

УДК 612.015.1

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ БИНАЗЫ НА АПОПТОЗ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

¹Миронов В.А., ¹Ширшиков Ф.В., ¹Калачева Н.В., ²Черепнев Г.В.

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, e-mail: public.mail@ksu.ru;

²Отдел лабораторной медицины Казанской государственной медицинской академии, Казань, e-mail: rkb2_rt@mail.ru

Изучено влияние двух различных концентраций (40 и 400 мкг/мл) биназы (РНКаза *Bacillus intermedius*) на развитие спонтанного и пероксид-индуцированного апоптоза в субпопуляциях лейкоцитов крови человека с помощью метода проточной лазерной цитофлуориметрии. Установлено, что биназа в концентрации 400 мкг/мл избирательно активирует спонтанный апоптоз моноцитов крови человека и не модифицирует апоптоз лимфоцитов и гранулоцитов в обеих исследованных концентрациях. В условиях оксидативного стресса, вызванного H₂O₂, биназа оказывает дифференцированное влияние на апоптоз моноцитов в зависимости от концентрации. В низкой концентрации она значительно увеличивает долю жизнеспособных моноцитов, обработанных пероксидом водорода. При концентрации 400 мкг/мл протекторный эффект биназы в отношении моноцитов исчезает. В то же время в концентрации 400 мкг/мл биназа меняет динамику H₂O₂-индуцированного апоптоза, повышая долю моноцитов в стадии раннего апоптоза. При этом она достоверно не модифицирует H₂O₂-индуцированный апоптоз гранулоцитов и лимфоцитов. Обнаружено сходство апоптоз-модулирующего эффекта биназы в моноцитах крови человека и перитонеальных макрофагах крысы.

Ключевые слова: биназа, спонтанный и пероксид-индуцированный апоптоз, апоптоз модулирующий эффект, мононуклеарные фагоциты

SELECTIVE ACTION OF BINASE ON APOPTOSIS OF SUBPOPULATIONS OF HUMAN BLOOD LEUKOCYTES

¹Mironov V.A., ¹Shirshikov F.V., ¹Kalacheva N.V., ²Cherepnev G.V.

¹Kazan (Volga region) State University, Kazan, Russia e-mail: public.mail@ksu.ru;

²Department of Laboratory Medicine Kazan State Medical Academy, Kazan, e-mail: rkb2_rt@mail.ru

Influence of two various concentrations (40 and 400 µg/ml) of binase (RNase *Bacillus intermedius*) on development spontaneous and peroxide-induced apoptosis in subpopulations of human blood leucocytes by means of a method flow laser cytofluorimetry is studied. It is positioned, that binase in concentration of 400 µg/ml are activated selectively by a spontaneous apoptosis of human blood monocytes and does not modify an apoptosis of lymphocytes and granulocytes in both investigated concentrations. In conditions oxidative-stress invoked H₂O₂, binase the differentiated impact on an apoptosis of monocytes depending on concentration makes. In low concentration it considerably enlarges a lobe of the viable monocytes treated by peroxide of hydrogen. At concentration of 400 µg/ml protection effect of binase concerning monocytes disappears. At the same time in concentration of 400 µg/ml of binase changes dynamics H₂O₂-induced of an apoptosis, raising a lobe of monocytes in a stage of an early apoptosis. It thus authentically does not modify H₂O₂-induced an apoptosis of granulocytes and lymphocytes. Resemblance apoptosis-modulatory effect of binase in human blood monocytes and rat peritoneal macrophages is revealed.

Keywords: binase, spontaneous and peroxide-induced apoptosis, apoptosis-modulatory effect, mononuclear phagocytes

В настоящее время в отечественной и зарубежной литературе активно обсуждается роль апоптоза клеток в норме и патологии. Пристальное внимание уделяется изучению влияния активных форм кислорода на апоптоз и некроз. Оксидативный стресс, определяемый как нарушение баланса между оксидантами и антиоксидантами в пользу первых, является одним из основных патофизиологических индукторов гибели клетки. В связи с этим поиск соединений, стимулирующих или подавляющих апоптоз, составляет одно из актуальных направлений современной биофармакологии.

Объект настоящего исследования – РНККаза *Bacillus intermedius* (биназа), которая обладает рядом биологических эффектов, в том числе способностью избирательно подавлять рост некоторых линий онкотрансформированных клеток, переводя их на путь апоптоза [2].

В работе исследовано влияние биназы на спонтанный и индуцированный апоптоз субпопуляций лейкоцитов периферической крови человека. Индукцию апоптоза осуществляли в модели оксидативного стресса, вызванного пероксидом водорода.

Материалы и методы исследований

Биназа (РНКаза *Bacillus intermedius*) – катионный белок с молекулярной массой 12,3 кДа, изоэлектрической точкой pI 8,9 и максимальной каталитической активностью при pH 8,5. В работе использовали гомогенный препарат РНККаза, полученный по методу [1].

Апоптоз субпопуляций лейкоцитов периферической крови человека исследовали методом лазерной проточной цитометрии с помощью флуорохромов Мерицианина 540 (MC-540) (*Sigma*) и (TO-PRO-3) диодид (*Invitrogen*). Индуктор апоптоза – пероксид водорода (*Sigma*). Для морфологической оценки апоптоза методом световой микроскопии использовали красители: трипановый синий и Романовского-Гимза (*Sigma*).

Выделение суспензии лейкоцитов периферической крови

Гепаринизированную венозную кровь условно здоровых доноров отстаивали в течение 30 минут при 37 °С, отбирали слой сыворотки с лейкоцитами и отмывали клетки центрифугированием (200 g, 10 мин). Полученный осадок лейкоцитов ресуспензировали в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) до конечной концентрации 10^6 клеток/мл и раскапывали по 250 мкл в пробирки для проточной цитометрии (Falcon 352054, BD). В опытные пробы вносили раствор биназы в фосфатно-солевом буфере (конечная концентрация 400 и 40 мкг/мл) и пероксид водорода (конечная концентрация 3 мМ). В контрольные пробы вносили фосфатно-солевой буфер в эквивалентном объеме. Клетки инкубировали 3 часа в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 100 % влажности. После инкубации клетки дважды промывали в фосфатно-солевом буфере центрифугированием при 250 g в течение 5 минут, ресуспензировали в 500 мкл буфера и вносили флуорохромы MC540 и TO-PRO-3 йодид. Пробы инкубировали 10 минут в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С и анализировали на проточном цитофлуориметре.

Определение экспрессии фосфатидилсерина и проницаемости цитоплазматической мембраны методом проточной цитометрии

Цитометрический анализ субпопуляций лейкоцитов проводили на проточном лазерном цитофлуориметре FacsCalibur (*Becton Dickinson, USA*), оснащенный двумя лазерами с длиной волны 488 и 635 нм. Экспрессию фосфатидилсерина (ФС) и проницаемость плазматической мембраны на уровне отдельной клетки оценивали по модифицированному протоколу [10]. В суспензию, содержащую 10^6 клеток/мл, за 10 мин. перед цитометрическим анализом вносили ФС-связывающий флуорохром MC-540 в конечной концентрации 0,2 мкг/мл. Для оценки проницаемости плазматической мембраны в клеточную суспензию одновременно с MC-540 вносили TO-PRO-3-йодид в конечной концентрации 0,2 мкМ. MC540 связывается с остатками фосфатидилсерина, экспонированного на мембране апоптотических клеток. ДНК-тропный флуорохром TO-PRO-3 через поврежденную цитоплазматическую мембрану проникает внутрь клетки и окрашивает ДНК. Лимфоидную, моноцитарную и гранулоцитарную субпопуляции выделяли по показателям прямого (FSC, диаметр клетки) и бокового (SSC, гранулярность клетки) светорассеяния. После исключения дедбриса и выделения лимфоидного, моноцитарного и гранулоцитарного гейтов, определяли долю:

- 1) интактных клеток [фенотип MC540(-)TO-PRO-3(-)];
- 2) клеток на ранней стадии апоптоза [фенотип MC540(+)TO-PRO-3(-)];
- 3) клеток на поздней стадии апоптоза [фенотип MC540(+)TO-PRO-3(+)];
- 4) некротических клеток [фенотип MC540(-)TO-PRO-3(+)].

На каждый вариант опыта просчитывали не менее 25000 клеточных событий. Результаты измерений обрабатывали в программе CellQuest Pro (*BD Biosciences*), статистический анализ полученных результатов выполняли по критерию хи-квадрат с коррекцией *Yates* в пакете прикладных программ STATISTICA 6.0.

Выделение перитонеальных макрофагов крысы

В экспериментах использовали перитонеальные макрофаги белых беспородных крыс 5–6-недельного

возраста. Работу с крысами проводили с соблюдением принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Крыс забивали декапитацией под эфирным наркозом. Перитонеальные макрофаги выделяли из перитонеальных смывов, вводя животным в брюшную полость холодный 0.9%-й раствор NaCl. Клетки промывали физиологическим раствором, суспендировали в среде RPMI (*Sigma, США*), разводили до концентрации $1,2 \cdot 10^6$ кл/мл и использовали в эксперименте.

Изучение влияния биназы на жизнеспособность, некроз и апоптоз макрофагов

Макрофаги, разведенные в среде RPMI 1640 до концентрации $1,2 \cdot 10^6$ кл/мл, наносили на покровные стекла в объеме 0,1 мл и оставляли на 20 мин при 37 °С для адгезии клеток. Затем клетки на стеклах дважды промывали средой и к опытным образцам добавляли раствор биназы в среде RPMI в конечной концентрации 100 и 200 мкг/мл. Стекла помещали на 0,5 часа в CO₂-инкубатор (37 °С), после чего заменяли среду с ферментом на среду, содержащую 2 мМ H₂O₂, и инкубировали 3 час. В качестве контролей использовали интактные клетки, инкубированные в питательной среде, а также клетки, в которые добавляли раствор H₂O₂ без предварительной инкубации с ферментом.

Идентификацию жизнеспособных, некротических и апоптотических клеток осуществляли методом световой микроскопии. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью витального красителя трипанового синего. Некротическую и апоптотическую гибель клеток дифференцировали по характерным морфологическим признакам [5] после окрашивания клеток по методике Романовского-Гимза [4]. Апоптотическими считали клетки только с фрагментированными ядрами (т.е. в позднем апоптозе). Анализировали несколько полей зрения на каждом стекле (не менее 600 клеток) и рассчитывали относительное содержание каждой клеточной популяции. Различия долей полагали достоверными при значениях $P \leq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Влияние биназы на апоптоз исследовали в гранулоцитарной, моноцитарной и лимфоидной популяциях лейкоцитов. Согласно результатам, полученным нами ранее [3], биназа в концентрации до 100 мкг/мл стимулировала функциональную активность макрофагов, а в концентрации выше 100 мкг/мл ингибировала её. Тенденция сохраняется и в отношении других клеток, в том числе онкотрансформированных, для которых цитотоксичными являются высокие концентрации РНКаз [2]. В связи с этим в работе мы исследовали две концентрации биназы: 40 мкг/мл (нетоксичная) и 400 мкг/мл (токсичная).

При действии биназы в концентрации 40 мкг/мл распределение моноцитов по стадиям апоптоза не отличается от контрольного (рис. 1Б, В). При концентрации биназы 400 мкг/мл доля моноцитов в поздней стадии апоптоза увеличивается на 92,2 % (рис. 1В). Биназа в концентрациях 40 и 400 мкг/мл не

модифицирует апоптоз лимфоцитов и гранулоцитов (рис. 2Б, В и 3Б, В). Пероксид водорода в концентрации 3 мМ эффективно стимулирует программированную клеточную гибель моноцитов (рис. 1б, в), лимфоцитов (рис. 2 Б, В) и гранулоцитов (рис. 3 Б, В). Биназа в концентрации 40 мкг/мл на 72,3% увеличивает долю MC540(-)ТО-PRO3(-) жизнеспособных моноцитов, обработанных пероксидом водорода (рис. 1А). Протекторный эффект биназы в отношении моноцитов исчезает при концентрации 400 мкг/мл.

Биназа в концентрации 400 мкг/мл модифицирует динамику H₂O₂-индуцированного апоптоза моноцитов, увеличивая накопление клеток в стадии раннего апоптоза на 24,9% (рис. 1Б). Биназа в концентрациях 40 и 400 мкг/мл не увеличивает долю MC540(-)ТО-PRO3(-) жизнеспособных лимфоцитов и гранулоцитов, обработанных пероксидом водорода (рис. 2А и 3А), и достоверно не модифицирует H₂O₂-индуцированный апоптоз гранулоцитов и лимфоцитов (рис. 2Б, В и 3Б, В).

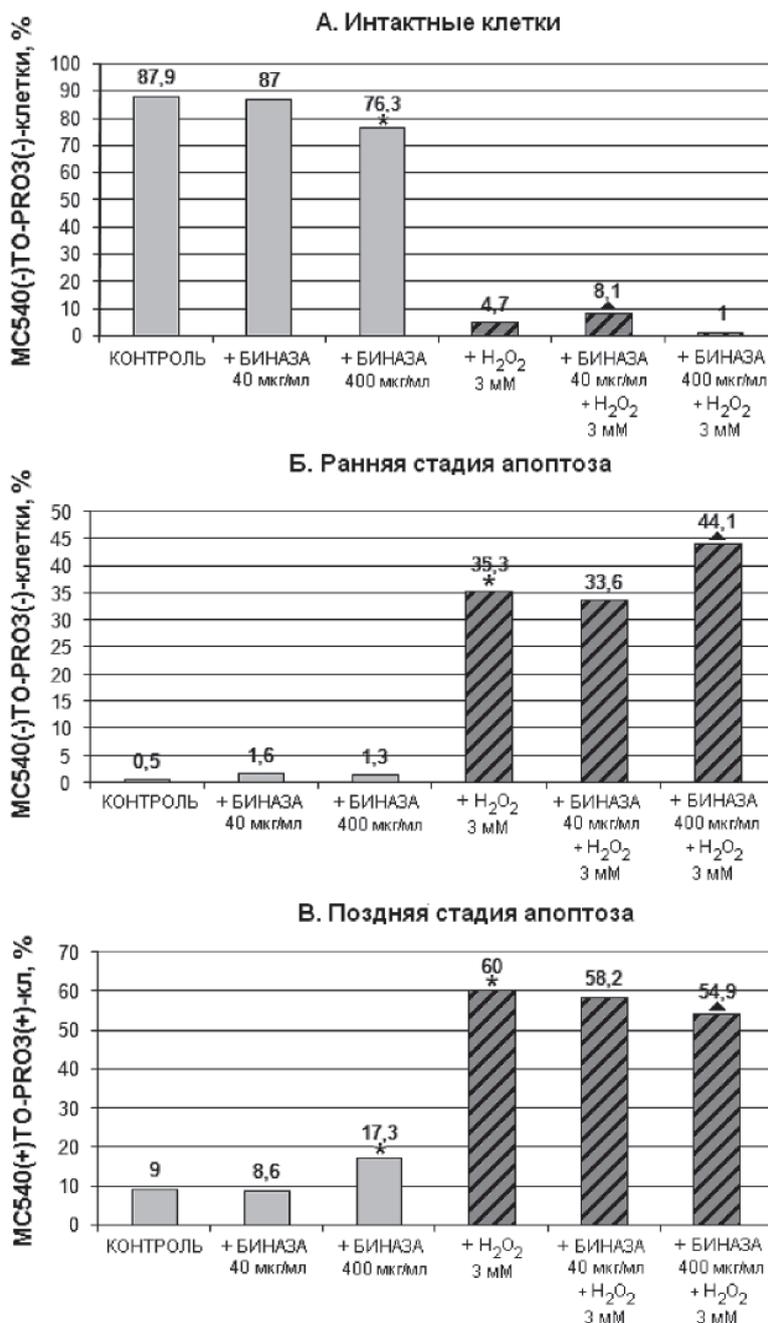


Рис. 1. Влияние биназы на спонтанный и H₂O₂-индуцированный апоптоз моноцитов (звездочкой обозначены достоверные отличия (P < 0,05) по сравнению с контролем (жизнеспособные клетки), треугольником – достоверные отличия (P < 0,05) по сравнению с клетками, обработанными H₂O₂

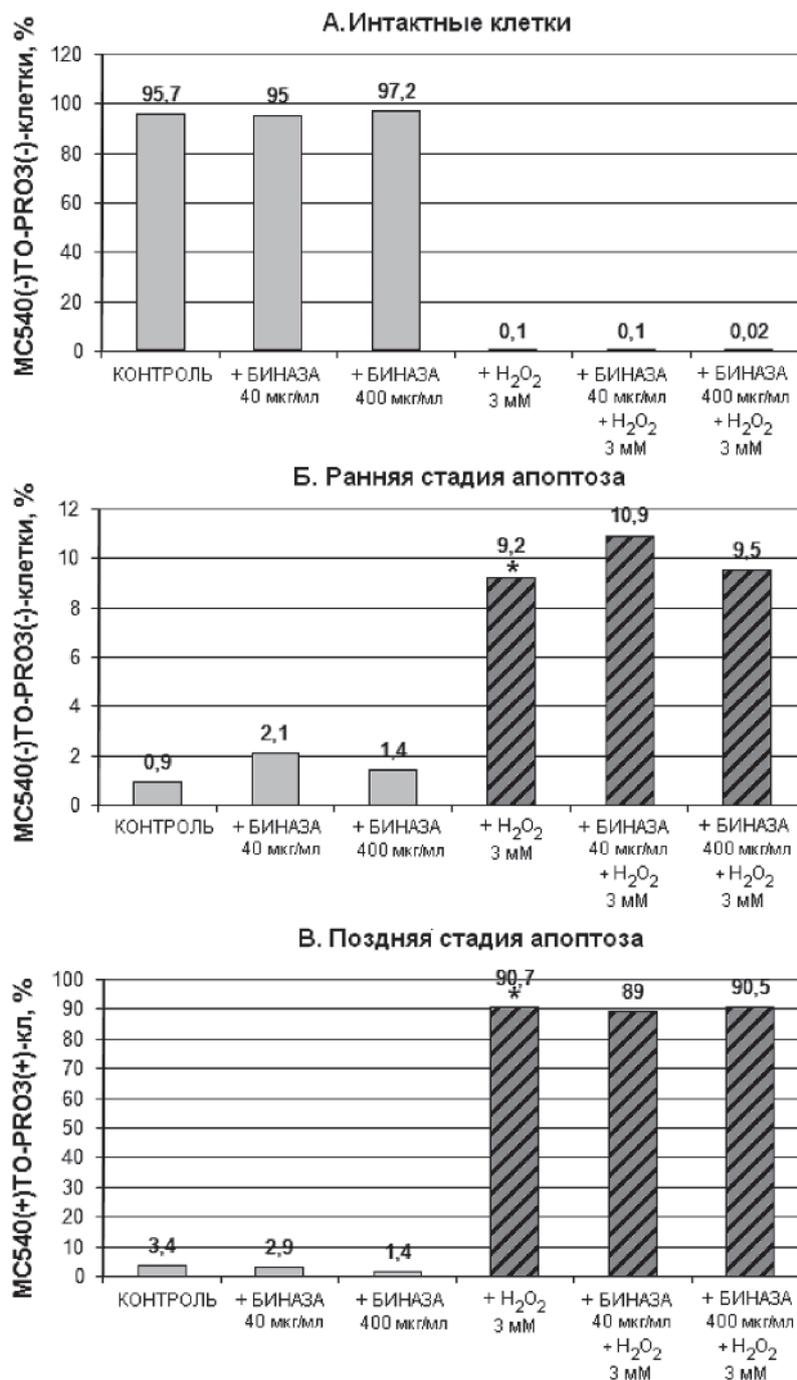


Рис. 2. Влияние биназы на спонтанный и пероксид-индуцированный апоптоз лимфоцитов (звездочкой обозначены достоверные отличия ($P < 0,05$) по сравнению с контролем (жизнеспособные клетки))

Таким образом, биназа в концентрации 400 мкг/мл избирательно стимулирует апоптоз моноцитов. В условиях оксидативного стресса, вызванного H₂O₂, биназа оказывает дифференцированное влияние на апоптоз моноцитов в зависимости от концентрации (рис. 4).

Поскольку моноциты являются предшественниками макрофагов и гистогенети-

чески представляют собой один тип клеток (моноклеарные фагоциты), мы сопоставили эффекты биназы в моноцитах донорской крови с таковыми для перитонеальных макрофагов крысы (рис. 5). Биназа в концентрации 200 и 400 мкг/мл стимулирует апоптоз макрофагов. Через 18 часов инкубации монослойной культуры макрофагов с биназой доля апоптотических клеток со-

ставляла более 50% по сравнению с 5–7% в контроле (данные не показаны). В условиях оксидативного стресса предварительная инкубация макрофагов с биназой приводила к снижению гибели перитонеальных ма-

крофагов от некроза, переводя клетки на доминирующий путь апоптоза. При концентрации 200 мкг/мл наблюдалась тенденция к увеличению доли жизнеспособных клеток (рис. 5).

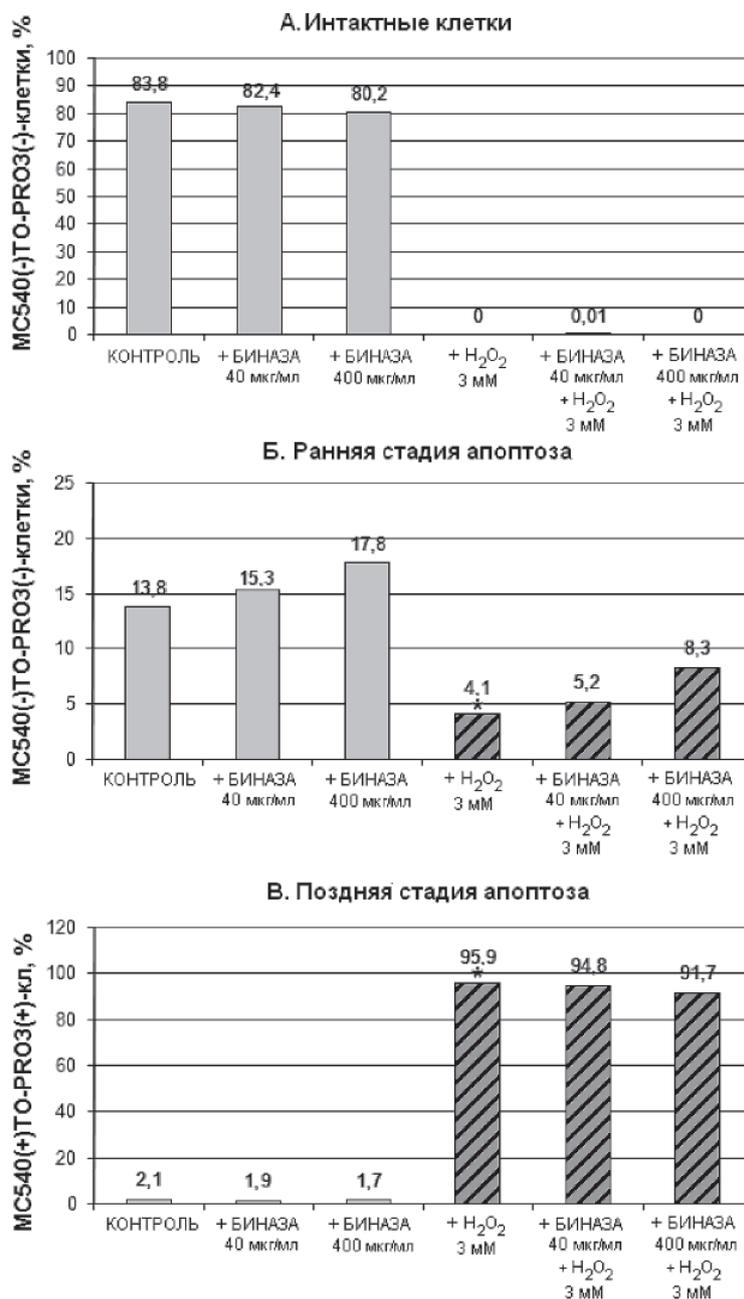


Рис. 3. Влияние биназы на спонтанный и пероксид-индуцированный апоптоз гранулоцитов (звездочкой обозначены достоверные отличия ($P < 0,05$) по сравнению с контролем (жизнеспособные клетки))

Согласно результатам, у моноцитов крови человека в модели оксидативного стресса после инкубации с биназой в низкой концентрации также увеличивалась жизнеспособность, а при высокой концентрации биназы наблюдалась ко-стимуляция апопто-

генного эффекта H₂O₂ и торможение процесса перехода клеток из ранней стадии апоптоза в позднюю. Таким образом, в мононуклеарных фагоцитах крысы и человека биназа проявляет сходный апоптоз-модулирующий эффект.

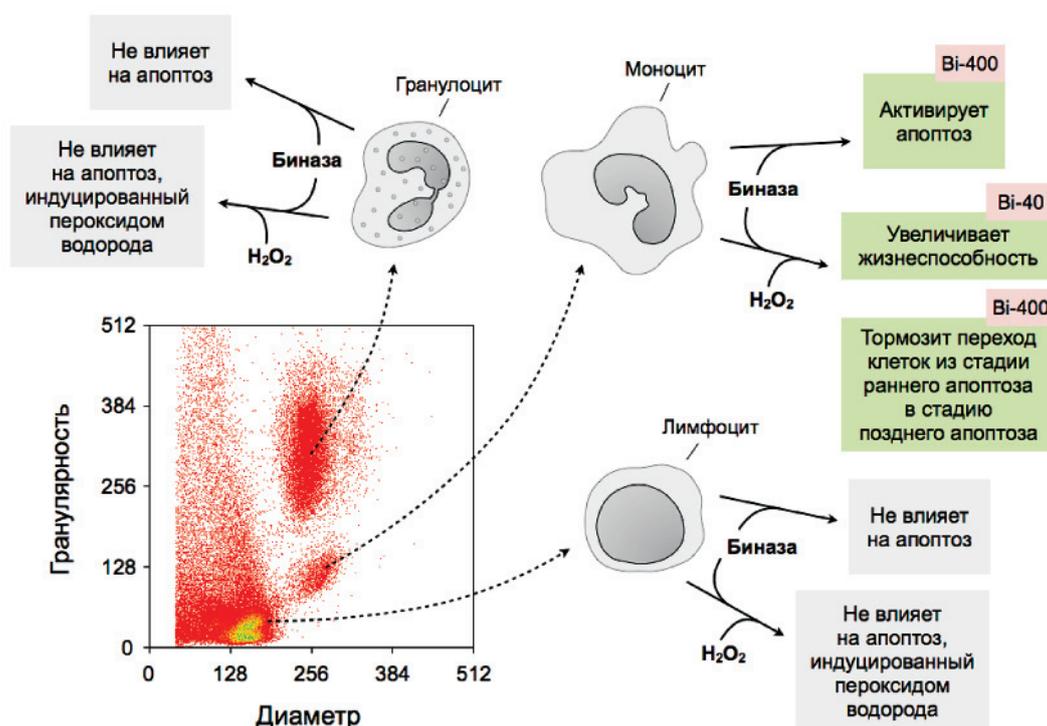


Рис. 4. Влияние биназы на спонтанный и H₂O₂-индуцированный апоптоз субпопуляций лейкоцитов крови человека. Vi-40 – концентрация биназы 40 мкг/мл; Vi-400 – концентрация биназы 400 мкг/мл

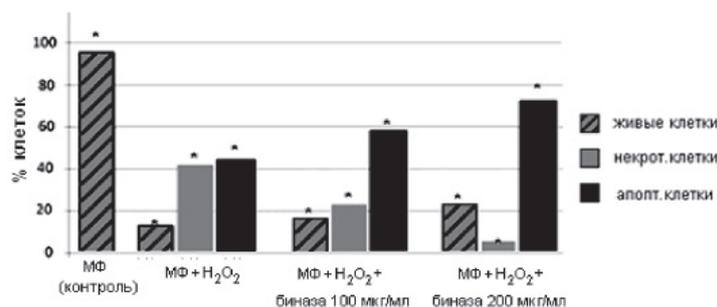


Рис. 5. Влияние биназы (100 и 200 мкг/мл) на гибель макрофагов в условиях окислительного стресса, индуцированного 2 мМ H₂O₂

На основании полученных результатов, а также данных публикаций, мы высказываем следующее предположение о возможных путях реализации обнаруженных эффектов биназы на клеточном уровне. Принимая во внимание, что бактерии рода *Bacillus* взаимодействуют с макрофагами через TLR-2 и TLR-4 рецепторы [7], а биназа концентрационно зависимо модулирует функциональную активность макрофагов [3], мы полагаем, что дифференцированный эффект биназы в популяциях лейкоцитов может быть опосредован Toll-подобными рецепторами (TLR). Как свидетельствуют многочисленные исследования последних лет, TLR уча-

ствуют в передаче про- и антиапоптогенных сигналов в клетке [8, 9]. Вместе с тем имеются работы, в которых показано, что пероксид водорода также инициирует TLR-зависимую апоптогенную сигнализацию [6]. В связи с этим можно предположить, что адсорбция биназы на клеточной поверхности прямо или косвенно будет оказывать влияние на TLR-опосредованные апоптогенные сигнальные пути и, в зависимости от условий, модулировать апоптоз в мононуклеарных фагоцитах. Изучение потенциальных TLR-зависимых механизмов избирательного действия биназы в мононуклеарных фагоцитах заслуживает дальнейшего исследования.

Выводы

1. Биназа избирательно активирует апоптоз моноцитов крови человека и не влияет на программированную клеточную гибель лимфоцитов и гранулоцитов.

2. В условиях оксидативного стресса предварительная инкубация лейкоцитов с биназой увеличивает субпопуляцию жизнеспособных моноцитов и меняет динамику H₂O₂-индуцированного апоптоза, повышая долю моноцитов в стадии раннего апоптоза.

3. Биназа не модифицирует H₂O₂-индуцированный апоптоз лимфоцитов и гранулоцитов.

Список литература

1. Голубенко И. А., Балабан Н.П., Лещинская И.Б. Рибонуклеаза *Bacillus intermedius* 7P. Очистка хроматографией на фосфоцеллюлозе и некоторые характеристики гомогенного фермента. *Биохимия*. – 1979. – Т. 44. – С. 640–648.

2. Сравнительная цитотоксичность биназы по отношению к опухолевым и нормальным клеткам: ученые записки Казанского университета / Э.А. Кабрера Фуентес, П.В. Зеленихин, А.И. Колпаков, К.Т. Прайсснер, О.Н. Ильинская. – 2010. – Т. 152. Кн. 3. – С. 143–148.

3. Калачева Н.В., Куриненко Б.М. Влияние рибонуклеаз и их модифицированных производных на функциональную активность перитонеальных макрофагов крысы // *Биомедицинская химия*. – 2005. – Т. 3. – С. 303–309.

4. Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная аналитика. – М., 1999. – Т.2.

5. Debby G.B., Cess W.J., Oomens, P.T., Carlijn M.C. Evolution of a continuous quantification method of apoptosis and necrosis in tissue cultures. *Cytotechnology*. – 2004. – V. 46. – P. 139–150.

6. Frantz S., Kelly R.A. Role of TLR-2 in the Activation of Nuclear Factor κB by oxidative stress in Cardiac Myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – V. 276. – P. 5197–5203.

7. Huang J.M., Roberto M.L., Ragione, Nanez A., Simon M. Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. *Immunol. Med. Microbiol.* – 2008. – V. 53. – P. 195–203.

8. Joshi, S.G., Francis C.W., Silverman D.J. Nuclear factor κB protects against host cell apoptosis during *Rickettsia rickettsii* infection by inhibiting activation of apical and effector caspases and maintaining mitochondrial integrity. *Infection and Immunity*. – 2003. – V. 71. – pp. 4127–4136.

9. Michael V.L., Satish K.N. Intracellular TLR Signaling: A Structural Perspective on Human Disease. *The Journal of Immunology*. – 2006. – V. 177 (1). – P. 11–16.

10. Mower D.A., Peckhman D.W. Decreased membrane phospholipid packing and decreased cell size precede DNA

cleavage in mature B cell apoptosis. *J.Immunol.* – 1994. – V. 152. – P. 4832–4842.

References

1. Golubenko I.A., Balaban N.P., Leshinskaya I.B. Ribonuclease *Bacillus intermedius* 7P. Clearing by a chromatography on phosphocellulose and some characteristics of homogeneous ferment. *Biological chemistry*. 1979. V. 44. P. 640–648.

2. Kabrera Fuentes Je.A., Zelenihin P.V., Kolpakov A.I., Prajssner K.T., Il'inskaja O.N. Comparative cytotoxicity of binase in relation to tumoral and normal cells. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta*. 2010. V. 152. P.143–148.

3. Kalacheva N.V., Kurinenko B.M. Influence of ribonucleases and their modified derivatives on functional activity of peritoneal macrophages of a rat. *Biomedical chemistry*. 2005. V.3. P.303–309

4. Men'shikov V.V. *Clinical laboratory analytics*. Moscow. 1999. V. 2.

5. Debby G.B., Cess W.J., Oomens, P.T., Carlijn M.C. Evolution of a continuous quantification method of apoptosis and necrosis in tissue cultures. *Cytotechnology*. 2004. V. 46. pp. 139–150.

6. Frantz S., Kelly R.A. Role of TLR-2 in the Activation of Nuclear Factor κB by oxidative stress in Cardiac Myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001. V. 276 (7). pp. 5197–5203.

7. Huang J.M., Roberto M.L., Ragione, Nanez A., Simon M. Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. *Immunol. Med. Microbiol.* 2008. V. 53. pp. 195–203.

8. Joshi, S.G., Francis C.W., Silverman D.J., Sahni S.K. Nuclear factor κB protects against host cell apoptosis during *Rickettsia rickettsii* infection by inhibiting activation of apical and effector caspases and maintaining mitochondrial integrity. *Infection and Immunity*. 2003. V. 71. pp. 4127–4136.

9. Michael V.L., Satish K.N. Intracellular TLR Signaling: A Structural Perspective on Human Disease. *The Journal of Immunology*. 2006. V. 177 (1). pp. 11–16.

10. Mower D.A., Peckhman D.W. Decreased membrane phospholipid packing and decreased cell size precede DNA cleavage in mature B cell apoptosis. *J. Immunol.*1994. V. 152. pp. 4832–4842.

Рецензенты:

Багаева Т.В., д.б.н., профессор, зав.кафедрой биотехнологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета Минобрнауки России, г. Казань;

Жданов Р.И., д.х.н., профессор кафедры фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета Минобрнауки России, г. Казань.

Работа поступила в редакцию 25.06.2012.