

ИНГИБИРОВАНИЕ ФАГОЦИТАРНОЙ ФУНКЦИИ МАКРОФАГОВ IN VITRO ДИМЕРНОЙ ФОРМОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ *BACILLUS INTERMEDIUS*

**© Н. В. Калачева,¹ О. А. Коновалова,² Д. С. Налимов,² М. Х. Салахов,²
О. Н. Ильинская,¹ Б. М. Куриенко¹**

¹ Лаборатория инженерной энзимологии и ² Кафедра оптики и нанофотоники
Казанского государственного университета;
электронный адрес: nvkalacheva@yandex.ru

Изучено взаимодействие «сшитой» диметилсуберимидатом димерной формы РНКазы *Bacillus intermedius*, с перитонеальными макрофагами крысы *in vitro*. Установлено, что димер РНКазы в концентрации 0.5—40.0 мкг/мл снижает фагоцитарную функцию макрофагов. Это выражается в ингибиции фагоцитоза и подавлении слияния фагосом с лизосомами в макрофагах. Методом атомно-силовой микроскопии показано, что димер РНКазы вызывает более сильное, чем мономер, изменение поверхностной структуры цитоплазматической мембраны макрофага. Обсуждается связь изменений свойств мембранных с ингибицией фагоцитарной функции макрофага.

Ключевые слова: димер, ингибиция, макрофаг, РНКаза *Bacillus intermedius*, цитоплазматическая мембрана, фагоцитарная функция.

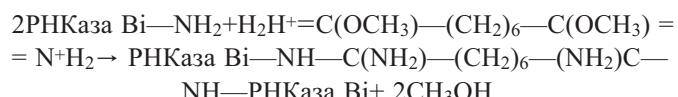
Принятые сокращения: АО — акридиновый оранжевый, АСМ — атомно-силовой микроскоп, РНКаза Bi — РНКаза *Bacillus intermedius*, ХЛ — хемиллюминесценция.

Макрофаги наряду с другими иммунокомпетентными клетками реализуют стратегию гомеостаза организма. Однако в ряде случаев механизм их гомеостатической функции трансформируется в компонент патофизиологического механизма некоторых заболеваний. К их числу относятся цитотоксические реакции в отношении тканей, ставших чужеродными, хронические воспалительные процессы при бактериальных, грибковых и протозойных инфекциях, грануломатоз, силикоз и др. Подавление реактивности макрофагов можно рассматривать как один из общих подходов в антивоспалительной терапии этих патологий. Поэтому вполне обосновано расширение спектра препаратов, обладающих ингибирующей активностью в отношении макрофагов, которые играют ключевую роль в вышеперечисленных процессах.

Ранее мы показали, что нативные (мономерные) РНКазы A и РНКаза *Bacillus intermedius* (РНКаза Bi) в зависимости от концентрации могут либо стимулировать, либо подавлять функциональную активность макрофагов (Калачева, Куриенко, 2005). Однако известно, что у димерных форм РНКаз цитотоксические свойства выражены значительно сильнее, чем у мономерных (Libonati, 2004; Ильинская, Макаров, 2005). Действие димеров в отношении макрофагов не исследовалось. В связи с этим задача настоящей работы — оценить степень ингибиции фагоцитарной функции макрофагов *in vitro* димерной формой РНКазы Bi.

Материал и методика

В экспериментах использовали электрофоретически гомогенный препарат РНКазы Bi. Димерную форму РНКазы получали путем «сшивания» мономеров диметилсуберимидатом (Wang et al., 1976). Схема «сшивания»:



К перемешиваемому раствору, содержащему 100 мг РНКазы в 10 мл 0.1 М натрий-fosфатного буфера, pH 10.0, при 25 °C добавляли 10 мг гидрохлорида диметилсуберимидата в твердом виде порциями примерно по 2 мг с интервалами в 5 мин; pH раствора поддерживали добавлением 0.1 М NaOH. Через 1 ч реакцию останавливали добавлением 2 мл 0.2 М ацетата аммония. Фракции моно-, ди-, три- и полимера рибонуклеазы выделяли из реакционной смеси гель-фильтрацией на сепадекс G-75 (колонка 1.2 × 90.0 см, элюент 0.02 М аммоний-ацетатный буфер, pH 4.5) и лиофилизовали.

РНКазную активность препаратов определяли по методу, описанному в работе Лещинской с коллегами (1980). Субстратом служила суммарная дрожжевая РНК производства СКТБ БАВ (Новосибирск). Активность РНКазы Bi составляла 1.6 · 10⁶ ед./мг. Удельная активность димера РНКазы Bi снижалась в среднем на 44 % по сравнению с мономерной формой.

Работу с крысами проводили с соблюдением принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Белых беспородных крыс забивали декапитацией под эфирным наркозом. Перitoneальные макрофаги выделяли из перitoneальной жидкости лабораторных животных 10—12-недельного возраста, вводя им в брюшную полость холодный 0.9%-ный раствор NaCl. Клетки промывали раствором Хенкса, суспендировали в среде Игла, разводили до концентрации $5.2 \cdot 10^6$ кл./мл и культивировали на стеклах в среде Игла, pH 7.2, содержащей телячью эмбриональную сыворотку (15 %) и 100 ед./мл канамицина, при 37 °C.

Влияние препаратов на слияние фагосом с лизосомами в перitoneальных макрофагах крысы проводили по описанной методике (Kielian, Cohn, 1980). Свежие пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* служили объектом фагоцитоза.

1-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 отмычки красителя средой Игла клетки обрабатывали суспензией дрожжей (10^5 кл./мл, 0.5 мл на стекло) в течение 30 мин. Дрожжи предварительно опсонизировали сывороткой крови крысы (Drapet et al., 1979). Спустя 30 мин дрожжи, не поглощенные макрофагами, отмывали средой и макрофаги быстро переносили в термостат при 37 °C. Через 1.5—2.0 ч оценивали 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 не окрашенных красителем дрожжевых частиц. В каждом случае определяли индекс слияния (в %) — долю клеток, в которых произошло слияние фагосом с лизосомами, от 100 фагоцитирующих макрофагов и индекс фагоцитоза (в %) — долю фагоцитирующих макрофагов от общего числа просмотренных клеток (Drapet et al., 1979).

Для изучения влияния препаратов на процесс слияния фагосом с лизосомами макрофаги инкубировали с растворами ферментов в соответствующих концентрациях в ростовой среде без сыворотки в течение 2 ч 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.

Образование фагоцитами активных форм кислорода оценивали по интенсивности люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ), как описано ранее (Калачева и др., 2007). В ходе работы измеряли интенсивность спонтанной и индуцированной фагоцитозом ХЛ макрофагов. Объектом фагоцитоза служила убитая нагреванием культура бактерий *Serratia marcescens*. Время измерения спонтанной ХЛ составляло 600 с, индуцированной — 1800 с. В качестве показателя степени активации фагоцитов принимали сумму ХЛ-сигнала за определенный промежуток времени, которую выражали в отн. ед. по сравнению с контролем.

Подготовку образцов для исследования атомно-силовым микроскопом (ACM) проводили следующим образом. Первичную культуру макрофагов получали из клеток перitoneальной жидкости, взятой от белых беспородных крыс. Клетки культивировали на покровных стеклах в среде Эрла при 37 °C, содержащей 20 % эмбриональной сыворотки теленка и 2 мкг/мл канамицина. Через 1 сут среду, в которой культивировали клетки, сливал и клет-

ки промывали средой Эрла без сыворотки 2 раза. Затем добавляли препарат фермента, растворенный в этой среде, в концентрации 15 мкг/мл. Инкубировали при 37 °C. Через 10 и 40 мин раствор, содержащий фермент, сливали, клетки промывали физиологическим раствором, затем водой и быстро сушили в слабом токе воздуха при комнатной температуре. Полученные образцы визуализировали с помощью ACM.

Визуализацию поверхности макрофагов проводили на воздухе при комнатной температуре в полу контактном режиме на ACM Solver P47H (ЗАО НТ-МДТ), сканер 50 мкм. Были использованы стандартные кремневые кантителлеры NSG11 (ЗАО НТ-МДТ), радиус кривизны острия которых был менее 10 нм. Сканирование проводили с разрешением 1024×1024 точки. Использовали 3 методики сканирования: постоянной амплитуды, фазового контраста и сигнала рассогласования. Рабочая амплитуда колебаний кантителлера составляла 30—50 нм.

О свойствах клеточной поверхности судили по изменению амплитуды колебаний кантителлера, зависящей от силы его взаимодействия с поверхностью интактных макрофагов и макрофагов, обработанных препаратами ферментов.

Статистическая обработка. Все эксперименты с клеточной культурой макрофагов проводили 5—6 раз и статистически обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel для ПК.

Реактивы: люминол, гидрохлорид диметилсуверимидата (Sigma, США); остальные реактивы отечественного производства марки «хх».

Результаты и обсуждение

Данные по влиянию мономерной и димерной форм РНКазы В_i на спонтанную и индуцированную хемилюминесценцию макрофагов представлены на рис. 1. На рис. 1 видно, что мономер РНКазы В_i активирует как спонтанную, так и индуцированную ХЛ макрофагов. Димер в этих концентрациях усиливает спонтанную ХЛ клеток, хотя и в меньшей степени, чем мономер, и ингибирует индуцированную. Индуцированная ХЛ отражает состояние метаболической активности макрофагов и степень их готовности к выполнению функции фагоцитоза (Маянский, Маянский, 1983). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что димер РНКазы эффективно подавляет активацию метаболизма, необходимую для выполнения специфических функций макрофагов.

Следующим этапом работы явилось изучение влияния мономера и димера РНКазы В_i на один из последующих этапов фагоцитоза — слияние фагосом с лизосомами. Слияние лизосом с фагосомами является заключительным этапом эндоцитоза (фагоцитоза). Образующиеся при этом фаголизосомы осуществляют деградацию содержащихся в эндосомах поглощенных структур (микроорганизмов, вирусов и макромолекул).

На рис. 2, а представлены данные по влиянию мономера и димера РНКазы В_i на слияние лизосом с фагосомами. Как видно на рис. 2, а, мономер РНКазы в концентрации до 20 мкг/мл стимулирует слияние фагосом с лизосомами. При дальнейшем увеличении концентрации происходит незначительное снижение эффекта. В отличие от мономера димер ингибирует слияние во всех исследованных концентрациях. При этом у макрофагов снижается и индекс фагоцитоза (рис. 2, б).

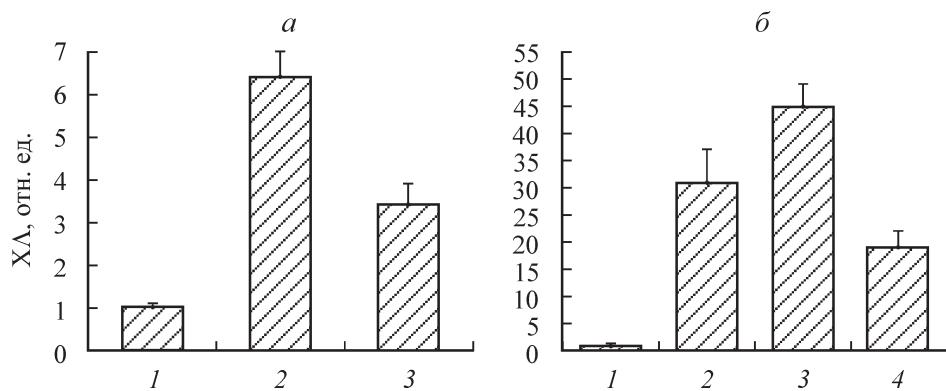


Рис. 1. Влияние димера РНКазы Ві на спонтанную (а) и индуцированную фагоцитозом бактерий (б) хемилюминесценцию макрофагов.

а: 1 — интактные клетки (контроль), 2 — мономер РНКазы Ві, 3 — димер РНКазы Ві. б: 1 — интактные клетки (контроль), 2 — макрофаги с добавлением бактерий, 3 — мономер РНКазы Ві, 4 — димер РНКазы Ві. Здесь и на рис. 2, 3: концентрация препаратов 15 мкг/мл, доверительные интервалы для средних значений соответствуют уровню значимости $P = 0.05$. Число экспериментов в серии 6.

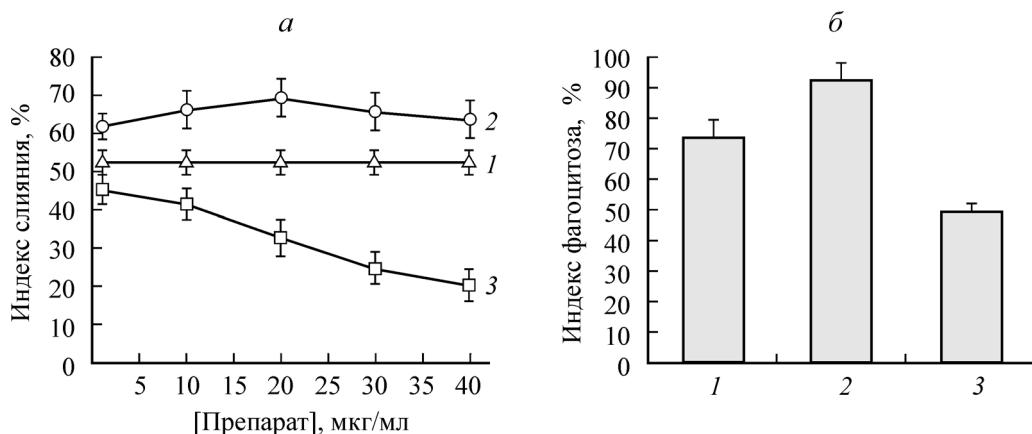


Рис. 2. Индекс слияния лизосом с фагосомами (а) и индекс фагоцитоза (б) после инкубации макрофагов с димерной или мономерной формой РНКазы Ві.

а: 1 — макрофаги с добавлением дрожжей (контроль), 2 — мономер РНКазы Ві, 3 — димер РНКазы Ві. б: 1 — макрофаги с добавлением дрожжей (контроль), 2 — мономер РНКазы Ві, 3 — димер РНКазы Ві.

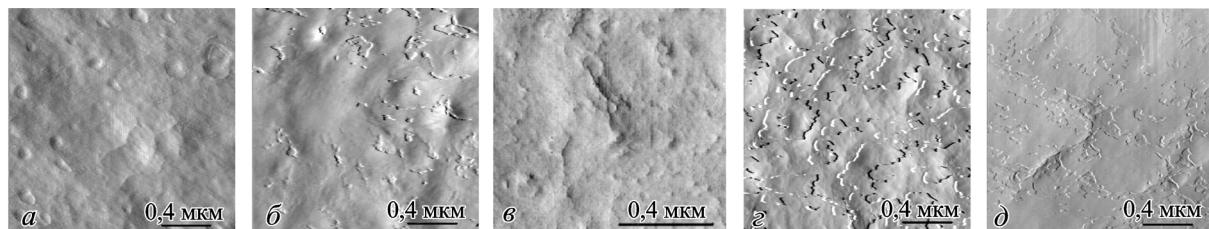


Рис. 3. Изображения клеточной поверхности макрофага, полученные в режиме сигнала рассогласования с помощью атомно-силового микроскопа.

а — клеточная поверхность интактного макрофага; б, в — клеточная поверхность макрофага, обработанная мономерной формой РНКазы Ві в течение 10 (б) или 40 (в) мин; г, д — клеточная поверхность макрофага, обработанная димерной формой РНКазы Ві в течение 10 (г) или 40 (д) мин. Размер кадра 1×1 мкм.

По существующим представлениям, активация фагоцитов осуществляется путем воздействия стимулирующих агентов на плазматическую мембрану. Это приводит к активации мембрально-связанных НАДН (НАДФН)-дегидрогеназ, запускающих систему активации окислительного метаболизма фагоцита, что сопровождается так называемым респираторным взрывом (Маянский, Маянский, 1983). Исходя из этого следует, что РНКазы активируют фагоциты путем взаимодействия с их плазматической мембраной. Опубликованные нами ранее данные, свидетельствующие об электростатическом связывании РНКаз с плазматической мембраной макрофагов (Калачева и др., 2007), хорошо согласуются с этими представлениями.

Визуализация мембран с помощью АСМ позволила сравнить поверхностную структуру мембран макрофагов после их взаимодействия с мономером и димером РНКазы Ви. На изображениях клеточной поверхности до (контроль, рис. 3, а) и после обработки препаратов мономером (рис. 3, б, в) и димером РНКазы (рис. 3, г, д) видно, что после 10-минутной обработки клеток исследуемыми препаратами вид клеточной поверхности изменяется по сравнению с интактными клетками. Изменения особенно сильно выражены в случае обработки клеток димером. Через 40 мин у образцов, обработанных мономерной формой, вид клеточной поверхности восстанавливается, приближаясь к контрольному образцу. После обработки димерной формой изменения, хотя и в меньшей степени, сохраняются.

О свойствах клеточной поверхности судили по амплитуде колебаний кантилевера АСМ, которая скачком меняется на участках мембранных клеток, обработанных препаратами РНКаз, по сравнению с интактными клетками. Визуализация мембран макрофагов методом АСМ не является прямым отображением поверхностной структуры клеток. Маленькая амплитуда колебаний кантилевера, при которой проводились эксперименты, делает поведение кантилевера сильно зависимым не только от рельефа поверхности макрофагов, но и от физико-химических свойств локальных участков цитоплазматической мембранны.

При попытке объяснить полученные результаты мы исходили из известных фактов, свидетельствующих о том, что белковые поликатионы, синтетические соединения поликатионной природы, а также двухвалентные катионы металлов связываются с мембранами за счет электростатических сил (Papahadjopoulos, 1977; Коркина и др., 1985, 1987; Платэ, Васильев, 1986; Антонов и др., 1992). При этом они образуют «сшивки» электроотрицательных областей клеточных мембран. Как следствие происходят уменьшение латеральной подвижности липидов и повышение температуры фазовых переходов липидов мембранны из состояния гель в состояние жидккий кристалл (Papahadjopoulos, 1977; Антонов и др., 1992). Такие изменения свойств мембранны лежат в основе увеличения ее вязкости (Papahadjopoulos, 1977; Hauser, Shipley, 1984; Margio, Sturtevant, 1987; Антонов и др., 1992). С увеличением вязкости мембранны нарушаются функционирование сенсорных и транспортных белков клетки, необходимых для поддержания клеточного гомеостаза (van der Heide, Poolman, 2000). Важную роль при адсорбционном способе взаимодействия с клеткой играют концентрация, основность и молекулярная масса лигандов (Платэ, Васильев, 1986). Поскольку РНКазы при физиологических условиях представляют собой полика-

тионы, после их воздействия на мембрану макрофага в ней могут происходить изменения, аналогичные вышеописанным. Тогда полученные результаты можно объяснить следующим образом. Низкие концентрации нативной (мономерной) РНКазы незначительно изменяют структуру мембран, что сопровождается ее слабым раздражением и приводит к запуску механизма активации макрофага. В отличие от мономера димер РНКазы взаимодействует с более обширными участками клеточной мембраны, сильнее модифицирует ее поверхностную структуру и, вероятно, вызывает образование более обширных доменов мембранных липидов, обладающих повышенной микровязкостью. При этом, естественно, происходит нарушение функционирования жизненно важных структур клетки, интегрированных в мембрану, что, вероятно, и является причиной подавления фагоцитарной функции макрофага.

Таким образом, особенностью взаимодействия димерной формы РНКазы Ви с макрофагами является ингибирование их фагоцитарной функции, являющейся одним из показателей их активации. Благодаря этому свойству открывается перспектива использования димерной формы РНКазы в антивоспалительной терапии и для ослабления деструктивных (цитотоксических) фагоцитзависимых реакций.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РНП.2.1.1.3222, ГК 02.512.11.2050, ГК 02.451.11.7019 и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01051). АСМ-измерения выполнены на оборудовании ФЦКП физико-химических исследований (Казань).

Список литературы

- Антонов В. Ф., Смирнова Е. Ю., Шевченко Е. В. 1992. Липидные мембранны при фазовых превращениях. М.: Наука. 136 с.
- Ильинская О. Н., Макаров А. А. 2005. Почему рибонуклеазы вызывают гибель раковых клеток. Молекуляр. биология. 39 (1) : 3—13.
- Калачева Н. В., Куриенко Б. М. 2005. Влияние рибонуклеаз и их модифицированных производных на функциональную активность перитонеальных макрофагов крысы. Биомед. химия. 51 (3) : 303—310.
- Калачева Н. В., Нарулина А. В., Куриенко Б. М. 2007. Особенности электростатического взаимодействия панкреатической и микробной рибонуклеаз с макрофагами *in vitro*. Цитология. 49 (4) : 296—299.
- Коркина Л. Г., Суслова Т. Б., Гуляева Ж. Г., Зезин А. Б., Величковский Б. Т., Владимиров Ю. А., Кабанов В. А. 1987. Мембранный механизм активации клеток. Биол. мембранны. 4 (10) : 1093—1101.
- Коркина Л. Г., Суслова Т. Б., Гуляева Ж. Г., Зезин А. Б., Величковский Б. Г., Кабанов В. А. 1985. Хемилюминесценция перитонеальных макрофагов, активированная неприродными полиэлектролитами. ДАН СССР. 282 (1) : 206—209.
- Лещинская И. Б., Балабан Н. П., Капранова М. Н., Голубенко И. А. 1980. Методы определения нуклеаз и родственных ферментов. В кн.: Современные методы изучения нуклеиновых кислот и нуклеаз микроорганизмов. Казань: Изд-во КГУ. 53—60.
- Маянский А. Н., Маянский Д. Н. 1983. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука. 275 с.
- Платэ Н. Ф., Васильев А. Е. 1986. Физиологически активные полимеры. М.: Химия. 382 с.
- Draper P., Hart D. A., Joung M. 1979. Effect of anionic inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages when

the ingested organism is *Mycobacterium lepraeumurium*. Infection and Immunity. 24 : 558—561.

Hauser H., Shipley G. G. 1984. Interactions of bivalent cations with phosphatidylserine bilayers membranes. Biochemistry. 23 : 34—41.

Heide T., van der Poolman P. 2000. Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. PNAS. 97 : 7102—7107.

Kielian M., Conn F. A. 1980. Phagosome-lysosome fusion characterization of intracellular membrane fusion in mouse macrophages. J. Cell Biol. 85 : 754—765.

Libonati M. 2004. Biologocal actions of the oligomers of ribonuclease A CMLS. Cell. Mol. Life Sci. 61 : 2431—2436.

Margio B., Sturtevant J. M. 1987. Effect of calcium ions on the thermotropic behaviour of neutral and amonic glycosphingolipids. Biochim. biophys. acta. 901 : 173—183.

Papahadjopoulos D. 1977. Effect of bivalent cations and proteins on thermotropic properties of phospholipid membranes. J. Colloid Interface Sci. 58 : 459—470.

Wang D., Wilson G., Moore S. 1976. Preparation of cross-linked dimers of pancreatic ribonuclease. Biochemistry. 15 : 660—665.

Поступила 18 VII 2007

INHIBITION OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF MACROPHAGES *IN VITRO* BY DIMER RNASE *BACILLUS INTERMEDIUS*

N. V. Kalacheva,¹ O. A. Konovalova,² D. S. Nalimov,² M. Kh. Salakhov,² O. N. Il'inskaya,¹ B. M. Kurinenko¹

¹ Department of Microbiology, Laboratory of Engineering Enzymology
and ² Department of Optics and Nanophotonics, Kazan State University;
e-mail: nvkalacheva@yandex.ru

The influence of cross-linked by dimethylsuberimidate dimeric RNase from *Bacillus intermedius* on peritoneal rat macrophages has been investigated *in vitro*. It has been shown that dimeric RNase with concentrations of 0.5—40.0 mg/ml decreases the functional activities of macrophages. This is manifested in the inhibition of the phagocyte function of macrophages and suppression of the fusion of phagosomes with lysosomes. The change in the cytoplasmatic membrane surface structure induced by the dimers, which is stronger than that induced by monomers, has been demonstrated using atomic force microscopy. The role of membrane properties modification in the inhibition effect of RNase dimers on the functional activities of macrophages is discussed.