

А.В. Данилевская, А.А. Лапчук
**ИССЛЕДОВАНИЯ ДЕЙСТВИЯ РИБОНУКЛЕАЗ
В ЛЕЧЕНИИ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

*Научные руководители: канд. мед. наук, доц. Д.А. Черношей,
канд. мед. наук К.И. Павлов**

Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии

**Лаборатория экспериментальной медицины, фармакологии и токсикологии НИЧ
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

A.V. Danilevskaya, A.A. Lapchuk
**RESEARCHES OF THE ACTION OF RIBONUCLEASES
IN THE TREATMENT OF RESPIROTORARY DISEASES**

*Tutors: PhD, associate professor D.A. Charnashei, PhD K.I. Pavlov**

Department of Microbiology, Virology, Immunology

**Laboratory of Experimental Medicine, Pharmacology and Toxicology
Belarusian State Medical University, Minsk*

Резюме. Проведено исследование действия рибонуклеаз на течение ОРДС у крыс. Было установлено, что при введении экзогенной рибонуклеазы 2, воспалительный процесс имел менее выраженный характер по сравнению с экспериментальной группой, к которой не применялись рибонуклеазы. Результат ПЦР исследования ткани легкого при ОРДС у крыс свидетельствовал о повышении экспрессии рибонуклеазы 7 при введении экзогенных РНКаз, в то время как в контрольной группе отмечалось повышение рибонуклеаз 4,5 и 7.

Ключевые слова: рибонуклеазы, острый респираторный дистресс-синдром.

Resume. The study describes the ribonucleases effect on the course of the ARDS in rats. It was found that the introduction of exogenous ribonuclease 2 led to the decrease of the inflammatory process intensity in comparison with the control group. The endogenous ribonucleases expression in ARDS studied by quantitative PCR revealed an increase of ribonucleases 4, 5 and 7 mRNA level in lung tissue. Introduction of exogenous ribonuclease led to an increase of the ribonuclease 7 only.

Keywords: ribonucleases, acute respiratory distress syndrome.

Актуальность. Острый респираторный дистресс синдром (ОРДС) является патологическим состоянием, которое может возникнуть в результате любого серьезного заболевания или состояния, которые повреждают легкие. В более чем 50% случаях, ОРДС развивается вследствие тяжелой инфекции или пневмонии, что также актуально во время COVID-19. Действие рибонуклеаз (RNASE) является одним из ключевых факторов в лечении и диагностике данного патологического процесса.

Цель: доказать значимость рибонуклеаз в течении патологического процесса острого респираторного дистресс синдрома.

Задачи:

1. Анализ литературных данных о действии и влиянии рибонуклеаз на течение патологического процесса острого респираторного дистресс синдрома (ОРДС).
2. Определить, как изменяется экспрессия рибонуклеаз при ОРДС на модели у крыс
3. Определить влияние введения экзогенных рибонуклеаз на течение, ОРДС.

Материалы и методы. Исследования выполнялись у крыс Wistar с применением внутрилёгочного введения растворов ЛПС *E.coli* и *P.aeruginosa* и внутривенного введения раствора тромбопластин-кальциевой смеси (20 мг/кг). Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике университета.

- Внутривенное введение раствора тромбопластин-кальциевой смеси
- Обезболивание тиопенталом натрия
- Внутрилегочное введение смеси рибонуклеаз и ЛПС *E.coli* и *P.aeruginosa* (опытная группа)
- Введение смеси ЛПС *E.coli* и *P.aeruginosa* (контрольная группа)
- Мониторинг состояния животных и регистрация признаков ОРДС
- Эвтаназия и препарирование крыс
- Исследование экспрессии эндогенных рибонуклеаз и цитокинов в ткани легкого методом количественной относительной ПЦР

Для изучения влияния введения экзогенных рибонуклеаз сформированы опытная и контрольная группы крыс. ОРДС моделировали внутривенным введением раствора тромбопластин-кальциевой смеси. Далее крыс наркотизировали тиопенталом натрия, удаляли шерсть на дорсальной части туловища и производили внутрилегочное введение липополисахаридов *E.coli* и *P.aeruginosa*. Животным опытной группы также вводили раствор рибонуклеазы 2.

Мониторинг за развитием ОРДС осуществляли в течении 5 часов, у животных наблюдались судороги, одышка, сопенье, выделения из носа, учащенное дыхание.

Далее производилась эвтаназия и препарирование крыс с изъятием образцов ткани легких с целью исследования экспрессии рибонуклеаз и цитокинов методом ПЦР.

Проведение ПЦР. Образец ткани легкого измельчали, выделение РНК проводили по общепринятой методике с применением три-реагента. Выделенные образцы обрабатывали ДНК-азой («Синтол», РФ). Далее образцы подвергали обратной транскрипции с применением набора «Реверта» («АртБиоТех», РБ). Количественную относительную ПЦР проводили с праймерами производства «АртБиоТех» РБ. Результаты нормировали по бета-актину.

Результаты и их обсуждение. В роли экзогенной рибонуклеазы при лечении использовалась RNASE2, которая относится к суперсемейству RNASE A, является гомологичной панкреатическим рибонуклеазам быка. Данный белок обладает цитотоксическим и антибактериальными свойствами, тем самым участвует в неспецифической защите дыхательного отдела. Вырабатывается эозинофильными клетками. При введении патогена бактериальной природы наибольшую противомикробную активность будет проявлять RNASE7. Экспрессия этого белка индуцируется в базальных клетках повреждённого эпителия дыхательных путей. Однако лечение рнказами сталкивается с проблемой высокой вероятности разрушения клеточными цитозольными ингибиторами.

При внутрилегочном введении растворов ЛПС *E. Coli* и *Pseudomonas aeruginosa* группе крыс наблюдалось повышение экспрессии RNASE2 по сравнению с группой, в которой применялось лечение введением экзогенной RNASE2 ($1,84 \pm 0,17$ – без лечения, $0,39 \pm 0,28$ – с лечением, $p=0,0004$), также отмечалось повышение экспрессии

RNASE6 и RNASE7 в моделях крыс с лечением, сравнивая с данными крыс не получившим лечение ($0,15 \pm 0,03$ – без лечения, $0,30 \pm 0,12$ – с лечением, $p=0,0465$; $0,22 \pm 0,02$ – без лечения, $0,99 \pm 0,45$ – с лечением, $p=0,0026$). Это связано с тем, что при введении экзогенной рибонуклеазы, организму не требуется тратить ресурсы на экспрессию собственной РНКазы 2. Именно рибонуклеаза 2 имеет огромное значение в ходе патологического процесса, так как она является хемоаттрактантом, привлекающим лейкоцитарные клетки. Усиление экспрессии РНКаз 6 и 7 свидетельствует о бактериальном происхождении патологического процесса, так как данные РНКазы проявляют наиболее выраженный противомикробный эффект.

В модели крыс, не получившим лечение, наблюдалось повышение цитокинов IL-6 под действием RNASE2, RNASE4, RNASE5, RNASE7, также выработка рибонуклеаз индуцируется экспрессией RNASE7, обладающей наибольшим эффектом на IL-6. Под действием бактериального агента, цитокины воспаления стимулируют экспрессию РНКаз. В первую очередь РНКаз 2 и 4, которые способствуют хемотаксису лейкоцитов. РНКазы 5 и 7 обладают наиболее выраженными противомикробными действиями, а также рибонуклеаза 5 способствует ангиогенезу и пролиферации эндотелиальных клеток, что является следствием повреждения легочной ткани в результате воспалительного процесса.

В модели крыс, получившим лечение, на концентрацию цитокинов IL-6 влияют RNASE2 и RNASE7. Также выявлена взаимосвязь RNASE4 и RNASE5, а также между RNASE5 и RNASE7. При введении экзогенной РНКазы 2 наблюдается хемотаксис РНКазы 7, которому не предшествует повреждение ткани воспалительным процессом. То есть, воспаление не успевает развиться до такой степени, что повреждение ткани будет способствовать усилению экспрессии РНКаз.

Выводы:

1. ОРДС является результатом повреждения легких при различных воспалительных процессах, вызванных вирусами и бактериями. Различают три фазы: экссудативная, пролиферативная и фибротическая. Наибольшую патологическую значимость в данной научной работе вызывает экссудативная фаза. Она характеризуется повышением выделения цитокинов альвеолярными макрофагами и нейтрофилами. Лейкоциты прикрепляются к эндотелию кровеносных сосудов эпителию альвеол, вызывая их повреждение и развитие воспалительного процесса в тканях. Синтез цитокинов приводит к повышению экспрессии рибонуклеаз, которые участвуют в протеолизе вирусной РНК. Также под действием рибонуклеаз наблюдаются процессы восстановления поврежденных тканей. Имеется несколько механизмов нейтрализации вирусной РНК: разрушения вРНК вне клетки РНКазой, которая не утрачивает каталитическую активность под действием природных ингибиторов РНКаз; взаимодействие РНКазы с вРНК в составе эндосомы; непосредственное разрушение вРНК в ядре. Непрямым действием РНКаз можно считать участие экзогенных рибонуклеаз в процессах РНК-интерференции.

2. В рамках используемой модели зафиксирована положительная относительная экспрессия РНКаз разных типов по сравнению с генами домашнего хозяйства. Наибольшая экспрессия определена для РНКаз 1, 5 и 2 ($4,15 \pm 1,53$, $3,80 \pm 0,70$, $1,84 \pm 0,17$, соответственно, $p > 0,05$ по сравнению с контрольными животными).

3. Введение экзогенной РНКазы 2 приводило к разнонаправленным изменениям экспрессии эндогенных РНКаз: достоверному снижению экспрессии РНКазы 2 и существенному повышению экспрессии РНКазы 7 (с $1,84 \pm 0,17$ и $0,22 \pm 0,02$ до $0,39 \pm 0,28$ и $0,99 \pm 0,45$, соответственно, $p < 0,05$).

4. Анализ корреляционных связей исследуемых параметров выявил положительные связи между экспрессией гена ИЛ6 и некоторых РНКаз (2, 4, 5, 7 типов) различной силы. Введение экзогенной РНКазы 2 вызвало изменение корреляционной картины: были зафиксированы сильные достоверные положительные корреляции между экспрессией ИЛ6 и РНКаз 2 и 7 ($r=0,90$, $p < 0,05$).

5. При ОРДС у крыс происходит повышение экспрессии рибонуклеаз под действием цитокинов воспаления, а также в результате повреждения тканей респираторного отдела воспалительными процессами. Таким образом, воспаление стимулировало экспрессию рибонуклеаз; наибольшая активность наблюдалась у РНКаз 1, 5 и 2.

6. Введение экзогенной РНКазы 2 приводило к существенному повышению экспрессии РНКазы 7, обладающей наиболее выраженным противомикробным действием. Воспалительный процесс протекал легче, чем у группы крыс без введения рибонуклеаз.

Литература

1. Рибонуклеазы как противовирусные агенты / О.Н., Ильинская, Р., Шах Махмуд // Молекулярная биология. – 2014. – Том. 48, № 5. – С.707-717.
2. Диагностика и интенсивная терапия острого респираторного дистресс-синдрома / А.И. Ярошецкий, А.И. Грицан, С.Н. Авдеев и др. // Анестезиология и реаниматология. – 2020. – № 2. – С. 5-39.
3. Рибонуклеазы с антипролиферативной активностью: молекулярно-биологические и биохимические свойства / В.С. Покровский, Е.М. Трещалина, Н. В. Андропова и др. // Клиническая онкогематология. – 2016. – Том. 9, № 2. – С.130-137.