

## РОСТМОДУЛИРУЮЩЕЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА ИЗ ГЕМОЛИМФЫ ЛИЧИНОК МУХИ *CALLIPHORA VICINA* (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) IN VITRO

© В. А. Плескач,<sup>1</sup> И. В. Кожухарова,<sup>1</sup> И. В. Арцыбашева,<sup>1</sup>  
Л. Л. Алексеенко,<sup>1</sup> С. И. Черныш<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

<sup>2</sup> Биологический институт С.-Петербургского государственного университета  
электронный адрес: gmdmk@mail.cytspb.rssi.ru

Противоопухолевую активность пептида аллоферон (АФ) из гемолимфы личинок мухи *Calliphora vicina*, состоящего из 13 аминокислот, изучали в массовых культурах клеток линий K562, J-96, P388D1, 3T3-SV40 и MH22a и при клонировании клеток линии P388D1. Ростмодулирующее и цитотоксическое действие пептида в концентрациях от  $10^{-5}$  до 250 мкг/мл сравнивали с действием известных цитостатиков — цитозара и доксорубина (ДР), а также гибридных молекул, созданных на основе пептида АФ и цитозара (цитала) или ДР (доксала). При воздействии АФ в концентрациях  $10^{-5}$  и  $10^{-3}$  мкг/мл пролиферативная активность клеток всех линий, за исключением линии 3T3-SV40, возрастала в 1.2—1.4 раза, в то время как пептид в концентрации не менее чем 10 мкг/мл подавлял пролиферацию. Направленность и величина ростмодулирующего эффекта зависели от продолжительности воздействия АФ и варьировали для разных клеточных линий. Пептид не влиял на жизнеспособность всех клеточных линий, кроме клеток линии P388D1, гибель которых регистрировали через 96 ч после начала воздействия АФ в концентрации 100 мкг/мл. Наиболее выраженную противоопухолевую активность (в основном ростингибирующую) проявляли цитозар и ДР. Для гибридных молекул в большинстве опытов была характерна промежуточная по сравнению с пептидом и цитостатиками антиопухолевая активность. Исключением является более высокая, чем у цитозара, цитотоксичность цитала в концентрации 100 мкг/мл для клеток линии P388D1. Результаты опытов по клонированию клеток в средах, содержащих тестируемые препараты, подтвердили данные, полученные при использовании массовых клеточных культур. Показано также, что АФ быстро проникает в клетки линии J-96 и преимущественно локализуется в клеточных ядрах и перинуклеарной области цитоплазмы.

Ключевые слова: пептид, клеточная линия, цитотоксичность, ростмодулирующее действие.

Принятые сокращения: АФ — аллоферон, ДР — доксорубин.

К настоящему времени в той или иной степени охарактеризовано свыше 2 млн пептидов различной видовой и тканевой принадлежности (Sidhu, Weiss, 2002; Wang, Wang, 2004). Часть из них синтезирована *in vitro* на основе ДНК-кодируемой пептидной библиотеки, в то время как другие пептиды были выделены из белков и представляют собой фрагменты белковых молекул (Lowman et al., 1998; Mizejowski, MacColl, 2003; Ingham et al., 2004; Kaga et al., 2007). Пептидные молекулы проявляют разнообразную биологическую активность, включая способность прямо или опосредованно влиять на пролиферацию и жизнеспособность опухолевых клеток. К пептидам с антиопухолевым действием относятся, в частности, дефинсины и дефинсиноподобные молекулы, которые взаимодействуют с компонентами плазматической мембраны, что приводит к быстрой гибели клеток (Cruciani et al., 1991; Harwig et al., 1995; Плескач и др., 2000). К недостаткам представителей этой группы можно отнести низкую избирательность цитотоксического действия и блокирование активности дефинсинов белковыми факторами сыворотки крови (Peck et al., 1993; Papo et al., 2004). По-

скольку первый из указанных недостатков характерен и для применяемых в клинической онкологии цитостатиков, в настоящее время остается актуальным поиск новых антиопухолевых препаратов, в том числе препаратов, которые могут увеличивать избирательность и эффективность действия известных онколитиков. Судя по имеющейся информации, в число таких адьювантных препаратов могут входить и некоторые из проверенных пептидов (Герасимова и др., 1995; Leushner et al., 2003; Mizejowski, MacColl, 2003; Papo et al., 2004). В связи с вышесказанным и очевидным дефицитом сведений о способности пептидов насекомых оказывать влияние на пролиферацию и жизнеспособность трансформированных клеток млекопитающих нами был выделен пептид, которому присвоили название аллоферон (АФ). АФ, содержащий 13 аминокислотных остатков, выделяли из тех фракций гемолимфы инфицированных убитыми бактериями личинок мухи *Calliphora vicina*, которые проявляли максимальную способность к усилению лизирующей активности естественных киллерных клеток (Chernysh et al., 2002).

Основная цель настоящей работы состояла в проверке ростмодулирующего и цитотоксического действия АФ в массовых культурах постоянных клеточных линий мыши и человека.

### Материал и методика

Подробные сведения о выделении, очистке и синтезе АФ приведены ранее (Chernysh et al., 2002). Помимо пептида АФ в работе оценивали биологическую активность цитозара и доксорубина (ДР), а также гибридных молекул, полученных конъюгацией АФ с цитозаром (цитала) или с ДР (доксала). Гибридные молекулы были синтезированы С. В. Николаевым на кафедре химии природных соединений химического факультета С.-Петербургского государственного университета.

В экспериментах использовали суспензионные и монослойные постоянные клеточные линии мыши и человека, которые культивировали в пластиковой посуде при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>. Клетки суспензионных линий мышью лимфоидной неоплазмы P388D1 и эритроидной лейкемии человека K562 культивировали в среде RPMI 1640, дополненной 10 % эмбриональной сыворотки теленка, глутамином и гентамицином, и пересевали механическим способом дважды в неделю в соотношении 1 : 3 или 1 : 4. Клетки монослойных, прикрепляющихся к пластику линий моноцитарной лейкемии человека J-96, мышью гепатокарциномы МН22а и трансформированных вирусом обезьяны фибробластов мыши 3T3-SV40 культивировали в среде DMEM, содержащей те же добавки, что и среда RPMI 1640. Эти клеточные линии пересевали 1—2 раза в неделю в соотношении 1 : 3 с помощью смеси равных объемов 0.25%-ного трипсина и 0.02%-ного ЭДТА.

При постановке экспериментов использовали клеточные культуры, находящиеся в логарифмической фазе роста. Суспензии клеток получали прямым пипетированием или после предварительной обработки смесью трипсина с ЭДТА. Полученные в результате центрифугирования при 300 g и комнатной температуре в течение 5—10 мин клеточные осадки суспендировали в растворе Хенкса (рН 7.0), повторно осаждали при вышеуказанных условиях и ресуспендировали в 1—2 мл полной среды. После определения концентрации клеток с помощью гемоцитометра клеточные суспензии разбавляли полной средой до необходимой исходной концентрации, которая составляла 1 · 10<sup>4</sup> кл./мл для монослойных линий и 2.5 · 10<sup>4</sup> кл./мл для суспензионных линий. При постановке опытов в лунки 24-луночных панелей вносили по 2 мл, а в лунки 96-луночных панелей — по 0.2 мл клеточных суспензий.

Навески тестируемых препаратов растворяли в среде без сыворотки и стерилизовали пропусканием через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore, США). Полученные маточные растворы последовательно разбавляли средой без сыворотки до необходимых рабочих концентраций. При использовании в качестве клеток-мишеней суспензионных и монослойных клеточных культур препараты добавляли в лунки (0.02 мл раствора препарата на лунку) сразу и через 1 сут после посева клеток соответственно. Инкубационную среду в течение опытов не меняли. Число клеток в лунках определяли каждые 24 ч с помощью гемоцитометра. При подсчете количества клеток для каждой концентрации препарата в одном опыте использовали не менее трех парал-

лельных лунок. Для оценки доли погибших клеток аликвоту каждой клеточной суспензии объемом 100 мкл смешивали с равным объемом 0.4%-ного раствора трипанового синего. Количество жизнеспособных и мертвых (окрашенных) клеток подсчитывали в гемоцитометре через 10 мин после начала их инкубации с красителем.

Влияние препаратов на эффективность клонирования клеток проверяли для клеток линии P388D1. С этой целью в лунки 24-луночных планшетов высевали по 50 клеток в 2 мл полной среды. Сразу после посева клеток в лунки добавляли по 200 мкл раствора проверяемого препарата. Количество клонов (колоний, содержащих не менее 50 клеток) подсчитывали через 10—12 сут после начала опыта. Для каждой концентрации препарата использовали 6—8 параллельных лунок.

Для оценки проникновения пептида в клетки и его внутриклеточной локализации использовали комплексы АФ—биотин и флуоресцеин—авидин. С этой целью клетки высевали на покровные стекла, культивировали до субмонослойной плотности и заменяли старую среду на свежую, содержащую биотинилированный АФ. Концентрация пептида составляла 1 мкг на 1 мл культуральной среды. Спустя 30 мин, 24 или 96 ч покровные стекла трижды промывали буфером PBS (рН 7.0) и фиксировали клетки 4%-ным параформальдегидом, приготовленным на этом же буфере. После фиксации клетки вновь промывали и инкубировали в темноте в PBS, содержащем комплекс флуоресцеин—авидин (1 мкг на 1 мл), в течение 30 мин при комнатной температуре. После промывки буфером PBS покровные стекла заключали в 2%-ный раствор пропилгаллата и помещали на предметные стекла. Приготовленные препараты хранили в темноте и просматривали в тот же день с помощью флуоресцентного микроскопа (Axioscope Zeiss, Германия) и лазерного сканирующего конфокального микроскопа (Leica Microsystems, Германия) при частоте возбуждения 488 нм. В качестве отрицательного контроля использовали вариант без предварительной инкубации клеток в среде, содержащей комплекс АФ—биотин.

В работе использовали цитозинарабинозид, доксорубин и гентамицин (Sigma, США); среды DMEM и RPMI 1640, эмбриональную сыворотку теленка и трипановый синий (Gibco, США); комплекс флуоресцеин—авидин и пропилгаллат (ICN, США); трипсин, ЭДТА, раствор Хенкса (Биолот, Россия); комплекс АФ—биотин (Корейский институт науки и технологии).

### Результаты

Основная задача работы состояла в оценке противоопухолевого потенциала пептида АФ, выделенного из инфицированных убитыми бактериями личинок *Calliphora vicina*. С этой целью были получены так называемые кривые роста клеток в среде без добавок и в среде, содержащей от 10<sup>-5</sup> до 250 мкг на 1 мл синтетического аналога АФ (Chernysh et al., 2002). Для более объективной оценки противоопухолевого потенциала пептида АФ его действие сравнивали с действием известных цитостатиков цитозара и ДР. Кроме того, для проверки совместного влияния пептида и цитостатика в некоторых опытах проводили параллельное изучение ростмодулирующей и цитотоксической активности одного из антиопухолевых агентов и гибридных молекул, созданных на основе АФ и ДР или АФ и цитозара (доксала и цитала соответственно).

Кривые роста клеток линии P388D1 получали в средах, содержащих АФ, цитозар или цитал (рис. 1). В течение первых 24 ч эксперимента все препараты, включая цитостатик, в концентрациях  $10^{-5}$  и  $10^{-3}$  мкг/мл стимулировали пролиферативную активность клеток в 1.3—1.4 раза (рис. 1, колонка I, а, столбцы 1—3 соответственно), в то время как воздействие цитозара и в особенности цитала в концентрации 100 мкг/мл приводило к значительному торможению роста клеток (рис. 1, I, а, столбцы 2, 3 соответственно), причем ростингибирующее действие цитала сопровождалось гибелью приблизительно 25 % клеток. В последующие 2 сут наблюдали отсутствие влияния АФ на пролиферацию клеток, снижение ростстимулирующего действия низких доз цитозара и цитала и увеличение супрессии роста клеток под влиянием высоких концентраций этих препаратов (рис. 1, I, б, в; столбцы 2, 3). На последнем сроке (через 96 ч после добавления препаратов в культуральную среду) стимулирование пролиферативной активности клеток происходило при применении АФ в концентрациях 0.1 и 1 мкг/мл (рис. 1, I, г, столбцы 1), в то время как в результате воздействия всех препаратов в концентрации 100 мкг/мл регистрировали гибель клеток (рис. 1, I, г).

Сходную по характеру, хотя и не идентичную, динамику роста и гибели клеток регистрировали и при воздействии АФ, цитозара и цитала на клетки линии K562 (рис. 2, I, а—в). Основные отличия ответа этих клеток на воздействие перечисленных препаратов от клеток линии P388D1 состояли в сниженной чувствительности к ростстимулирующему действию АФ и цитозара в концентрациях  $10^{-5}$  и  $10^{-3}$  мкг/мл в течение первых 24 ч опыта (рис. 2, I, а, столбцы 1), более выраженной ростингибирующей активности пептида в концентрации 100 мкг/мл в последующие сутки эксперимента (рис. 2, I, б, столбцы 1) и повышенной чувствительности к ростингибирующей активности цитозара в концентрации 0.1—100 мкг/мл на протяжении всего времени действия агента (рис. 2, I, а, б, в; столбцы 2). В течение контролируемого времени ростингибирующее действие препаратов не было связано с гибелью клеток.

Цитотоксический и ростмодулирующий потенциал АФ, цитозара и цитала в диапазоне концентраций  $10^{-3}$ —250 мкг/мл проверяли и на клеточных линиях 3T3-SV40 и МН22а. Через 24 и 48 ч после начала культивирования клеток линии 3T3B-SV40 в средах с этими препаратами ростстимулирующее действие проявлял только цитал в концентрациях  $10^{-3}$  и  $10^{-1}$  мкг/мл (рис. 1, II, а, столбцы 3). Цитал в концентрации 250 мкг/мл и цитозар в концентрациях свыше  $10^{-1}$  мкг/мл полностью блокировали пролиферацию клеток (рис. 1, II, а, столбцы 2, 3), причем при воздействии цитостатика и гибридной молекулы в наиболее высоких концентрациях супрессия пролиферативной активности была связана с гибелью примерно 10 и 25 % клеток соответственно.

Пролиферативная активность клеток линии МН22а полностью блокировалась в течение 48 ч воздействия цитозара в концентрациях, превышающих 10 мкг/мл, и частично — циталом в концентрации 250 мкг/мл (рис. 1, III, б, столбцы 2, 3 соответственно). АФ практически не оказывал влияния на пролиферацию и жизнеспособность клеток линии МН22а (рис. 1, III, а, б, столбцы 1).

Кривые роста клеток линии K562 были получены также и при их культивировании в средах, содержащих ДР и доксал (рис. 2, II, а—в). Результаты экспериментов свидетельствуют о более выраженной по сравнению с цито-

заром (рис. 1, II, а—в) чувствительности этих клеток к цитотоксическому действию ДР в концентрации 100 мкг/мл. В среде, содержащей цитостатик в концентрации 100 мкг/мл, доля погибших клеток возрастала с 35 (через 1 сут воздействия ДР) до 100 % к окончанию эксперимента (рис. 1, II, а, в; столбцы 2). Сравнение ответа этих клеток на действие гибридных молекул свидетельствует об их большей по сравнению с циталом чувствительности к ростстимулирующему действию низких концентраций доксала (рис. 2, I, II; столбцы 3).

Ростмодулирующее действие АФ в концентрации  $10^{-5}$  и  $10^{-3}$  мкг/мл на клетки линии J-96 проявлялось в увеличении их пролиферативной активности в 1.3 раза в течение 1-х сут (кривая роста не приводится).

Противоопухоловое действие АФ, цитостатиков и гибридных молекул в концентрации  $10^{-2}$ —1 мкг/мл оценивали и при клонировании на пластике клеток линии P388D1. Пептид практически не влиял на эффективность клонирования клеток, в то время как цитозар и ДР в концентрации  $10^{-2}$  мкг/мл снижали клоногенность клеток линии P388D1 в 6 и 12 раз соответственно. Применение обоих цитостатиков в концентрациях 0.1 и 1 мкг/мл приводило к полному подавлению способности клеток к образованию клонов (см. таблицу). Сходные результаты были получены и при клонировании клеток линии P388D1 в среде, содержащей смесь АФ (1 мкг/мл) и ДР (от  $10^{-2}$  до 1 мкг/мл). Эффективность клонирования клеток в среде, содержащей гибридные молекулы, была промежуточной между таковой при действии только АФ или цитостатика.

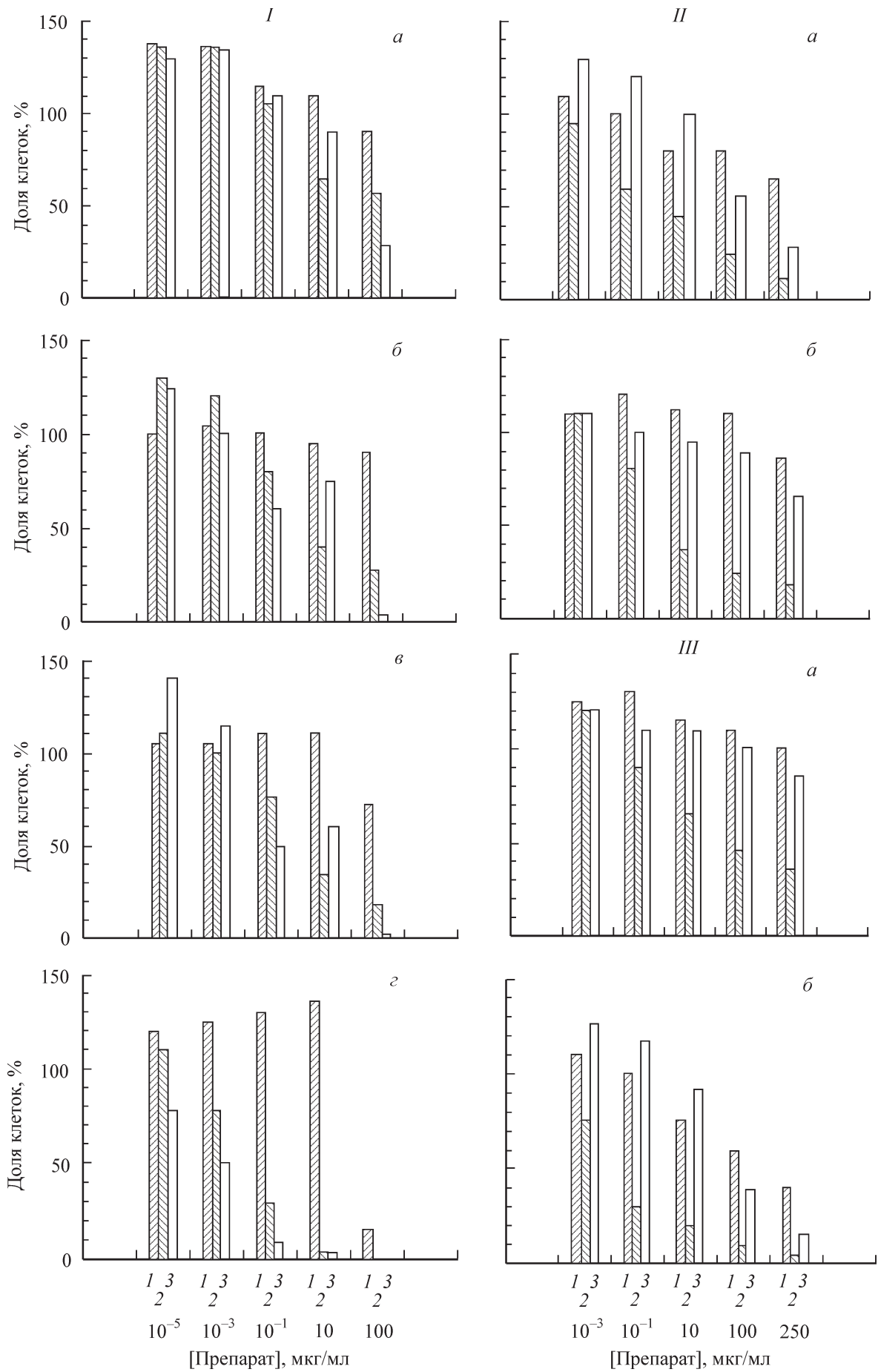
Способность пептида проникать в клетки и его локализацию в цитоплазме изучали на клетках линии J-96. С этой целью клетки культивировали в среде, содержащей комплекс АФ—биотин, в течение 30 мин, 24 и 96 ч. По истечении времени инкубации внутриклеточную локализацию пептида выявляли с помощью комплекса флуоресцеин—авидин. При сканировании клеток (данные не представлены) было показано, что через 30 мин и 24 ч АФ локализован главным образом в клеточных ядрах, в то время как через 96 ч комплекс АФ—биотин выявлялся в основном в перинуклеарном пространстве (рис. 3, б—г).

## Обсуждение

На протяжении последних лет проводятся активный поиск и изучение пептидов с прямым и опосредованным антинеопластическим действием (Yang et al., 2002; Orpenheim et al., 2003; Kaga et al., 2007). Для первичного изучения прямой противоопухоловой активности обычно используют клетки трансформированных линий. При оценке антиопухолового потенциала *in vitro* основными критериями являются ростингибирующая и цитотоксическая активность проверяемых препаратов в массовых клеточных культурах и при клонировании клеток.

Цель настоящей работы состояла в предварительной оценке прямого антиопухолового действия АФ — линейного пептида, который был выделен из гемолимфы инфицированных убитыми бактериями личинок *C. vicina* (Chernysh et al., 2002). Ростмодулирующую активность и цитотоксичность АФ проверяли как в массовых культурах, так и при клонировании трансформированных клеток.

Мы показали, что пептид способен оказывать влияние на пролиферацию массовых культур различных клеточ-



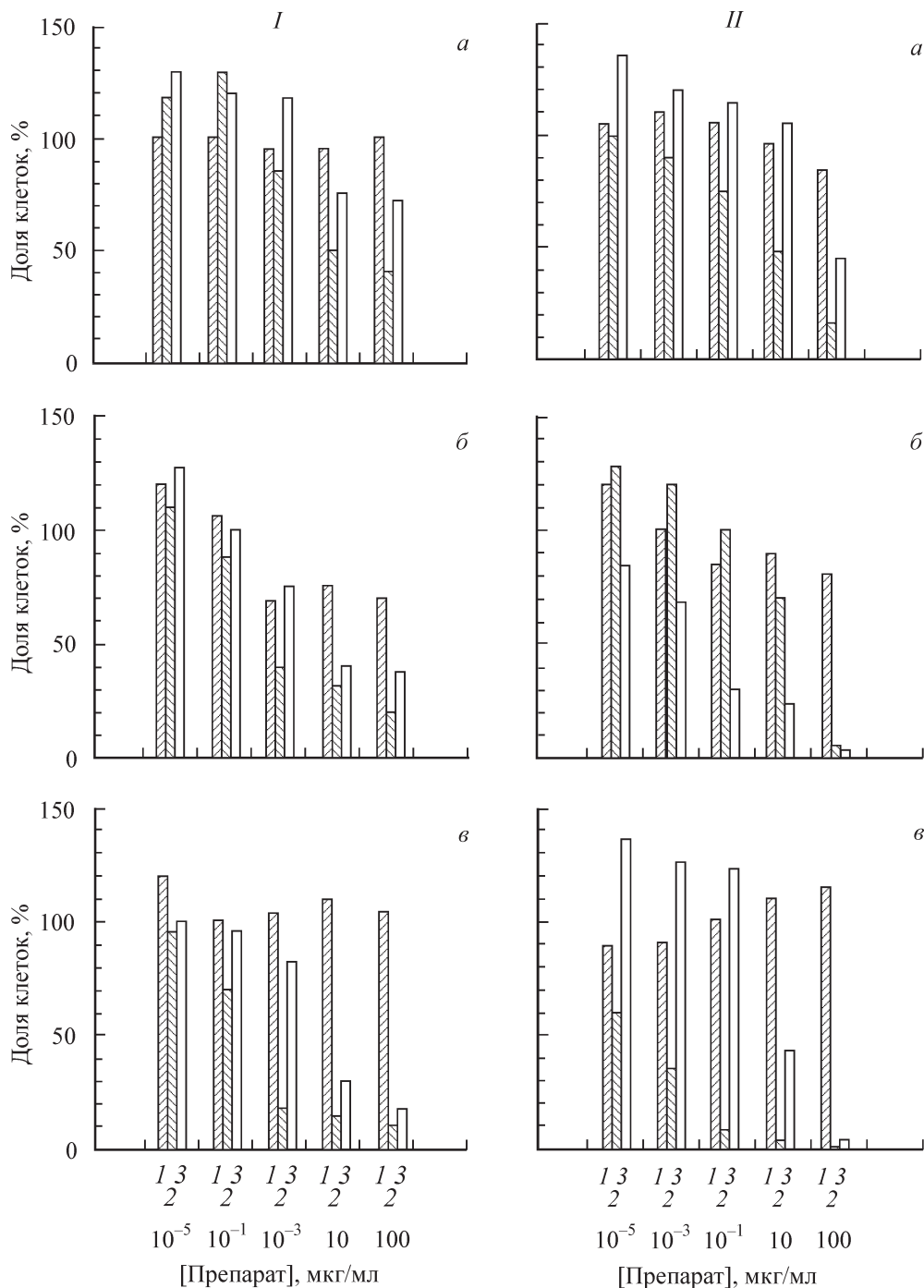


Рис. 2. Влияние пептида АФ, цитостатиков и гибридных молекул на пролиферативную активность клеток линии К562. Колонка I — доля жизнеспособных клеток через 24 (а), 48 (б) и 72 (в) ч культивирования в среде, содержащей АФ, цитозара и цитал (столбцы 1—3 соответственно); колонка II — доля жизнеспособных клеток через 24 (а), 48 (б) и 72 (в) ч культивирования в среде, содержащей АФ, ДР или доксал (столбцы 1—3 соответственно). Долю жизнеспособных клеток выражали в % от количества клеток при их культивировании в среде без тестируемых препаратов; представлены среднearифметические значения 12—15 независимых определений; во всех экспериментах величина 95%-ных доверительных интервалов средних значений не превышала 12 %.

Рис. 1. Влияние пептида аллоферона (АФ), цитозара и цитала на пролиферативную активность клеток линий Р388D1, 3Т3-SV40 и МН22а.

Колонки I, II — доля жизнеспособных клеток линий Р388D1 и 3Т3-SV40 соответственно через 24 (а), 48 (б), 72 (в) и 96 (г) ч культивирования в среде с препаратами; колонка III — то же для клеток линии МН22а через 24 (а) и 48 (б) ч культивирования в среде с препаратами. Столбцы 1—3 — соответственно АФ, цитозар и цитал. Долю жизнеспособных клеток выражали в % от количества клеток при их культивировании в среде без тестируемых препаратов; представлены среднearифметические значения 12—15 независимых определений; во всех экспериментах величина 95%-ных доверительных интервалов средних значений не превышала 12 %.

**Влияние аллоферона (АФ), цитостатиков и гибридных молекул на эффективность клонирования клеток линии P388D1**

| Препарат        | Концентрация, мкг/мл | Эффективность клонирования, % |
|-----------------|----------------------|-------------------------------|
| Контроль АФ     | 0                    | 25 ± 2                        |
|                 | 10 <sup>-2</sup>     | 26 ± 2                        |
|                 | 10 <sup>-1</sup>     | 29 ± 3                        |
| Цитозар         | 1                    | 28 ± 2                        |
|                 | 10 <sup>-2</sup>     | 4 ± 2                         |
|                 | 10 <sup>-1</sup>     | 0                             |
| Цитал           | 1                    | 0                             |
|                 | 10 <sup>-2</sup>     | 28 ± 3                        |
|                 | 10 <sup>-1</sup>     | 16 ± 1                        |
| Доксорубин (ДР) | 1                    | 10 ± 1                        |
|                 | 10 <sup>-2</sup>     | 2 ± 2                         |
|                 | 10 <sup>-1</sup>     | 0                             |
| Доксал          | 1                    | 0                             |
|                 | 10 <sup>-2</sup>     | 18 ± 1                        |
|                 | 10 <sup>-1</sup>     | 15 ± 1                        |
| АФ + ДР         | 1                    | 14 ± 1                        |
|                 | 1 + 10 <sup>-2</sup> | 4 ± 2                         |
|                 | 1 + 10 <sup>-1</sup> | 0                             |
|                 | 1 + 1                | 0                             |

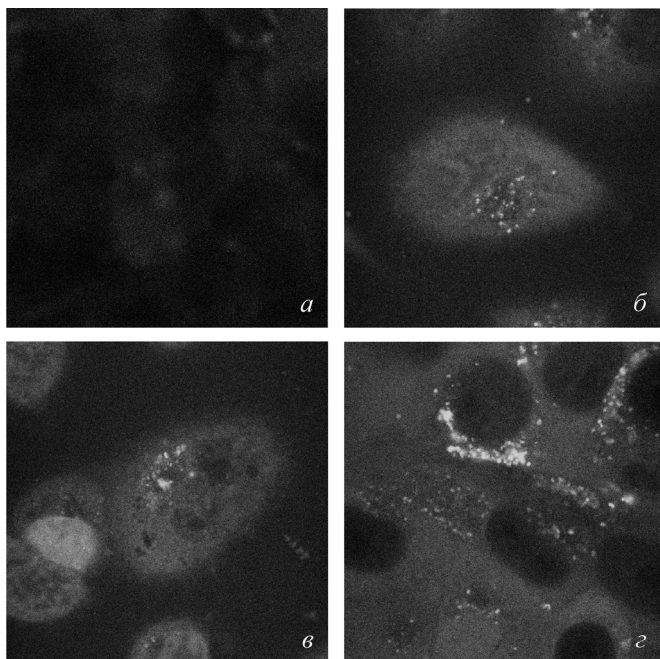


Рис. 3. Флуоресценция клеток линии J-96 при добавлении комплекса флуоресцеин—авидин без предварительной инкубации клеток в среде, содержащей комплекс АФ—биотин (а), и после культивирования клеток с комплексом АФ—биотин в течение 30 мин (б), 24 (в) и 96 (г) ч.

Культивирование клеток в среде, содержащей биотинилированный АФ, и последующая инкубация с комплексом флуоресцеин—авидин приводят к выявлению флуоресцирующих скоплений, которые располагаются в основном в клеточных ядрах (б, в) и перинуклеарном пространстве (г), причем их количество и величина возрастают по мере увеличения продолжительности взаимодействия клеток с комплексом АФ—биотин.

ных линий мыши и человека. Ростстимулирующее действие АФ было зарегистрировано главным образом при применении низких доз пептида (10<sup>-5</sup> и 10<sup>-3</sup> мкг/мл), в то время как для супрессии пролиферации требовались концентрации не менее чем 10 мкг на 1 мл культуральной среды. Направленность (вектор) и степень ростмодулирующего эффекта АФ зависели не только от его исходной концентрации, но и от продолжительности воздействия на клетки и варьировали для разных линий клеток. В диапазоне исследуемых концентраций (от 10<sup>-5</sup> до 250 мкг/мл) пептид не влиял на жизнеспособность клеток. Исключением является гибель клеток линии P388D1 через 96 ч после начала действия 100 мкг/мл АФ (рис. 1, I, г, столбцы 1).

Один из возможных подходов для модификации, в том числе усиления антиопухолетического действия пептидов, состоит в получении гибридных молекул, состоящих из молекул пептида и какого-либо препарата с противоопухолетической активностью (Hui et al., 2002; An et al., 2003). В нашей работе проверялось ростмодулирующее и цитотоксическое действие гибридных молекул, созданных из АФ и цитозара (цитала) или АФ и ДР (доксала). Было показано, что в большинстве случаев гибридные молекулы проявляют промежуточную по сравнению с АФ и соответствующим цитостатиком противоопухолетическую активность. Одним из исключений является более высокая, чем у цитозара, цитотоксичность цитала в концентрации 100 мкг/мл для клеток линии P388D1 (рис. 1, I, а—в; столбцы 2, 3).

Результаты экспериментов по клонированию клеток линии P388D1 в средах с тестируемыми препаратами подтвердили промежуточную по сравнению с родительскими молекулами ростмодулирующую активность цитала и доксала. Кроме того, сравнение эффективности клонирования этих клеток в среде с доксалом и в среде, содержащей смесь АФ и ДР, по-видимому, противоречит мнению о возможной нестабильности гибридной молекулы и ее расщеплении на исходные молекулы (см. таблицу).

Результаты, которые были получены при использовании клеток линии J-96, позволяют предположить, что молекулы АФ быстро проникают в клетки и локализуются главным образом внутри клеточных ядер (рис. 3, б, в) или в околоядерном пространстве (рис. 3, г). Сходная динамика проникновения через плазматическую мембрану и внутриклеточная локализация пептидов описаны и другими авторами (Mizejewski et al., 2004; Rapo et al., 2004).

Таким образом, пептид АФ способен быстро проникать в трансформированные клетки, накапливаться в клеточных ядрах и перинуклеарной области и оказывать влияние на пролиферативную активность трансформированных линий клеток.

Работа выполнена при частичной поддержке Федеральной программы поддержки ведущих научных школ (грант НШ-963.2008).

#### Список литературы

- Герасимова Т. К., Софьина З. П., Бутова Т. Ю., Трещалина Е. М., Смирнова З. С., Солнцева Т. И. 1995. Некоторые подходы к модификации противоопухолетических эффектов цитостатиков. Эксперим. клинич. фармакол. 58 (3) : 27—32.
- 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 пеп-

тидов нейтрофилов на культивируемые клетки. Цитология. 42 (3) : 228—233.

An J., Sun Y. P., Adams J. 2003. Drug interaction between the proteasome inhibitor bortezomib and cytotoxic chemotherapy tumor necrosis factor (TNF) alpha, and TNF-related apoptosis-induced ligand in prostate cancer. Clin. Cancer Res. 9 : 4537—4545.

Chernysh S., Kim S. I., Bekker G., Pleskach V. A., Filatova N. A., Anikin V. B., Platonov V. G., Bullet Ph. 2002. Antiviral and antitumor peptides from insects. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 12 628—12 632.

Cruciani R. A., Barker J. L., Zasloff M., Chen H.-C., Colamonic O. 1991. Antibiotic magainins exert cytotoxic activity against transformed cell lines through channel formation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 88 : 3792—3796.

Harwig S. S. L., Kokryakov V. N., Swiderek K. M., Aleshina G. M., Zhao C., Lehrer R. I. 1995. Prophenin-1, an exceptionally rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. FEBS Lett. 362 : 65—69.

Hui L., Leung K., Chen H. M. 2002. The combined effects of antibacterial peptide cecropin A and anticancer agents on leukemia cells. Anticancer Res. 22 : 2811—2816.

Ingham K. C., Brew S. A., Ericson H. P. 2004. Localization of a cryptic binding site for tenascin on fibronectin. J. Biol. Chem. 279 : 28 132—28 135.

Kaga H., Okochi M., Nakanishi M., Hayashi H., Kato R., Honda H. 2007. Screening of a novel octamer peptide CNSWCKD, that induces caspase-dependent cell death. Biochem. Biophys. Res. Commun. 362 : 1063—1068.

Leushner C., Enright H., Gawronska B., Hansel W. 2003. Membrane disrupting lytic peptide conjugates destroy hormone dependent and independent breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Breast Cancer Res. Treat. 78 : 17—27.

Lowman H. B., Chen Y. M., Skelton N. J., Mortensen D. L., Tomlinson E. E., Sadick M. D., Robinson I. C. A. F., Clark R. G. 1998. Molecular mimics of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) for inhibiting IGF-1: IGF-binding protein interactions. Biochemistry. 37 : 8870—8878.

Miezejewski G. J., MacColl R. 2003. Alpha-fetoprotein inhibitory peptides: potential leads for cancer therapeutics. Mol. Cancer Ther. 2 : 1243—1255.

Miezejewski G. J., Miller K. D., Catalfamo J. L., Dauphinee M. 2004. Review of ATP-derived peptides. Chemotherapy. 16 : 1—32.

Oppenheim J. J., Biragyn A., Kwak L. W., Yang D. 2003. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. Annals Rheumatic Disorders. 62 : ii 17—21.

Papo N., Braunstein A., Eshhar Z., Yechiel S. 2004. Suppression of human prostate tumor growth in mice by a cytolytic D-, L-amino acid peptide: membrane lysis, increased necrosis, and inhibition of prostate-specific antigen secretion. Cancer Res. 64 : 5779—5786.

Peck K. A., Darvean R. P., Fell H. P. 1993. Identification of serum components which inhibit the tumorocidal activity of a helical peptide. Cancer Chemother. Pharmacol. 32 : 109—115.

Sidhu S. S., Weiss G. A. 2002. DNA-encoded peptide libraries and drug discovery. In: Anticancer drug development. London: Acad. Press. 237—248.

Wang Z., Wang G. 2004. APD: antimicrobial peptide database. Nucl. Acids Res. 2 : D590—D592.

Yang D., Biragyn A., Kwak L. W., Oppenheim J. J. 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. Trends Immunol. 23 : 291—296.

Поступила 6 VII 2010

#### GROWTH MODULATING AND CYTOTOXIC EFFECTS OF THE PEPTIDE FROM HEMOLYMPH OF BLOW FLY *CALLIPHORA VICINA* (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) *IN VITRO*

V. A. Plekach,<sup>1</sup> I. V. Kozhucharova,<sup>1</sup> I. V. Artcibasheva,<sup>1</sup> L. L. Alekseenko,<sup>1</sup> S. I. Chernysh<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and <sup>2</sup> Biological Institute of St. Petersburg State University; e-mail: gmdmk@mail.cytbs.rssi.ru

Biological activity of alloferon (AF), peptide, consisting of 13 a. a. isolated from hemolymph of experimentally infected blow fly *Calliphora vicina* was studied. AF in concentrations from  $1 \cdot 10^{-5}$  to 250  $\mu\text{g/ml}$  was added into the culture medium of the target cell lines K562, J-96, P388D1, Hep22a and 3T3B-SV40. First two days the peptide in concentrations  $1 \cdot 10^{-5}$  and  $1 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$  in most cases stimulated the cell proliferative activity and suppressed the cell growth when applied in concentrations 10 and 100  $\mu\text{g/ml}$ . Trend in growth modulating effect was dependent on duration of AF treatment. The peptide did not expressed cytotoxic effect with the exception of destruction of P388D1 cells that was registered after 96 h incubation in the medium initially contained 100  $\mu\text{g/ml}$  AF. Simultaneously, cytotoxic and growth modulating effects of doxorubicin and cytosinarabioside, as well as hybrid molecules, AF — cytosinarabioside (cytal) and AF — doxorubicin (doxal) have been studied. Doxorubicin and cytosinarabioside expressed greater growth inhibition effect compared to the hybrid molecules and AF itself. The results obtained with mass cell cultures were supported by experiments where P388D1 cells clonogenic capacity was tested. Besides, it has been demonstrated that AF rapidly penetrates into cytoplasm of J-96 cells and concentrates mainly into and around the cell nuclei.

Key words: peptide, cell line, cytotoxicity, growth modulating effect.