

УДК 577.29:577.151.7

©Коллектив авторов

## МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ИСКУССТВЕННЫХ РИБОНУКЛЕАЗ НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

*Е.Б. Логащенко\*, И.Л. Кузнецова, Е.И. Рябчикова, В.В. Власов, М.А. Зенкова*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины, 630090,  
Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8; факс: +7(383)-3333677;  
эл. почта: evg\_log@niboch.nsc.ru

Исследована способность искусственных рибонуклеаз – низкомолекулярных соединений, способных расщеплять РНК *in vitro* - вызывать концентрационно - зависимую гибель опухолевых клеток человека. Показано, что токсическое действие искусственных рибонуклеаз на клетки проявляется уже при низких ( $10^{-5}$  М) концентрациях соединений. Изучение механизма токсического действия этих соединений показало, что дополнительно к рибонуклеазной активности исследованные соединения обладают и мембранотропной активностью, что позволяет им эффективно проникать в клетки. Показано, что действие искусственных рибонуклеаз реализуется за счет повреждения ими клеточных мембран, отслойки плазмалеммы и нарушения её макромолекулярной организации, при этом клетка с поврежденной мембраной продолжает жить в случае, если воздействие соединений было кратковременным.

**Ключевые слова:** искусственные рибонуклеазы, цитотоксическое действие, мембранотропная активность, противоопухолевые препараты.

**ВВЕДЕНИЕ.** Злокачественные заболевания являются одной из основных проблем современной медицины и онкологии, так как даже при благоприятном течении болезни часто не удается достичь полного выздоровления пациента, существенно увеличить продолжительность и обеспечить сохранение качества его жизни. Это связано с тем, что предлагаемые схемы лечения рака используют хирургические методы в комбинации с высокодозной терапией, серьезным недостатком которой является высокая токсичность современных противоопухолевых препаратов в отношении жизненно важных органов и систем организма. Сопутствующие побочные эффекты снижают эффективность, а в ряде случаев, ограничивают применение противоопухолевых средств. Для решения проблемы лечения рака необходимы новые подходы, обеспечивающие высокую избирательность и эффективность лечения по сравнению со стандартной химиотерапией. Например, природные РНКазы проявляют цитотоксичность, которая повышается при присоединении к ним катионных группировок [1]. Особое внимание исследователей привлекла РНКаза из ооцитов амфибий, названная “онконазой” [2], которая проявляет высокую цитотоксичность по отношению к линиям опухолевых клеток человека, причем гибель клетки происходит по механизму апоптоза [3, 4]. В настоящее время ведутся разработки противоопухолевого препарата на основе онконазы.

---

\* - адресат для переписки

В последнее время большой интерес вызывают соединения, способные эффективно расщеплять РНК – искусственные РНКазы (аРНКазы) [5]. Эти соединения, подобно природным ферментам, катализируют реакцию трансэтерификации в физиологических условиях и необратимо разрушают РНК. Несмотря на то, что в последние годы было создано большое число таких низкомолекулярных катализаторов, ещё не удалось получить соединений, которые бы эффективно расщепляли РНК внутри клетки.

Наши исследования показали, что аРНКазы на основе конъюгатов 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана и имидазола эффективно расщепляют РНК в физиологических условиях *in vitro*. Полное расщепление РНК наблюдается уже через 6–12 часов при концентрации соединений  $10^{-5}$ – $10^{-4}$  М [6–8]. Добавление этих соединений к культуре клеток MDCK (клетки почки собаки) приводило к гибели этих клеток. Представлялось интересным выяснить, проявляют ли эти соединения токсичность по отношению к раковым клеткам человека, и вследствие чего происходит гибель клеток: разрушения мРНК или токсическое действие этих аРНКаз обеспечивается другими механизмами.

**МЕТОДИКА.** В экспериментах были использованы клетки эпидермоидной карциномы человека линии KB-3-1, клетки эпителиоидной карциномы шейки матки линии HeLa, клетки нейробластомы линии SK-N-MC, клетки почки эмбриона человека линии HEK293, а также перевиваемая культура эпителиальных клеток почки собаки MDCK.

Клетки культивировали в среде IMDM, содержащей 10%-ную эмбриональную телячью сыворотку, антибиотики (100 ед./мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина) и антимикотик амфотерицин (0,25 мкг/мл), в атмосфере 5%-ного  $\text{CO}_2$  при 37°C. Клетки высевали в 96-луночный планшет (3000 клеток в 100 мкл среды на лунку) или в 24-луночный планшет (10000 клеток в 500 мкл среды на лунку) и культивировали 24 ч, после чего добавляли аРНКазы.

Суммарную клеточную РНК выделяли из культивируемых клеток линии KB-3-1 согласно методике, описанной в [9]. Для предотвращения деградации РНК все операции по ее выделению проводили на льду. Клетки ( $10^5$ – $10^6$ ) осаждали центрифугированием при 200 g в течение 10 мин при 4°C. Супернатант удаляли и клетки лизировали 1%-ным SDS. К смеси добавляли 1/10 объёма 2 М ацетата натрия, pH 4,5, и 2 объёма фенола, уравновешенного водой, тщательно перемешивали. Водную фазу от органической отделяли центрифугированием (10000 g, 10 мин) и экстрагировали остатки белков равным объёмом смеси фенол/хлороформ (v/v, 1/1). РНК осаждали из водной фазы 2,5–3 объёмами этанола в присутствии 0,3 М ацетата натрия, pH 4,5, и инкубировали для формирования осадка в течение 12 ч при –20°C. Осадок РНК отделяли центрифугированием (12000 g, 4°C, 15 мин), промывали 75%-ным этанолом, высушивали и растворяли в воде Milli Q, хранили при –20°C. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 260 нм. Наличие примесей белков определяли по отношению значения поглощения на длинах волн 260 нм/280 нм. Сохранность выделенной РНК проверяли с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле.

Изменение уровней мРНК генов *GAPDH*, *18S* рРНК,  $\beta$ -актина,  $\beta$ -микроглобулина ( $\beta_2m$ ) и *c-myc* в клетках KB-3-1 проводили методом обратной транскрипции - полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) согласно процедуре, опубликованной в [10].

Для синтеза кДНК использовали суммарную РНК клеток KB-3-1, выделенную как описано ранее. Реакцию синтеза кДНК проводили при 42°C в течение 1 ч, в реакционной смеси, содержащей буфер 50 mM Трис-HCl, pH 8,3, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM DTT, 75 mM KCl, 0,05 мкг/мкл суммарной РНК, 5 мкМ праймера d(T)<sub>15</sub>, 0,5 mM каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов и 0,5 е.а./мкл РНК-зависимой ДНК-полимеразы M-MuLV.

В качестве прямых (**U**) и обратных (**R**) праймеров были использованы следующие последовательности олигонуклеотидов:

для гена *GAPDH* – (**U**) ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC; (**R**) TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

для гена *18S* – (**U**) ATT CGT ATT GCG CCG CTA GA; (**R**) GGT CGG CAT CGT TTA TGG TC

для гена  $\beta$ -актин – (**U**) GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG; (**R**) GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG

для гена  $\beta_2m$  – (**U**) ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA; (**R**) ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG

для гена *c-тус* – (**U**) GAC AGC AGC TCG CCC AA; (**R**) CTC CTC GGT GTC CGA GGA CC

ПЦР проводили в реакционной смеси, содержащей 250 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0,25 мкМ прямого и обратного праймеров, кДНК, полученную с 50 нг суммарной клеточной РНК, и 2 е.а. *Taq*-ДНК-полимеразы в буфере 10 мМ Трис-НCl, pH 8,3, 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01%-ный Твин-20. Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле в стандартных условиях. Гель окрашивали бромистым этидием (0,002%) в течение 15 мин и фотографировали.

Токсическое действия соединений Dp12 и ABL3C3 на культуры клеток определяли с помощью МТТ теста [11]. Клетки высаживали в 96-луночные планшеты как описано выше, обрабатывали соединениями в концентрациях от 10<sup>-7</sup> до 10<sup>-3</sup> М. Через определенные промежутки времени оценивали с помощью МТТ теста количество выживших клеток. Для этого к клеткам без смены среды добавляли раствор 3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) (5 мг/мл) в фосфатно-солевом буфере до концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали в течение 3 ч в тех же условиях. Среду удаляли, к клеткам добавляли по 100 мкл ДМСО, в котором происходит растворение образовавшихся в клетках кристаллов формазана, и измеряли оптическую плотность на многоканальном спектрофотометре на длинах волн 570 и 630 нм, где A<sub>570</sub> – поглощение формазана, а A<sub>630</sub> – фон клеток. Данные представляли в виде процента живых клеток относительно контроля. За 100% принимали количество клеток в контроле, где клетки инкубировали в отсутствие аРНКаз.

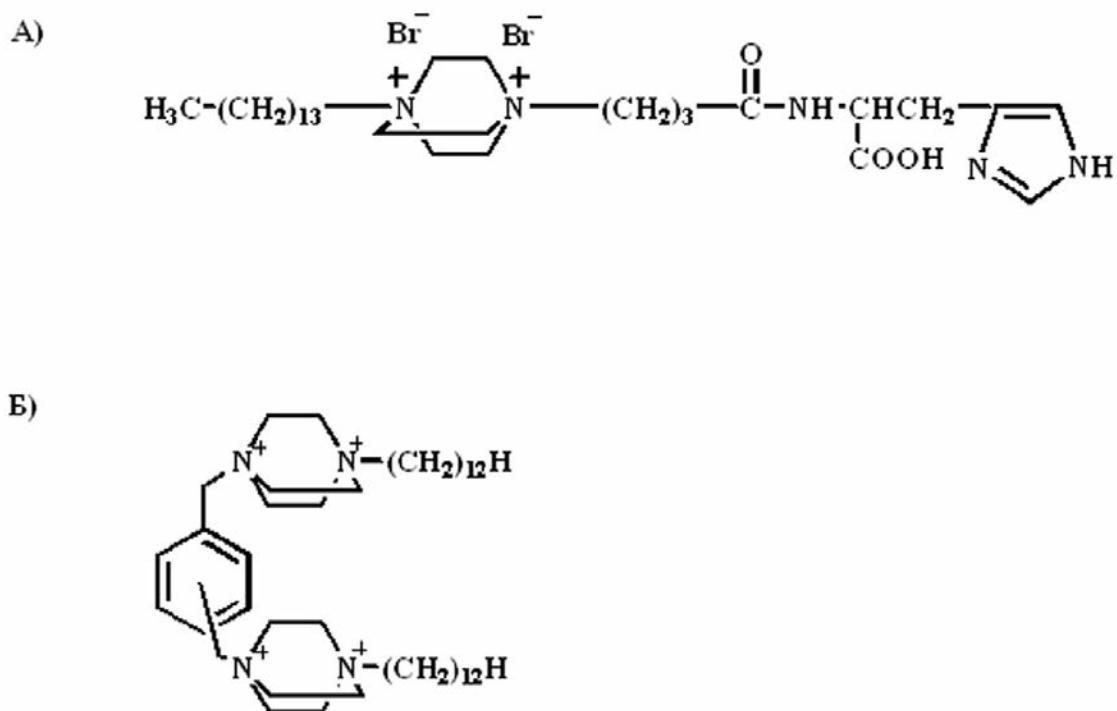
Мембранотропную активность соединений Dp12 и ABL4C3 определяли с помощью окраски клеток трипановым синим. Данные представляли в виде процента живых неокрашенных трипановым синим клеток относительно клеток с повреждённой мембраной (окрашенных красителем). За 100% принимали отношение окрашенных и неокрашенных клеток в контроле, где клетки инкубировали в отсутствие аРНКаз и детергента.

Изучение изменений ультраструктуры клеток культуры KB-3-1 под воздействием ABL3C3 проводили, используя электронную микроскопию. Клетки, выращенные на мембранах Millicell, обрабатывали аРНКазой ABL3C3 в концентрациях 20 и 50 мкМ, и фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида при 4°C через 30 мин, 2,5 ч, 6 и 24 ч. После промывки раствором Хенкса мембраны с клетками дофиксировали 1% раствором осмиевой кислоты и обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации и ацетоне по стандартной методике и заливали в смесь эпон-аралдит [12]. Ультратонкие срезы готовили в плоскости, перпендикулярной поверхности поддерживающей мембраны на ультратоме Райхерт (“Райхерт”, Австрия), контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца и просматривали в электронном микроскопе Н-600 (“Hitachi”, Япония).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Химические рибонуклеазы – это низкомолекулярные соединения различной природы, способные катализировать расщепление РНК в мягких условиях [5]. Ранее было показано, что расщепление РНК в физиологических условиях (pH 7,0, 37°C) происходит эффективно

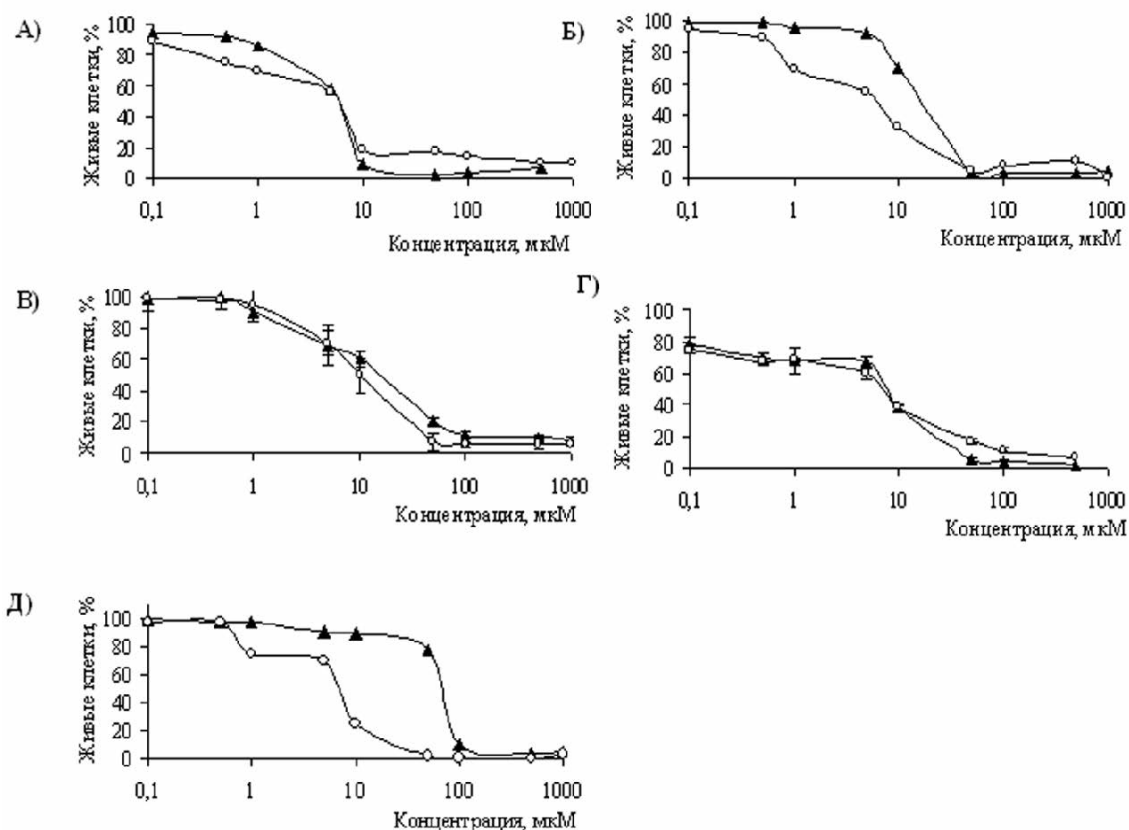
## ДЕЙСТВИЕ РИБОНУКЛЕАЗ НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

в присутствии целого ряда соединений, имитирующих активные центры природных РНКаз [7, 13, 14]. Одним из наиболее эффективных соединений такого типа оказалось соединение ABL3C3 (рис. 1), представляющее собой конъюгат 1,4-дизабицикло[2.2.2]октана, несущего олигометиленовый фрагмент у кватернизованного атома азота, и гистидина [6]. Это соединение в концентрации  $1-5 \times 10^{-4}$  М полностью расщепляет *in vitro* различные РНК за 6-12 ч при 37°C [7]. Второе соединение, использованное в работе, - искусственная рибонуклеаза Dp12 (рис. 1) [8]- представляет собой два остатка 1,4-дизабицикло[2.2.2]октана, несущие додекаметиленовые заместители у четвертичных атомов азота, присоединенные к бензольному кольцу в *para*-положении. В отличие от аРНКазы ABL3C3, соединение Dp12 не содержит функциональных групп, известных как эффективные катализаторы реакции трансэтерификации, однако эффективно расщепляет РНК при концентрации  $10^{-5}$  М [8, 15].



**Рисунок 1.**  
Химические рибонуклеазы ABL3C3 (А) и Dp12 (Б).

Цитотоксичность искусственных рибонуклеаз исследовали с помощью МТТ теста, позволяющего спектрофотометрически определить количество живых клеток [16]. Клетки инкубировали с аРНКазами в концентрации от  $10^{-7}$  М до  $10^{-3}$  М в течение 24 ч и затем оценивали долю выживших клеток по отношению к контролю (клетки, инкубированные в отсутствие аРНКаз) (рис. 2). Концентрационные кривые токсичности соединений имеют классический S-образный вид для всех линий клеток, использованных в работе. В диапазоне концентраций от  $10^{-7}$  М до  $10^{-5}$  М соединения ABL3C3 и Dp12 слабо токсичны, а при инкубации клеток с соединениями в концентрации  $10^{-5}$ – $10^{-4}$  М происходит резкое снижение количества выживших клеток. При этом соединение Dp12, способное количественно расщеплять РНК *in vitro* при более низких концентрациях, чем соединение ABL3C3, только в некоторых случаях (для клеток KB-3-1 и MDCK) оказалось более токсично, чем ABL3C3.



**Рисунок 2.**

Токсическое действие аРНКаз ABL3C3 и Dp12 на различные эукариотические клетки. Клетки инкубировали с аРНКазами ABL3C3 (▲) и Dp12 (○) в концентрации от  $10^{-7}$  М до  $10^{-3}$  М в течение 24 ч. Количество живых клеток оценивали с помощью МТТ теста. За 100% принимали количество живых клеток в контроле, где клетки инкубировали в отсутствие соединений.

А) - Д) - для линий клеток HeLa, KB-3-1, SKNMC, HEK293 и MDCK, соответственно.

Значения  $IC_{50}$  (концентрация соединения, при которой наблюдается гибель половины клеток) для соединения Dp12 составляет 6-10 мкМ (таблица), в то время как концентрация соединения, при которой наблюдается наибольшая скорость расщепления РНК *in vitro*, составляет 10 мкМ. Таким образом, при концентрации 10 мкМ, обеспечивающей эффективное расщепление РНК *in vitro*, соединение Dp12 токсично для клеток. Аналогичные данные были получены для соединения ABL3C3, для которого оптимальная концентрация для расщепления РНК варьирует от 0,1 до 0,5 мМ, и значения  $IC_{50}$ , 10-60 мкМ в зависимости от типа клеток, находятся в том же диапазоне. Следует отметить, что значение  $IC_{50}$  для аРНКазы Dp12 мало различается между клеточными линиями. Напротив, клетки HeLa и HEK293 были наиболее, а клетки MDCK наименее чувствительны к токсическому действию ABL3C3: значения  $IC_{50}$  отличались почти на порядок. Поскольку клетки MDCK не являются опухолевыми, можно говорить о некоторой избирательности действия ABL3C3 на опухолевые линии клеток. Полученные результаты указывают на то, что в концентрации  $\geq 10^{-5}$  М искусственные рибонуклеазы Dp12 и ABL3C3, токсичны для опухолевых клеток и, возможно, либо повреждают жизненно важные РНК клетки и/или действуют на другие биополимеры клеток.



## ДЕЙСТВИЕ РИБОНУКЛЕАЗ НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

Таблица. Значения  $IC_{50}$  соединений Dp12 и ABL3C3 для клеток HEK293, SK-N-MC, KB-3-1, HeLa и MDCK.

Клетки	$IC_{50}^*$	
	Dp12 [мкМ]	ABL4C3 [мкМ]
HEK293	7±5	7±6
SK-N-MC	10±4	20±8
KB-3-1	7±3	20±7
HeLa	6±3	6±4
MDCK	7±4	60±10

Примечание: \* - концентрация соединения, при которой наблюдается гибель 50% клеток.

Для более детального выяснения механизма токсического действия аРНКаз Dp12 и ABL3C3, было необходимо исследовать кинетику действия соединений на клетки. В этих экспериментах клетки инкубировали с соединением при концентрации ABL3C3 близкой  $IC_{50}$ , а количество выживших клеток оценивали через определенные промежутки времени в течение двух суток, также используя МТТ тест. Кинетика токсического действия аРНКазы ABL3C3 на клетки HeLa представлена на рисунке 3. Аналогичные данные были получены и для соединения Dp12 для всех используемых в работе клеточных линиях (первичные данные не приводятся). Видно, что кинетика гибели клеток под действием аРНКазы носит двухфазный характер. Гибель клеток с наибольшей скоростью происходит в первые часы их инкубации в присутствии аРНКаз, причём концентрация соединения влияет лишь на процент погибших клеток, но не на скорость их гибели (рис. 3). В период 6–48 часов инкубации доля выживших клеток относительно контроля заметно не меняется. Следует отметить, что кинетика гибели клеток под действием ABL3C3 и Dp12 на первом этапе (до 6 ч) не коррелирует с кинетикой расщепления РНК этими соединениями, однако в промежутке от 6 до 48 ч характер кривой совпадает с кинетикой расщепления РНК [7, 15].

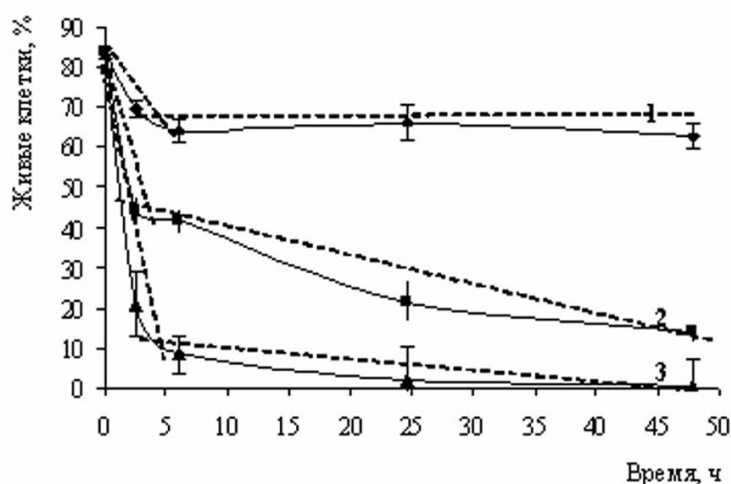


Рисунок 3.

Кинетика гибели клеток HeLa в присутствии соединения ABL3C3. Клетки инкубировали с ABL3C3 в концентрациях  $10^{-6}$  М (1),  $5 \times 10^{-6}$  М (2) и  $10^{-5}$  М (3) в течение 48 ч. Количество живых клеток оценивали с помощью МТТ теста. За 100% принимали количество живых клеток в контроле, где клетки инкубировали в отсутствие аРНКазы. Пунктирными линиями показан двухфазный характер кинетических кривых.

Соединения Dp12 и ABL3C3 являются амфифилами и при определённых условиях способны образовывать мицеллоподобные структуры, и вести себя в растворе подобно ионным детергентам [15]. Как известно, токсическое действие детергентов на клетки связано с разрушением их мембран. Для того чтобы проверить, не связано ли токсическое действие Dp12 и ABL3C3 с их амфифильными свойствами, то есть с их мембранотропной активностью, мы использовали окраску клеток после инкубации с аРНКазами трипановым синим, который способен проникать и окрашивать клетки в случае повреждения их внешней мембраны. В качестве контроля мы использовали детергент NP40, обладающий высокой мембранотропной активностью [17]. Проведенное исследование показало (рис. 4), что токсическое действие соединения ABL3C3 намного слабее, чем у детергента NP40, однако уже через 30 минут наблюдается окраска примерно 10-20% клеток трипановым синим, что свидетельствует о повреждении внешней мембраны клеток (рис. 4). Через 2,5 ч 0,05%-ный детергент NP40 вызывает гибель практически всех клеток, в то время как доля окрашенных клеток после инкубации в присутствии аРНКаза ABL3C3 практически не изменяется. Данные по цитотоксичности соединения ABL3C3 по отношению к клеткам KB-3-1 (24 ч инкубации), полученные с помощью окраски трипановым синим, полностью совпадают с данными, полученными с помощью МТТ теста (рис. 2). Аналогичные результаты были получены и для соединения Dp12 (рис. 4). По-видимому, аРНКазаы оказывают слабое мембранотропное действие на клетки в первые часы инкубации и именно мембранотропная активность аРНКаза вызывает быструю гибель клеток на первом этапе, однако мембранотропная активность исследуемых аРНКаза значительно менее выражена, чем у детергентов.

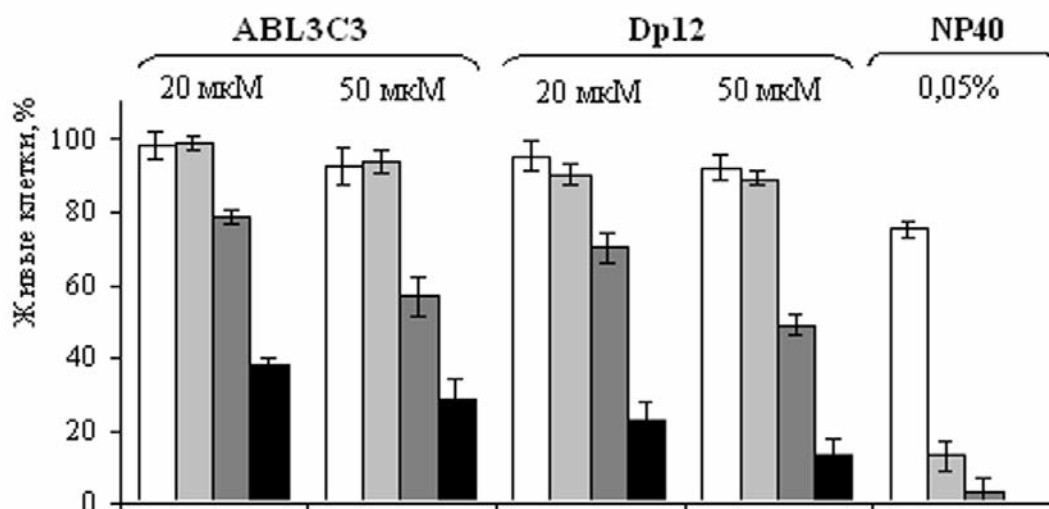


Рисунок 4.

Сравнение токсического действия соединения ABL3C3, Dp12 и детергента NP40. Клетки KB-3-1 после 30 минут (белые столбики), 2,5 ч (светло-серые столбики), 6 ч (темно-серые столбики) и 24 ч (чёрные столбики) инкубации. Оценку доли погибших клеток проводили с помощью окраски трипановым синим.

Известно, что токсическое действие соединений может привести к индукции апоптоза и активации проапоптотических факторов, что ведет к активации каспаз (цистеиновых аспартат-специфичных протеиназ). Различают инициаторные и эффекторные каспазы. Первые протеолитически активируют эффекторные каспазы, которые вызывают деградацию специфических субстратов клетки, её гибель и распад с образованием в конечном итоге апоптотических телец.

## ДЕЙСТВИЕ РИБОНУКЛЕАЗ НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

При этом расщеплению подвергаются протеиновые киназы, белки цитоскелета, ферменты репарации ДНК и происходит разрушение генов “домашнего хозяйства” [18]. Известно, что эукариотические РНКазы обладают апоптогенным потенциалом действия против опухолевых клеток. Например, онконаза вызывает каспазозависимый апоптоз, вызывая разрушение цитоплазматической тРНК [19], BS-РНКазы вызывает апоптоз клеток в случае агрессивного подтипа рака щитовидной железы [20]. Также недавно опубликованы данные, характеризующие в качестве апоптогена онконазу, значительно ингибирующую рост опухолевых клеток A549 (немелкоклеточной карциномы легких) как *in vitro*, так и *in vivo* [21].

Мы решили проверить, влияет ли обработка клеток исследуемыми аРНКазы на уровень экспрессии генов “домашнего хозяйства”. В этих экспериментах клетки KB-3-1 инкубировали в присутствии ABL3C3 (концентрация соединения была 20 и 50 мкМ), в течение 0-24 ч, после чего выделяли суммарную клеточную РНК и методом ОТ-ПЦР оценивали уровни экспрессии генов. В качестве контроля использовали клетки, не обработанные ABL3C3. Токсическое действие аРНКазы оценивали путём сравнения уровня экспрессии мРНК генов *GAPDH*, *18S pРНК*,  $\beta$ -актина,  $\beta$ -микроглобулина ( $\beta_2m$ ) и *c-myc* в клетках KB-3-1 обработанных и необработанных соединением (рис. 5). Как видно из представленных данных, инкубация клеток KB-3-1 в присутствии аРНКазы ABL3C3 в концентрации 20 и 50 мкМ не приводит к значительному изменению уровня мРНК генов *18S pРНК*,  $\beta$ -актина,  $\beta$ -микроглобулина, *GAPDH* и *c-myc* даже после инкубации в течение 24 ч, времени когда наблюдалась значительная гибель клеток (рис. 2). Возможно, под действием исследуемых аРНКаз происходят лишь единичные разрывы в исследуемых мРНК, которые не фиксируются использованным методом ввиду ограниченного размера ПЦР продукта, однако влияющие на функционирование клетки в целом, либо действие этих РНКаз на клетку происходит по механизму, не вызывающему деградацию мРНК.

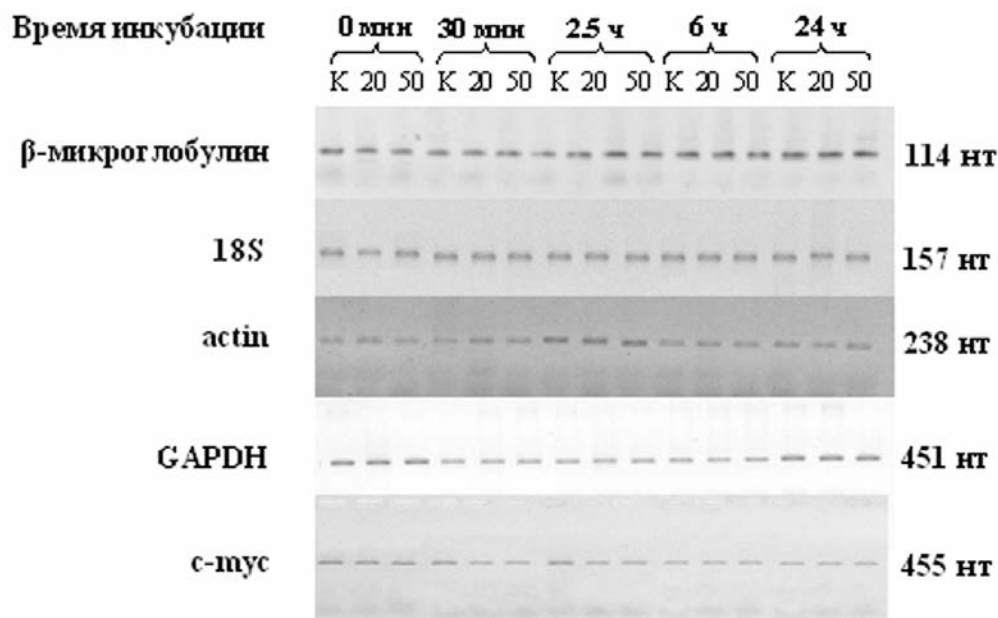


Рисунок 5.

Анализ уровней мРНК различных генов в клетках KB-3-1 после инкубации с соединением ABL3C3. Представлена панель фотографий 1,5% агарозного геля, окрашенного бромистым этидием, после разделения продуктов реакции ОТ-ПЦР препаратов суммарной РНК клеток, обработанных ABL3C3. Клетки инкубировали в присутствии 20 и 50 мкМ концентрации аРНКазы в течение различного времени (указано сверху). Положение продуктов ПЦР реакции, соответствующих определенным генам приведено слева, справа указан размер ПЦР продукта. К - контрольные клетки, 20 и 50 - концентрация ABL3C3 20 мкМ и 50 мкМ, соответственно.



Для непосредственного изучения процессов, происходящих в клетках под воздействием ABL3C3, было проведено изучение ультратонкой структуры клеток: контрольных и инкубированных в присутствии аРНКазы с помощью электронной микроскопии. Оказалось, что морфология клеток культуры KB-3-1 в образцах, обработанных соединением ABL3C3 в концентрациях 20 и 50 мкМ в течение 2-5 мин, не отличается от морфологии интактных (контрольных) клеток (рис. 6А). Клетки ограничены плазматической мембраной (плазмалеммой), формирующей редкие тонкие выросты цитоплазмы и микроворсинки, встречаются отдельные десмосомы. Плазмалемма имеет “классический” вид трехконтурной мембраны с электронно-прозрачным липидным и электронно-плотными белковыми слоями (рис. 6А). Для удобства изложения поверхность клеток, граничащая с питательной средой, именуется апикальной, а поверхность, граничащая с опорной подложкой – базальной. На латерально-базальной плазмалемме наблюдаются “опушенные” эндоцитозные ямки и пузырьки, расположенные случайным образом, встречаются кавеолы. Крупное ядро клеток имеет ровные контуры, заполнено в основном эухроматином, с хорошо выраженным ядрышком. Цитоплазма клеток имеет низкую электронную плотность и содержит немногочисленные митохондрии, короткие узкие цистерны ЭПР с электронно-прозрачным содержимым и редкими рибосомами, единичные лизосомальные структуры и аппарат Гольджи небольшого размера. Изредка в цитоплазме клеток встречаются гомогенные жировые включения низкой электронной плотности.

Обработка соединением ABL3C3 в течение 30 мин и 2,5 ч вызывает отчетливое повреждение плазмалеммы клеток KB-3-1 (рис. 6Б,В). Дефекты апикальной плазмалеммы, имеющие размеры до 0,5 мкм в сечении, регистрируются на срезах около 10% от общего числа клеток через 30 мин, и более 50% через 2,5 ч. Поврежденная плазмалемма отделяется от цитоплазмы и формирует мембранные профили неровных очертаний, в основном – в виде пузырьков, концентрических и замкнутых округлых фигур разных размеров. На электронограммах отчетливо прослеживается связь плазмалеммы, сохраняющейся на границе дефектов, с мембраной профилей. В зоне дефектов находится оголенная цитоплазма, не имеющая на поверхности каких-либо пограничных структур, цитоплазматический матрикс непосредственно контактирует с окружающей средой (рис. 6Б-Г). Трёхконтурное строение отделившихся фрагментов плазмалеммы нарушено, она имеет вид сплошного осмиофильного слоя (рис. 6В). На границе оголенной цитоплазмы локализуются мембранные пузырьки, очевидно, представляющие собой поперечные срезы кавеол (рафтов) (рис. 6Г). Описанные дефекты плазмалеммы отсутствовали на базальной поверхности клеток и на срезах интактных клеток в течение 24 ч наблюдения. В клетках, инкубированных в присутствии соединения ABL3C3 течение 2,5 ч, наблюдалась активация аппарата Гольджи (увеличение его площади, возрастание количества гладкомембранных и опушённых пузырьков), рост числа эндосомальных структур. Выявлялись участки мембран ЭПР, ядерной оболочки и цистерн аппарата Гольджи, потерявшие трехконтурное строение и имевшие вид сплошного осмиофильного слоя, с такими участками были связаны мелкие везикулы, образованные размытой осмиофильной мембраной (рис. 6Д). После 2,5 ч инкубации с соединением в клетках наблюдалось появление неровных жировых включений с отложениями осмиофильного вещества по периферии (рис. 6Б,В), отражающих активацию деструктивных процессов. Характер изменений клеток был одинаков при концентрациях соединения ABL3C3 20 и 50 мкМ, однако при низкой концентрации число клеток с дефектами плазмалеммы и изменениями цитоплазматических структур было заметно меньше, и они имели дефекты плазмалеммы меньшей площади.

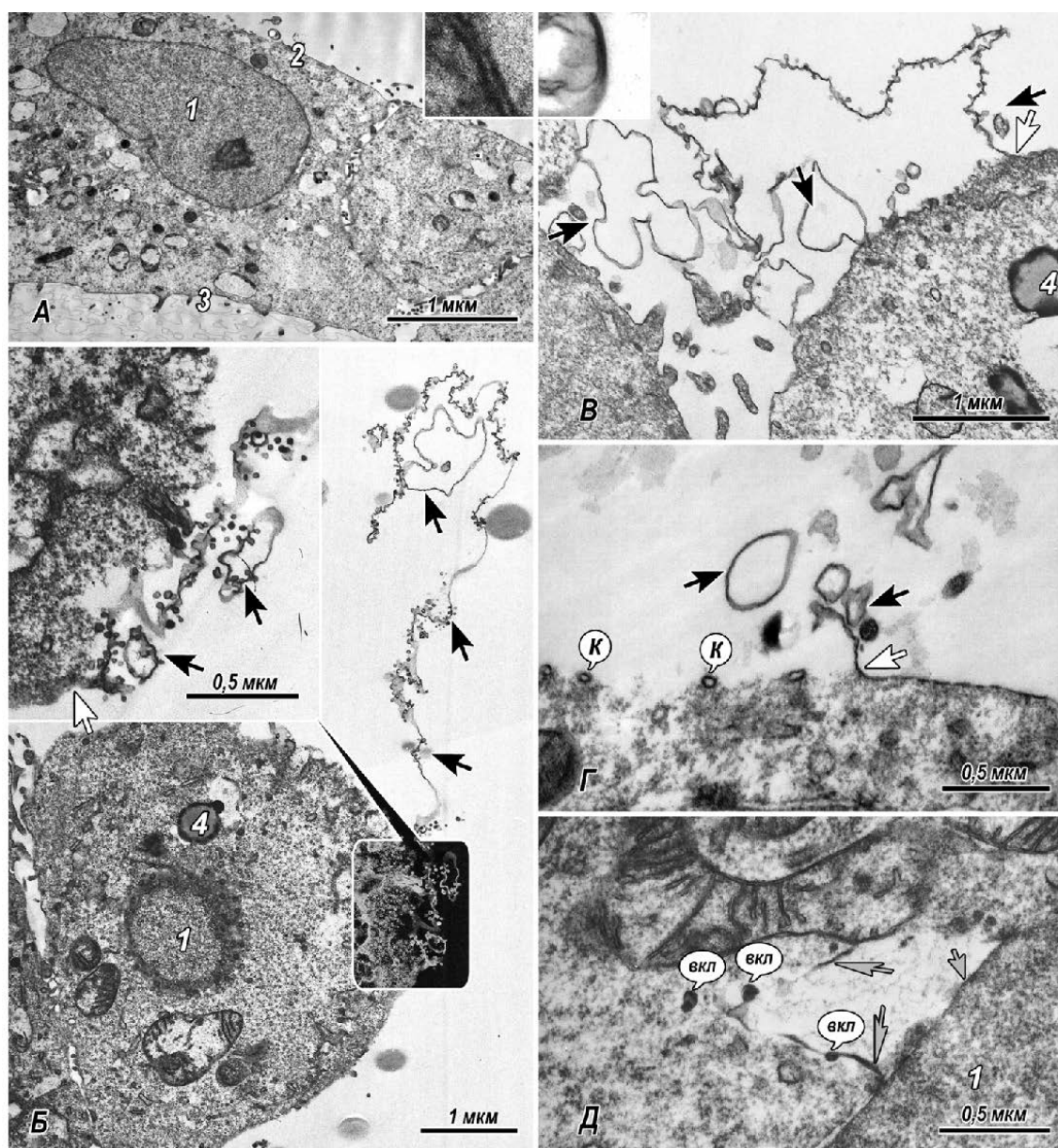


Рисунок 6.

Нарушение целостности клеточных мембран культуры KB-3-1 под действием соединения ABL3C3. А - Интактные клетки. 1 - ядро; 2 - апикальная поверхность клетки; 3 - базальная поверхность клетки. В рамке показан фрагмент поперечного среза плазматической мембраны, видны белково-липидные слои. Длина стороны рамки соответствует 40 нм. Б - клетка после 2,5 ч инкубации с соединением ABL3C3 в концентрации 20 мкМ. Оголен участок цитоплазмы с формированием протяженных мембранных фрагментов. В рамке приведен фрагмент, выделенный негативным изображением и показывающий отсложку плазматической мембраны с образованием мелких везикул. 4 - липидные включения. В - участок клетки после 2,5 ч инкубации с соединением ABL3C3 в концентрации 50 мкМ. В рамке показан фрагмент поперечного среза отслоившейся плазматической мембраны, белково-липидные слои не различаются. Длина стороны рамки соответствует 40 нм. Г - граница отслойки поврежденной плазматической мембраны клетки после 2,5 ч инкубации с соединением ABL3C3 в концентрации 50 мкМ. Кавеолы в оголенной цитоплазме отмечены буквой "к". Д - повреждение мембраны ядерной оболочки через 6 ч после обработки соединением ABL4C3 в концентрации 20 мкМ. Короткой стрелкой показан внутренний листок ядерной оболочки, длинной - измененный наружный, мелкие осмиофильные включения отмечены буквами "вкл". Чёрные стрелки на всех снимках показывают отслоившуюся плазматическую мембрану; белые стрелки - участок перехода между отслоившейся и сохранённой мембраной.



Таким образом, соединение ABL3C3 в течение 30 минут оказывает выраженное повреждающее действие на плазмалемму клеток KB-3-1, приводя не только к её отслойке и оголению участков цитоплазмы, но и вызывая нарушение её макромолекулярной организации. Повреждения мембран органоидов развиваются позднее и выражены в меньшей степени, но имеют такой же характер, как и повреждения плазмалеммы.

Через 6 ч инкубации клеток KB-3-1 в присутствии соединения ABL3C3 в концентрациях 20 и 50 мкМ клетки с дефектами плазмалеммы были единичны и имели морфологию, идентичную описанной выше. Основная часть клеток в этот период потеряла характерную фибробластическую форму и округлилась, что привело к перераспределению органоидов в цитоплазме (рис. 7А). Полная перестройка организации клеток затрудняет оценку изменений количества органоидов и их строения по сравнению с более ранними сроками эксперимента. Однако морфология клеток (рис. 7Б) свидетельствует об интенсивном протекании процессов эндоцитоза и утилизации мембран: высокое содержание эндосом, миелоноподобных фигур, везикулярных и лизосомальных структур, активация аппарата Гольджи. Во многих клетках выявлялись участки повреждения мембран ЭПР, ядерной оболочки и аппарата Гольджи, аналогичные наблюдавшимся через 2,5 ч инкубации. Как и в более ранние сроки, повреждающее действие на клетки KB-3-1 соединения ABL3C3 в концентрации 20 мкМ менее выражено как на уровне отдельных клеток, так и монослоя в целом. Анализ строения клеток KB-3-1 позволяет заключить, что после 6 ч инкубации с соединением ABL3C3 часть клеток погибает и разрушается, а в сохранившихся клетках идут активные процессы утилизации поврежденных клеточных мембран и репарации.

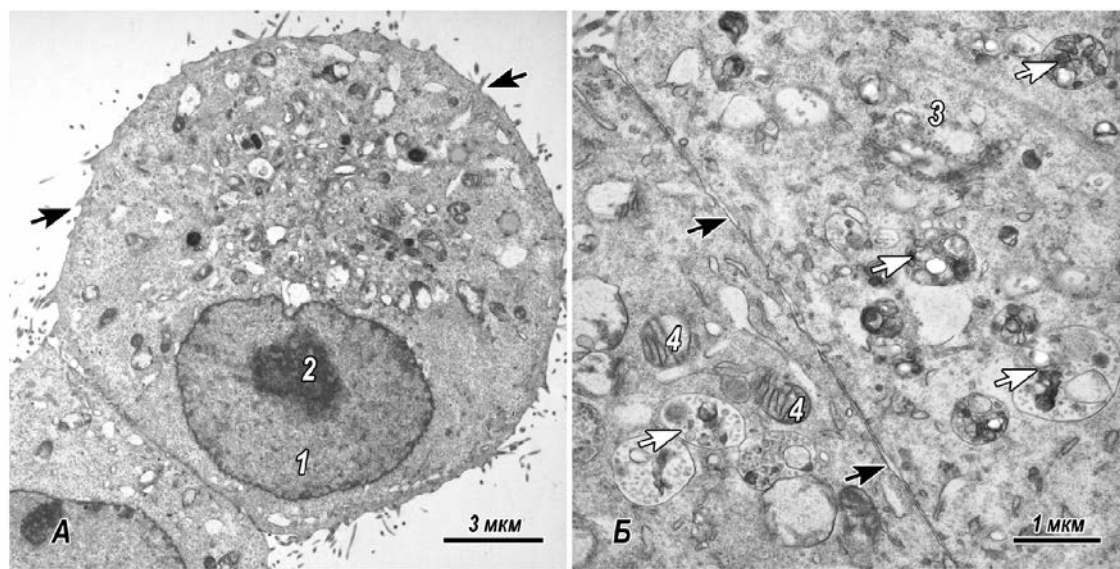


Рисунок 7.

Изменения морфологии клеток культуры KB-3-1 после 6 часов инкубации с соединением ABL3C3 в концентрации 50 мкМ. А - округлившиеся клетки; Б - участки цитоплазмы соседних клеток с высоким содержанием лизосомальных и фагосомальных структур (показаны белыми стрелками). 1 - ядро; 2 - ядрышко; 3 - аппарат Гольджи; 4 - митохондрии; чёрной стрелкой показана плазмалемма.

Через 24 ч после добавления к клеткам соединения ABL3C3 в концентрации 50 мкМ клетки на подложке практически отсутствовали. При концентрации соединения 20 мкМ монослой был сохранен, в клетках наблюдались выраженные изменения, отражающие активные процессы утилизации повреждённых мембран: в цитоплазме наблюдались многочисленные эндосомы и аутофагосомы, содержащие фрагменты мембран разной степени деградации, был хорошо развит аппарат Гольджи, ответственный за синтез гидролаз и доставку их в эндосомы и аутофагосомы [22]. Одновременно с этим, структура некоторых клеток через 24 ч после инкубации с соединением ABL3C3 в концентрации 20 мкМ практически не отличалась от контроля. По-видимому, эти клетки являются “новыми” и сформировались за счет митотического деления в течение эксперимента (митозы в культуре регистрировались на протяжении 24 ч наблюдения). Данные клетки, очевидно, не подвергались воздействию препарата, и могут служить источником восстановления монослоя. Дефекты плазматической мембраны с образованием мембранных профилей в данный период не выявлены.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Таким образом, нами было показано, что исследуемые аРНКазаы обладают высокой токсичностью по отношению ко всем использованным клеточным культурам, причем их токсическое действие проявляется в концентрациях более низких или близких тем, при которых наблюдается эффективное расщепление РНК *in vitro*. При этом токсическое действие аРНКаза в отношении перевиваемой культуры эпителиальных клеток почки собаки MDCK, не являющейся опухолевой линией, на порядок ниже по сравнению с остальными, что дает основание предположить об избирательности действия аРНКаза в отношении опухолевых культур. Проведенное исследование показало, что кроме рибонуклеазной активности эти соединения обладают и мембранотропной активностью, что позволяет им эффективно проникать в клетки. Кинетика токсического действия этих соединений имеет двухфазный характер, что дает основание предположить, что резкое снижение жизнеспособности клеток в первые 6 ч инкубации с исследуемыми аРНКазами, по-видимому, связано именно с мембранотропным действием последних, в то время как последующая гибель клетки обусловлена непосредственно рибонуклеазным действием. Стоит отметить, что концентрация, при которой наблюдается эффективное действие исследуемых аРНКаза на жизнеспособность опухолевых клеток ( $10^{-6}$  М), значительно ниже концентрации мицеллообразования (для Dp12 –  $10^{-4}$  М) [15], что исключает вклад “мицеллярного катализа” в механизм действия данных аРНКаза.

Известно, что цитотоксический эффект РНКаз может включать некаталитические контакты молекул РНКаз с клеточными компонентами. Например, электростатическое связывание молекул РНКаз с отрицательно заряженными гликолипидами и гликопротеинами мембраны может оказывать влияние на рецепторы сигнальной системы клетки и таким образом разрушать всю систему передачи сигнала [23]. Проведенный анализ действия аРНКаза с помощью электронной микроскопии показал, что искусственные рибонуклеазы вызывают за короткое время (30 мин) нарушение макромолекулярной структуры клеточной мембраны и образование дефектов плазмалеммы с оголением участков цитоплазмы, а при более продолжительной инкубации (2,5 ч) повреждают мембраны цитоплазматических органоидов, причем эти изменения носят отчетливый дозозависимый характер.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследованные аРНКазаы обладают противоопухолевым потенциалом действия и могут рассматриваться в качестве основы терапевтических препаратов для лечения раковых заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №05-04-49109-а, программы РАН “Молекулярная и клеточная биология” и “Фундаментальные науки - медицине”, интеграционным проектом СО РАН №20.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Futami J., Maeda T., Kitazoe M., Nukui E., Tada H., Seno M., Kosaka M., Yamada H. (2001) *Biochemistry*, **40**, 7518-7524.
2. Ardelt W., Mikulski S. M., Shogen K. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 245-251.
3. Iordanov M.S., Ryabinina O.P., Wong J., Dinh T.H., Newton D.L., Rybak S.M., Magun B.E. (2000) *Cancer Res.*, **60**, 1983-1994.
4. Grabarek J., Ardelt B., Du L., Darzynkiewicz Z. (2002) *Exp. Cell. Res.*, **278**, 61-71.
5. Niittymäki T., Lonnberg H. (2006) *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 15-25.
6. Konevets D.A., Beck I.E., Beloglazova N.G., Sulimenkov I.V., Sil'nikov V.N., Zenkova M.A., Shishkin G.V., Vlassov V.V. (1999) *Tetrahedron*, **55**, 503-512.
7. Zenkova M., Beloglazova N., Sil'nikov V., Vlassov V., Giege R. (2001) *Methods Enzymol.*, **341**, 468-490.
8. Koval'ov N., Kuznetsova I., Burakova E., Sil'nikov V., Zenkova M., Vlassov V. (2004) *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **23**, 977-981.
9. Chattopadhyay N., Kher R., Godbole M. (1993) *Biotechniques*, **15**, 24-26.
10. Kostenko E.V., Laktionov P.P., Vlassov V.V., Zenkova M.A. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1576**, 143-147.
11. Park J.G., Kramer B.S., Steinberg S.M., Carmichael J., Collins J.M., Minna J.D., Gazdar A.F. (1987) *Cancer Res.*, **47**, 5875-5879.
12. Уикли Б. (1975) *Электронная микроскопия для начинающих*, Мир, Москва.
13. Poduininogin M.A., Vlassov V.V., Giege R. (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5950-5956.
14. Mironova N.L., Pyshnyi D.V., Ivanova E.M., Zenkova M.A., Gross H.J., Vlassov V.V. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1928-1936.
15. Kovalev N.A., Medvedeva D.A., Zenkova M.A., Vlassov V.V. (2008) *Bioorg. Chem.*, **36**, 33-45.
16. Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B. (1987) *Cancer Res.*, **47**, 936-942.
17. Davies A.A., Wigglesworth N.M., Allan D., Owens R.J., Crumpton M.J. (1984) *Biochem. J.*, **219**, 301-308.
18. Ghobrial I.M., Witzig T.E., Adjei A.A. (2005) *CA Cancer J. Clin.*, **55**, 178-194.
19. Saxena S., Shogen K., Ardelt W. (2003) *Laboratory Medicine*, **34**, 380-387.
20. Spalletti-Cernia D., Sorrentino R., Di Gaetano S., Piccoli R., Santoro M., D'Alessio G., Laccetti P., Vecchio G. (2004) *Br. J. Cancer*, **90**, 270-277.
21. Lee I., Kalota A., Gewirtz A.M., Shogen K. (2007) *Anticancer Res.*, **27**(1A), 299-307.
22. Reggiori F., Klionsky D.J. (2005) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**(4), 415-422.
23. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. (2003) *FEBS Lett.*, **540**, 15-20.

Поступила: 01. 09. 2008.



MECHANISM OF THE TOXICITY OF THE ARTIFICIAL RIBONUCLEASES FOR THE  
DIFFERENT HUMAN CANCER CELL LINES

*E.B. Logashenko, I.L. Kuznetsova, E.I. Ryabchikova, V.V. Vlassov, M.A. Zenkova*

Institute of chemical biology and fundamental medicine, Lavrentev av. 8, Novosibirsk, 630090 Russia;  
fax: +7(383)-3333677; e-mail: evg\_log@niboch.nsc.ru

The ability of artificial ribonucleases to cause in the concentration-dependent manner death of cancer cells has been studied. The cytotoxic activity of artificial ribonucleases is observed at rather low concentration of these compounds ( $10^{-5}$  M). Analysis of the mechanism of artificial ribonucleases cytotoxicity revealed that compounds under the study exhibit membranotropic activity in addition to ribonucleases activity found earlier. This activity is responsible for effective penetration of these compounds inside cells. The results obtained show that artificial ribonucleases induce cell death via damage of cells membrane, detachment of plasmalemma and derangement its macromolecular organization. In the case of short-term exposure of cells to the compounds, cells, even with damaged membrane, survive.

**Key words:** artificial ribonucleases, cytotoxicity, membranotropic activity, antineoplastic drugs.