mir-144</b>	5492	1374.8	4.0
70	<b>mmu-mir-365-1</b>	5314.8	2170	2.5
71	<b>mmu-mir-134</b>	5084	2553.6	2.0
72	<i>mmu-mir-494</i>	5009.5	790.2	6.3
73	<i>mmu-mir-337</i>	4979	1097	4.5
74	<b>mmu-mir-34b</b>	4955.3	1089.5	4.6

Таблица S2 (продолжение)

Score in L3	миРНК**	value_L3, RPKM*	value_L4, RPKM*	Fold change <sup>#</sup>
75	<i>mmu-mir-664</i>	4932.2	1448.8	3.4
76	<i>mmu-mir-224</i>	4546.3	1178	3.9
77	<b>mmu-mir-19b-1</b>	4422.2	1212	3.7
78	<i>mmu-mir-324</i>	4314.6	2591.4	1.7
79	<b>mmu-mir-212</b>	4311.4	2836.6	1.5
80	<b>mmu-mir-31</b>	4302.7	1062.7	4.0
81	<b>mmu-mir-421</b>	4114.5	1221.8	3.4
82	<i>mmu-mir-215</i>	4031	766.5	5.3
83	<b>mmu-mir-20a</b>	3862.2	565.2	6.8
84	<i>mmu-mir-34a</i>	3847.5	2002.4	1.9
85	<b>mmu-mir-503</b>	3754.3	2091.8	1.8
86	<i>mmu-mir-485</i>	3719.1	1018.5	3.7
87	<b>mmu-mir-143</b>	3449.2	998.3	3.5
88	<i>mmu-mir-667</i>	3433.3	2197	1.6
89	<i>mmu-mir-326</i>	3259.2	1967.8	1.7
90	<b>mmu-mir-30e</b>	3112	1010.4	3.1
91	<i>mmu-mir-204</i>	2921	1061.4	2.8
92	<b>mmu-mir-19a</b>	2899.8	478	6.1
93	<i>mmu-mir-497</i>	2886.8	1737	1.7
94	<b>mmu-mir-148a</b>	2754	1275.4	2.2
95	<b>mmu-mir-34c</b>	2650	1234	2.2
96	<b>mmu-let-7f-1</b>	2619	562.8	4.7
97	<b>mmu-mir-350</b>	2581	582.3	4.4
98	<b>mmu-mir-125b-2</b>	2463.8	760.6	3.2
99	<i>mmu-mir-296</i>	2273	847.3	2.7
100	<i>mmu-mir-206</i>	2217.2	695.6	3.2
101	<i>mmu-mir-299</i>	2012	599	3.4
102	<b>mmu-let-7g</b>	1915.5	502.4	3.8
103	<i>mmu-mir-541</i>	1907.7	303	6.3
104	<b>mmu-let-7i</b>	1881.3	775	2.4
105	<i>mmu-mir-200c</i>	1758	774.4	2.3
106	<i>mmu-mir-1943</i>	1716.5	74.5	23.0
107	<i>mmu-mir-128-1</i>	1678.3	739.3	2.3
108	<i>mmu-mir-1930</i>	1659.3	647.4	2.6
109	<i>mmu-mir-877</i>	1640.7	911.7	1.8
110	<i>mmu-mir-20b</i>	1597	536.2	3.0
111	<b>mmu-mir-186</b>	1564.3	135.8	11.5
112	<i>mmu-mir-434</i>	1560.5	403	3.9

Таблица S2 (продолжение)

Score in L3	миРНК**	value_L3, RPKM*	value_L4, RPKM*	Fold change <sup>#</sup>
113	<i>mmu-mir-103-2</i>	1453.2	395	3.7
114	<b>mmu-mir-29b-1</b>	1408	326	4.3
115	<b>mmu-mir-7-1</b>	1398.2	582.7	2.4
116	<b>mmu-mir-16-1</b>	1240.8	465	2.7
117	<i>mmu-mir-133a-1</i>	1213.4	312.2	4.0
118	<i>mmu-mir-200a</i>	1144.6	315.5	3.6
119	<b>mmu-mir-301</b>	1032	307.2	3.4
120	<i>mmu-mir-874</i>	1005	2640	-2.6 <sup>##</sup>
121	<i>mmu-mir-182</i>	983.4	205	4.8
122	<i>mmu-mir-219-1</i>	930.4	339.5	2.7
123	<b>mmu-mir-199b</b>	911.6	261	3.5
124	<b>mmu-mir-411</b>	909.3	102.4	8.9
125	<b>mmu-let-7a-1</b>	883	175.2	5.0
126	<i>mmu-mir-329</i>	839.3	355.8	2.4
127	<b>mmu-mir-1249</b>	591.5	181.6	3.3
128	<i>mmu-mir-363</i>	590	136.6	4.3
129	<i>mmu-mir-129-2</i>	527	176.7	3.0
130	<b>mmu-let-7c-1</b>	457.2	87.6	5.2
131	<i>mmu-mir-101a</i>	449	65.7	6.8
132	<i>mmu-mir-429</i>	401.7	82	4.9
133	<i>mmu-mir-715</i>	347.7	835.6	-2.4 <sup>##</sup>
134	<i>mmu-mir-195</i>	315.3	65.7	4.8
135	<b>mmu-mir-743b</b>	241	0	
136	<i>mmu-mir-3101</i>	234.6	0	
137	<i>mmu-mir-218-1</i>	216.2	26	
138	<i>mmu-mir-802</i>	113.8	0	
139	<b>mmu-mir-196a-1</b>	108.6	0	

\*\* миРНК, достоверно отличающиеся в группе мышей с LLC, получавшей инъекции РНКазы А, от группы мышей с LLC, получавшей инъекции физ/раствора.

\*RPKM (reads per kb per million)=number of reads of specific miRNA/(size of miRNA(kb) x total number of reads in library(mln)).

<sup>#</sup>Fold change=RPKM\_L3/RPKM\_L4, <sup>##</sup>Fold change= RPKM\_L4/RPKM\_L3.

миРНК, специфические как для опухоли, так и для сыворотки крови, выделены жирным шрифтом. Сывороточные миРНК выделены курсивом.

**Таблица S3.** Гены, уровень которых повышался в опухоли мышей с LLC после применения РНКазы А (сортированы по величине  $L_C$ ).

ID гена	Название гена	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L6/L5)	p-value	q-value
<b>Метаболизм</b>						
<b>Метаболизм аминоксахаров и нуклеотидных сахаров, метаболизм аминокислот и нуклеотидов</b>						
<i>Uap1l1</i>	UDP-N-Acetylglucosamine pyrophosphorylase 1 like 1	17.34	26.29	0.6	0.00187	0.02923
<i>Mtap</i>	Methylthioadenosine phosphorylase	13.66	22.33	0.71	9.81E-05	0.00481
<i>Cant1</i>	Calcium activated nucleotidase 1	6.52	11.51	0.82	0.00256	0.03514
<i>Impdh2</i>	IMP (Inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 2	1.02	2.74	1.43	0.00339	0.04178
<b>Метаболизм углеводов</b>						
<i>Pgls</i>	6-Phosphoglucono-lactonase	18.58	33.22	0.84	0.00027	0.00901
<i>Gaa</i>	Glucosidase, alpha	15.80	22.90	0.54	0.00144	0.02547
<i>Bpgm</i>	2,3-Bisphosphoglycerate mutase	9.06	14.14	0.64	0.00292	0.03832
<i>Mcee</i>	Methylmalonyl CoA epimerase	8.60	21.53	1.32	1.59E-05	0.00166
<i>B4galt2</i>	UDP-Gal:BetaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 2	4.85	8.40	0.79	0.0037	0.04364
<i>Xylb</i>	Xylulokinase	2.32	4.99	1.10	1.92E-05	0.00188
<i>Pdk4</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase 4	1.34	2.72	1.02	0.00103	0.02062
<i>Aldoc</i>	Aldolase, fructose-bisphosphate C	0.64	2.39	1.90	0.00094	0.0197
<i>Lalba</i>	Lactalbumin alpha	0	3.10	-	0.00011	0.00517
<b>P450-опосредованный метаболизм</b>						
<i>Akr7a5</i>	Succinic semialdehyde reductase	5.48	9.43	0.78	0.00315	0.04015
<b>Метаболизм инозитол фосфата</b>						
<i>Impa1</i>	Inositol monophosphatase 1	15.79	22.55	0.51	0.0038	0.04436
<i>Gpaal</i>	Glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1	7.43	12.18	0.71	0.00175	0.02796
<i>Ip6k2</i>	Inositol hexakisphosphate kinase 2	2.89	8.04	1.48	4.76E-07	0.00016
<i>Plcd1</i>	Phospholipase C, delta 1	2.64	4.78	0.852	0.00236	0.03338

Таблица S3 (продолжение)

ID гена	Название гена	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L6/L5)	p-value	q-value
<i>Pigb</i>	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class B	1.74	4.69	1.43	0.00128	0.0237
<b>Метаболизм жирных кислот и липидов</b>						
<i>Ech1</i>	Enoyl CoA hydratase 1, peroxisomal	37.98	54.91	0.53	0.00310	0.03980
<i>Hadh</i>	Гидроксиacyl-CoA dehydrogenase	11.77	25.37	1.11	6.51E-08	3.85E-05
<i>Eci2</i>	Enoyl-CoA delta isomerase 2	8.82	19.01	1.11	0.00017	0.00663
<i>Acadvl</i>	Acyl-CoA dehydrogenase, very long chain	7.85	13.03	0.73	0.00103	0.02062
<i>Pld3</i>	Phospholipase D family, member 3	6.50	11.38	0.81	0.00045	0.01241
<i>Cbr4</i>	Carbonyl reductase 4	2.33	5.91	1.34	0.0011	0.02151
<i>Acat2</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase 2	1.86	4.88	1.39	2.52E-05	0.00215
<i>Phospho1</i>	Phosphoethanolamine/ phosphocholine phosphatase	1.24	3.77	1.60	0.00331	0.04151
<i>Plcx2</i>	Phosphatidylinositol specific phospholipase C X domain containing 2	1.20	2.16	0.84	0.00105	0.02091
<i>Acsbg1</i>	Lipidosin	0.68	1.75	1.37	0.00229	0.03303
<i>St3gal5</i>	Ganglioside GM3 synthase	0.26	1.40	2.44	0.00243	0.03388
<b>Окислительное фосфорилирование</b>						
<i>Ndufv3</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3, 10kDa	17.75	42.63	1.26	5.19E-05	0.00319
<i>Cox8a</i>	Cytochrome C oxidase subunit VIIIA (ubiquitous)	24.20	41.03	0.76	0.00366	0.04343
<i>Foxred1</i>	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 1	10.74	16.27	0.6	0.00324	0.04087
<i>Ndufb11</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 11, 17.3kDa	5.04	14.96	1.57	3.72E-05	0.00273
<i>Bcs1l</i>	BC1 (Ubiquinol-cytochrome C reductase) synthesis-like	3.33	6.82	1.04	0.00038	0.0114
<i>Cox18</i>	COX18 Cytochrome C oxidase assembly factor	2.06	6.37	1.63	5.05E-05	0.00317
<b>Метаболизм никотината и никотинамида</b>						
<i>Nmnat3</i>	Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3	2.02	4.29	1.08	0.00073	0.01671

Таблица S3 (продолжение)

ID гена	Название гена	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L6/L5)	p-value	q-value
<i>Art5</i>	ADP-ribosyltransferase 5	0.83	2.58	1.63	0.00147	0.02569
<b>Glutathione metabolism</b>						
<i>Chac1</i>	ChaC glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1	4.66	8.87	0.93	0.00091	0.01927
<i>Haghl</i>	Гидрохуацилглутатион гидролаза-подобная	2.45	8.07	1.72	4.99E-05	0.00314
<b>События, важные для опухолевой прогрессии</b>						
<b>Ангиогенез</b>						
<i>Angptl4</i>	Angiopoietin-Like 4	14.83	22.73	0.62	0.00148	0.02575
<i>Adamts10</i>	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 10	2.23	3.95	0.83	0.00166	0.0271
<i>Robo4</i>	Roundabout guidance receptor 4	1.03	2.11	1.04	0.002	0.03073
<b>Апоптоз</b>						
<i>Pcbp4</i>	Poly(RC) binding protein 4	47.48	69.55	0.55	0.00089	0.01913
<i>Steap3</i>	Tumor suppressor-activated pathway protein 6	16.05	23.19	0.53	0.00242	0.03388
<i>Ctsh</i>	Cathepsin H	13.46	20.99	0.64	0.00211	0.03174
<i>Faim</i>	Fas apoptotic inhibitory molecule	5.57	13.60	1.29	2.18E-05	0.00199
<i>Pycard</i>	Caspase recruitment domain-containing protein 5	4.75	8.99	0.92	0.00024	0.00846
<i>Plekhf1</i>	Lysosome-associated apoptosis-inducing protein containing PH and FYVE domains	1.57	5.74	1.87	2.63E-06	0.00054
<i>Nol3</i>	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD Domain)	0.39	1.88	2.28	0.00011	0.00519
<i>Dapk1</i>	Death associated protein kinase 1	0.49	1.56	1.66	7.83E-06	0.00103
<b>Клеточная адгезия, миграция и инвазия</b>						
<i>Rap2a</i>	RAP2A, member of RAS oncogene family	7.50	10.91	0.54	0.00381	0.04438
<i>Myh12b</i>	Myosin, light chain 12B, regulatory	5.64	13.62	1.27	4.03E-05	0.00280
<i>Emp2</i>	Epithelial membrane protein	5.40	8.84	0.71	0.00081	0.01776
<i>Ptpn14</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14	3.85	5.70	0.56	0.00152	0.02591

Таблица S3 (продолжение)

ID гена	Название гена	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L6/L5)	p-value	q-value
<i>Vcas3</i>	Microtubule associated cell migration factor	1.83	3.52	0.94	0.00246	0.03418
<i>Abi3</i>	ABI family member 3	1.05	3.52	1.74	8.34E-06	0.00103
<i>Ajap1</i>	Adherens junctions associated protein 1	1.28	2.83	1.14	0.00054	0.01361
<i>Jup</i>	Desmoplakin III	0.82	1.78	1.11	0.00053	0.01352
<i>Macrodl</i>	MACRO domain containing 1	0.72	2.79	1.96	0.0031	0.03979
<b>Контроль клеточного цикла, трансформация</b>						
<i>Usp10</i>	Ubiquitin specific peptidase 10	15.57	22.53	0.53	0.00187	0.02923
<i>Mad2l2</i>	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2 (yeast)	3.31	6.89	1.06	0.00206	0.03139
<i>Cdc26</i>	Cell division cycle 26	1.14	5.82	2.35	0.00042	0.01186
<i>Rnf122</i>	Ring finger protein 122	0.26	1.79	2.79	1.58E-06	0.00037
<b>Гипоксия</b>						
<i>Higd1a</i>	HIG1 hypoxia inducible domain family member 1A	1.21	2.96	1.29	0.00232	0.03304
<b>Сигнальные пути, участвующие в злокачественной трансформации</b>						
<i>PI3K/AKT</i>						
<i>Angpt2</i>	Angiopoietin 2	3.91	7.65	0.97	0.00276	0.03705
<i>Il2rb</i>	Interleukin 2 receptor subunit beta	1.32	3.13	1.25	0.00028	0.00905
<i>Hsp90aa1</i>	Heat shock protein 90kDa alpha family class A member 1	1.20	2.60	1.11	0.00152	0.0259
<i>RAS</i>						
<i>Rras</i>	Related RAS viral (R-Ras) oncogene homolog	13.76	29.60	1.11	4.08E-06	0.00069
<i>Grap</i>	GRB2-related adaptor protein (RAS)	4.84	9.12	0.91	0.00091	0.01927
<i>Angpt2</i>	Angiopoietin 2	3.91	7.65	0.97	0.00276	0.03705
<i>Rgs14</i>	Regulator of G-protein signaling 1	3.14	5.64	0.84	0.00231	0.03303
<i>MAPK</i>						
<i>Rras</i>	Related RAS viral (R-Ras) oncogene homolog	13.76	29.60	1.11	4.08E-06	0.00069

Таблица S3 (продолжение)

ID гена	Название гена	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L6/L5)	p-value	q-value
<i>Trib3</i>	Tribbles pseudokinase 3	7.68	12.24	0.67	0.00292	0.03833
<i>Map3k6</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	4.89	7.40	0.6	0.00368	0.0436
<i>Hspa1b</i>	Heat shock protein family A (Hsp70) member 1B	1.26	3.28	1.38	4.91E-05	0.00313
<i>Lamtor1</i>	Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 1	0.59	3.05	2.37	0.00116	0.02209
<i>Dok4</i>	Docking protein 4	0.69	1.84	1.42	0.00441	0.04917
<i>TGF-<math>\beta</math></i>						
<i>Fam89b</i>	Protein FAM89B	25.82	42.43	0.72	0.00069	0.01608
<i>Fmod</i>	Fibromodulin	0.40	1.24	1.63	0.00344	0.04184
<i>Wnt</i>						
<i>Serpinf1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	7.48	14.38	0.94	0.00013	0.00582
<i>Wnt8a</i>	Wnt family member 8A	1.54	4.66	1.6	0.00011	0.00529
<i>Vangl1</i>	VANGL planar cell polarity protein 1	2.11	4.29	1.02	0.00218	0.0325
<i>Bcl9</i>	B-Cell CLL/lymphoma 9	1.00	1.98	0.99	0.00053	0.01355
<i>Shisa2</i>	Shisa family member 3	0.26	1.43	2.44	8.27E-05	0.0044
<i>JAK-STAT</i>						
<i>Il12rb1</i>	Interleukin 12 receptor subunit beta 1	1.41	3.31	1.23	0.00014	0.00606
<i>Il2rb</i>	Interleukin 2 receptor subunit beta	1.32	3.13	1.25	0.00028	0.00905
<i>Кальциевый сигнальный путь</i>						
<i>Tnnc2</i>	Troponin C2, fast	25.42	41.88	0.72	0.00204	0.03124
<i>Camk2g</i>	Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II gamma	4.66	7.63	0.71	0.00117	0.02215
<i>Tnnc1</i>	Troponin C type 1	0.77	5.08	2.72	0.00164	0.02686
<b>Немелкоклеточный рак легких</b>						
<i>ErbB2</i>	Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2	1.21	2.56	1.08	0.00245	0.03404

Таблица S3 (продолжение)

ID гена	Название гена	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L6/L5)	p-value	q-value
<b>Опухолевые супрессоры</b>						
<i>Cyb561d2</i>	Putative tumor suppressor protein 101F6	5.44	9.11	0.74	0.00426	0.04818
<i>Trit1</i>	tRNA isopentenyltransferase 1	3.12	6.38	1.03	0.00031	0.00971
<i>Pdgfrl</i>	PDGF receptor beta-like tumor suppressor	0.65	2.70	2.05	0.00062	0.01489

**Таблица S4.** Гены, уровень которых снижался в опухоли мышей с LLC после применения РНКазы А (сортированы по величине L<sub>C</sub>).

ID гена	Название гена	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L5/L6)	p-value	q-value
<b>Метаболизм</b>						
<b>Метаболизм аминокислот и нуклеотидных сахаров, метаболизм аминокислот и нуклеотидов</b>						
<i>Nos2</i>	Nitric oxide synthase 2, inducible	11.73	7.52	-0.64	0.00063	0.01509
<i>Dguok</i>	Deoxyguanosine kinase	16.41	6.93	-1.24	5.16E-05	0.00319
<i>Adprm</i>	CDP-choline phosphohydrolase	6.44	3.37	-0.93	0.00294	0.03855
<i>Twistnb</i>	TWIST neighbor	4.51	2.05	-1.14	0.00023	0.00824
<i>Setdb2</i>	Lysine N-methyltransferase 1F	3.48	1.80	-0.95	0.00146	0.02569
<i>Hal</i>	Histidine ammonia-lyase	2.87	1.11	-1.37	0.00016	0.00644
<i>Amdhd1</i>	Amidohydrolase domain containing 1	2.79	0.81	-1.78	3.77E-05	0.00274
<i>Gnpnat1</i>	Glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1	1.41	0.26	-2.45	0.00050	0.01322
<b>Метаболизм углеводов</b>						
<i>Eno3</i>	Enolase 3 (beta, muscle)	27.34	12.82	-1.09	7.20E-06	0.00098
<i>Galnt3</i>	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3	13.85	6.54	-1.08	2.23E-08	1.98E-05
<i>Alg10b</i>	Asparagine-linked glycosylation protein 10 homolog B	10.12	5.74	-0.82	5.42E-05	0.00330
<i>Csgalnact2</i>	Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2	8.60	5.68	-0.60	0.00385	0.04445
<i>Alg6</i>	ALG6, alpha-1,3-glycosyltransferase	4.31	2.47	-0.80	0.00320	0.04047
<i>Ndst2</i>	Glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase	4.43	2.42	-0.87	0.00061	0.01489
<i>Gxylt1</i>	Glucoside xylosyltransferase 1	3.86	2.18	-0.83	0.00024	0.00839
<i>Xylt1</i>	Xylosyltransferase I	1.25	0.42	-1.58	0.00285	0.03775
<b>P450-опосредованный метаболизм</b>						
<i>Hsd11b1</i>	Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase	4.45	1.92	-1.21	0.00280	0.03745

Таблица S4 (продолжение).

ID гена	Название гена	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L5/L6)	p-value	q-value
<i>Cyp27b1</i>	Cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1	3.27	1.62	-1.01	0.00263	0.03584
<i>Cyp26b1</i>	Cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1	1.22	0.27	-2.20	4.08E-05	0.00280
<b>Метаболизм инозитол фосфата</b>						
<i>Pi4k2b</i>	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta	31.67	22.66	-0.48	0.00374	0.04384
<b>Метаболизм жирных кислот и липидов</b>						
<i>Acpat2</i>	1-Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2	26.46	14.39	-0.89	0.00049	0.01309
<i>Cd5l</i>	CD5 molecule-like	10.16	4.57	-1.15	5.47E-06	0.00087
<i>Mcat</i>	Mitochondrial malonyltransferase	7.60	4.17	-0.87	0.00149	0.02575
<i>Elovl6</i>	ELOVL fatty acid elongase 6	6.49	3.36	-0.95	3.02E-06	0.00058
<i>Lipt1</i>	Lipoyltransferase 1	4.78	2.33	-1.04	0.00337	0.04165
<i>B4galnt6</i>	Beta-1,4-galactosyltransferase 6	2.34	1.12	-1.06	0.00013	0.00582
<i>B3galnt1</i>	Globoside synthase	1.71	0.26	-2.69	0.00080	0.01775
<b>Окислительное фосфорилирование</b>						
<i>Cox7b</i>	Cytochrome C oxidase subunit VIIb	38.69	19.50	-0.99	4.08E-06	0.00070
<i>Ndufa5</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5	29.21	16.40	-0.83	0.00435	0.04875
<i>Atp8b4</i>	ATPase, class I, type 8B, member 4	1.80	0.73	-1.30	4.48E-05	0.00298
<b>Метаболизм никотината и никотинамида</b>						
<i>Bst1</i>	Bone marrow stromal cell antigen 1	10.19	4.78	-1.09	5.47E-06	0.00087
<b>Метаболизм глутатиона</b>						
<i>Gclm</i>	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	19.43	12.17	-0.67	0.00222	0.03272
<i>Gss</i>	Glutathione synthetase	7.18	3.89	-0.88	0.00162	0.02674

Таблица S4 (продолжение).

ID гена	Название гена	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L5/L6)	p-value	q-value
<i>Gpx7</i>	Glutathione peroxidase 7	2.20	0.30	-2.89	0.00300	0.03875
<b>Метаболизм фолата</b>						
<i>Dhfr</i>	Dihydrofolate reductase	9.83	6.54	-0.59	0.00360	0.04319
<i>Mthfd2l</i>	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2-like	1.90	0.66	-1.52	0.00241	0.03383
<b>События, важные для опухолевой прогрессии</b>						
<b>Ангиогенез</b>						
<i>Cxcl5</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	5.32	2.37	-1.17	0.00057	0.01409
<i>Filip1l</i>	Filamin A interacting protein 1-like	4.18	2.11	-0.98	0.00424	0.04799
<i>Smoc2</i>	Secreted modular calcium-binding protein 2	2.79	1.37	-1.03	0.00219	0.03251
<i>Angptl1</i>	Angiopoietin-like 1	1.21	0.15	-3.01	0.00445	0.04935
<b>Апоптоз</b>						
<i>Lcn2</i>	Lipocalin 2 (Oncogene 24p3)	58.01	34.52	-0.75	0.00016	0.00643
<i>Ctsc</i>	Cathepsin C	37.67	26.68	-0.50	0.00284	0.03775
<i>Gzmb</i>	Cathepsin G-Like	9.07	2.59	-1.81	7.68E-08	4.09E-05
<i>Hipk3</i>	Homeodomain interacting protein kinase 3	8.96	6.27	-0.51	0.00374	0.04384
<i>Phlda1</i>	Apoptosis-associated nuclear protein	7.17	3.00	-1.26	1.32E-05	0.00149
<i>Bcl2l2</i>	BCL2-like	4.95	2.71	-0.87	0.00067	0.01571
<i>Casp9</i>	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidas	4.68	2.43	-0.94	0.00025	0.00849
<i>Ctso</i>	Cathepsin O	2.44	0.92	-1.40	7.07E-05	0.00394
<i>Casp12</i>	Caspase 12	2.21	0.81	-1.45	0.00066	0.01571
<i>Coro2a</i>	Coronin, actin binding protein, 2A	1.31	0.33	-2.01	0.00018	0.00710

Таблица S4 (продолжение).

ID гена	Название гена	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L5/L6)	p-value	q-value
<b>Клеточная адгезия, миграция и инвазия</b>						
<i>S100a4</i>	Metastasin	72.78	42.34	-0.78	0.00074	0.01684
<i>Coll1a1</i>	Collagen, Type I, Alpha 1	55.80	35.41	-0.66	0.00018	0.00689
<i>Cav2</i>	Caveolin 2	54.16	37.09	-0.55	0.00092	0.01947
<i>Rab1</i>	RAB1A, member RAS oncogene family	46.64	33.27	-0.49	0.00310	0.03979
<i>Thbs1</i>	Thrombospondin 1	30.29	20.16	-0.59	0.00045	0.01237
<i>Rasgrf1</i>	Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	29.90	10.33	-1.53	1.11E-09	2.35E-06
<i>Shc4</i>	SHC (Src homology 2 domain containing) family, member 4	8.01	0.91	-3.14	6.86E-14	3.65E-10
<i>Lrg1</i>	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	5.37	2.60	-1.04	0.00393	0.04504
<i>Cxcl5</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	5.32	2.37	-1.17	0.00057	0.01409
<i>Itga7</i>	Integrin, alpha 7	3.72	1.53	-1.28	6.95E-06	0.00097
<i>Smoc2</i>	Secreted modular calcium-binding protein 2	2.79	1.37	-1.03	0.00219	0.03251
<i>Ccnd2</i>	Cyclin D2	1.63	0.59	-1.46	1.89E-05	0.00188
<b>Контроль клеточного цикла, трансформация</b>						
<i>S100a9</i>	Calgranulin-B	269.93	188.42	-0.52	0.00209	0.03155
<i>Nedd8</i>	Neddylin	83.75	46.05	-0.86	3.01E-05	0.00239
<i>Incenp</i>	Inner centromere protein antigens 135/155kDa	13.08	8.20	-0.67	0.00053	0.01355
<i>Cenpw</i>	Cancer-up-regulated gene 2 protein	4.13	1.83	-1.17	0.00297	0.03870
<i>Nudt6</i>	Antisense basic fibroblast growth factor	4.44	1.21	-1.88	0.00064	0.01526
<b>Сигнальные пути, участвующие в злокачественной трансформации</b>						
<i>PI3K/AKT</i>						

Таблица S4 (продолжение).

ID гена	Название гена	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L5/L6)	p-value	q-value
<i>Coll1a1</i>	Collagen, Type I, Alpha 1	55.80	35.41	-0.66	0.00018	0.00689
<i>Thbs1</i>	Thrombospondin 1	30.29	20.16	-0.59	0.00045	0.01237
<i>Il4ra</i>	Interleukin 4 receptor	20.39	14.71	-0.47	0.00436	0.04880
<i>Csf3</i>	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	9.32	3.87	-1.27	2.87E-05	0.00234
<i>Jak2</i>	Janus kinase 2	8.78	5.24	-0.74	0.00120	0.02258
<i>Tnc</i>	Tenascin C	6.86	4.59	-0.58	0.00156	0.02626
<i>Jak3</i>	Janus kinase 3	4.25	1.88	-1.18	1.93E-05	0.00188
<i>Itga7</i>	Integrin, alpha 7	3.72	1.53	-1.28	6.95E-06	0.00097
<i>Csf3r</i>	CD114 antigen	2.16	0.93	-1.22	0.00045	0.01241
<i>Il7r</i>	Interleukin 7 receptor	1.86	0.45	-2.05	2.37E-05	0.00207
<i>Ccnd2</i>	Cyclin D2	1.63	0.59	-1.46	1.89E-05	0.00188
<i>Itga4</i>	Integrin Subunit Alpha 4	1.33	0.75	-0.83	0.00257	0.03522
<i>RAS</i>						
<i>Rasgrf1</i>	Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	29.90	10.33	-1.53	1.11E-09	2.35E-06
<i>Kras</i>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	18.49	13.00	-0.51	0.00231	0.03303
<i>Shc4</i>	SHC (Src homology 2 domain containing) family, member 4	8.01	0.91	-3.14	6.86E-14	3.65E-10
<i>Pld1</i>	Choline phosphatase 1	1.88	0.63	-1.59	1.04E-05	0.00123
<i>MAPK</i>						
<i>Ccl7</i>	Monocyte chemoattractant protein 3	89.78	42.91	-1.07	1.56E-08	1.67E-05
<i>Dusp6</i>	Dual specificity phosphatase 6	76.41	50.37	-0.60	0.00040	0.01164
<i>Il1b</i>	Interleukin 1, beta	61.23	38.23	-0.68	8.56E-05	0.00442

Таблица S4 (продолжение).

ID гена	Название гена	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L5/L6)	p-value	q-value
<i>Cd14</i>	Cd14 molecule	32.23	19.21	-0.75	0.00011	0.00523
<i>Rasgrf1</i>	Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	29.90	10.33	-1.53	1.11E-09	2.35E-06
<i>Stk24</i>	Serine/threonine kinase 24	16.21	10.17	-0.67	0.00058	0.01432
<i>Il1r2</i>	Interleukin 1 receptor, type II	10.66	5.51	-0.95	0.00074	0.01684
<i>Ccl5</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 5	10.56	3.19	-1.73	0.00192	0.02980
<i>Map2k4</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase 4	6.70	4.12	-0.70	0.00184	0.02888
<i>Hspa2</i>	Heat shock 70kDa protein 2	5.88	2.73	-1.11	5.93E-05	0.00357
<i>Itgax</i>	CD11C	1.42	0.47	-1.59	0.00028	0.00905
<i>TGF-β</i>						
<i>Ccl7</i>	Monocyte chemoattractant protein 3	89.78	42.91	-1.07	1.56E-08	1.67E-05
<i>Thbs1</i>	Thrombospondin 1	30.29	20.16	-0.59	0.00045	0.01237
<i>Ccl5</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 5	10.56	3.19	-1.73	0.00192	0.02980
<i>Acvr1b</i>	Activin A receptor, type IB	5.06	2.63	-0.94	0.00029	0.00939
<i>Rbx1</i>	Ring-Box 1, E3 ubiquitin protein ligase	3.13	0.52	-2.60	3.29E-05	0.00249
<i>Fst</i>	Follistatin	1.22	0.14	-3.12	0.00122	0.02287
<i>Wnt</i>						
<i>Chd8</i>	Chromodomain helicase DNA binding protein 8	10.71	7.09	-0.59	0.00044	0.01229
<i>Lrrfip2</i>	LRR binding FLII interacting protein 2	10.20	6.72	-0.60	0.00344	0.04184
<i>Dkk2</i>	Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2	8.50	5.09	-0.74	0.00046	0.01241
<i>Hmgxb4</i>	HMG box domain containing 4	3.26	1.61	-1.02	0.00033	0.01009
<i>Rbx1</i>	Ring-Box 1, E3 ubiquitin protein ligase	3.13	0.52	-2.60	3.29E-05	0.00249

Таблица S4 (продолжение).

ID гена	Название гена	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L5/L6)	p-value	q-value
<i>Lgr4</i>	Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4	2.84	1.67	-0.77	0.00346	0.04197
<i>Ccnd2</i>	Cyclin D2	1.63	0.59	-1.46	1.89E-05	0.00188
<i>JAK-STAT</i>						
<i>Ccl7</i>	Monocyte chemoattractant protein 3	89.78	42.91	-1.07	1.56E-08	1.67E-05
<i>Il4ra</i>	Interleukin 4 receptor	20.39	14.71	-0.47	0.00436	0.04880
<i>Shcbp1</i>	Protein expressed in activated lymphocytes	16.22	9.86	-0.72	0.00054	0.01356
<i>Ccl5</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 5	10.56	3.19	-1.73	0.00192	0.02980
<i>Csf3</i>	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	9.32	3.87	-1.27	2.87E-05	0.00234
<i>Jak2</i>	Janus kinase 2	8.78	5.24	-0.74	0.00120	0.02258
<i>Jak3</i>	Janus kinase 3	4.25	1.88	-1.18	1.93E-05	0.00188
<i>Csf3r</i>	CD114 antigen	2.16	0.93	-1.22	0.00045	0.01241
<i>Il21r</i>	Interleukin 21 receptor	1.93	0.69	-1.49	0.00109	0.02143
<i>Il7r</i>	Interleukin 7 receptor	1.86	0.45	-2.05	2.37E-05	0.00207
<i>Ccnd2</i>	Cyclin D2	1.63	0.59	-1.46	1.89E-05	0.00188
<i>Кальциевый сигнальный путь</i>						
<i>P2rx7</i>	Purinergic receptor P2X, ligand gated ion channel, 7	7.45	2.82	-1.40	0.00100	0.02030
<i>Tnc</i>	Tenascin C	6.86	4.59	-0.58	0.00156	0.02626
<b>Опухоль-ассоциированные гены*</b>						
<i>Orai1</i>	ORAI calcium release-activated calcium modulator	13.60	6.73	-1.01	1.59E-05	0.00166
<i>Dpp3</i>	Dipeptidyl-peptidase 3	24.46	17.34	-0.50	0.00431	0.04856
<i>Arhgef1</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	23.04	15.28	-0.59	0.00069	0.01611

Таблица S4 (продолжение).

ID гена	Название гена	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L5/L6)	p-value	q-value
<i>Steap1</i>	Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	19.82	11.67	-0.76	0.00123	0.02290
<i>Arhgef11</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11	10.10	5.77	-0.81	1.18E-05	0.00135
<i>Skp2</i>	S-phase kinase-associated protein 2, E3 ubiquitin protein ligase	8.89	5.29	-0.75	0.00097	0.01984
<i>Tpd52</i>	Tumor protein D5	9.46	4.87	-0.96	9.17E-05	0.00457
<i>Mllt11</i>	Myeloid/Lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 11	3.39	0.97	-1.80	4.11E-06	0.00070
<i>Laptm4b</i>	Lysosomal protein transmembrane 4 beta	2.51	0.97	-1.37	0.00298	0.03875
<i>Rfng</i>	RFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	2.47	0.94	-1.40	0.00158	0.02648
<i>Ehbp1</i>	NPF calponin-like protein	1.74	0.85	-1.04	0.00313	0.04002
<i>Rbm6</i>	Lung cancer antigen NY-LU-12	1.40	0.44	-1.69	0.00081	0.01775
<b>Немелкоклеточный рак легкого</b>						
<i>Jak3</i>	Janus kinase 3	4.25	1.88	-1.18	1.93E-05	0.00188
<b>миРНК при раке</b>						
<i>Ezh2</i>	Enhancer of Zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit	27.39	15.17	-0.85	3.19E-06	0.00060
<i>Lin28a</i>	Lin-28 homolog A	15.71	8.78	-0.84	5.95E-06	0.00087
<i>Zcchc6</i>	Zinc finger, CCHC domain containing 6	10.04	6.04	-0.73	6.89E-05	0.00393
<i>Tnrc6a</i>	Trinucleotide repeat containing 6A	6.30	4.22	-0.58	0.00130	0.02375
<i>Zcchc11</i>	TUTase	4.00	2.48	-0.69	0.00222	0.03269
<b>Опухолевые супрессоры</b>						

**Таблица S4 (продолжение).**

<b>ID гена</b>	<b>Название гена</b>	<b>Value L5, RPKM</b>	<b>Value L6, RPKM</b>	<b>Log2 (L5/L6)</b>	<b>p-value</b>	<b>q-value</b>
<i>Armch1</i>	Armadillo repeat containing, X-linked 1	5.26	2.24	-1.23	0.00016	0.00644
<i>Brcal</i>	BRCA2, DNA repair associated	2.83	1.48	-0.93	0.00016	0.00644
<i>Tssc1</i>	Tumor suppressing subtransferable candidate 1	2.07	0.50	-2.04	0.00151	0.02586
<i>Scal</i>	Suppressor of cancer cell invasion	1.39	0.81	-0.77	0.00362	0.04321

\* Экспрессия этих генов повышена в клетках различных опухолевых линий.

**Таблица S5.** Гены – участники транскрипции, уровень которых повышался в опухоли мышей с LLC после применения РНКазы А (сортировано по value L6)

ID гена	Функция	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L6/L5)	p-value	q-value
<i>Pmf1</i>	Транскрипционные активаторы и ко-активаторы	27.88	45.89	0.72	0.00031	0.00970
<i>Klf9</i>		5.93	9.45	0.67	0.00151	0.02586
<i>Vcas3</i>		1.83	3.52	0.94	0.00246	0.03418
<i>Zfp513</i>	Транскрипционные регуляторы	3.29	5.99	0.86	0.00206	0.03139
<i>Zfp296</i>		1.60	3.72	1.22	0.00335	0.04165
<i>Zfp790</i>		2.06	3.61	0.81	0.00174	0.02796
<i>Zfp651</i>		1.71	2.83	0.72	0.00317	0.04026
<i>Zfp316</i>		0.59	1.68	1.50	1.24E-06	0.0003
<i>Mbd1</i>		6.10	10.07	0.72	0.00108	0.02126
<i>Pcgf5</i>	Транскрипционные репрессоры и ко-репрессоры	5.40	9.98	0.89	0.00114	0.02193
<i>Nelf</i>		5.61	9.80	0.80	0.00098	0.02002
<i>Cbfa2t2</i>		3.40	6.20	0.86	3.20E-05	0.00247
<i>Per1</i>		3.75	6.04	0.69	0.00145	0.02565
<i>Gtf2h2</i>	Факторы транскрипции	15.21	25.89	0.77	9.74E-05	0.00480
<i>E2f1</i>		7.3	12.28	0.74	0.00059	0.01442
<i>Gabpb1</i>		4.14	8.16	0.98	0.00041	0.01178
<i>Klf5</i>		2.85	6.59	1.21	8.55E-05	0.00442
<i>Zfp691</i>		1.05	4.88	2.22	6.19E-05	0.00368
<i>Hoxc10</i>		1.86	4.47	1.26	0.00028	0.00905
<i>Gas7</i>		2.48	4.13	0.74	0.00129	0.02375
<i>Tfeb</i>		0.93	4.13	2.14	1.08E-06	0.00027
<i>Hes6</i>		1.62	4.10	1.34	0.00231	0.03303
<i>Ovol1</i>		1.07	2.56	1.25	0.00055	0.01385
<i>Hnf1b</i>		0.69	2.13	1.63	0.00022	0.00812
<i>Zscan10</i>		0.12	1.98	4.09	1.96E-05	0.00188
<i>Hoxb8</i>		0.40	1.53	1.96	0.00062	0.01489
<i>Cc2d1a</i>		0.50	1.51	1.68	0.00045	0.01241
<i>Zfp167</i>		0.24	1.33	2.48	0.00151	0.02586
<i>Pou2f3</i>		0.12	1.23	3.30	0.00073	0.01671

**Таблица S6.** Гены – участники транскрипции, уровень которых снижался в опухоли мышей с LLC после применения РНКазы А (сортировано по value L5)

ID гена	Функция	Value L5, RPKM	Value L6, RPKM	Log2 (L6/L5)	p-value	q-value	
<i>Bcl9l</i>	Транскрипционные активаторы и ко-активаторы	3.37	1.46	-1.21	3.76E-06	0.00067	
<i>Zmiz2</i>		2.91	1.44	-1.02	0.00187	0.02923	
<i>Hipk2</i>		2.82	1.12	-1.33	0.00022	0.00801	
<i>Znr1</i>	Транскрипционные регуляторы	7.98	2.79	-1.52	0.00241	0.03383	
<i>Sertad2</i>		7.51	4.76	-0.66	0.00171	0.02762	
<i>Zfp292</i>		7.33	4.94	-0.57	0.00085	0.01824	
<i>Tfe3</i>		6.59	2.97	-1.15	0.00035	0.01047	
<i>Chd7</i>		5.15	3.34	-0.62	0.00074	0.01684	
<i>Zfp81</i>		5.14	2.34	-1.13	0.00016	0.00643	
<i>Rfx5</i>		2.86	1.13	-1.34	8.27E-06	0.00103	
<i>Med21</i>		58.00	37.32	-0.64	0.00168	0.02737	
<i>Med6</i>		12.53	5.98	-1.07	0.00041	0.01178	
<i>Zbtb6</i>		10.50	7.02	-0.58	0.00176	0.02807	
<i>Bmp2k</i>		10.37	7.02	-0.56	0.00118	0.02236	
<i>Zfp948</i>		8.67	5.13	-0.76	0.00120	0.02252	
<i>Esf1</i>		8.66	5.36	-0.69	0.00119	0.02244	
<i>Zkscan1</i>		8.28	4.89	-0.76	0.00018	0.00710	
<i>Mll1</i>		7.18	5.15	-0.48	0.00358	0.04306	
<i>Pias1</i>		5.00	2.83	-0.82	0.00079	0.01761	
<i>Kdm6a</i>		2.50	1.18	-1.08	0.00013	0.00577	
<i>Zfp7</i>		2.46	1.17	-1.07	0.00317	0.04026	
<i>Zfp597</i>		2.12	0.91	-1.22	3.78E-05	0.00274	
<i>Zbtb24</i>		1.95	0.86	-1.19	0.00345	0.04184	
<i>Prdm10</i>		1.93	0.89	-1.12	0.00238	0.03364	
<i>Pak6</i>		1.90	0.39	-1.72	0.00180	0.02853	
<i>Kdm5b</i>		1.89	1.01	-0.90	0.00144	0.02550	
<i>Spint1</i>		1.77	0.58	-1.61	0.00216	0.03229	
<i>Thap7</i>		Транскрипционные репрессоры и ко-репрессоры	7.63	3.12	-1.29	0.00028	0.00905
<i>Mxd4</i>			7.02	3.37	-1.06	0.00235	0.03326
<i>Tle1</i>	5.06		3.10	-0.10	0.00220	0.03265	
<i>Sfmbt1</i>	3.07		1.90	-0.69	0.00362	0.04321	
<i>Gtf2h5</i>	Факторы транскрипции	17.35	10.52	-0.72	0.00352	0.04258	
<i>Tceb1</i>		14.37	5.37	-1.42	4.51E-06	0.00074	
<i>Ccnc</i>		13.60	6.94	-0.97	6.55E-05	0.00379	
<i>Top1</i>		12.25	7.94	-0.63	0.00084	0.01808	
<i>Adnp</i>		10.85	7.49	-0.53	0.00301	0.03888	
<i>Ccnt2</i>		7.21	4.39	-0.72	0.00138	0.02472	
<i>Iws1</i>		4.38	2.42	-0.86	1.22E-05	0.00138	
<i>Atf7</i>		3.28	1.53	-1.10	0.00050	0.01322	
<i>Dlx6</i>		3.00	0.34	-3.12	0.00297	0.03870	
<i>Rhox2d</i>		2.61	0.00	-	0.00017	0.00672	
<i>Gpbbp1l1</i>		2.30	0.67	-1.77	8.38E-06	0.00103	
<i>Akna</i>		2.18	1.19	-0.87	0.00209	0.03155	
<i>Dlx1</i>		1.69	0.51	-1.73	0.00291	0.03823	

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2(Список научных трудов, вошедших в диссертацию)

### Статьи в научных журналах

1. **Mironova N.**, Shklyayeva 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. 91. – 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.A., **Mironova N.L.**, Vlassov V.V., Zenkova M.A. New approaches for cancer treatment: antitumor drugs based on gene-targeted nucleic acids // *Acta Naturae.* – 2009. – V. 1. – № 2. – P. 44–60.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. **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.

13. **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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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. 148–162.
18. 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. – V. 9. – № 3. – P. 70–82.
19. 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 // Мол. биология. – 2017. – Т. 51. – № 1. – С. 118–125.
20. 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* // Мол. биология. – 2017. – Т. 51. – № 4. – С. 637–646.
21. 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.
22. **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

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 г.

### Тезисы конференций

1. Zenkova M.A., **Mironova N.L.**, Shklyayeva O.A., Andreeva E., Vlassov V.V. Animal model of tumor progression a study of combined therapy to overcome the multiple drug resistance syndromes of malignant cells // European Conference Center Kirchberg-Luxembourg. Luxembourg, January 25 – 28. – 2006. – P. 667.
2. **Миронова Н.Л.**, Шкляева О.А., Андреева Е.М., Попова Н.А., Зенкова М.А., Власов В.В. Модель опухолевой прогрессии *in vivo* для исследования комбинированной терапии, направленной на преодоление синдрома множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток // International conference “Basic Science for Biotechnology and Medicine”, Novosibirsk, Russia, September 3 – 7. – 2006. – P.23.

3. **Миронова Н.Л.**, Шкляева О.А., Андреева Е.М., Попова Н.А., Зенкова М.А., Власов В.В. Модель опухолевой прогрессии *in vivo* для исследования комбинированной терапии, направленной на преодоление синдрома множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Конференция “От экспериментальной биологии к превентивной и интегративной медицине”, Судак, Украина, 17 – 28 сентября. – 2006. – С. 44.
4. **Mironova N.L.**, Shklyayeva O.A., Zenkova M.A., Vlassov V.V. Combined anticancer therapy: siRNA and cytostatics // 32<sup>nd</sup> FEBS Congress “Molecular Machines”, Vienna, Austria, July 7 – 12. – 2007. – P. 163.
5. **Миронова Н.Л.**, Шкляева О.А., Рябчикова Е.И., Зенкова М.А., Власов В.В. Онкосупрессивное действие РНКазы А и ДНКазы I *in vivo* // III Международная конференция «Фундаментальные науки – медицине», Новосибирск, Россия, 2 – 8 сентября. – 2007. – С. 48.
6. Шкляева О.А., **Миронова Н.Л.**, Попова Н.А., Николин В.П., Каледин В.И., Зенкова М.А., Власов В.В. Повышение чувствительности лимфосаркомы мышей к химиотерапии под действием *mdr1b* и *bcl-2* siРНК // III Международная конференция «Фундаментальные науки – медицине», Новосибирск, Россия, 2 – 8 сентября. – 2007. – С. 103.
7. **Mironova N.L.**, Shklyayeva O.A., Ryabchikova E.I., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Tumoricidal activity of RNase A and DNase I // International conference “Apoptosis world 2008”, Luxemburg, January 25 – 28. – 2008. – P. 266.
8. Shklyayeva O.A., **Mironova N.L.**, Popova N.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A.. Sensitizing mouse lymphosarcoma to chemotherapy by *mdr1b* and *bcl-2* siRNAs // International conference “Apoptosis world 2008”, Luxemburg, January 25 – 28. – 2008. – P. 278.
9. **Mironova N.L.**, Panzhinsky E.E., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Genomodified dendritic cells: the search for correlations between type of transfected exogenous nucleic acids and immunogenicity // International conference “Mechanisms of early differentiation: embryogenesis, myogenesis (cardiac differentiation) and hematopoiesis/lymphopoiesis, Barsinghausen, Germany, September 1 – 5. – 2008. – P. 104.
10. **Миронова Н.Л.**, Шкляева О.А., Попова Н.А., Рябчикова Е.И., Зенкова М.А., Власов В.В. Противоопухолевый и антиметастатический потенциал РНКазы А и ДНКазы I // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, Россия, 11 – 15 мая. – 2008. – С. 230.
11. Панжинский Е.Э., **Миронова Н.Л.**, Зенкова М.А., Власов В.В. Геномодифицированные дендритные клетки: поиск корреляций между типом трансфецируемого генетического материала и иммуногенностью // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, Россия, 11 – 15 мая. – 2008. – С. 231.
12. Шкляева О.А., **Миронова Н.Л.**, Попова Н.А., Николин В.П., Каледин В.И., Власов В.В., Зенкова М.А. Обращение фенотипа множественной лекарственной устойчивости опухоли с помощью siРНК, адресованной к мРНК генов *mdr1a* и *mdr1b*, у мышей // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, Россия, 11 – 15 мая. – 2008. – С. 233.
13. **Миронова Н.Л.**, Шкляева О.А., Попова Н.А., Рябчикова Е.И., Власов В.В., Зенкова М.А. Эффективное подавление метастазирования с помощью внутримышечных инъекций РНКазы А и ДНКазы I // Молекулярная онкология, Новосибирск, Россия, 1 – 3 октября. – 2008. – С. 136 – 137.
14. **Миронова Н.Л.**, Шкляева О.А., Рябчикова Е.И., Власов В.В., Зенкова М.А. Антиметастатические препараты нового поколения на основе природных нуклеаз. // Результаты фундаментальных и прикладных исследований для создания новых лекарственных средств, Москва, Россия, 9 – 11 июня. – 2008. – С. 133.

15. Шкляева О.А., **Миронова Н.Л.**, Рябчикова Е.И., Попова Н.А., Власов В.В., Зенкова М.А. Антиметастатическая активность РНКазы А и ДНКазы I: связь каталитической функции с наблюдаемым эффектом // Конференция «Фундаментальные науки – медицине», Новосибирск, Россия, 2 – 5 сентября. – 2008. – С. 55.
16. **Mironova N.L.**, Panzinskyi E.E., Popova N.A., Nikolin V.P., Zenkova M.A., Vlassov V.V. Dendritic cells – based vaccine against murine lymphosarcoma exhibiting multiple drug resistant phenotype // First International Conference. Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring (CITIM), Kiev, Ukraine, May 18 – 21. – 2009. – P. 47.
17. **Миронова Н.Л.**, Патутина О.А., Рябчикова Е.И., Попова Н.А., Власов В.В., Зенкова М.А. Природные нуклеазы, РНКазы А и ДНКазы I, как перспективные препараты для лечение метастатических форм рака // Научная конференция «Медицинская геномика и протеомика», Новосибирск, Россия, 9 – 13 сентября. – 2009. – С. 70.
16. Patutina O.A., **Mironova N.L.**, Popova N.A., Kaledin V.I., Nikolin V.P., Vlassov V.V., Zenkova M.A. The siRNA targeted to *mdr1b* in vivo restores the sensitivity of murine lymphosarcoma to chemotherapy // 3<sup>rd</sup> FEBS Special Meeting ATP-Binding cassette (ABC) Proteins: From Multidrug resistance to genetic diseases, Innsbruck, Austria, February 27 – March 5. – 2010. – P. 120.
17. **Mironova N.**, Patutina O., Ryabchikova E., Popova N., Nikolin V., Kaledin V., Vlassov V., Zenkova M. Antitumor drugs on the base of natural and artificial nucleases // 46<sup>th</sup> International Conference on Medicinal Chemistry “The Interfacing Chemical Biology and Drug Discovery”, Reims, France, June 30 – July 2. – 2010. – P. 146.
18. **Mironova N.**, Patutina O., Ryabchikova E., Popova N., Nikolin V., Kaledin V., Vlassov V., Zenkova M. Antitumor drugs on the base of natural and artificial nucleases // European School of Medicinal Chemistry (XXX Advanced Course of Medicinal Chemistry and “E.Duranti” National Seminar for PhD Students), Urbino, Italy, July 4 – 9. – 210. – P. 212.
19. Марков О.В., **Миронова Н.Л.**, Николин В.П., Попова Н.А., Зенкова М.А., Власов В.В. Модифицированные дендритные клетки: поиск корреляции между источником антигена и способностью дендритных клеток запускать противоопухолевый ответ // Ежегодная научная конференция «Фундаментальные науки – медицине», Новосибирск, Россия, 7 – 10 сентября. – 2010. – С. 51.
20. Zenkova M., **Mironova N.**, Patutina O., Vlassov V. Antimetastatic activity of RNase A // 8<sup>th</sup> RNase Congress, Naples, Italy, 20 – 22 October. – 2010. – P. 79.
21. **Mironova N.L.**, Markov O.A., Popova N.A., Kaledin V.I., Nikolin V.P., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Dendritic cells-based antitumor vaccines: opposite effects depending on application scheme // Cell Signal-omics 2011, Integrated cellular pathology, Systems biology of human disease, Luxembourg, January 26 – 28. – 2011. – P. 161.
22. **Mironova N.L.** Antimetastatic activity of RNase A and DNase I // Russian-German Conference Held under the Auspices of the Russian-German Year of Education, Science and Innovation “Molecular Basis of Infections”, Novosibirsk, Russia, June 14 – 15.
23. **Mironova N.L.**, Patutina O.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Anticancer therapeutics on the base of RNase A and DNase I // 36<sup>th</sup> FEBS Congress Biochemistry for Tomorrow’s Medicine, Torino, Italy, June 25– 30. – 2011. – P. 11.93.
24. Markov O.V., Maslov M.A., **Mironova N.L.**, Vlassov V.V., Zenkova M.A. Novel derivatives of cationic lipids for delivery of DNA and RNA into dendritic cells // 11<sup>th</sup> Forum for Young Scientists, 36<sup>th</sup> FEBS Congress Biochemistry for Tomorrow’s Medicine, Torino, Italy, June 23– 25. – 2011. – P. 466.

25. Markov OV, **Mironova NL**, Maslov MA, Vlassov VV, Zenkova MA. Novel derivatives of cationic lipids for delivery of DNA and RNA into immature dendritic cells // 31st European School of Medicinal Chemistry, Urbino, Italy, 3 – 8 July. – 2011. – P.92.
26. **Миронова Н. Л.**, Патутина О. А., Бреннер Е. В., Курильщикова А. М., Власов В. В., Зенкова М. А. Поиск молекулярных мишеней RNКазы А, определяющих ее противоопухолевую и антиметастатическую активность // II Международная научная конференция «Физико-химическая биология», посвященная 85-ти летию академика Кнорре Д. Г., Новосибирск, Россия, 25 – 29 июня. – 2011. – С. 88.
27. **Миронова Н. Л.**, Патутина О. А., Бреннер Е. В., Курильщикова А. М., Власов В. В., Зенкова М. А. Поиск молекулярных мишеней RNКазы А путем секвенирования кДНК-библиотек миRNК на платформе Solid // II Международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика», Новосибирск, Россия, 14 – 17 ноября. – 2011. – С. 58.
28. Марков О. В., **Миронова Н. Л.**, Власов В. В., Зенкова М. А. Эффективная доставка ДНК и RNК в дендритные клетки с помощью новых катионных липосом // Фундаментальные науки – медицине, Новосибирск, Россия, 11 – 15 сентября. – 2012. – С. 38.
29. **Mironova N.L.**, Patutina O.A., Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Zenkova M.A., Vlassov V.V. RNase A strongly inhibits metastasis development through the alteration of miRNA profiles in tumor tissue and blood serum // Congress 22<sup>nd</sup> IUBMB and 37<sup>th</sup> FEBS “From single molecules to molecular biology”, Sevilla, Spain, September 4-9. – 2012. – P04-62.
30. **Mironova N.L.**, Patutina O.A., Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Zenkova M.A., Vlassov V.V. RNase A strongly decreased metastasizing of Lewis lung carcinoma through the affect of miRNAs regulated tumor development and progression // ECDO 2012, 20<sup>th</sup> Euroconference on Apoptosis “From Death to Eternity”, Rome, Italy, September 14 – 17. – 2012. – P. 180.
31. **Mironova N.L.** MicroRNA in metastases development // PTB-2012, International conference on postgenomic technology for biomedicine, Novosibirsk, Russia, June 25 – 29. – 2012.
32. Патутина О. А., **Миронова Н. Л.**, Сенькова А. В., Марков О. В., Петрушанко И. Ю., Миткевич В. А., Макаров А. А., Зенкова М. А. Бактериальная рибонуклеаза биназа препятствует опухолевому росту и метастазированию за счёт индукции апоптоза в опухолевых клетках // Фундаментальные науки – медицине, Новосибирск, Россия, 16 – 20 сентября. – 2013. – С. 31.
33. **Mironova N.L.**, Patutina O.A., Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Identification of molecular targets of RNase A in antitumor therapy // The First Meeting in the Frame of French-Siberian Centre of Research and Education “Nucleic Acid - Protein Interactions for Life Sciences”, Novosibirsk, Russia, May 13 – 15. – 2013.
34. **Mironova N.L.**, Patutina O.A., Petrushanko I.Y., Sen'kova A.V., Brenner E.V., Mitkevich V.A., Markov O.A., Zenkova M.A., Makarov A.A. Different mechanisms of tumoricidal action of pancreatic RNase a and microbial ribonuclease binase: alteration of miRNA profiles vs apoptosis induction // ICDS Congress “Mechanisms of Cell Death: The Command to Die”, Fuengirola, Spain, June 4 – 6. – 2013. P. 45 – 46.
35. Patutina O.A., **Mironova N.L.**, Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Identification of molecular targets of RNase A in antitumor therapy // 38<sup>th</sup> FEBS Congress “Mechanisms in Biology”, Saint-Petersburg, Russia, July 6 – 11. – 2013. – P. 38.
36. Markov O.V., **Mironova N.L.**, Vlassov V.V., Zenkova M.A. Dendritic cells as pre-exposure and post-exposure antitumor vaccines // 38th FEBS Congress “Mechanisms in Biology”, Saint-Petersburg, Russia, July 6 – 11. – 2013. – P. 463 – 464.

37. Zenkova M.A., **Mironova N.L.**, Patutina O.A., Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Vlassov V.V. miRNA boost in the tumor and miRNA drop in the blood serum caused by treatment with RNase A promote an attenuation of tumor malignancy // 9th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society, Napoli, Italy, October 6 – 8. – 2013.
38. Zenkova M.A., **Mironova N.L.**, Patutina O.A., Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Vlassov V.V. miRNA boost in the tumor and miRNA drop in the blood serum caused by treatment with RNase A promote an attenuation of tumor malignancy // “From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies”, Paris, France, October 17 – 18. –2013. – P. 36.
39. Markov O.V., **Mironova N.L.**, Kabilova T.O., Маслов М.А., Zenkova M.A. Novel liposome-based systems for effective delivery of therapeutic nucleic acids // Science of the future, Saint-Petersburg, Russia, September 17 – 20. –2014.
40. **Mironova N.L.**, Patutina O.A., Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Zenkova M.A., Vlassov V.V. RNase A caused rearrangement of intracellular pathways in tumor cells providing restoration of normal cell proliferation and differentiation // FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, 30 August – 4 September. – 2014. – P. 500 – 501.
41. Patutina O.A., **Mironova N.L.**, Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Vlassov V.V., Zenkova M.A. RNase A inhibits metastasis spreading upon tumor progression due to reorganization of regulatory networks of miRNAs // FEBS Workshop “Decoding non-coding RNAs in development and cancer”, Capri, Italy, October 12 – 15. – 2014. – P. 81.
42. **Mironova N.L.** The interplay between miRNAs and tumor-specific intracellular cascades // International Research Conference “Expanding Frontiers of RNA Chemistry and Biology”, Novosibirsk, Russia, November 9 – 11. – 2015.
43. **Миронова Н.Л.**, Патутина О.А., Бреннер Е.В., Курильшиков А.М., Зенкова М.А., Власов В.В. Противоопухолевое действие РНКазы А связано с переключением внутриклеточных каскадов, задействованных в злокачественной трансформации клетки, и восстановлением нормальной клеточной пролиферации и дифференцировки // VII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Новосибирск, Россия, 12 – 17 июля. – 2015.
44. Alekseeva L.A., **Mironova N.L.**, Zenkova M.A., Efratti S., Gribova O. Search for correlation between concentration of extracellular DNA and deoxyribonuclease activity of blood plasma of patients with different tumors under the treatment with DNase I in oral form (O'Shadi D) // The Fourth Meeting of the CNRS Laboratoire International Associé NUCPROT, Novosibirsk, Russia, July 23 – 25. – 2015. P. 29.
45. **Mironova N.L.**, Patutina O.A., Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Zenkova M.A. Cancer related pathways respond to ribonuclease A treatment affecting microRNA machinery of tumour cells // Международная конференция "Химическая биология", посвященная 90-летию академика Д.Г. Кнорре, Новосибирск, Россия, 24 – 28 июля. – 2016. – С. 72.
46. Alekseeva L.A., Patutina O.A., Sen'kova A.V., Zenkova M.A., **Mironova N.L.** Inhibition of invasive properties of murine melanoma by bovine pancreatic DNase I in vitro and in vivo // Международная конференция "Химическая биология", посвященная 90-летию академика Д.Г. Кнорре, Новосибирск, Россия, 24 – 28 июля. – 2016. – С. 176.
47. Марков О.В., **Миронова Н.Л.**, Шмендель Е.В., Маслов М.А., Зенкова М.А. Системная доставка опухолевой РНК в комплексе с маннозилированными липосомами активирует противоопухолевый цитотоксический Т-клеточный ответ на модели меланомы мыши // Международная конференция "Химическая биология", посвященная 90-летию академика Д.Г. Кнорре, Новосибирск, Россия, 24 – 28 июля. – 2016. – С. 203.
48. **Mironova N.L.**, Markov O.V., Маслов М.А., Zenkova M.A. Systemic delivery of mannosylated liposomes loaded with tumor RNA activates antitumor cytotoxic T-cell response in

murine melanoma model // 4th Annual Congress of the European Society for Translational Medicine (EUSTM-2016), Prague, Czech Republic, 17 – 20 October. – 2016. – P. 78.

49. **Mironova N.L.**, Patutina O.A., Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Zenkova M.A. Cancer related pathways respond to pancreatic ribonuclease A treatment affecting microRNA machinery of tumour cells // 4th Annual Congress of the European Society for Translational Medicine (EUSTM-2016), Prague, Czech Republic, 17 – 20 October. – 2016. – P. 79.

50. Марков О.В., **Миронова Н.Л.**, Шмендель Е.В., Маслов М.А., Зенкова М.А. Противоопухолевые дендритно-клеточные вакцины, нагруженные суммарной опухолевой РНК в комплексах с маннозилированными липосомами // V Съезд биохимиков России, Сочи, Россия, 4 – 8 октября – 2016. – С. 170.

51. **Миронова Н.Л.**, Патутина О.А., Бреннер Е.В., Курильщикова А.М., Зенкова М.А., Власов В.В. Экзогенные нуклеазы как средства подавления опухолевой прогрессии путем инактивации опухоль-ассоциированных нуклеиновых кислот // Всероссийская конференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего», Новосибирск, Россия, 24 – 26 июля. – 2017. – С. 76.

52. Марков О.В., **Миронова Н.Л.**, Маслов М.А., Шмендель Е.В., Зенкова М.А. Применение маммосодержащих липосомальных композиций для получения противоопухолевых дендритноклеточных вакцин // Всероссийская конференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего», Новосибирск, Россия, 24 – 26 июля. – 2017. – С. 75.

53. **Mironova N.L.**, Patutina O.A., Kurilshikov A.M., Alekseeva L.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Exogenous nucleases as tools for searching therapeutic targets/oncomarkers among tumor-associated nucleic acids // 5th Annual Congress on Clinical & Translational science (EUSTM-2017), Berlin, Germany, October 20 – 22. – 2017. – P. 45 – 46.

54. Markov O.V., **Mironova N.L.**, Alekseeva A., Shmendel E., Maslov M., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Extracellular vesicles of murine dendritic cells efficiently activate antitumor cytotoxic T-lymphocytes targeted to melanoma B16 cells // 5th Annual Congress on Clinical & Translational science (EUSTM-2017), Berlin, Germany, October 20 – 22. – 2017. – P. 39.