

УДК 577.152.277 + 57.083.3  
©Калачёва, Куриненко

### ВЛИЯНИЕ РИБОНУКЛЕАЗ И ИХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ КРЫСЫ

*Н.В. Калачева, Б.М. Куриненко*

Казанский государственный университет,  
Научно-исследовательский институт биологии, лаборатория инженерной  
энзимологии; 420008, Казань, ул. Кремлевская 18;  
факс: (8432) 387418

Исследовано влияние панкреатической и микробной РНКаз и их модифицированных производных на фагоцитоз дрожжей перитонеальными макрофагами и процесс слияния в них лизосом с фагосомами. Действие нативных РНКаз на макрофаги зависит от концентрации. сравнительно низкие концентрации (0,5 - 50 мкг/мл) стимулируют фагоцитоз и слияние лизосом с фагосомами, в то время как концентрации выше 75 мкг/мл заметно ингибируют эти процессы. РНКазы, модифицированные поверхностно-активным веществом оксанолам КД-6, а также димерные формы проявляют только ингибирующий эффект. Стимулирующий эффект нативной микробной РНКазы и ингибирующий эффект ее гидрофобизированного производного не зависят от коагальгической активности.

**Ключевые слова:** РНКазы, макрофаг, слияние фагосом с лизосомами, ингибирование.

**ВВЕДЕНИЕ.** Наряду с фагоцитозом макрофаги, располагая дистантными медиаторами, регулирующими клеточную пролиферацию и резистентность, реализуют стратегию гомеостаза. Продолжением их гомеостатической (физиологической) функции является обеспечение механизмов подключения фибробластов к репаративным процессам (физиологической основе склеропатий), а также стимуляция непосредственных участников цитотоксических реакций в отношении тканей, ставших чужеродными. Макрофаги определяют внешние признаки гранулематоза -- макрофагзависимого воспаления при хронических бактериальных, грибковых и протозойных инфекциях. Ослабление реактивности макрофагов можно рассматривать как один из общих механизмов противовоспалительной терапии и ослабления цитотоксических реакций [1,2]. Таким образом, поиск веществ, подавляющих реактивность макрофагов, представляет интерес для клинической медицины и фундаментальной науки.

Ранее нами было установлено, что РНКазы *Bacillus intermedius* в концентрациях  $10^{-4}$  -  $10^{-6}$  мкг/мл подавляет функциональную активность В-лимфоцитов (клетки, содержащие СР-рецепторы) и субпопуляции О-клеток, включающих как естественные эффекторные клетки (НК- и К- клетки), так и Т-лимфоциты с низкой плотностью СДГ-антигенов [3]. В связи с этим

## ВЛИЯНИЕ РНКАЗ НА ПЕРИТОНЕАЛЬНЫЕ МАКРОФАГИ

представляется целесообразным изучить влияние РНКаз на реактивность макрофагов.

Настоящая работа посвящена изучению возможности использования РНКаз для подавления одного из этапов фагоцитоза – слияния фагосом с лизосомами в перитонеальных макрофагах крысы. Эта реакция наряду с поглощением корпускулярных объектов отражает функциональную активность макрофагов.

**МЕТОДИКА.** В экспериментах использовали электрофоретически гомогенные препараты панкреатической РНКазы А (РНКазы А) фирмы “Sigma” (США) и РНКазы *Bacillus intermedius* (РНКазы Вi). Нативная РНКазы Вi была получена по ранее опубликованному методу [4] и очищена до электрофоретически гомогенного состояния. Селективно инактивированная по гистидину активного центра, РНКазы *Bacillus intermedius* получена согласно методу [5]. Гидрофобизированные производные РНКаз получали по методике, описанной в работе [6]. В качестве гидрофобного модификатора РНКазы использовали поверхностно-активное вещество оксанол КД-6, общей формулы  $C_nH_{2n}(C_2H_4O)_mH$ , где  $n=8-10$ ,  $m=6$ . Его предварительно переводили в альдегидную форму. Димерные формы панкреатической РНКазы и РНКазы *Bacillus intermedius* получали путем “сшивания” последних диметилсуберимидатом [7].

Специфическую активность РНКаз определяли по методу, описанному в работе [8]. Субстратом служила суммарная дрожжевая РНК производства СКТБ БАВ (Новосибирск). Активности РНКазы А и РНКазы Вi составляли соответственно  $1,1 \times 10^6$  ед/мг и  $1,6 \times 10^6$  ед/мг. Гидрофобизированные производные РНКаз сохраняли 80-84% от исходной активности ферментов, димерные формы – 40-45 % от таковой.

Перитонеальные макрофаги выделяли из перитонеальной жидкости белых лабораторных крыс 5-6 недельного возраста, вводя им в брюшную полость холодный 0,9 % раствор NaCl. Клетки 3 раза промывали тем же раствором, суспендировали в среде Игла, разводили до концентрации  $5,2 \times 10^6$  клеток/мл и культивировали на стеклах в среде Игла pH 7,2, содержащей телячью эмбриональную сыворотку (15%) и 100 единиц/мл канамицина при 37°C.

Влияние РНКаз на слияние фагосом с лизосомами в перитонеальных макрофагах крысы проводили по методике [9].

Объектом фагоцитоза служили свежие пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

Суточную монослойную культуру макрофагов инкубировали в течение 30 мин при 37°C в растворе акридинового оранжевого (АО) в конечной концентрации 5 мкг/мл среды без сыворотки. После отмывки красителя средой Игла клетки обрабатывали суспензией дрожжей (концентрация  $10^5$  клеток/мл, 0,5 мл на стекло) в течение 30 минут. Дрожжи предварительно опсонизировали сывороткой крови крысы [10]. Спустя 30 минут дрожжи, не поглощенные макрофагами, отмывали холодной средой, и макрофаги быстро переносили в термостат на 37°C. Через 1,5-2 часа наблюдали фагоцитоз дрожжей макрофагами в люминесцентном микроскопе. Присутствие окрашенных АО дрожжевых частиц внутри клеток указывало на слияние фагосом с лизосомами. Фагосомы, не слившиеся с лизосомами, отличались от слившихся наличием в них неокрашенных красителем дрожжевых частиц. В каждом случае определяли индекс слияния (%) – число клеток, в которых произошло слияние фагосом с лизосомами на 100 фагоцитирующих макрофагов, и индекс фагоцитоза (%) – число фагоцитирующих макрофагов на общее число просмотренных клеток [10].

Для изучения влияния РНКаз и их производных на процесс слияния фагосом с лизосомами макрофаги инкубировали с растворами этих ферментов в соответствующих концентрациях в ростовой среде в течение двух часов при 37°C, после чего отмывали раствором Хенкса и обрабатывали АО и суспензией дрожжей, как описано выше. Опыты с каждым исследуемым препаратом повторяли 5-6 раз.

Влияние ферментных препаратов на адгезию к пластиковой поверхности изучали согласно следующей методики. Суспензию перитонеальных макрофагов крысы (исходная концентрация  $5,7 \times 10^6$  клеток) обрабатывали ферментными

препаратами соответствующей концентрации в синтетической среде без сыворотки в течение 20 минут. Затем их трижды отмывали избытком среды, центрифугируя 3 минуты при 1,5 тыс. оборотов/мин., разводили средой до исходной концентрации, помещали на пластиковые чашки, и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Через 2 часа в камере Горяева подсчитывали количество клеток, не адсорбированных на пластиковой поверхности и рассчитывали степень адгезии клеток (А%):

$$A = \frac{\text{число исходных клеток} - \text{число неадсорбированных на стекле клеток}}{\text{число исходных клеток}} \cdot 100 \%$$

Все эксперименты проводили в 5-6 повторностях и статистически обрабатывались с использованием программы Microsoft Excel для ПК. Статистическая значимость различий между экспериментами рассчитывалась по критерию Стьюдента. Стандартное отклонение ( $\alpha$ ) не превышало 5 %.

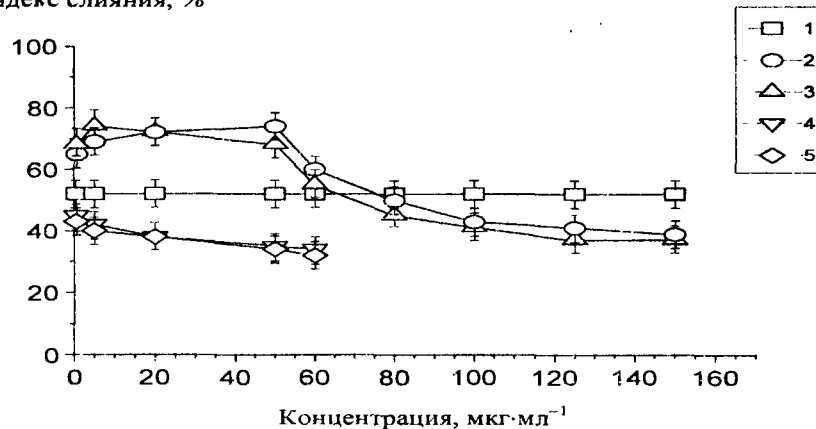
**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Инкубация макрофагов с нативными РНКазы в течение 2-х часов оказывала неоднозначное влияние на слияние лизосом с фагосомами. Их действие на клетки зависело от концентрации фермента (рис. 1). Как видно из рисунка 1 РНКазы А и РНКазы В<sub>1</sub> в концентрации 0,5 - 50 мкг/мл стимулировали слияние и ингибировали этот процесс при концентрации выше 75 мкг/мл и выше. РНКазы, модифицированные поверхностно-активным веществом оксанолом КД-6, проявляли только ингибирующий эффект во всем интервале исследованных концентраций. Ингибирование слияния лизосом с фагосомами сопровождалось снижением индекса фагоцитоза у макрофагов и откреплении клеток от стекла. При концентрации 60 мкг/мл и выше количество открепленных макрофагов увеличивалось настолько, что затрудняло наблюдение слияния лизосом с фагосомами. При этом жизнеспособность клеток, определяемая по окраске трипановым синим, сохранялась на уровне контроля (93-95%).

Наряду с нативной РНКазой В<sub>1</sub> была исследована ее инактивированная форма, полученная фотоокислением гистидина 101 активного центра. Из представленных данных (рис. 2) видно, что фотоинактивированная РНКазы в тех же концентрациях, что и нативная, стимулирует слияние лизосом с фагосомами, а ее гидрофобизированная форма проявляет ингибирующий эффект (таблица). Таким образом, оба эффекта (стимулирующий для нативной РНКазы и ингибирующий для гидрофобизированной) не зависели от каталитической активности фермента.

Стимуляция слияния лизосом с фагосомами в макрофагах, обработанных нативными РНКазы, и ее независимость от каталитической активности хорошо согласуется с результатами по активации клеточного метаболизма, полученными нами ранее на других фагоцитирующих клетках (нейтрофилах) [11]. В этих экспериментах было показано, что нативная и инактивированная РНКазы В<sub>1</sub> в равной степени активируют окислительный метаболизм нейтрофилов. Процесс активации сопровождается респираторным взрывом. Триггерный механизм этого явления локализован на внешней цитоплазматической мембране [12]. Поскольку респираторный взрыв предшествует активации всех функций фагоцитов, можно предположить, что стимуляция РНКазы слияния лизосом с фагосомами также опосредована воздействием ферментов на внешнюю мембрану.

## ВЛИЯНИЕ РНКАЗ НА ПЕРИТОНЕАЛЬНЫЕ МАКРОФАГИ

Индекс слияния, %



Индекс фагоцитоза, %

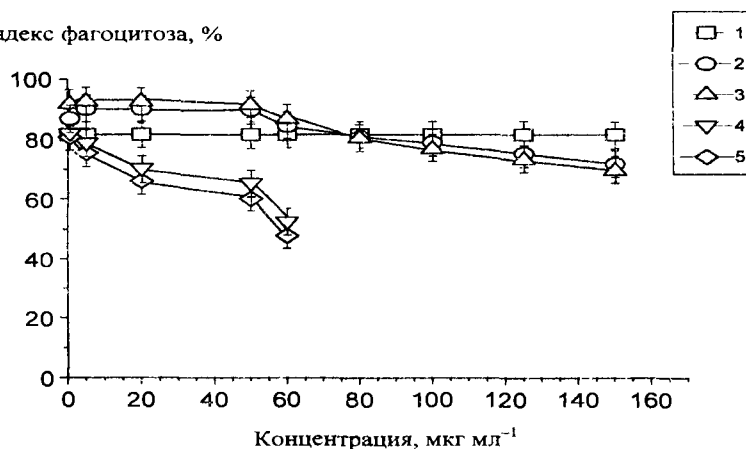


Рисунок 1.

Индекс слияния лизосом с фагосомами (%) и индекс фагоцитоза (%) после инкубации макрофагов с РНКазой и их гидрофобизированными производными. 1- контроль (интактные клетки), 2- РНКазы А, 3- РНКазы В<sub>1</sub>, 4- оксанол - РНКазы А, 5- оксанол - РНКазы В<sub>1</sub>. Время инкубации - 2 часа.

Индекс слияния, %

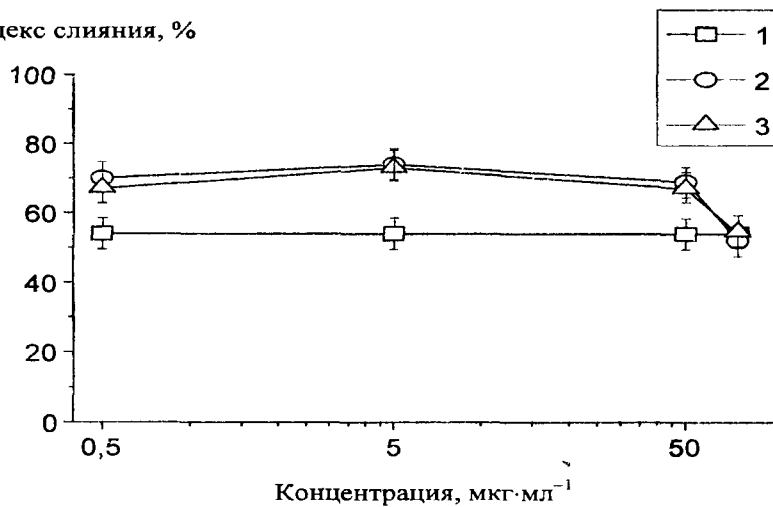


Рисунок 2.

Индекс слияния лизосом с фагосомами (%) после инкубации макрофагов с нативной (2) и инактивированной РНКазой В<sub>1</sub> (3). 1 - контроль (интактные клетки). Время инкубации - 2 часа.

Ингибирование слияния лизосом с фагосомами связывается с воздействием веществ на внутриклеточные мембраны, в частности, мембраны эндосом и лизосом. Эффект отмечен при действии на макрофаги ряда веществ поликатионной природы, например, полиаминов [13,14]. Полагают, что такое действие связано с аккумуляцией этих веществ в лизосомах и обусловлено вызываемым ими изменением структуры лизосомальных мембран. Ингибирующий эффект полиаминов возрастает с увеличением гидрофобности их молекул [15]. Исследуемые РНКазы представляют собой основные белки. При физиологических условиях они являются поликатионами, и их физико-химические свойства подобны свойствам полиаминов. Пиноцитозный путь пропикновения полиаминов в клетку с последующим транспортом их в лизосомы дает основание предположить, что механизмы подавления слияния лизосом с фагосомами для РНКаз и полиаминов идентичны или очень близки.

Гидрофобизация РНКаз, вероятно, увеличивает их сродство к мембранам и, как следствие, скорость проникновения в клетку и затем в лизосомы. В результате у гидрофобизированных препаратов наблюдается только эффект подавления слияния, который не связан с расщеплением внутриклеточной РНК и обусловлен более сильным воздействием этих РНКаз на состояние лизосомальной мембраны. Независимость эффекта от каталитической активности служит дополнительным подтверждением этого предположения. В то же время, нельзя исключить влияния РНКаз на процесс слияния лизосом с фагосомами через их воздействие на мембрану фагосом. Мембрана фагосом формируется из внешней клеточной мембраны, которая после обработки клеток РНКазой также может быть модифицирована.

Для оценки влияния РНКаз на плазматическую мембрану мы исследовали их действие на адгезию макрофагов к пластиковой поверхности. Адгезивность плазматической мембраны в равной степени определяет способность клеток прикрепляться к какому-либо субстрату (в том числе эндоцитируемому) и отражает физическое и функциональное состояние мембраны [12]. В связи с этим способность макрофагов к адгезии расценивалась нами как критерий состояния мембраны. Результаты исследований представлены на рисунке 3. Из рисунка видно, что нативные РНКазы в концентрации 5-50 мкг/мл не изменяли адгезивность макрофагов и снижали ее в более высоких концентрациях. В отличие от нативных, гидрофобизированные производные РНКаз в концентрации 5-50 мкг/мл снижали адгезию клеток. При этом гидрофобизирующий реагент оксанол-КД-6 в концентрации, равной его содержанию в 100 мкг модифицированной РНКазы, не оказывал влияния на адгезию клеток. Снижение адгезивных свойств макрофагов после инкубации с РНКазой не влияло на их жизнеспособность, которая сохранялась на уровне контроля и составляла 93- 95%.

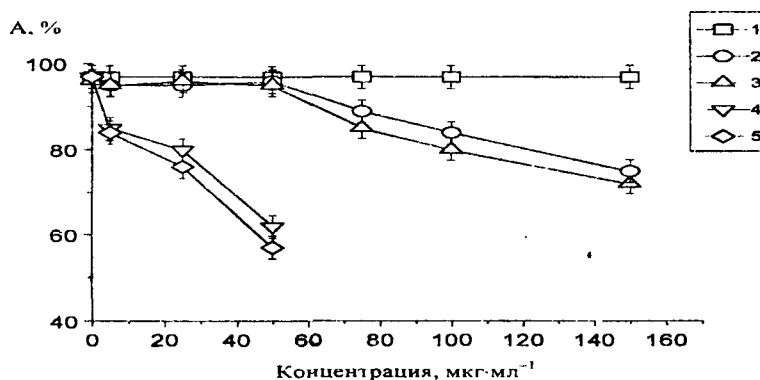


Рисунок 3

Степень адгезии макрофагов (А, %) к пластиковой поверхности после инкубации их с РНКазами и их гидрофобизированными производными. 1 - контроль (интактные клетки), 2 - РНКаз А, 3 - РНКаз Вi, 4 - оксанол- РНКаз А, 5 - оксанол РНКаз Вi.

## ВЛИЯНИЕ РНКАЗ НА ПЕРИТОНЕАЛЬНЫЕ МАКРОФАГИ

Поскольку гидрофобизированные РНКаза снижают адгезию макрофагов при значительно более низких концентрациях, чем нативные, можно сделать вывод, что они в большей степени модифицируют свойства плазматической мембраны.

Известно, что эффективность эндоцитоза белков клеткой можно повысить не только посредством гидрофобизации молекул, но и увеличением их молекулярной массы [16]. Исходя из этого, мы сравнили действие гидрофобизированных производных и димерных форм РНКАз на слияние лизосом с фагосомами. Из представленных в работе данных видно, что димеры обеих РНКАз, также как и гидрофобизированные препараты, ингибируют процесс слияния лизосом с фагосомами в макрофагах более интенсивно, чем нативные. При этом уменьшается и количество фагоцитирующих клеток (таблица).

*Таблица.* Индекс слияния фагосом с лизосомами и индекс фагоцитоза после инкубации макрофагов с РНКазами и их модифицированными и димерными формами.

Препарат	Концентрация, мкг/мл	Индекс слияния, %	Индекс фагоцитоза, %
РНКаза Вi	20	69,3 ± 4,8	90,1 ± 2,4
Оксанол РНКаза Вi	20	38,4 ± 4,2	73,4 ± 3,6
Инактивированная Оксанол РНКаза Вi	20	36,8 ± 5,1	75,2 ± 2,1
Димер РНКаза Вi	10	41,4 ± 4,2	72,4 ± 3,1
	20	32,7 ± 4,9	
РНКаза А	20	66,4 ± 3,9	91 ± 4,2
Димер РНКаза А	10	44,8 ± 5,2	69,2 ± 2,4
	20	38,3 ± 4,8	
Контроль (интактные клетки)	—	52,4 ± 3,4	82,4 ± 2,9

Примечание: время инкубации 2 часа

С точки зрения обсуждавшегося выше механизма подавления слияния лизосом с фагосомами интересно сравнить свойства оксанол-РНКАз со свойствами димера панкреатической РНКаза А, описанным в литературе. Бартолейн и др. на клетках гепатомы показали, что димер РНКаза А обладает более высокой цитотоксической активностью по сравнению с нативным ферментом. Цитотоксичность не связана с каталитической активностью, а зависит от скорости поступления димера в клетку, которая значительно превышает таковую для мономера. При этом препарат изменяет адсорбционные свойства клеточной мембраны, аккумулируется внутри лизосом, как большинство эндоцитируемого материала и ингибирует слияние лизосом с эндосомами в опухолевых клетках [17-19]. По мнению авторов, одной из наиболее вероятных причин этого эффекта является модификация свойств цитоплазматической мембраны под действием димера.

Анализ полученных в настоящей работе данных позволяет сделать следующее предположение. Взаимодействие с макрофагами нативных, гидрофобизированных и димерных форм РНКАз имеет как общие черты, так и различия. Действие низких концентраций нативных РНКАз сопровождается, по-видимому, сравнительно медленным их пиноцитозом. Доминирует эффект, обусловленный слабым раздражением плазматической мембраны, приводящий к запуску триггерного механизма активации клеток, что приводит к усилению адгезивности макрофагов (стимуляции поглощения корпускулярного материала) и стимуляции слияния лизосом с фагосомами. С увеличением их концентрации, а также при действии на клетки гидрофобизированных и димерных форм РНКАз проявляется противоположный эффект – ослабление адгезивных свойств

макрофага и подавление слияния лизосом с фагосомами. Вероятно, это связано с более сильным раздражением цитоплазматической мембраны.

Таким образом, общей особенностью взаимодействия с фагоцитирующей клеткой нативных, гидрофобизированных и димерных форм РНКаз является ингибирование слияния лизосом с фагосомами. Эта особенность РНКаз, более выраженная у гидрофобизированных производных ферментов и димеров, вероятно, лежит в основе их цитотоксического действия на клетки. Однако, если цитотоксическое действие производных РНКаз для пролиферирующих клеток сопровождается подавлением их жизнедеятельности [6,18,19], то по отношению к высокоспециализированным клеткам с низкой скоростью размножения (макрофаги, нейтрофилы) оно ограничивается ослаблением их реактивности. Это свойство РНКаз и их модифицированных производных может быть использовано в противовоспалительной терапии и для ослабления деструктивных (цитотоксических) фагоцитзависимых реакций.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Ismail N., Olano J.P., Feng H.M., Walker D.H.* (2002) FEMS Microbiol. Lett., **207**, 111-120.
2. *Маянский А.Н., Пикуза О.И.* (1993) Клинические аспекты фагоцитоза. Издательство "Магариф", Казань.
3. *Kurinenko B.M., Bulgakova R.Sh., Davydov R.Y.* (1998) FEMS Immunol. Med. Microbiol., **21**, 117-122.
4. *Голубенко И.А., Балабан Н.П., Лецинская И.Б. и др.* (1979) Биохимия, **44**, 640-648.
5. *Куриненко Б.М., Голубенко И.А., Булгакова Р.Ш. и др.* (1986) Биоорганическая химия, **12**, 457-466.
6. *Калачева Н.В., Сергеева Е.В., Куриненко Б.М.* (1998) Антибиот. химиотер., **43**, 16-19.
7. *Kooistra T., Duursma A., Bouma J.M.W., Gruber M.* (1977) Acta Biol. Med. Germ., **36**, 1763-1776.
8. *Лецинская И.Б., Балабан Н.П., Капранова М.Р., Голубенко И.А.* (1980) Современные методы изучения нуклеиновых кислот и нуклеаз микроорганизмов. Издательство КГУ, Казань, с. 53-60.
9. *Kielian M., Cohn Z.A.* (1980) J. Cell. Biol., **85**, 754-765.
10. *Draper P., Hart D.A., Joung M.* (1979) Infect. Immun., **24**, 558-561.
11. *Куриненко Б.М., Нехорошкова З.М., Булгакова Р.Ш.* (1995) Антибиот. химиотер., **7**, 29-33.
12. *Маянский А.Н., Маянский Д.Н.* (1989) Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Издательство "Наука" Новосибирск.
13. *Schuber F.* (1989) Biochem. J., **249**, 1-10.
14. *Моженок Т.П., Булычев А.Г., Браун А.Д.* (1990) Цитология, **32**, 882-887.
15. *Моженок Т.П., Булычев А.Г., Кузнецова И.М., Браун А.Д.* (1991) Цитология, **10**, 85-88.
16. *Kooistra T., Duursma A.M., Bouma J.M.W., Gruber M.* (1979) Biochim. Biophys. Acta, **587**, 282-298.
17. *Bartholeyns J., Baudhuin P.* (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **2**, 573-576.
18. *Bartholeyns J., Zeneberg A.* (1979) Eur. J. Cancer., **15**, 85-91.
19. *Bartholeyns J., Quintart J., Baudhuin P.* (1979) Biochem. J., **178**, 433-442.

Поступила: 17. 03. 2003

---

## ВЛИЯНИЕ РНКАЗ НА ПЕРИТОНЕАЛЬНЫЕ МАКРОФАГИ

---

### THE INFLUENCE OF NATIVE RIBONUCLEASES AND THEIR MODIFIED DERIVATIVES ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF RAT PERITONEAL MACROPHAGES

*N. V. Kalacheva, B. M. Kurinenko*

Laboratory of Engineering Enzymology, Institute of Biology,  
Kazan State University, Kremlevskaya str., 18, Kazan, 420008 Russia.  
fax: (8432) 38-74-18

The influence of native, hydrophobized and dimeric forms of ribonucleases (RNase A and RNase *Bacillus intermedius*) on the process of phagocytosis and fusion between lysosomes and phagosomes in rat macrophages has been studied. The effect of native RNases depends on their concentration: comparatively low concentrations ( $0.5 - 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) stimulate the phagocytosis and phagosome-lysosome fusion whereas high concentrations (above  $75 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) inhibit these processes. RNases modified by surfactant oxanol-KD-6 and dimeric forms of RNases possess only the inhibitory effect, which appears at concentration considerably lower than that of native enzymes. The stimulatory effect of native RNases and the inhibitory effect of hydrophobized derivatives do not depend on the catalytic activity.

**Key words:** RNase, macrophage, lysosome-phagosome fusion, inhibition.