

ДЕЙСТВИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ НА ОПУХОЛЕВЫЕ И НОРМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ В КУЛЬТУРЕ

© *О. В. Шамова*^{1,*}, *Г. А. Сакута*², *Д. С. Орлов*¹, *В. В. Зенин*², *Г. И. Штейн*²,
*Н. И. Колодкин*³, *И. В. Афонина*³, *В. Н. Кокряков*¹

¹ ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, ² Институт цитологии РАН и

³ ГНЦ ГосНИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: oshamova@yandex.ru

Изучали действие эффекторных молекул системы врожденного иммунитета — катионных антимикробных пептидов (АМП) из нейтрофильных гранулоцитов (протегрина 1 свиньи и бактенецина 5 козы) — на опухолевые и нормальные клетки млекопитающих *in vitro*. Сравнивали цитотоксическую активность различных по структуре протегрина 1 (ПГ1) и бактенецина 5 (Бак5) в отношении ряда клеточных линий, а также особенности их действия на эти клетки. Изучали, в частности, способность пептидов проникать через клеточную мембрану в цитоплазму клеток-мишеней. Показано, что ПГ1, имеющий структуру бета-шпильки, обладает быстрым и выраженным цитотоксическим действием в отношении большинства исследованных клеточных линий, причем это действие проявляется более заметно в бессывороточной среде и снижается в среде, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, но не отменяется полностью. Рассмотрено влияние серпинов (α 1-антитрипсина) на цитотоксическую активность ПГ1. Установлено, что в присутствии α 1-антитрипсина цитотоксическая активность ПГ1 снижается, в свою очередь антипротеазная активность α 1-антитрипсина угнетается в присутствии ПГ1. Показано, что Бак5 (линейный пептид), имеющий высокое содержание пролина в составе молекулы, проявляет значительно более низкую, чем в ПГ1, токсическую активность в отношении исследованных клеточных линий. Получены ПГ1 и Бак5, конъюгированные с флуоресцентным красителем (BODIPY F1), с помощью конфокальной микроскопии показано, что оба меченых пептида способны проникать через мембраны в цитоплазму клеток в течение 15—30 мин после добавления пептидов к клеточным суспензиям. С помощью проточной цитометрии показано, что проникновение пептидов в клетки-мишени зависит от температуры инкубационной среды и уровня энергетического метаболизма клеток. При блокировании синтеза АТФ или понижении температуры (до 4 °С) процесс транслокации обоих пептидов через клеточные мембраны угнетается. Присутствие веществ, угнетающих эндоцитоз (винбластин, цитохалазин В и метилциклодекстрина), тоже снижает эффективность включения ПГ1-BODIPY и Бак5-BODIPY в клетки, но не отменяет полностью этот процесс. Полученные данные дают возможность предположить, что оба пептида проникают в клетки как при участии процесса эндоцитоза, так и независимо от него. Способность пептидов проникать во внутриклеточное пространство свидетельствует в пользу предположения о том, что АМП могут участвовать в процессах, происходящих в цитоплазме эукариотических клеток — как опухолевых, так и нормальных, в том числе в модуляции активности внутриклеточных серпинов.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, бактенецин 5, протегрин 1, врожденный иммунитет, цитотоксическая активность, серпины.

Принятые сокращения: ААТ — α 1-антитрипсин, АМП — антимикробные пептиды, Бак5 — бактенецин 5, ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография, ИК50 — концентрация, при которой достигается 50%-ное ингибирование роста клеток, ПГ1 — протегрин 1.

Нейтрофильные гранулоциты являются важнейшими эффекторными клетками системы врожденного иммунитета и обеспечивают передовую линию защиты организма от инфекционных агентов. Роль нейтрофильных гранулоцитов в осуществлении противоопухолевой защиты организма в настоящее время остается малоизученной, а накопленные данные с трудом поддаются обобщению (Carlo et al., 2001). Однако бесспорно показано, что в лизосоноподобных гранулах нейтрофилов содержится целый арсенал молекул, способных лизировать как микробные, так и эукариотические клетки (Lehrer, Ganz, 2002; Zasloff, 2002; Voman, 2003). В состав активных ком-

понентов лизосоноподобных гранул нейтрофилов входят протеолитические ферменты, миелопероксидазная система, а также катионные пептиды с мол. массой 2—6 кДа. Эти пептиды вначале были открыты как соединения, обладающие выраженной антимикробной активностью, поэтому за ними закрепилось название «антимикробные пептиды» (АМП). Затем было показано, что некоторые АМП нейтрофилов обладают спектром биологических свойств, отличных от антибиотических, что дало основание рассматривать эти пептиды как возможные регуляторные молекулы, обеспечивающие взаимодействие систем врожденного и приобретенного иммуните-

та (Hancock, Diamond, 2000; Yang et al., 2004; Zannetti, 2004).

У млекопитающих известны две большие группы АМП: дефенсины и кателицидины. Дефенсины — семейство гомологичных пептидов с мол. массой 3.5—4.0 кДа, молекулы которых стабилизированы тремя дисульфидными мостиками (Lehrer et al., 1993; Lehrer, Ganz, 2002). Другая обширная группа кателицидинов включает в себя пептиды с разнообразными структурами, общим для которых является лишь то, что все они происходят из молекулы-предшественниц, состоящих из двух частей: одна гомологична белку кателину (ингибитору катепсина L), а другая представляет собой собственно антимикробный пептид, который приобретает антимикробную активность после протеолитического отщепления кателиновой части молекулы-предшественницы (Zanetti et al., 1995).

Для ряда АМП, в частности дефенсинов человека, показана способность лизировать различные опухолевые (а также в некоторых случаях и нормальные) клетки организма (Lichtenstein et al., 1986; Lichtenstein, 1991; Lehrer et al., 1993; Плескач и др., 2000). Однако в настоящее время исследований в этом направлении немного.

Целью настоящей работы было изучение действия двух АМП — протегрина 1 (ПГ1) и бактенецина 5 (Бак5) — на опухолевые, а также на некоторые нетрансформированные клетки в культуре. Эти два пептида, принадлежащие к семейству кателицидинов и обладающие высокой антимикробной активностью против широкого спектра микроорганизмов, значительно различаются по своей структуре и механизму антимикробного действия. Поэтому мы сравнивали их эффекты на эукариотические клетки. ПГ1 свиньи состоит из 18 аминокислот (RGGR-LCYRRRRCVVCVGR-NH₂), причем 6 из них представлены аргинином, что и определяет высокий положительный заряд молекулы этого пептида. В ее состав входят также четыре цистеина, образующих два дисульфидных мостика (Kokryakov et al., 1993). Основной мишенью антимикробного действия ПГ1, как предполагается, являются мембраны микроорганизмов. В отличие от ПГ1 Бак5 козы представляет собой линейную молекулу (RFRPPIRRP-PIRPPFNPPFRPPVRRPFRPPFRPPFRPPFRPPGPF-NH₂), характерной особенностью которой является высокое содержание пролина и аргинина (Gennaro et al., 1989; Shamova et al., 1999). Механизм его антимикробного действия связывают не с повреждением мембран, а с нарушением различных внутриклеточных процессов (Gennaro et al., 2002). В задачи нашего исследования входило изучение как непосредственного токсического действия пептидов в отношении различных опухолевых и нормальных клеток в культуре, так и некоторых факторов, которые могут ограничивать это действие, в частности сыворотки крови и ее отдельных компонентов. Кроме того, для получения информации о механизмах действия АМП на клетки ПГ1 и Бак5 были конъюгированы с флуоресцентными маркерами, что позволило исследовать процесс проникновения пептидов через мембраны клеток-мишеней во внутриклеточные компартменты с помощью конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии.

Материал и методика

Реактивы: среды и сыворотки («Биолот», Россия); трипановый синий (Merck, Германия); BODIPY FL SE (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, Sucinimidil Es-

ter) (Molecular Probes, США); МТТ (3-[4-5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), α1-антитрипсин, *p*-нитрофениловый эфир бутилтреокси-L-аланина и эластаза (Sigma, США).

Антимикробные пептиды. Использовали как химически синтезированные, так и природные пептиды, выделенные из лейкоцитов животных. Так, ПГ1 из лейкоцитов свиньи и Бак5 из лейкоцитов козы выделяли, как описано ранее (Kokryakov et al., 1993; Shamova et al., 1999, соответственно). Химически синтезированный ПГ1 был любезно предоставлен проф. Р. Лерером (Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США). Химически синтезированный Бак5 получали последовательным наращиванием пептидной цепи на *p*-метилбензгидриламинопере (Sigma, США) на синтезаторе Vega Coupler 250 (США) с помощью оксипентотриазоловых эфиров и нейтрализацией *in situ* (Schnolzer et al., 1992), используя Вос-технологии (Merrifield, Barany, 1980). Очистку пептида проводили с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Чистота полученного бактенецина была более 99 %. Он имел удовлетворительный аминокислотный анализ, был индивидуален по данным аналитической ВЭЖХ, его молекулярная масса, по данным масс-спектрометрии, соответствовала расчетной.

ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Gilson (Франция) на колонках DeltaPak 5 мкм C18 100A (3.9×150.0 мм) для аналитических целей и Waters Prep-NovaPak 6 мкм C18 60A (19×300 мм) для препаративной очистки. Аминокислотный анализ проводили на анализаторе Alpha-Plus (LKB, Швеция) после гидролиза пептида 6 М HCl в течение 22 ч при 110 °С. Масс-спектрометрию осуществляли методом MALDI TOF.

Масс-спектрометрический анализ проводили на времяпролетном масс-спектрометре с ионизацией с помощью матрицы (MALDI TOF — Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) на приборе PerSeptive BioSystems «Voyager-DE BioSpectrometry Workstation». В качестве матрицы использовали альфа-цианокоричную кислоту. Масс-спектрометрию выполняли на оборудовании ЦКП «Аналитическая спектрометрия» при С.-Петербургском государственном политехническом университете.

Клеточные линии. Использовали клетки эритромиелоидной лейкемии человека K562, клетки гистиоцитарной лимфомы человека U937, клетки промиелоцитарной лейкемии человека HL60, клетки эпителиоидной карциномы легкого человека A549, клетки эпидермоидной карциномы человека A431, остеосаркомы человека MG63, а также нетрансформированные клетки: нормальные фибробласты кожи человека, первичные миобласты крыс, фибробласты легкого эмбриона человека MRC5, клетки эмбриона мыши NIH 3T3. Клетки суспензионных линий K562, U937 и HL60 культивировали в среде RPMI 1640, дополненной глутамином, гентамицином и 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой. Монослойные клетки A549, MG63 и др. культивировали в среде ДМЕМ, содержащей те же добавки. Спленоциты крыс получали из селезенки крыс, которую помещали в физиологический раствор (рН 7.4) и осторожно измельчали с помощью гомогенизатора (стекло/стекло). Гомогенат процеживали через нейлоновый фильтр и проводили в полученной клеточной суспензии гемолиз эритроцитов с помощью 0.83%-ного хлористого аммония (4 объема). Далее клеточную суспензию центрифугировали при 300 g,

промывали физиологическим раствором и помещали в среду RPMI 1640.

Цитотоксическое действие пептидов оценивали с помощью МТТ-теста, который позволяет оценить суммарную активность дыхательных ферментов митохондрий (Mosmann, 1983). В экспериментах использовали клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста. Клетки суспензионных линий K562, U937 и др. вносили в лунки 96-луночных планшетов (Orange Scientific, Бельгия) в среде RPMI 1640, содержащей или не содержащей 10%-ной эмбриональной сыворотки, так чтобы в одной лунке было 10 000 клеток в 90 мкл раствора. Далее к 90 мл клеточной суспензии добавляли по 10 мкл раствора пептида (в среде RPMI) различной концентрации. В контрольные лунки добавляли по 10 мкл среды. Планшеты далее помещали в атмосферу 5 % CO₂ при 37 °C на 6, 24 или 48 ч. Клетки монослойных культур (A549, MG63, MRC5 и др.) высевали в планшеты (по 10 000 клеток на лунку) за 20 ч до внесения пептидов, чтобы позволить клеткам сформировать монослой. По прошествии 20 ч среду меняли и в лунки добавляли по 10 мкл раствора пептидов (или среды в случае контроля) и помещали на 6, 24 или 48 ч в атмосферу 5 % CO₂ при 37 °C. За 3 ч до окончания срока инкубации в лунки планшетов добавляли по 10 мкл раствора МТТ (5 мг/мл в физиологическом растворе, pH 7.4). По окончании инкубации в лунки планшетов вносили по 100 мкл изопропанола, содержащего 0.04 М HCl. Далее измеряли оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 540 нм, вычитая величину оптической плотности при 690 нм, на фотометре Labsystems Multiskan MS (Финляндия). Для построения графиков и расчета средней ингибирующей концентрации пептидов (ИК50) использовали программу Sigma Plot 9.

Конъюгацию ПГ1 и Бак5 (химически синтезированных пептидов) с флуорофором BODIPY FL SE (длины волн возбуждения и испускания соответственно 503 и 512 нм) проводили в 0.2 М натрий-фосфатном буфере, pH 6.5, в течение 24 ч на холоде при перемешивании с помощью магнитной мешалки. В данных условиях метка присоединяется к N-концевой аминокислоте (Gaudriault, Vincent, 1992). На 500 мкг ПГ1 брали 500 мкг красителя, на 500 мкг Бак5 — 1 мг. Реакцию останавливали, добавляя трифторуксусную кислоту до конечной концентрации 0.1 %. Далее проводили очистку меченого продукта от непрореагировавшего пептида и других нежелательных продуктов реакции с помощью ВЭЖХ на колонке Vydac C-18 (США) с использованием линейного градиента вода—ацетонитрил от 0 до 60 % в присутствии 0.1%-ной трифторуксусной кислоты. Идентификацию меченых пептидов и оценку их чистоты проводили с помощью масс-спектрометрии (MALDI TOF). Концентрацию пептидов, конъюгированных с BODIPY FL, определяли спектрофотометрически согласно рекомендациям производителя флуорофора, учитывая, что на одну молекулу пептида приходится одна молекула BODIPY. Активность полученных ПГ1-BODIPY и Бак5-BODIPY как против микроорганизмов, так и против эукариотических клеток практически не отличалась от активности исходных немеченых пептидов.

Микроскопия. За процессом связывания ПГ1-BODIPY и Бак5-BODIPY с клетками-мишенями наблюдали с помощью флуоресцентного (МИКМЕД, ЛОМО, Санкт-Петербург) и конфокального (LEICA TCS SL, Германия) микроскопов. Клеточные суспензии переносили в пластиковые пробирки по 50 000 клеток на пробирку в

объеме 50 мкл. Затем к этим суспензиям добавляли по 1 мкл меченых пептидов до конечной концентрации 1—10 мкМ или 1 мкл среды для контрольных проб. Пробирки помещали в атмосферу 5 % CO₂ при 37 °C на 30 мин, 1 или 2 ч; затем клетки осаждали центрифугированием, отмывали от избытка несвязавшегося пептида и препараты (без фиксации) немедленно использовали для микроскопического исследования. Связывание меченых пептидов с клетками наблюдали, просматривая препараты под флуоресцентным микроскопом МИКМЕД. Те же препараты просматривали и в проходящем свете. Кроме того, препараты использовали для приготовления мазков, которые окрашивали по Май-Грюнвальду и анализировали с помощью световой микроскопии. Для исследования распределения меченых пептидов в клетках использовали лазерную сканирующую конфокальную микроскопию на микроскопе LEICA TCS SL со следующими параметрами: лазер Ar.488; объектив HCX PL APO CS 63 (апертура 1.32); получали серии оптических срезов с шагом 1.2 или 1.0 мкм; размер изображений 512 × 512 пикселей.

Проточная цитометрия. Интернализацию меченых пептидов (BODIPY FL) в клетки-мишени оценивали количественно с помощью проточной цитометрии (прибор ACR1000 Brucker, Франция) по увеличению величины сигнала зеленой флуоресценции. В каждой серии экспериментов прибор калибровали по светорассеянию и флуоресценции с помощью калибровочных шариков RCP 30 5A (Spherotech, США), что давало возможность количественно сравнивать результаты в отдельных экспериментах. Положение модального значения величины флуоресценции проанализированных клеток выражали в отн. ед.

Пробы для экспериментов готовили следующим образом: клетки (75 тыс. в 50 мкл среды RPMI 1640) инкубировали с пептидами в различных условиях: при 37 или 4 °C (на ледяной бане), в присутствии 0.1%-ного азида натрия и 50 мМ неутилизуемого аналога глюкозы 2-дезоксиглюкозы (для оценки зависимости транслокации пептидов в клетки от интенсивности их энергетических процессов), в присутствии 10 мкМ винбластина (связывающего тубулин и вызывающего его деполимеризацию), в присутствии 10 мкМ цитохалазина В (ингибирующего полимеризацию актина), в присутствии 0.25 мМ метилциклодекстрина (для выяснения роли эндоцитоза в переносе пептидов через клеточные мембраны). За 1 ч до внесения пептидов в клеточные суспензии вносили азид натрия и 2-дезоксиглюкозу либо вещества, угнетающие эндоцитоз (винбластин, или цитохалазин В, метилциклодекстрин), либо клетки помещали на 30 мин на ледяную баню. Предварительно проверяли, что вносимые вещества в данных концентрациях не вызвали гибели клеток. Концентрации азида натрия, 2-дезоксиглюкозы и ингибиторов эндоцитоза подбирали с учетом данных литературы (Drin et al., 2002; Takeshima et al., 2003; Tomasinsig et al., 2006). После внесения пептидов в концентрации 3 (ПГ1) или 5 (Бак5) мкМ инкубацию продолжали в течение 1 ч; затем для удаления пептидов, связавшихся с поверхностями клеток, их обрабатывали трипсином (Tomasinsig et al., 2006), который добавляли до конечной концентрации 1 мг/мл; через 5 мин клетки отмывали физиологическим раствором, pH 7.4. Кроме того, за 3 мин до измерения к отмываемым клеткам добавляли раствор трипанового синего до конечной концентрации 40 мкг/мл (Van Amersfoort, Van Strijp, 1994), который служил в качестве «гасителя» флуоресценции BODIPY FL и, не проникая внутрь живых

клеток, элиминировал сигнал от пептидов-BODIPY, находящихся на поверхности клеток-мишеней. Конечный объем клеточных суспензий, которые использовали для исследования с помощью проточного цитофлуориметра, составлял 200 мкл. Для оценки влияния исследуемых пептидов на жизнеспособность клеток учитывали долю погибших клеток. Для этого к исследуемой суспензии клеток за 1 мин до измерения добавляли йодид пропидия и определяли долю (в %) окрашенных клеток, т. е. клеток с поврежденной клеточной мембраной.

Влияние α 1-антитрипсина (ААТ) на цитотоксическую активность ПГ1. Пептид в концентрации 200 мкг/мл (100 мкМ) инкубировали с ААТ, взятым в концентрации от 2.5 до 80.0 мкМ, в течение 1 ч, затем по 10 мкл полученных смесей вносили в лунки планшетов, в каждой из которых находилось по 90 мкл клеточной суспензии (10 тыс. клеток на лунку). В контрольные пробы вносили по 10 мкл пептида (100 мкМ) без ААТ, либо по 10 мкл среды, либо по 10 мкл ААТ (80 мкМ) без пептида. Таким образом, конечная концентрация пептида в лунке планшета составляла 10 мкМ, а ААТ — от 0.25 до 8.00 мкМ. Планшеты оставляли на 24 ч в атмосфере 5 % CO₂, затем оценивали жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста.

Влияние пептидов на антипротеазную активность ААТ, т. е. на способность ингибировать ферментативную реакцию, катализируемую эластазой из лейкоцитов человека (Sigma, США), после инкубирования ААТ с антимикробными пептидами. Активность эластазы оценивали по описанному методу (Visser, Blont, 1972). Реакцию проводили в лунках 96-луночного планшета. Объем проб составлял 100 мкл. Субстратом реакции служил *p*-нитрофениловый эфир бутилтреокси-L-аланина (НВА). Реакцию проводили в 0.02 М Na-фосфатном буфере с 0.15 М NaCl, pH 7.5; белки и пептиды растворяли в том же буфере. Пептиды в концентрации от 6.25 до 200.00 мкМ инкубировали с 20 мкМ ААТ в течение 1 ч, затем раскапывали по 10 мкл полученных смесей пептидов с ААТ в лунки планшета, добавляли по 80 мкл буфера и по 10 мкл эластазы (6 мкМ). Контролями служили: 1) пробы, в которые вносили по 10 мкл ААТ без пептидов, 5 мкл эластазы и 80 мкл буфера; 2) пробы, в которые вносили по 5 мкл эластазы и 90 мкл буфера; 3) пробы, в которые вносили по 90 мкл буфера. Реакцию запускали добавлением во все пробы по 5 мкл субстрата (1.2 мг/мл). За ходом реакции следили по появлению продукта реакции, проводя измерение оптической плотности растворов при длине волны 405 нм на фотометре Labsystems Multiskan MS (Финляндия).

Статистическая обработка результатов. Использовали программу Statistica 6. Достоверность различий между группами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

Цитотоксическое действие пептидов. Использование МТТ-теста позволяет оценивать активность митохондриальных дегидрогеназ исследуемых клеток и, следовательно, получать информацию об интенсивности метаболизма этих клеток. Данный метод часто применяют для изучения пролиферативной активности клеток, а также токсического действия на клетки различных соединений. При использовании этого теста для исследования

цитотоксического действия препаратов необходимо учитывать, что некоторые вещества могут непосредственно влиять на процесс дыхания клеток, что значительно затрудняет трактовку результатов. Мы проводили предварительные эксперименты по оценке токсического действия ПГ1 и Бак5 на различные клетки с использованием ряда методов: МТТ-теста, окраски клеток трипановым синим и окраски акридиновым оранжевым совместно с бромистым этидием. Так как полученные результаты оказались сходными, в дальнейшем использовали МТТ-тест как наиболее удобный и воспроизводимый и считали, что полученные результаты свидетельствуют об изменении жизнеспособности клеток после воздействия пептидов. Цитотоксические эффекты ПГ1 и Бак5 исследовали через 6, 24 и 48 ч после инкубации их с клетками. Использовали серийные разведения пептидов в диапазоне от 0.4 до 25.0 мкг/мл — концентрации на порядок выше той, при которой эти пептиды проявляют антимикробное действие в отношении большинства исследованных микроорганизмов (Gennaro et al., 1989; Kokryakov et al., 1993; Shamova et al., 1999). В этих экспериментах были использованы природные пептиды ПГ1 и Бак5, полученные из лейкоцитов свиньи и козы соответственно. Однако в аналогичных экспериментах с синтетическими ПГ1 и Бак5 мы получили такие же результаты, поэтому в дальнейшем использовали синтетические пептиды. В таблице представлены результаты изучения действия ПГ1 на различные опухолевые и нетрансформированные клетки *in vitro*. Полученные данные свидетельствуют о том, что ПГ1 обладает цитотоксической активностью в отношении всех исследуемых клеток, хотя чувствительность к нему клеток разных линий различается. Цитотоксическое действие ПГ1 на нетрансформированные клетки в целом было несколько сниженным по сравнению с его эффектами на опухолевые клетки. Так, для нормальных фибробластов кожи человека ИК50 была выше 25 мкг/мл. Миобласты крысы и клетки эмбриона мыши NIH 3T3 тоже были отно-

Цитотоксическое действие протегрина 1 на различные опухолевые и нетрансформированные клетки *in vitro* по результатам МТТ-теста

Клетки	ИК50 (мкг/мл) при инкубации с ПГ1 в течение разного времени, ч					
	6		24		48	
	+S	-S	+S	-S	+S	-S
U937	17.2	5.2	23.9	5.1	24.9	6.7
K562	>25	>25	>25	25.0	>25	21.6
HL60	>25	7.6	6.4	3.0	4.9	1.8
A549	>25	7.1	>25	2.9	>25	6.2
A431	>25	4.1	25.0	3.6	>25	5.3
MG63	21.4	5.0	>25	4.8	>25	6.2
MRC5	>25	14.4	>25	>25	>25	>25
NIH 3T3	>25	20.6	>25	13.5	>25	>25
Миобласты крысы	25.0	>25	>25	>25	>25	>25
Фибробласты кожи человека	>25	>25	>25	>25	>25	>25

Примечание. Представлены медианные ингибирующие концентрации пептида (ИК50) в мкг/мл при его действии на клетки в содержащей (+S) и не содержащей (-S) 10%-ной эмбриональной сыворотки коров средах.

сительно устойчивы к действию ПГ1. Однако мы наблюдали, что добавление ПГ1 в среду клеток всех трех типов хотя и не приводило к гибели 50 % клеток и более, но все же вызывало снижение их жизнеспособности по сравнению с контролем (на 10—20 %). Таким образом, хотя не трансформированные клетки были более устойчивы к повреждающему действию ПГ1, в целом этот пептид, как и большинство других исследованных АМП, не имеет выраженной цитотоксической избирательности в отношении опухолевых клеток.

В задачи нашего исследования входила также оценка цитотоксического действия АМП в присутствии в инкубационной среде сыворотки крови, так как известно, что белки, содержащиеся в сыворотке крови, могут влиять на действие цитотоксических агентов различной природы (Еропкин, Еропкина, 2003). В частности, антимикробные пептиды из семейства дефенсинов, для которых была показана цитотоксическая активность в отношении эукариотических клеток, полностью теряли эту активность в присутствии сыворотки крови (Lichtenstein et al., 1986; Lichtenstein, 1991). Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что цитотоксическое действие ПГ1 более выражено в бессывороточной среде, хотя и в присутствии 10%-ной эмбриональной сыворотки крови коров пептид сохранял токсические свойства в отношении некоторых клеточных линий, причем в каждом случае влияние сыворотки на активность пептидов проявлялось по-разному.

Другой исследуемый антимикробный пептид, Бак5, отличающийся от протегрина структурой и механизмом антимикробного действия, проявил значительно более низкую цитотоксическую активность в отношении всех использованных линий опухолевых клеток. Во всех проведенных нами экспериментах ИК50 была более 25 мкг/мл как в бессывороточной среде, так и в присутствии 10%-ной эмбриональной сыворотки коров. Необходимо, однако, заметить, что добавление Бак5 (до конечной концентрации 25 мкг/мл и меньше) к клеточным суспензиям все же вызывало достоверное снижение жизнеспособности большинства исследованных опухолевых клеток (на 10—30 %), хотя дозозависимости мы не наблюдали. В серии экспериментов с клеточными линиями U937 и K562, а также со спленоцитами крыс использовали более высокие концентрации синтетического Бак5 — до 200 мкг/мл. Было показано, что при инкубации клеток U937 с Бак5 в течение 24 ч ИК50 составила 74 мкг/мл в бессывороточной среде и более 200 мкг/мл в присутствии сыворотки; для клеток K562 — 150 и более 200 мкг/мл соответственно; для спленоцитов крысы — более 200 мкг/мл в обоих случаях. Таким образом, некоторые токсические эффекты Бак5 в отношении опухолевых клеток по сравнению с ПГ1, а также с описанными в литературе эффектами дефенсинов (Lichtenstein, 1986, 1991; Плескач и др., 2000) значительно менее выражены.

Влияние ААТ на цитотоксическую активность АМП. Показано, что ингибирующее действие сыворотки крови в отношении цитотоксического действия антимикробных пептидов из семейства альфа-дефенсинов определяется связыванием их с рядом сывороточных белков (белков из семейства серпинов — ингибиторов сериновых протеиназ, а также ингибитора протеаз α 2-макробулина), причем в результате такого связывания не только отменялись цитотоксические эффекты дефенсинов, но и снижалось ингибирующее действие этих белков в отношении протеиназ (Panyutich, Ganz, 1991; Panyutich

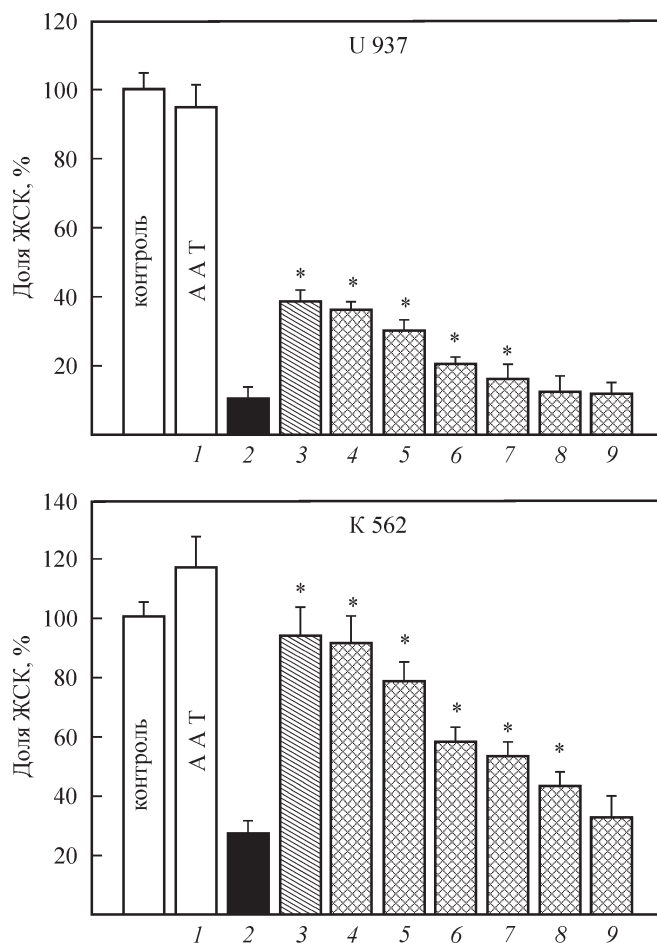


Рис. 1. Влияние α 1-антитрипсина (ААТ) на цитотоксическую активность протегрина 1 (ПГ1) в отношении клеток линий U937 и K562.

По горизонтали: 1 — 8 мкМ ААТ, 2 — 10 мкМ ПГ1, 3 — 10 мкМ ПГ1 + 10%-ная эмбриональная сыворотка коров, 4 — 10 мкМ ПГ1 + 8 мкМ ААТ (1.25 : 1), 5 — 10 мкМ ПГ1 + 4 мкМ ААТ (2.5 : 1), 6 — 10 мкМ ПГ1 + 2 мкМ ААТ (5 : 1), 7 — 10 мкМ ПГ1 + 1 мкМ ААТ (10 : 1), 8 — 10 мкМ ПГ1 + 0.5 мкМ ААТ (20 : 1), 9 — 10 мкМ ПГ1 + 0.25 мкМ ААТ (40 : 1); по вертикали — доля жизнеспособных клеток (ЖСК), % к контролю, т. е. к клеткам, к которым не добавляли ни пептид, ни ААТ (для группы 3 контролем служили клетки, инкубированные в среде, содержащей 10%-ную сыворотку). Звездочкой отмечены достоверные отличия от группы 1 при $P < 0.05$ (количество параллельных проб 4—6). Пептид инкубировали с ААТ (как описано в разделе «Материал и методика»), затем добавляли к клеточным суспензиям. Цитотоксическую активность препаратов оценивали с помощью МТТ-теста.

et al., 1995). Нами было изучено влияние одного из представителей семейства серпинов — ААТ — на цитотоксическую активность ПГ1. Пептид инкубировали с ААТ, взятым в различных концентрациях, в течение 1 ч, затем смесь пептида с ААТ добавляли к суспензиям клеток U937 или K562 и оценивали цитотоксическую активность исследуемого препарата с помощью МТТ-теста. На рис. 1 представлены данные, демонстрирующие, что добавление в инкубационную среду ААТ снижает активность ПГ1 в отношении клеток линии U937 и K562. Цитотоксическая активность ПГ1 (в концентрации 10 мкМ) в отношении клеток K562 снижается, если перед добавлением пептида к клеткам его инкубировали с ААТ, при соотношении концентраций пептида и ААТ, равном 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1, 2.5 : 1.0 или 1.25 : 1.00, причем в последнем случае токсические эффекты ПГ1 практически полностью отменялись, так же как и при добавлении в среду 10%-ной

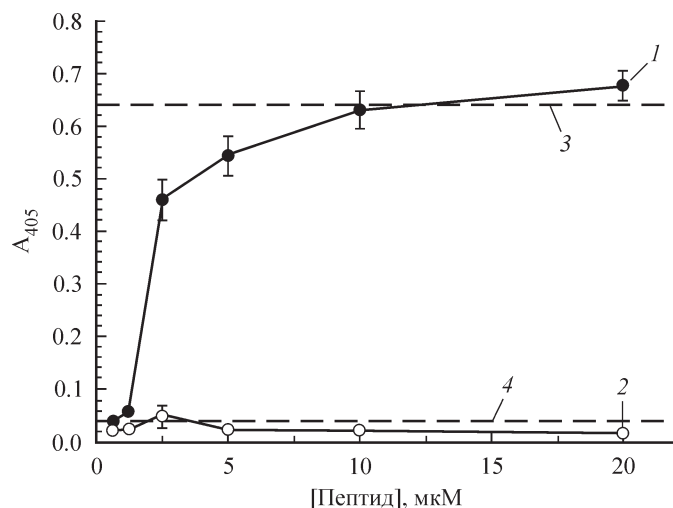


Рис. 2. Влияние ПГ1 (1) и бактенецина 5 (Бак5, 2) на способность ААТ ингибировать ферментативную активность эластазы.

По вертикали — оптическая плотность растворов при длине волны 405 нм. 3 — пробы, в которых содержалась только эластаза без ингибитора и пептидов, 4 — пробы, в которых содержались эластаза и ААТ без пептидов. Количество параллельных проб 4—6. Пептиды в различной концентрации инкубировали с ААТ, полученные смеси добавляли к пробам, содержащим эластазу (см. раздел «Материал и методика»).

эмбриональной сыворотки коров. Цитотоксическая активность ПГ1 (10 мкМ) в отношении более чувствительных к его действию клеток линии U 937 снижалась после преинкубации пептида с ААТ несколько менее и не отменялась полностью даже при соотношении пептид : ААТ равном 125 : 1,00, так же как и при добавлении сыворотки.

Исследование влияния ААТ на цитотоксическую активность Бак5 мы сочли нецелесообразным, так как токсические эффекты Бак5 были относительно слабо выраженными и для выявления способности ААТ модулировать эти эффекты необходимо было бы использовать слишком высокие концентрации этого пептида, значительно превышающие физиологические. Однако все же необходимо было выяснить, имеет ли место взаимодействие Бак5 с ААТ, так как оно могло бы участвовать в процессах, связанных с регуляцией активности серпинов.

Нами было изучено влияние ПГ1 и Бак5 на способность ААТ ингибировать ферментативную активность эластазы (сериновой протеиназы). На рис. 2 представлены данные, отражающие влияние пептидов на антипротеазную активность ААТ. ААТ в концентрации 2 мкМ практически полностью ингибировал ферментативную реакцию, катализируемую эластазой из лейкоцитов человека. Однако если перед добавлением к ферменту ААТ (20 мкМ) инкубировали с пептидами, взятыми в различных концентрациях (200, 100, 50, 25, 12,5 или 6,25 мкМ), в течение 1 ч, а затем полученные смеси добавляли к пробам, содержащим эластазу (после чего конечная концентрация ААТ составляла 2 мкМ, а пептидов 20, 10, 5, 2,5, 1,25 или 0,63 мкМ), то ингибирующее действие ААТ снижалось при соотношениях ПГ1 : ААТ, равных 2,5 : 1,0 и 1,25 : 1,00, и полностью отменялось при соотношениях 10 : 1 и 5 : 1. Использование более низких концентраций ПГ1 оказалось неэффективным. Бак5 во всем диапазоне концентраций не оказывал влияния на антипротеазную активность ААТ.

Таким образом, проведенные эксперименты позволили оценить цитотоксические эффекты ПГ1 и Бак5 в отношении различных трансформированных и нетрансформированных клеток. Было рассмотрено влияние сыворотки крови на активность пептидов, а также изучено взаимодействие ААТ (одного из компонентов сыворотки) с исследуемыми пептидами. Далее мы исследовали особенности действия пептидов на клетки-мишени более детально. В частности, провели сравнительное изучение способности Бак5 и ПГ1, несущих флуоресцентную метку, проникать через мембраны клеток во внутриклеточное пространство при различных условиях.

Нами была осуществлена конъюгация ПГ1 и Бак5 с флуоресцентным соединением BODIPY-FL. Цитотоксические свойства полученных меченых пептидов практически не отличались от свойства нативных молекул. С помощью флуоресцентной микроскопии установили, что связывание ПГ1-BODIPY с клетками происходит в течение первых 10—15 мин инкубации.

Анализ мазков клеток, окрашенных по Май-Грюнвальду, показал, что через 15—30 мин после добавления ПГ1-BODIPY в концентрации 5—10 мкМ (10—20 мкг/мл) выявлялись выраженные деструктивные изменения в клетках, чувствительных к действию пептида (в клетках U937, HL60, A549 и в меньшей степени K562), проявлялись дегенеративные дистрофические изменения цитоплазмы и ядра клеток, а в некоторых случаях возникали вакуоли в цитоплазме клеток. Конфокальная микроскопия при этом выявила зеленую флуоресценцию в мембранах клеток, цитоплазме, ядерных мембранах и в ядрах поврежденных клеток (рис. 3, а, б). При использовании ПГ1-BODIPY в более низкой (1—2 мкМ) концентрации заметного повреждающего действия не было. Однако показано, что и в низких концентрациях пептид проникает через мембраны клеток во внутриклеточные компартменты (рис. 3, в, г). При использовании ПГ1-BODIPY в концентрации ниже 1 мкМ проникновения пептида внутрь клеток не наблюдалось, лишь на цитоплазматических мембранах регистрировалась слабая зеленая флуоресценция.

Аналогичные исследования были проведены и с Бак5-BODIPY. Этот пептид в концентрации 1—10 мкМ (5—50 мкг/мл) не вызывал заметных повреждений исследуемых клеток. Однако он, как и ПГ1, способен проникать через клеточные мембраны и накапливаться в цитоплазме клеток (рис. 3, д, е).

Использование проточной цитофлуориметрии позволило получить дополнительную количественную информацию о действии пептидов на исследуемые клетки. Была изучена кинетика проникновения меченых пептидов (в нетоксических концентрациях) в клетки U937 и K562; связавшиеся с поверхностью клеток пептиды удаляли кратковременной обработкой клеток трипсином (Tomassinsig et al., 2006) и, кроме того, раствором трипанового синего, который, не проникая в цитоплазму клеток, элиминировал флуоресцентный сигнал BODIPY FL на поверхности клеток-мишеней (Van Amersfoort, Van Strijp, 1994). Оказалось, что в течение 15 мин оба пептида проникали в клетки (рис. 4). Количество погибших клеток оценивали, добавляя в измеряемые пробы иодид пропидия. Доля погибших клеток в большинстве случаев практически не отличалась от таковой в контрольных пробах (без добавления пептидов). Лишь в случае инкубации клеток U937 с ПГ1-BODIPY в течение 3 ч доля погибших клеток увеличивалась до 12 %.

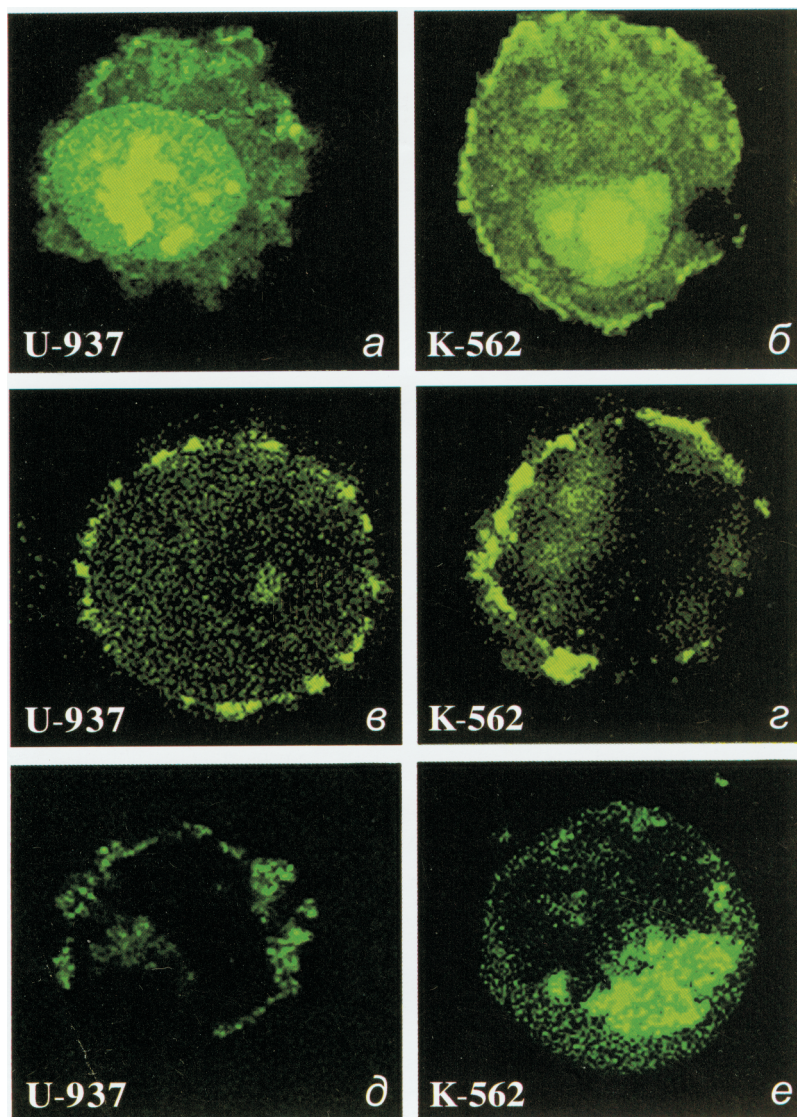


Рис. 3. Распределение ПГ1-BODIPY и Бак5-BODIPY в клетках U937 и K562.

a, б — после 30 мин инкубации клеток с 6 мкМ ПГ1-BODIPY; *в, г* — после 60 мин инкубации клеток с 2 мкМ ПГ1-BODIPY; *д, е* — после 60 мин инкубации клеток с 5 мкМ Бак5-BODIPY; конфокальная микроскопия. Показаны оптические срезы, проходящие примерно через середину клеток (объектив HCX PL APO CS 63). Препараты просматривали непосредственно после окончания эксперимента без фиксации клеток.

Далее выясняли более детально, как происходит проникновение пептидов в клетки и какова роль эндоцитоза в этом процессе. Для оценки зависимости транслокации пептидов через мембраны клеток-мишеней от интенсивности их энергетических процессов клетки инкубировали с пептидами в различных условиях: при 37 и 4 °C (на ледяной бане), в присутствии ингибиторов синтеза АТФ (0.1 % азида натрия совместно с 50 мМ 2-дезоксиглюкозы), добавленных за 1 ч до внесения пептидов. Снижение температуры среды значительно угнетало процесс проникновения обоих пептидов в клетки K562 (рис. 5). Блокирование синтеза АТФ в результате обработки клеток азидом натрия и 2-дезоксиглюкозой тоже вызывало угнетение переноса через мембраны клеток Бак5-BODIPY и в меньшей степени ПГ1-BODIPY.

Для оценки роли эндоцитоза в переносе пептидов через клеточные мембраны клетки инкубировали в присутствии 10 мкМ винбластина (связывающего тубулин и вызывающего деполимеризацию микротрубочек), либо 10 мкМ цитохалазина В (ингибирующего полимеризацию

актина), либо метилциклодекстрина (0.25 мМ). Концентрация азида натрия, 2-дезоксиглюкозы и ингибирующих эндоцитоз соединений подбирали с учетом данных литературы (Drin et al., 2002; Takeshima et al., 2003; Tomasinsig et al., 2006). Все вещества вносили за 1 ч до добавления пептидов, причем предварительно проверяли нетоксичность этих веществ в данных концентрациях. Оказалось, что присутствие различных ингибиторов эндоцитоза угнетало, но не отменяло процесса транслокации пептидов через мембраны клеток-мишеней как в случае бактенецина-BODIPY, так и в случае протегрина-BODIPY (рис. 5).

Обсуждение

Катионные АМП, содержащиеся в лизосоноподобных гранулах нейтрофилов, являются одними из ключевых эффекторных молекул системы врожденного иммунитета (Lehrer, Ganz, 2002). Они проявляют микробоцидную активность против широкого спектра бактерий,

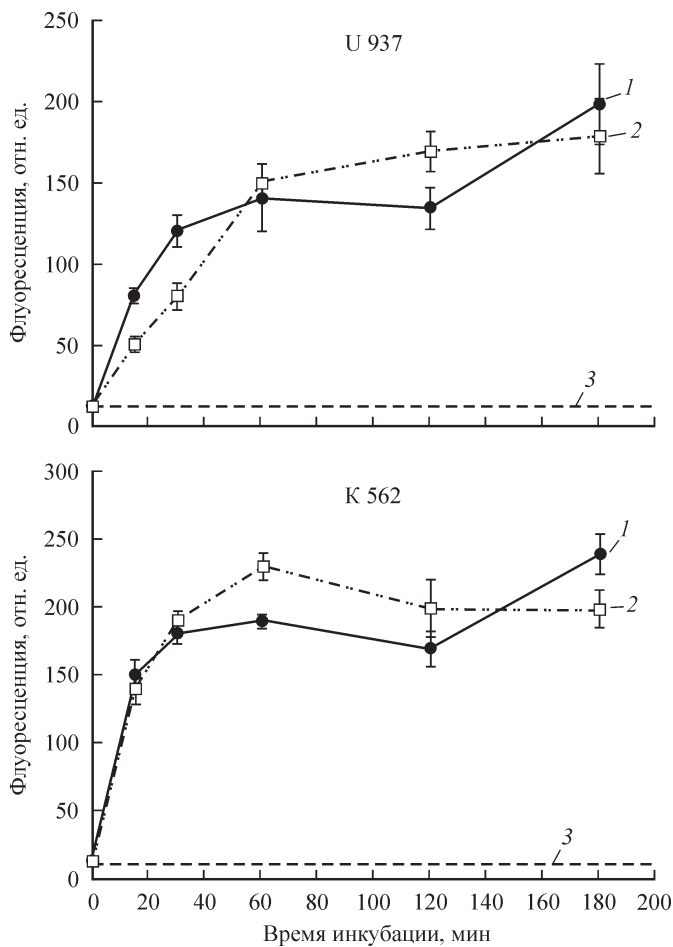


Рис. 4. Кинетика включения ПГ1-BODIPY (3 мкМ) и Бак5-BODIPY (5 мкМ) в клетки U937 и K562.

1 — ПГ1-BODIPY, 2 — Бак5-BODIPY, 3 — собственная флуоресценция клеток. Данные проточной цитометрии, полученные в трех независимых экспериментах, представлены средней величиной и ее средноквадратичным отклонением.

грибков и оболочечных вирусов. В последнее время показано, что помимо антимикробной АМП обладают целым спектром различных биологических активностей в отношении собственных клеток организма, причем характер действия АМП на эукариотические клетки во многом зависит от концентраций этих веществ в среде. В концентрациях в несколько раз больших, чем необходимы для проявления антимикробных эффектов, многие АМП оказывают токсическое действие в отношении собственных клеток организма — как нормальных, так и трансформированных. В меньших концентрациях АМП способны вызывать хемотаксис макрофагов, нейтрофилов, незрелых дендритных клеток (Yang et al., 2004), дегрануляцию тучных клеток (Befus et al., 1999), оказывать митогенное действие в отношении эпителиальных клеток и фибробластов (Murphy et al., 1993), связывать бактериальный липополисахарид (Hancock, Diamond, 2000), влиять на процессинг интерлейкина 1 (Perregaux et al., 2002).

Действие АМП из семейства дефенсинов на клетки макроорганизма начали изучать в 1980-е годы, причем основное внимание было сосредоточено на исследовании их цитотоксической активности в отношении опухолевых клеток в культуре (Lichtenstein et al., 1986; Lichtenstein,

1991). Однако исследования в этом направлении остаются немногочисленными, и к настоящему времени есть только единичные публикации, в которых рассматриваются эффекты АМП на различные эукариотические клетки.

Мы изучили цитотоксическое действие двух различных по структуре пептидов из семейства кателицидинов — ПГ1 и Бак5 — на ряд опухолевых и нормальных клеток в культуре. Было показано, что ПГ1, катионный пептид, имеющий конформацию бета-шпильки и обладающий антимикробной активностью широкого спектра действия, связанной с его выраженной мембранотропной и порообразующей активностью, способен быстро и эффективно повреждать опухолевые, а также, хотя и в меньшей степени, нетрансформированные клетки млекопитающих. Цитотоксические свойства ПГ1 в отношении различных клеточных линий проявлялись при использовании его в концентрации 1.5—12.0 мкМ (3—25 мкг/мл), в то время как его антимикробная активность в отношении большинства исследованных микроорганизмов выражена уже при концентрации пептида 0.5—1.0 мкМ (Kokryakov et al., 1993). Другой исследованный нами АМП, Бак5, отличающийся высоким содержанием пролина в составе молекулы, имеющий конформацию полипролиновой спирали 2-го типа и тоже обладающий значительной антимикробной активностью (преимущественно в отношении грамотрицательных бактерий), незначительно повреждающий микробные мембраны и влияющий на внутриклеточные процессы (Gennago et al., 2002), проявил значительно более низкую цитотоксическую активность в отношении

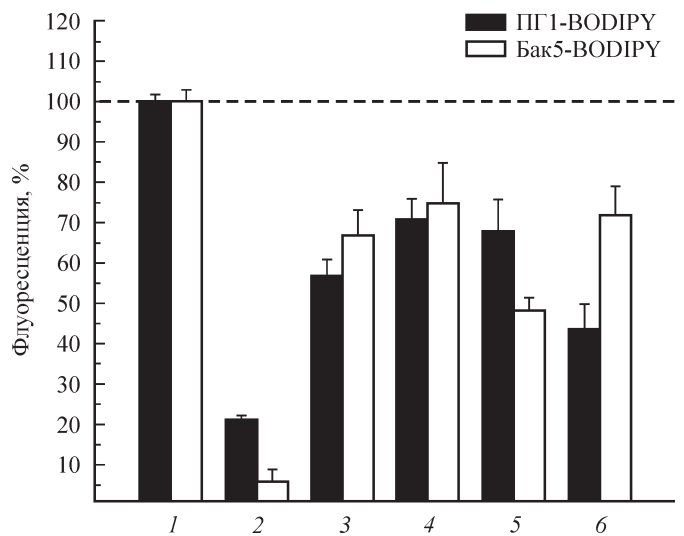


Рис. 5. Влияние низкой температуры (2), угнетения синтеза АТФ (3) и эндоцитоза (4—6) на включение ПГ1-BODIPY (темные столбики) и Бак5-BODIPY (светлые столбики) в клетки K562.

По вертикали — интенсивность флуоресценции, %; по горизонтали: 1 — контроль — флуоресценция клеток, которые инкубировали при 37 °С в течение 1 ч с ПГ1-BODIPY (3 мкМ) или Бак5-BODIPY (5 мкМ); 2 — клетки помещали на 30 мин на ледяную баню, затем добавляли пептиды и оставляли на ледяной бане еще на 1 ч; 3 — клетки инкубировали 1 ч с 0.1%-ным азидом натрия и 50 мкМ 2-дезоксиглюкозы, затем добавляли пептиды и инкубировали еще 1 ч; 4—6 — клетки инкубировали в течение 1 ч с винбластином (4), цитохалазином В (5) или метилциклодекстрином (6), добавляли пептиды и инкубировали еще 1 ч; по окончании инкубации клетки обрабатывали, как описано в разделе «Материал и методика», чтобы исключить сигнал от пептидов, связанных с мембранами клеток, и полученные пробы анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии. Различия между группой 1 и группами 2—6 достоверны в случае каждого пептида при $P < 0.05$.

клеток млекопитающих. Концентрации, в которых пептид имел токсические эффекты в отношении эукариотических клеток, были на один-два порядка выше, чем необходимы для его противомикробного действия.

Из литературы известно, что концентрация АМП в крови в норме невысока, но при различных патофизиологических процессах (инфекции, воспалении и стрессе) происходят массовая дегрануляция нейтрофилов и высвобождение во внеклеточное пространство содержимого их лизосомоподобных гранул, в результате чего концентрация АМП в крови и других биологических жидкостях возрастает в несколько раз. Например, для человека показано, что в норме концентрация α -дефенсинов в плазме крови составляет около 42 нг/мл, а при инфекционной патологии повышается в десятки раз — например, при сепсисе достигает 9—179 мкг/мл (Panyutich, Ganz, 1991). Концентрация протегринов в жидкости, полученной из абсцесса, достигала 15—150 мкг/мл (Shi, Ganz, 1998). Поэтому несомненна актуальность изучения факторов, ограничивающих повреждающее действие АМП в случаях, когда их концентрация в крови или тканях становится критически высокой.

Для ряда исследованных к настоящему времени АМП, в том числе дефенсинов, показано, что их токсические эффекты в отношении как микроорганизмов, так и клеток макроорганизма снижаются или полностью отменяются в присутствии сыворотки крови. Для ПГ1 известно, что в отличие от дефенсинов его антимикробная активность сохраняется при наличии в среде 2—10 % сыворотки (Shi, Ganz, 1998). В результате проведенных нами исследований показано, что в присутствии 10%-ной сыворотки цитотоксические эффекты ПГ1 снижаются, хотя и в разной степени для разных клеточных линий.

Нами показано, что присутствие в среде одного из основных компонентов сыворотки крови — белка ААТ из семейства серпинов — снижает цитотоксическую активность ПГ1. При этом преинкубация ПГ1 с ААТ в свою очередь снижала способность ААТ ингибировать ферментативную реакцию, катализируемую сериновой протеиназой эластазой, в то время как Бак5 не влиял на антипротеазную активность ААТ. Полученные для ПГ1 результаты находятся в хорошем соответствии с данными других авторов (Panyutich et al., 1995), которые детально исследовали связывание дефенсинов с ААТ и некоторыми другими серпинами, а также с α 2-макроглобулином. Интересно, что молярные соотношения пептида и ААТ, при которых мы наблюдали блокирование цитотоксических эффектов ПГ1, а также отмену антипротеазного действия ААТ, были близкими к таковым для дефенсинов и ААТ, известным из литературы (Panyutich et al., 1995).

Дефенсины имеют лишь незначительную степень структурной гомологии с протегринами, однако, как и протегрины, содержат дисульфидные мостики, вследствие чего большая часть молекулы представлена β -тяжами, как и у протегринов. Учитывая, что линейный пептид Бак5 не влиял на антипротеазную активность ААТ, можно предположить, что дефенсина- и протегриноподобные пептиды связываются с ААТ в сайте, играющем важную роль для проявления функциональной активности серпинов. Исследование взаимодействия различных АМП с серпинами важно как для понимания механизмов защиты собственных клеток организма от повреждающего действия АМП, так и для анализа возможного участия АМП в регуляции активности белков из семейства серпи-

нов. Эти белки выполняют в организме разнообразные функции, участвуя в образовании и деградации различных гуморальных факторов белковой природы, а также являясь переносчиками разнообразных молекул, в частности цитокинов (Гурин, 2003). Таким образом, связывание серпинов с АМП может играть важную роль в регуляции этих функций.

Следующей задачей нашей работы было изучение механизма действия пептидов на клетки-мишени, для чего мы использовали ПГ1 и Бак5, конъюгированные с флуоресцентным маркером BODIPY FL. Мы показали, что в высоких концентрациях ПГ1-BODIPY быстро проникает через мембраны клеток в цитоплазму и далее в ядра, повреждая при этом клетки. Однако и в более низких концентрациях ПГ1-BODIPY интернализируется в цитоплазму клеток, но не повреждает их. Бак5-BODIPY, не проявляющий значительных токсических эффектов, тоже проникает в клетки.

В настоящее время внимание исследователей все больше привлекают пептиды, способные к транслокации через мембраны эукариотических клеток (CPP — cell penetrating peptides) (Lindgren et al., 2000; Suzuki et al., 2002; Richard et al., 2003). Подобное свойство ряда пептидов интернализоваться в клетки, не нарушая целостности клеточных мембран и не вызывая гибели клеток, было показано для ряда катионных пептидов, таких, например, как Tat-пептиды, rAntr, транспортан и др. (Lindgren et al., 2000). Подобные исследования в последнее время стали проводиться и для АМП нейтрофилов и их структурных аналогов.

Так, проведено сравнительное исследование способности мембранолитического пептида LL-37 и фрагментов пептида Бак7 проникать в клетки-мишени (Tomasinsig et al., 2006). Особенностью Бак7, как и Бак5, является высокое содержание пролина в составе молекулы (хотя эти два пептида и не обладают существенной структурной гомологией), и его антимикробное действие также связывают не с повреждением мембран, а с нарушением внутриклеточных процессов. Авторы показали, что интернализация фрагмента Бак7 (1—35) в клетки U937 зависела от температуры инкубационной среды, уровня метаболизма клеток, а также от присутствия ингибиторов эндоцитоза (Tomasinsig et al., 2006). При температуре 4 °С, а также при блокировании синтеза АТФ только около 3—5 % пептида проникало в клетки U937; присутствие ингибиторов эндоцитоза (метилциклодекстрина, амилорида, цитохалазина D и нокодазола) тоже угнетало процесс переноса пептида через мембраны клеток U937, хотя и в меньшей степени (на 50—70 %); в случае клеток NIH 3T3 действие всех перечисленных факторов было в целом сходным, но значительно менее выраженным.

Пониженная температура и угнетение клеточного метаболизма снижали эффективность транслокации через мембраны клеток U937 примерно на 80 % и другого пептида LL-37; присутствие ингибиторов эндоцитоза — на 30—50 % (за исключением амилорида, который не влиял на интернализацию LL-37 в клетки) (Tomasinsig et al., 2006). Для ряда линейных пептидов, являющихся модификациями протегринов, также показано, что интернализация их в клетки зависит от температуры среды и интенсивности энергетического метаболизма клеток и происходит с участием эндоцитоза (Drin, Tamsamani, 2002). Однако короткий фрагмент Бак7 (1—24), как сообщалось, проникал через липидные бислои путем прямой транслокации (Sadler et al., 2002). Линейный пептид буфорин

тоже проникал в клетки HeLa вне зависимости от температуры среды и интенсивности метаболизма этих клеток (Takeshima et al., 2003).

Таким образом, процесс транслокации различных АМП через мембраны эукариотических клеток зависит от особенностей структуры пептидов и от специфики клеток. В нашем случае наибольшее ингибирующее влияние на процесс включения ПГ1-BODIPY и Бак5-BODIPY в клетки K562 оказывало понижение температуры инкубационной среды до 4 °С (включение Бак5 снижалось на 94, а ПГ1 — на 80 %). Угнетение метаболизма клеток-мишеней также ингибировало процесс интернализации обоих пептидов в клетки, хотя и в меньшей степени. Присутствие ингибирующих эндоцитоз винбластин, цитохалазина В и метилциклодекстрина также угнетало процесс включения меченых пептидов в клетки, но не отменяло полностью этот процесс. Поэтому можно предположить, что наряду с переносом пептидов с помощью эндоцитоза имеет место и не зависящее от эндоцитоза проникновение АМП через мембрану клеток в цитоплазму и далее, возможно частично, в ядро.

Очевидно, что исследование механизмов проникновения АМП в клетки нуждается в дальнейшем продолжении. При этом необходимо отметить, что способность пептидов проникать во внутренние компартменты клеток представляет несомненный интерес, так как дает возможность предположить участие этих пептидов в различных внутриклеточных процессах, в частности в процессах, связанных с ограничением активности серпинов. Кроме того, изучение интернализации пептидных молекул во внутриклеточное пространство может иметь и важное практическое значение. В последнее время ведется поиск пептидов, которые могут служить переносчиками различных лекарственных средств через мембраны опухолевых клеток в случаях, когда терапевтические агенты, действие которых избирательно направлено на опухолевые клетки, не могут самопроизвольно проникать в эти клетки (Dietz, Behr, 2004). С этой точки зрения особенно перспективным может стать изучение Бак5 и его аналогов, так как этот пептид, легко транслоцирующийся через мембраны клеток-мишеней, имеет низкую цитотоксическую активность в отношении собственных клеток организма.

Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях» (Санкт-Петербург), где выполнялась проточная цитометрия. Авторы также глубоко признательны сотрудникам Центра коллективного пользования «Аналитическая спектроскопия» при СПбГПУ за предоставленную возможность использовать оборудование Центра.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 03-04-49747, 03-04-49576, 03-04-49349) и INTAS (проект 03-51-4984).

Список литературы

Гурин А. В. 2003. Ингибиторы протеиназ и цитокины крови в механизмах гипертермии и при стрессе. Минск: УП: «Технопринт». 124 с.
Еропкин М. Ю., Еропкин Е. М. 2003. Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. СПб.: МОРСАР АВ. 240 с.

Кокряков В. Н. 1999. Биология антибиотиков животного происхождения. СПб.: Наука. 162 с.

Плескач В. А., Алешина Г. М., Арцыбашева И. В., Шамова О. В., Кожухарова И. В., Гойло Т. А., Кокряков В. Н. 2000. Цитотоксическое и митогенное влияние антимикробных пептидов нейтрофилов на культивируемые клетки. Цитология. 42 (3) : 228—233.

Befus A. D., Mowat C., Gilchrist M., Solomon S., Bateman A. 1999. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanism of action. J. Immunol. 163 : 947—953.

Boman H. G. 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concept. J. Intern. Med. 254 : 197—215.

Carlo E., Forni G., Lollini P. 2001. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. Blood. 92 : 339—344.

Dietz G. P. H., Behr M. 2004. Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. Mol. Cell. Neurosci. 27 : 85—131.

Drin G., Tamsamani J. 2002. Translocation of protegrin I through phospholipid membranes: role of peptide folding. Biochim. biophys. acta. 1559 : 160—170.

Gaudriault G., Vincent J. P. 1992. Selective labeling of α - or ϵ -amino groups in peptides by the Bolton-Hunter reagent. Peptides. 13 : 1187—1192.

Gennaro R., Skerlavaj B., Romeo D. 1989. Purification, composition, and activity of two bactericins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. Infect. Immun. 57 : 3142—3146.

Gennaro R., Zanetti M., Benincasa M., Podda E., Miani M. 2002. Pro-rich antimicrobial peptides from animals: structure, biological functions and mechanism of action. Curr. Pharm. Des. 8 : 763—778.

Hancock R. E., Diamond G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends Microbiol. 8 : 402—410.

Kokryakov V. N., Harwig S. S. L., Panyutich E. A., Shevchenko A. A., Aleshina G. M., Shamova O. V., Korneva H. A., Lehrer R. I. 1993. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine feature of corticostatic defensins and tachyplesins. FEBS Lett. 327 : 231—236.

Lau Y. E., Rozek A., Scott M. G., Goosney D. L., Davidson D. J., Hancock R. E. W. 2005. Interaction and cellular localization of the human host defense peptide LL-37 with lung epithelial cells. Infect. Immun. 73 : 583—591.

Lehrer R. I., Ganz T. 2002. Defensins of vertebrate animals. Curr. Opin. Immunol. 14 : 96—102.

Lehrer R. I., Lichtenstein A. K., Ganz T. 1993. Defensins: antimicrobial; and cytotoxic peptides of mammalian cells. Annu. Rev. Immunol. 11 : 105—128.

Lichtenstein A. K. 1991. Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. J. Clin. Invest. 88 : 93—100.

Lichtenstein A. K., Ganz T., Selsted M., Lehrer R. I. 1986. Cytocidal effects of human defensins, cationic peptides of neutrophils primary granules. Clin. Res. 34 : 462—470.

Lindgren M., Hallbrink M., Prochiantz A., Langel U. 2000. Cell-penetrating peptides. Trends Pharmacol. Sci. 21 : 99—103.

Merrifield R. B., Barany G. 1980. Solid-phase peptide synthesis. In: The peptides: analysis, synthesis, biology. New York: Acad. Press. 2 : 3—284.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 65 : 55—63.

Murphy C., Foster B., Mannis M., Selsted M., Reid T. 1993. Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. J. Cell. Physiol. 155 : 408—413.

Panyutich A. V., Ganz T. 1991. Activated alpha2-macroglobulin is a principal defensin-binding protein. Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol. 5 : 101—106.

Panyutich A. V., Hiemstra P. S., Wetering S., Ganz T. 1995. Human neutrophil defensins and serpins form complexes and inactivate each other. Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol. 12 : 351—357.

Perregaux D. G., Bhavsar K., Contillo L., Shi J., Gabel C. A. 2002. Antimicrobial peptides initiate IL-1 posttranslational proces-

sing: a novel role beyond innate immunity. *J. Immunol.* 168 : 3024—3032.

Richard J. P., Melikov K., Vives E., Ramos C., Verbeure B., Gait M. J., Chernomordik L. V., Lebleu B. 2003. Cell penetrating peptide: a reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* 278 : 585—590.

Sadler K., Eom K. D., Yang J. L., Dimitrova Y., Tam J. P. 2002. Translocating proline-rich peptides from the antimicrobial peptide bactenecin 7. *Biochemistry.* 41 : 14 150—14 157.

Schnolzer M., Alewood P., Jones A., Alewood D., Kent S. B. H. 1992. *In situ* neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. Rapid, high yield assembly of difficult sequences. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 40 : 180—193.

Shamova O., Brogden K. A., Zhao C., Nguyen T., Kokryakov V. N., Lehrer R. I. 1999. Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. *Infect. Immun.* 67 : 4106—4111.

Shi J., Ganz T. 1998. The role of protegrins and other elastase-activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids. *Infect. Immun.* 66 : 3611—3617.

Suzuki T., Futaki S., Niwa M., Tanaka S., Ueda K., Sugiura Y. 2002. Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J. Biol. Chem.* 277 : 2437—2443.

Takeshima K., Chikushi A., Lee K.-K., Yonehara S., Matsuzaki K. 2003. Translocation of analogues of the antimicrobial peptide

magainin and buforin across human cell membranes. *J. Biol. Chem.* 278 : 1310—1315.

Tomasinsig L., Skerlavaj B., Papo N., Giabbail B., Shai Y., Zanetti M. 2006. Mechanistic and functional studies of the interaction of a proline-rich antimicrobial peptide with mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 281 : 383—391.

Van Amersfoort E. S., Van Strijp J. A. 1994. Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocyte by polymorphonuclear leukocytes. *Cytometry.* 17 : 294—299.

Visser L., Blont K. 1972. The use of p-nitrophenyl n-tetabutyl oxycarbonyl L-alanilate as substrate for elastase. *Biochim. biophys. acta.* 268 : 257—260.

Yang D., Biragyn A., Hoover D., Lubkowski J., Oppenheim J. 2004. Multiple role of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 22 : 181—215.

Zanetti M. 2004. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 75 : 39—48.

Zanetti M., Gennaro R., Romeo D. 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 371 : 1—5.

Zaslloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415 : 389—395.

Поступила 16 XI 2006

EFFECTS OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF NEUTROPHILS ON TUMOR AND NORMAL CELLS IN CULTURE

O. V. Shamova,^{1,*} G. A. Sakuta,² D. S. Orlov,¹ V. V. Zenin,² G. I. Shtein,² N. I. Kolodkin,³
I. V. Afonina,³ V. N. Kokryakov¹

¹ Institute of Experimental Medicine RAMS, ² Institute of Cytology RAS, and

³ Research Institute of Pure Biochemicals, St. Petersburg;

* e-mail: oshamova@yandex.ru

We performed a comparative study of effects of two structurally different cationic antimicrobial peptides of cathelicidin family, porcine protegrin 1 (PG1) and caprine bactenecin 5 (Bac5) on selected tumor and normal mammalian cells *in vitro*. Protegrins are amphiphilic β -hairpin molecules having broad-spectrum antimicrobial activity due to their marked membranolytic properties. Bac5 belongs to the group of proline-rich peptides, which adopt a polyproline type II extended helix and kill microorganisms rather by a non-lytic mechanism. We have shown that while PG1 exerts distinct and fast cytotoxic effects on most of used tumor cells being slightly less toxic for nontransformed host cell, the proline-rich Bac5 is much less cytotoxic for all the cells tested. The toxic effects of PG1 were partially declined in the presence of 10 % fetal calf serum. It was revealed that PG1 was able to interact with proteins of serpin family (as had been previously established for human defensins by Panyutich et al., 1995). Pre-incubation of PG1 with α 1-antitrypsin caused the decrease of the cytotoxic activity of the peptide and, on the other hand, the antiprotease activity of α 1-antitrypsin was reduced after interaction of the serpin with PG1 (not with Bac5). Confocal microscopy experiments allowed to monitor the internalization of fluorescent labeled (by BODIPY FL) peptides into target cells and their intracellular distribution. Bac5-BODIPY (at 5 μ M) was rapidly taken into the cells. PG1-BODIPY at non-toxic concentrations was also able to enter the cells without significant damage to them. The comparative study of the kinetics of the peptides uptake into the target cells and the influence of low temperature, energy-depletion and endocytosis inhibitors on the process of the internalization of the peptides into the cells was carried out using flow cytometry.

Key words: antimicrobial peptides, caprine Bac5, protegrin 1, innate immunity, cytotoxicity, serpins.