

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК IN VITRO АЛЛОФЕРОНОМ-1 И АЛЛОСТАТИНОМ-1

© **В. А. Плескач**,¹ **И. В. Кожухарова**,¹ **Л. Л. Алексеенко**,¹ **Н. М. Плескач**,¹
В. Б. Аникин,² **С. И. Черныш**³

¹ Институт цитологии РАН, ² Институт гриппа РАМН, Санкт-Петербург,
³ Биологический институт С.-Петербургского государственного университета;
электронный адрес: gmdmk@mail.cytspb.rssi.ru

Сравнивали влияние синтетического пептида аллоферона-1 (АФ), идентичного антивирусному и противоопухолевому пептиду из гемолимфы личинок мухи *Calliphora vicina* (Chernysh et al., 2002), и его модифицированного аналога аллостатина-1 (АС) на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток постоянных линий человека и мыши. Ранее было зарегистрировано влияние АФ на пролиферативную активность в массовых культурах клеток человека и мыши (Плескач и др., 2010). Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что замена двух аминокислот в молекуле АФ незначительно влияет на ростмодулирующее действие пептида. В опытах по клонированию клеток линии P388D1 оба пептида усиливали ростингибирующее действие доксорубина (ДР), однако при воздействии на клетки относительно низких концентраций цитостатика значительно более выраженный стимулирующий эффект был зарегистрирован при применении АС. Одновременное добавление в культуральную среду пептида АС и циклофосфамида в концентрациях, которые при раздельном воздействии препаратов не снижают клоногенной способности клеток, приводило к 1.5—4-кратному уменьшению эффективности их клонирования, причем степень ростингибирующего действия цитостатика прямо коррелировала с концентрацией пептида. Эксперименты с использованием комплекса пептид-флуоресцеин позволили прийти к заключению о том, что АФ и АС принадлежат к группе быстро проникающих в клетки пептидов и, судя по результатам опытов с комплексом аллоферон-флуоресцеин, способны присоединяться к хромосомам.

Ключевые слова: клеточная линия, пролиферативная активность, пептид, ростмодулирующее действие, клоногенность, флуоресценция.

Принятые сокращения: АС — аллостатин-1, АФ — аллоферон-1, ВПЧ — вирус папилломы человека, ДР — доксорубин, ЦФ — циклофосфамид.

Современная медицина располагает значительным арсеналом противоопухолевых средств, для которых характерен цитостатический механизм действия. Абсолютное большинство цитостатиков относится к числу низкомолекулярных органических соединений с высоким уровнем токсичности для нормальных клеток организма (DeVita, Chu, 2008). Недостатки цитостатической химиотерапии общеизвестны и делают необходимым поиск более эффективных и безопасных противоопухолевых препаратов, способных избирательно подавлять пролиферацию опухолевых клеток и оказывать минимальное воздействие на нормальные ткани. Одним из немногих препаратов этого типа, используемых в клинической практике, является альфа-интерферон, применяемый в высоких дозах для подавления пролиферации при терапии ряда опухолей. Необходимость дальнейших исследований в этом направлении очевидна, однако область, которую они охватывают, ограничена главным образом изучением свойств цитокинов, некоторых ферментов и моноклональных антител к опухолевым антигенам (Waldmann, 2003). Список потенциальных кандидатов на звание противоопухолевого препарата нового типа может быть значительно расширен за счет пептидов природного происхождения.

К настоящему времени выделено и структурно охарактеризовано несколько миллионов пептидов различного видового и тканевого происхождения (Bowman, 1995; Kay et al., 1998; Sidhu, Weiss, 2002; Wang, Wang, 2004).

Накопленные экспериментальные данные свидетельствуют о взаимодействии пептидов с различными клеточными компонентами, включая плазматическую мембрану, рецепторы для цитокинов, сами цитокины, ферменты и определенные звенья внутриклеточной передачи регуляторных сигналов (Matsuzaki et al., 1991; Swiral et al., 1996; Livnah et al., 1996; Hyde-De Ruyscher et al., 1999; Mizejewski, Mac Coll, 2003), а также о способности пептидов оказывать влияние на различные компоненты иммунной системы (Linn et al., 1997; Delano et al., 2000; Yang et al., 2002; Day et al., 2003) и проявлять как ростингибирующую, так и цитотоксическую активность по отношению к трансформированным клеткам *in vitro* и опухолевым клеткам *in vivo* (Baker et al., 1993; Chen et al., 1997; Плескач и др., 2000; Chernysh et al., 2002; Capello et al., 2006; Kaga et al., 2007). Еще одной существенной причиной, определяющей широкое использование пептидов в разнообразных экспериментальных моделях, является относительная простота их модификации и достаточно высокая

вероятность изменения биологической активности после видоизменения этих молекул (Dawson et al., 1999; Naque et al., 2001; Papo, Shai, 2003).

Биологическая активность пептидных молекул, в первую очередь коротких, содержащих не более 30 аминокислотных остатков пептидов, нередко связана с их способностью быстро (в течение приблизительно 2—5 мин) проникать через плазматическую мембрану (Magzoub, Gräslund, 2004; Kerkis et al., 2008). Более того, для большинства изученных проникающих в клетки пептидов установлена способность выступать в качестве векторов, обеспечивающих проникновение в клетки макромолекул, включая гидрофильные белковые молекулы (Rousselle et al., 2001; Joliot, Prochiantz, 2004; Russell, Keiler, 2007). Показано также, что после попадания в цитоплазму они могут быть ассоциированы с различными клеточными структурами, включая цитоскелет, митохондрии, центриоли и хромосомы (Kerkis et al., 2008).

В настоящей работе экспериментально изучено влияние на пролиферативную и клоногенную активность опухолевых клеток двух пептидов: аллоферона-1 (АФ) и аллостатина-1 (АС). АФ и структурно близкий ему аллоферон-2 образуют группу природных аллоферонов, выделенных из гемолимфы насекомого *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae), для которых установлена способность стимулировать цитотоксическую активность естественных киллеров млекопитающих (Chernysh et al., 2002). АФ является линейным катионным пептидом следующей структуры: His-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly. Этот пептид проявляет противовирусную активность, в основе которой лежит активация естественных киллеров и системы интерферона, и используется для лечения герпес-вирусной инфекции (Ершов и др., 2003). АФ обладает также ограниченным противоопухолевым действием, которое выражается в подавлении роста опухолевого трансплантата у мышей (Chernysh et al., 2002) и в ингибировании пролиферации опухолевых клеток *in vitro* (Плескач и др., 2010). АС (синоним аллоферон-3) является синтетическим аналогом природных аллоферонов, состоящим из линейной последовательности аминокислот His-Gly-Val-Ser-Gly-Trp-Gly-Gln-His-Gly-Thr-His-Gly. АС оказывает сходное с природными аллоферонами стимулирующее действие на естественные киллеры и продукцию интерферона. Противовирусная активность АС включает в себя кроме герпесных инфекций инфекции, вызываемые ВПЧ (Сафронникова и др., 2007). Поскольку онкогенные формы ВПЧ служат основной причиной возникновения вирусозависимых форм рака, дальнейшее изучение противоопухолевого потенциала АС представляет самостоятельный интерес.

Одна из задач наших экспериментов состояла в сравнении цитотоксического и ростмодулирующего действия АФ и АС в культурах трансформированных клеток. Другая задача заключалась в изучении специфичности их проникновения в клетки и внутриклеточной локализации, а также в проверке способности пептидных молекул взаимодействовать с хромосомами культивируемых клеток.

Материал и методика

Для оценки цитотоксического и ростмодулирующего действия исходного и модифицированного пептидов использовали постоянные линии клеток человека и мыши,

которые пассировали при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Клетки суспензионных линий мышиной лимфоидной неоплазмы P388D1, эритроидной лейкемии человека K562 и лимфомы Namalva культивировали в среде RPMI 1640 с 10 % эмбриональной сыворотки теленка, дополненной глутамином и гентамицином. Клетки монослойных линий человека — моноцитарной лейкемии J-96 и остеогенной саркомы MG63 — культивировали в среде ДМЕМ, содержащей те же добавки, что и среда RPMI 1640. Клетки суспензионных культур пересевали дважды в неделю механическим способом (пипетированием) в соотношении 1 : 3 или 1 : 4. Клетки монослойных культур пересевали 1—2 раза в неделю в соотношении 1 : 3 с помощью равных объемов растворов 0.25%-ного трипсина и 0.02%-ного ЭДТА и последующего пипетирования.

При постановке экспериментов использовали клеточные культуры, находящиеся в логарифмической стадии роста. Полученные суспензии клеток осаждали центрифугированием при 300 g в течение 5—10 мин, клеточные осадки суспендировали в буфере Хенкса, после чего клетки повторно осаждали и ресуспендировали в небольшом объеме полной среды. После подсчета концентрации клеток в камере Горяева клеточные суспензии рабавляли полной средой до необходимой исходной концентрации, которая составляла 10⁴ и 2.5 · 10⁴ кл./мл для монослойных и суспензионных линий соответственно. Навески АФ, АС, ДР, цитозара и ЦФ растворяли непосредственно перед добавлением в инкубационную среду 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 получении кривых роста клеток в лунки 24-луночных панелей вносили по 2 мл клеточных суспензий. При постановке опытов на клетках суспензионных культур по 200 мкл рабочего раствора препарата на лунку 24-луночной панели вносили сразу после посева клеток, в то время как при использовании монослойных клеток-мишеней препараты добавляли через 1 сут после посева клеток. Инкубационную среду в течение опыта не заменяли. Для оценки доли погибших клеток аликвоты клеточных суспензий объемом 100 мкл смешивали с равными объемами 0.4%-ного раствора красителя трипанового синего. Количество живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) клеток подсчитывали в гемоцитометре через 10 мин после начала их инкубации с красителем каждые 24 ч в течение 72 ч после внесения в культуральную среду проверявшихся препаратов. При подсчете количества клеток для каждой концентрации препарата в одном опыте использовали не менее 3 параллельных лунок.

При проверке влияния препаратов на пролиферативную активность клеток линии J-96 с помощью мультисканирующего спектрофотометра ID в 96-луночные панели высевали по 4 · 10³ клеток на лунку в 0.2 мл полной среды. Проверявшиеся препараты добавляли в культуральную среду через 1 сут после посева клеток в 20 мкл среды без сыворотки крови. Через 24 ч после начала их воздействия среду отбрасывали и после подсушивания лунок клетки окрашивали 0.1%-ным раствором кристалл-виолета в 30%-ном водном растворе этанола в течение 10 мин при комнатной температуре. Избыток красителя удаляли посредством 5-кратной промывки клеток дистиллированной водой и после просушивания хранили до использования в

темноте. Для каждой дозы препарата использовали от 6 до 12 параллельных проб. Экстракцию связанного клетками кристалл-виолета проводили непосредственно перед измерением коэффициентов экстинции при 37 °С в течение 10 мин 90%-ным водным раствором этанола. Соответствие между коэффициентами экстинции красителя при частоте возбуждения 535 нм и количеством клеток в лунке определяли на основе предварительно полученной калибровочной кривой.

Влияние препаратов на эффективность клонирования проверяли для клеток линии P388D1. С этой целью в лунки 24-луночных панелей высевали по 50 клеток в 2 мл полной среды. Сразу после посева клеток в культуральную среду вносили необходимые дозы препаратов в среде без сыворотки крови (200 мкл на лунку). Количество клонов (колоний, содержащих не менее 50 клеток) подсчитывали через 7—12 сут после начала опыта. Для каждой концентрации препарата использовали 5—7 параллельных лунок.

Способность молекул пептида АС проникать в культивируемые клетки изучали с помощью комплекса АС—флуоресцеин. Для этого клетки линии Namalva высевали в пластиковые чашки в концентрации $2 \cdot 10^5$ кл./мл. Через 1 сут старую среду заменяли на среду, содержащую АС, меченный флуоресцентным красителем в концентрации 1 мкг/мл. В качестве контрольных клеток использовали клетки, которые перед заменой среды в течение 1 ч инкубировали в присутствии 10 мкг/мл немеченого АС.

Клетки из контрольных и экспериментальных чашек переносили в центрифужные пробирки через 10 мин, 1 и 24 ч после начала культивирования в среде с комплексом АС—флуоресцеин. Их осаждали и трижды промывали охлажденным буфером PBS без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} посредством центрифугирования при 300 g в течение 10 мин, фиксировали 2%-ным раствором параформальдегида, приготовленным на этом же буфере, и хранили в темноте при 4 °С. Перед приготовлением препаратов клетки трижды отмывали от фиксатора указанным буфером PBS, после чего к 20 мкл суспензии добавляли 5 мкл стабилизирующего препарата пропилгалат. Для получения препаратов 25 мкл указанной смеси наносили на предметное стекло и накрывали ее покровным стеклом. Препараты анализировали с помощью конфокального сканирующего флуоресцентного микроскопа Leica (Microsystems, Германия) при частоте возбуждения 488 нм.

Способность молекул пептида АФ взаимодействовать с хромосомами клеток линий J-96 и Namalva изучали с помощью комплекса АФ—флуоресцеин. При получении метафазных пластинок соблюдали следующие условия: 1) демиколцин в конечной концентрации 0.025 мкг/мл добавляли в культуральную среду через 16—18 ч после посева клеток; 2) по истечении 2—2.5 ч среду с препаратом удаляли, культуры трижды промывали буфером PBS без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} и переводили в суспензию посредством пипетирования (клетки Namalva) или с помощью стандартной смеси растворов ЭДТА и трипсина (клетки J-96) и последующего пипетирования при 37 °С; 3) гипотоническую обработку клеток производили смесью 0.075%-ного раствора KCl и 1%-ного раствора цитрата Na^+ (1 : 1, по объему) в течение 21 мин, после чего их фиксировали смесью метанола и уксусной кислоты (3 : 1, по объему); 4) зафиксированные клетки наносили на влажные предметные стекла на льду и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Все вышеперечисленные манипуляции проводили при минимальном

воздействии света. Комплекс АФ—флуоресцеин в концентрации 5 мкг/мл добавляли в культуральную среду сразу после посева клеток на 16—18 ч или после добавления демиколцина на 2.5 ч. Чтобы контролировать влияние пептида на взаимодействие комплекса с хромосомами, проверяли флуоресценцию метафазных хромосом после культивирования клеток в среде без добавок и в среде, содержащей соответствующую концентрацию флуоресцентного красителя. Полученные препараты заключали и анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica.

В работе использовали: среды DMEM, RPMI 1640, эмбриональную сыворотку теленка и краситель трипановый синий (Gibco, США); гентамицин, доксорубин, цитозар и циклофосфамид (Sigma, США); пропилгалат, демиколцин и кристалл-виолет (ICN, США); трипсин, ЭДТА, буфер Хенкса и PBS (Биолот, Россия); АФ, АС, АФ—флуоресцеин и АС—флуоресцеин (Аллофарм, Россия).

Результаты

Одна из задач работы состояла в сравнении ростмодулирующего и цитотоксического действия исходного и модифицированного посредством замены двух аминокислот пептидов (АФ и АС соответственно) в культурах трансформированных клеток.

Основным методом для решения этой задачи был прямой подсчет количества жизнеспособных и погибших клеток при получении так называемых кривых роста точных линий P388D1, K562, MG63 и J-96 в среде без добавок и в среде, содержащей различные концентрации этих пептидов. В качестве известных ростиингибирующих агентов в экспериментах были использованы цитостатики — цитозар и ДР.

Кривые роста клеток линии P388D1 получали при их культивировании в средах, содержащих АФ, АС и цитозар (рис. 1, I). В первые 24 ч опыта в средах, исходно содержащих 10^{-5} и 10^{-3} мкг/мл АФ или АС (рис. 1, I а; столбцы 1 и 2 соответственно) и цитозар в диапазоне концентраций 10^{-5} — 10^{-1} мкг/мл (рис. 1, I а; столбцы 3), было зарегистрировано 1.2—1.3- и 1.4—1.8-кратное увеличение пролиферативной активности клеток соответственно. Более высокие концентрации АФ и АС не влияли на интенсивность пролиферации клеток, тогда как применение цитостатика в концентрациях 10^1 и 10^2 мкг/мл приводило к полному подавлению их пролиферации (рис. 1, I а; столбцы 3), причем в среде, содержащей цитозар в концентрации 10^2 мкг/мл, ростиингибирующий эффект сопровождался гибелью приблизительно 20 % клеток. Спустя 48 ч после начала воздействия препаратов ростстимулирующий эффект сохранялся только при культивировании клеток в средах, исходно содержащих цитозар в концентрации 10^{-5} мкг/мл (рис. 1, I б; столбец 3).

По достижении этой контрольной точки опыта цитостатик частично (1 мкг/мл) или полностью (10 мкг/мл) подавлял пролиферацию клеток, в то время как при его воздействии в концентрации 10^2 мкг/мл было зарегистрировано не только полное подавление пролиферативной активности, но и гибель примерно 60 % клеток (рис. 1, I б; столбцы 3). Через 72 ч после начала инкубации с препаратами количество клеток в средах, содержащих 10^{-5} мкг/мл АФ и АС, превышало количество клеток в

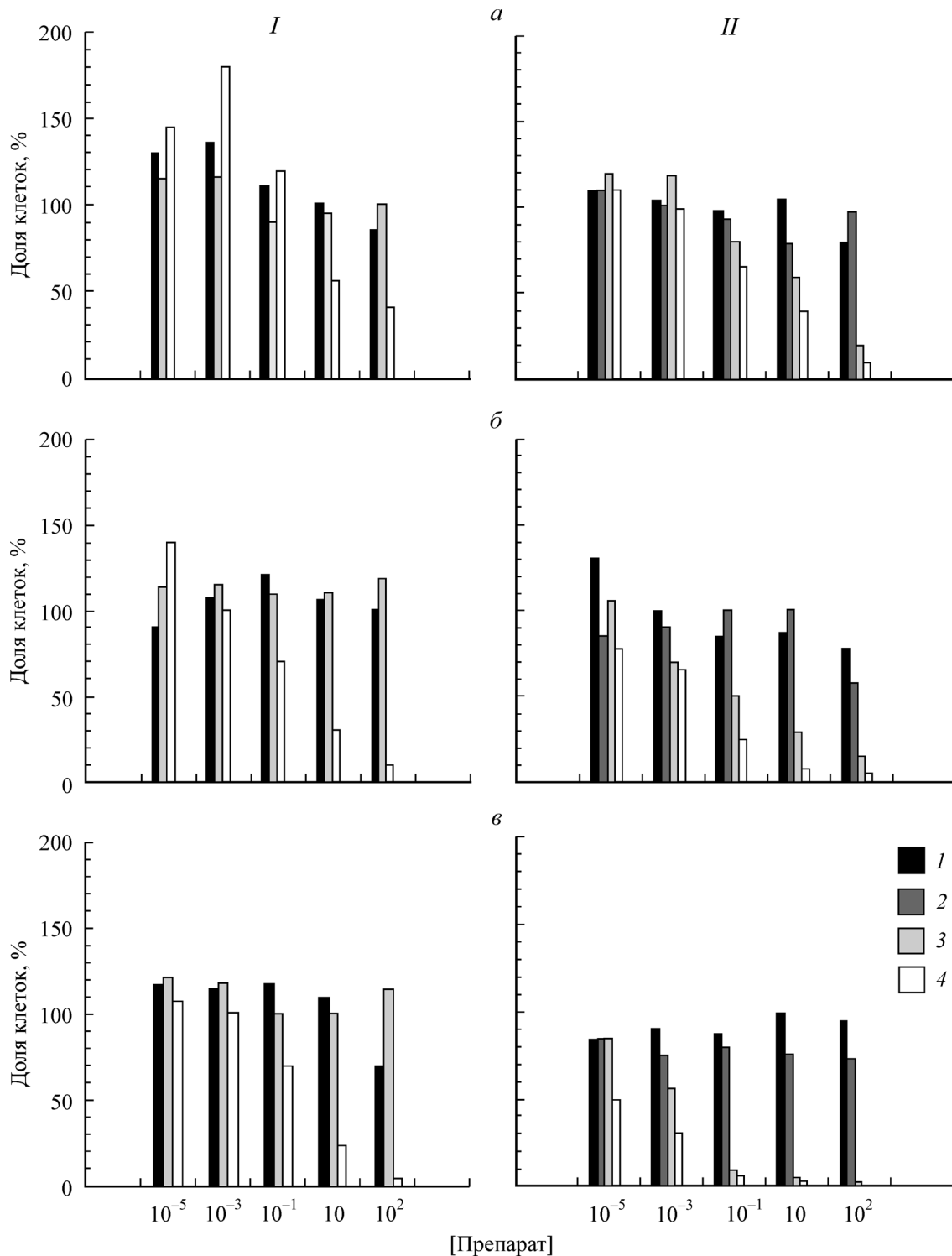


Рис. 1. Влияние пептидов и цитостатиков на пролиферативную активность клеточных линий P388D1 и K562.

Долю клеток рассчитывали в % от количества клеток при их культивировании в среде без тестируемых препаратов и через 1, 2 и 3 сут (*I, II; а—в* соответственно) после добавления препаратов: *I* — доля клеток линии P388D1 при культивировании в среде, содержащей АФ, АС или цитозар (*столбцы 1—3* соответственно); доля клеток линии K562 при культивировании в среде, содержащей АФ, АС, цитозар и ДР (*столбцы 1—4* соответственно). Представлены среднearифметические значения 9—12 независимых определений. Величина 95%-ных доверительных интервалов средних значений не превышала 10 %.

среде без добавок примерно в 1.2 раза и не отличалось от контрольного значения при их применении в концентрациях от 10⁻³ до 10 мг/мл включительно. Однако в отличие от пептида АС пептид АФ в концентрации 10² мг/мл в последние сутки эксперимента частично (примерно в

1.4 раза) суппрессирует пролиферативную активность клеток (рис. 1, *I в; столбец 1*). На этом сроке опыта не было выявлено ростстимулирующего действия цитозара в концентрации 10⁻⁵ мг/мл (рис. 1, *I в; столбцы 3*), в то время как в среде, исходно содержащей 10² мг/мл цито-

Изменение количества клеток линий MG63 и J-96 при воздействии АФ и АС

Препарат	Время действия препарата, ч	Концентрация препарата, мкг/мл	Количество клеток линии MG63 в лунке, $\times 10^3$	Количество клеток линии MG53, % от контрольных значений ¹	Количество клеток линии J-96 в лунке, $\times 10^3$	Количество клеток линии J-96, % от контрольных значений ²
АФ	24	10^{-6}	Не определяли	—	143 ± 11	128
		10^{-5}	97 ± 9	105	143 ± 13	128
		10^{-3}	88 ± 9	96	141 ± 11	126
		10^{-1}	83 ± 7	90	Не определяли	—
АС	24	10^{-6}	Не определяли	—	149 ± 12	133
		10^{-5}	87 ± 8	95	141 ± 14	126
		10^{-3}	88 ± 8	96	136 ± 14	121
		10^{-1}	86 ± 6	94	Не определяли	—
АФ	48	10^{-6}	Не определяли	—	313 ± 27	133
		10^{-5}	144 ± 12	76	296 ± 27	126
		10^{-3}	156 ± 13	82	284 ± 25	121
		10^{-1}	125 ± 10	66	Не определяли	—
АС	48	10^{-6}	Не определяли	—	291 ± 26	124
		10^{-5}	179 ± 11	94	261 ± 22	111
		10^{-3}	191 ± 13	101	263 ± 26	112
		10^{-1}	165 ± 12	87	Не определяли	—

^{1,2} За контрольные значения принято количество клеток линий MG63 и J-63 в среде без добавок через 24 и 48 ч их инкубации с пептидами: 92 ± 7 и 190 ± 11 для клеток линии MG63 и 112 ± 7 и 235 ± 21 для клеток линии J-96 соответственно. Каждое значение представляет собой среднеарифметическое 9 определений и 95%-ный доверительный интервал.

статика, доля погибших клеток возрастала до 75—80 % (рис. 1, I в; столбцы 3).

Кривые роста клеток линии K562 получали при их культивировании в средах, которые содержали пептиды АФ и АС, а также цитостатики цитозар и ДР (рис. 1, II). Пептид АФ практически не оказывал влияния на пролиферацию клеток этой линии на протяжении всего опыта (рис. 1, II а, б, в; столбцы 1), за исключением увеличения пролиферативной активности клеток в 1.3 раза через 48 ч опыта (рис. 1, II б; столбец 1). Пептид АС не стимулировал пролиферацию клеток линии K562 в ходе эксперимента, однако при применении в концентрации 10^2 мкг/мл вызывал приблизительно 1.7-кратное снижение пролиферативной активности между 24 и 48 ч опыта (рис. 1, II б; столбец 2).

В отличие от цитозара, который при применении в концентрациях 10^{-5} и 10^{-3} стимулировал пролиферативную активность клеток в 1.2 раза в первые 24 ч опыта (рис. 1, II а; столбцы 3), соответствующие концентрации ДР не проявляли ростстимулирующей активности (рис. 1, II а; столбцы 4). Оценивая результаты влияния цитостатиков на пролиферацию и жизнеспособность клеток линии K562 в целом, следует отметить, что их ростингибирующее и цитотоксическое действие возрастало по мере увеличения дозы и времени инкубации с клетками, причем максимальный противоопухолевый эффект, который был зарегистрирован при применении препаратов в концентрации 10^2 мкг/мл и выражался в гибели 85—90 % клеток, достигался при воздействии ДР на 1 сут раньше, чем в среде с цитозаром (через 48 и 72 ч опыта; рис. 1, II б, в; столбцы 4 и 3 соответственно).

Ростмодулирующее действие исходного пептида и его модификации оценивали в культурах клеточных линий MG63 и J-96 двумя способами: на основе анализа

кривых роста и по результатам определения коэффициентов экстинкции экстрагированного из клеток кристалл-виолета с применением мультисканирующего спектрофотометра. Отсутствие принципиальных различий между полученными этими способами данными позволило обобщить их в одной таблице.

Из представленных результатов следует, что добавление в культуральную среду пептидов в конечных концентрациях от 10^{-5} до 10^{-1} мкг/мл практически не влияло на пролиферативную активность клеток линии MG63 в течение первых 24 ч опыта, однако в последующие сутки АФ в отличие от АС супрессировал пролиферативную активность этих клеток в 1.2—1.5 раза. Добавление пептидных молекул в концентрациях от 10^{-6} до 10^{-3} мкг/мл в культуральную среду клеток линии J-96 приводило к 1.2—1.5-кратному возрастанию интенсивности их пролиферации в 1-е сут эксперимента, причем ростстимулирующее влияние этих концентраций АФ проявлялось и в следующие 24 ч инкубации клеток в присутствии пептида. В отличие от АФ ростстимулирующее действие АС через 48 ч после начала воздействия на клетки было зарегистрировано только в среде, содержащей 10^{-6} мкг/мл пептида (см. таблицу).

Помимо опытов с массовыми культурами клеток для сравнения ростмодулирующего действия АФ и АС были поставлены эксперименты по клонированию клеток в среде с пептидами. Параллельно определяли влияние ДР на эффективность клонирования этих клеток и оценивали способность АФ и АС оказывать влияние на ростингибирующую способность цитостатика (рис. 2, I а—г). В отличие от препарата ДР, который при применении в концентрациях от 10^{-4} до 10^{-1} мкг/мл супрессировал клоногенную способность клеток линии P388D1, по мере увеличения его концентрации (до полного подавления в

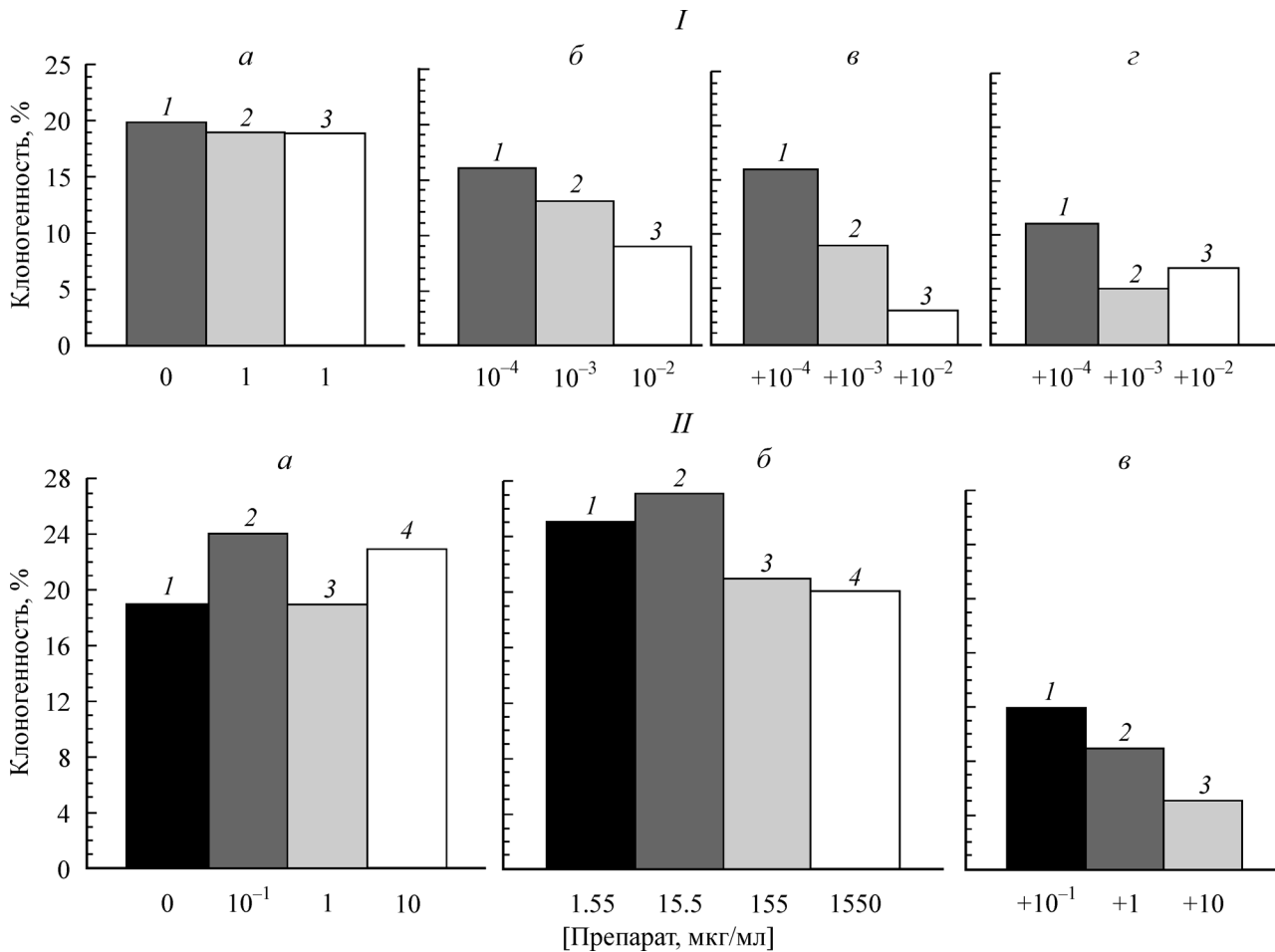


Рис. 2. Влияние пептидов и цитостатиков на клоногенность клеток линии P388D1.

Клоногенность клеток в среде без добавок (Ia, IIa, столбцы 1) и при культивировании в средах, содержащих следующие препараты: АФ и АС (IIa, столбцы 2, 3), ДР (Iб, столбцы 1–3), АФ в концентрации 1 мкг/мл + ДР (Iв, столбцы 1–3), АС в концентрации 1 мкг/мл + ДР (Iг, столбцы 1–3), АС (IIa, столбцы 2–4), ЦФ (IIб, столбцы 1–4), ЦФ в концентрации 1550 мкг/мл + АС (IIв, столбцы 1–3). Приведены среднеарифметические значения 15 независимых определений. Величина 95%-ных доверительных интервалов не превышала 8 %.

среде, содержащей 10⁻¹ мкг/мл цитостатика; рис. 2, I б; столбцы 1–4) пептиды в концентрации 1 мкг/мл не влияли на эффективность их клонирования (рис. 2, I а; столбцы 1–3).

При одновременном добавлении в культуральную среду одного из пептидов в концентрации 1 мкг/мл и ДР в концентрации 10⁻⁴ мкг/мл (рис. 2, I в, г) только АС усиливал в 1.5 раза ростингибирующее действие цитостатика (рис. 3, I б–г; столбцы 1). В среде, содержащей 10⁻³ мкг/мл ДР и 1 мкг/мл одного из пептидов, было зарегистрировано 1.4- и 2.4-кратное усиление супрессирующего действия цитостатика при воздействии АФ и АС соответственно, однако при увеличении исходной концентрации ДР до 10⁻¹ мкг/мл способность усиливать его ростингибирующий эффект оказалась выше у пептида АФ (рис. 2, I б–г; столбцы 2, 3).

В другой серии опытов эффективность клонирования клеток линии P388D1 определяли при их инкубации в средах, содержащих пептид АС, ЦФ и комбинацию этих препаратов (рис. 2, II). Было показано, что при воздействии АС в концентрации 1 мкг/мл (рис. 2, II а; столбец 3) эффективность клонирования клеток либо не отличается от таковой в среде без препаратов (рис. 3, а, столбец 1), либо при воздействии пептида в концентрации 10⁻¹ мкг/мл превышает контрольное значение клоноген-

ности приблизительно в 1.3 раза (рис. 2, II а, столбцы 2, 4). Увеличение эффективности клонирования клеток в 1.1–1.4 раза происходило и в средах, содержащих ЦФ в концентрациях от 1.55 до 1550 мкг/мл включительно (рис. 2, II б). Тем не менее вопреки отмеченному рост-стимулирующему действию этих препаратов одновременное добавление в инкубационную среду 1550 мкг/мл цитостатика от 10⁻¹ до 10 мкг/мл АС приводило к 1.4–3.8-кратному в зависимости от концентрации пептида снижению клоногенной способности клеток линии P388D1 (рис. 2, II в).

Динамику проникновения пептидов в клетки изучали на клетках линии Namalva, которые культивировали в среде, содержащей комплекс АС—флуоресцеин в концентрации 1 мкг/мл, в течение 10 мин, 1 и 24 ч (рис. 3). Специфичность этого процесса оценивали, сравнивая интенсивность флуоресценции клеток, которые перед добавлением в культуральную среду меченного красителем пептида не инкубировали с АС или преинкубировали в среде, содержащей 10 мкг/мл немеченного пептида. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой интенсивности флуоресценции клеток, которые предварительно не инкубировали в среде с немеченым АС, и ее возрастании по мере увеличения времени культивирования клеток в присутствии комплекса пептид—флуоресцеин.

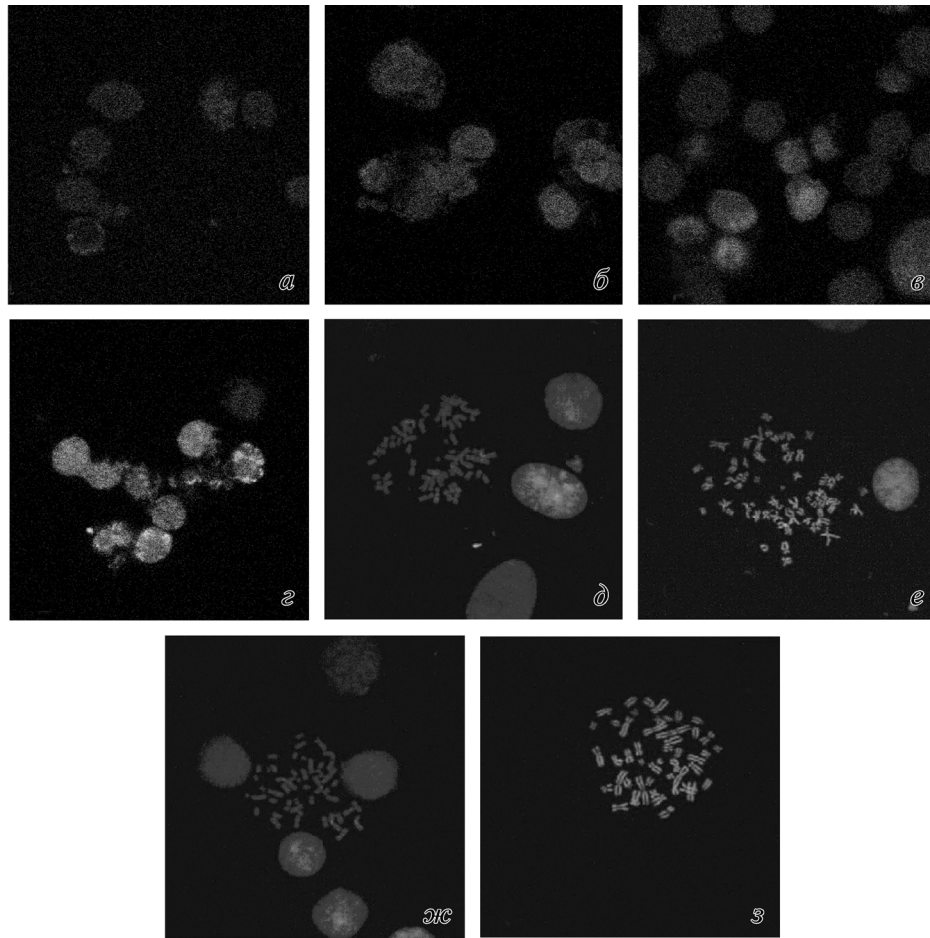


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции клеток линии Namalva и метафазных хромосом клеток линий J-96 и Namalva.

Интенсивность флуоресценции интактных (б, г, е) и преобработанных пептидом АС в концентрации 10 мкг/мл (а, в, д) клеток линии Namalva определяли через 1 (а, б) и 24 (в, г) ч культивирования в среде, содержащей комплекс АС—флуоресцеин. Представленные фотографии свидетельствуют о том, что предварительная инкубация в среде с пептидом АС приводит к заметному снижению включения комплекса АС—флуоресцеин в клетки. Интенсивность флуоресценции метафазных хромосом регистрировали через 18 ч культивирования клеток линий J-96 (д, е) и Namalva (ж, з) в среде с флуоресцеином (д, ж) или комплексом АФ—флуоресцеин (е, з). Представленные данные свидетельствуют о том, что интенсивность флуоресценции хромосом после культивирования клеток в среде, содержащей комплекс АФ—флуоресцеин, значительно превышает фоновую флуоресценцию, обусловленную наличием флуоресцеина в культуральной среде.

Преинкубация с немеченым АС приводила к значительному снижению интенсивности флуоресценции, зарегистрированному через 1 и 24 ч после начала эксперимента (рис. 3).

Возможность и специфичность присоединения пептидных молекул к хромосомам оценивали при культивировании клеток линий J-96 и Namalva в среде, содержащей 5 мкг/мл комплекса АФ—флуоресцеин, в течение 18 и 2.5 ч (до и после внесения в инкубационную среду ингибитора митоза соответственно). Интенсивность флуоресценции хромосом метафазных пластинок, полученных после культивирования клеток при указанных условиях, сравнивали с таковой при их культивировании в среде без добавок и в среде с флуоресцеином. При культивировании клеток обеих линий в течение 2.5 ч как в контрольной среде, так и в средах, которые содержали флуоресцеин или комплекс АФ—флуоресцеин, была зарегистрирована приблизительно равная (фоновая) флуоресценция хромосом. После 18 ч инкубации клеток в среде, содержащей комплекс АФ—флуоресцеин, интенсивность флуоресценции хромосом, напротив, значительно превышала таковую после их инкубации в среде без добавок и в среде с красителем (рис. 3).

Обсуждение

Основной целью модификации пептидных молекул является изучение механизма их действия и изменение биологической активности пептидов. Один из способов такой модификации состоит в замещении одной и более аминокислот на альтернативные L- и (или) энантиомерные D-аминокислоты (Dawson et al., 1999; Papo et al., 2004; Kaga et al., 2007).

В нашей работе сравнивали цитотоксическое и ростомодулирующее действие пептида АФ, который был выделен из гемолимфы личинок мухи *Calliphora vicina* (Chernysh et al., 2002), и полученного из него посредством замещения двух аминокислот пептида АС. Влияние исходного и модифицированного пептидов на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток было проверено как в массовых культурах трансформированных клеточных линий человека и мыши, так и при клонировании клеток мышинной лимфоидной неоплазмы линии P388D1. Полученные результаты свидетельствуют о том, что замещение аминокислот в молекуле АФ не приводит к качественному изменению проверявшихся *in vitro* видов биологической активности. Этот вывод, по-видимому, не отме-

няет возможность выявления качественных различий между исходным и модифицированным вариантами молекулы пептида при применении других биологических тестов как *in vitro*, так и *in vivo*.

К числу заслуживающих внимания количественных различий в ростмодулирующем действии пептидов, с нашей точки зрения, относится значительно более выраженная у АС способность усиливать ростингибирующую активность низких концентраций цитостатика ДР, которая была зарегистрирована при клонировании клеток линии P388D1 (рис. 2, II б—г; столбцы 1, 2). Усиление ростингибирующего и цитотоксического эффектов цитостатиков в отношении клеток опухолевых линий под влиянием коротких пептидов (при одновременном снижении их эффективной дозы) было отмечено и в работах других экспериментаторов (Johnstone et al., 2000; Papo et al., 2004). По мнению целого ряда авторов, отмеченное стимулирующее действие коротких пептидов обусловлено тем, что они выполняют роль транспортных векторов и способны обеспечивать увеличение проницаемости плазматической мембраны для молекул цитостатиков (Rousselle et al., 2001; Joliot, Prochiantz, 2004; Magzoub, Gräslund, 2004; Kerkis et al., 2008). С этим выводом хорошо согласуются данные о влиянии одновременного влияния АС и ЦФ на эффективность клонирования клеток линии P388D1 (рис. 2, II в). Следует подчеркнуть, что в отличие от опытов с ДР в опытах с применением ЦФ значительное снижение клоногенности клеток под влиянием комбинации пептида и цитостатика было зарегистрировано в среде, содержащей ЦФ в концентрации, которая сама по себе не влияла на способность клеток к образованию клонов (рис. 2, II б, столбец 4). Кроме того, результаты этих экспериментов позволяют прийти к выводу о том, что при комбинированном применении АС и ЦФ степень ростингибирующего эффекта цитостатика прямо коррелирует с концентрацией пептида (рис. 2, II в).

К настоящему времени установлено, что многие из коротких пептидных молекул быстро, в течение минут, проникают в живые клетки (Kerkis et al., 2008). Такая способность была показана и для пептида АФ, который выявляется в клетках линии J-96 через 30 мин после начала их культивирования в среде с комплексом АФ—биотин (Плескач и др., 2010). Судя по результатам обсуждаемой работы, замена двух аминокислот не оказывает существенного влияния на скорость проникновения пептида в клетку, поскольку АС был выявлен в клетках линии Namalva по истечении 1 ч их инкубации в среде, содержащей комплекс АС—флуоресцеин. Эти результаты, очевидно, позволяют отнести пептиды АФ и АС к группе быстро проникающих в клетку пептидных молекул (cell-penetrating) (Joliot, Prochiantz, 2004; Magzoub, Gräslund, 2004).

Одним из наиболее вероятных механизмов проникновения коротких пептидов в клетку является их адсорбция на клеточной поверхности и последующий эндоцитоз пептидных молекул (Rousselle et al., 2001; Kerkis et al., 2008). Полученные в опытах по проникновению АС в клетки линии Namalva результаты (рис. 3), по-видимому, свидетельствуют о том, что кратковременная предварительная инкубация клеток с избытком пептида может приводить к достаточно продолжительному нарушению этих процессов.

Ранее было показано, что после проникновения в клетки линии J-96 пептид АФ быстро (в течение 30 мин) накапливается в перинуклеарном пространстве (Плескач

и др., 2010). В настоящей работе продемонстрировано присоединение АФ к хромосомам клеток линий J-96 и Namalva при их культивировании в среде, содержащей комплекс АФ—флуоресцеин, до внесения ингибитора митоза (рис. 3). Эти данные согласуются с результатами экспериментов других авторов (Fujihara et al., 2000; Kerkis et al., 2008).

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

Список литературы

- Ершов Ф. И., Кубанова А. А., Пинегин Б. В., Шульженко А. Е., Беккер Г. П., Черныш С. И., Бугаев Л. В. 2003. Влияние аллокина-альфа на течение рецидивов хронического генитального герпеса. *Materia Medica*. 4 (40) : 103—111.
- 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.
- Плескач В. А., Кожухарова И. В., Арцыбашева И. В., Алексеев Л. Л., Черныш С. И. 2010. Ростмодулирующее и цитотоксическое действие пептида из гемолимфы личинок мухи *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae) *in vitro*. *Цитология*. 52 (12) : 000—000.
- Сафронникова Н. Р., Черныш С. И., Серебряная Н. Б. 2007. Современные методы лечения папилломавирусной инфекции. В кн.: Превентивная онкогинекология. СПб.: Коста. 142—159.
- Baker M. A., Malay W. L., Zasloff M., Jacob L. S. 1993. Anticancer efficacy of magainin 2 and analogue peptides. *Cancer Res*. 53 : 3052—3057.
- Bowman H. G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Ann. Rev. Immunol.* 13 : 61—92.
- Capello A., Krenning E. P., Bernard B. F., Breeman W. A. P., Erion J. L., de Jong M. 2006. Anticancer activity of targeted proapoptotic peptides. *J. Nucl. Med.* 47 : 122—129.
- Chen H. M., Wang W., Smith D., Chan S. C. 1997. Effects of the antibacterial peptide cecropin B and its analogs cecropin B-1 and B-2 on lysosomes, bacteria and cancer cells. *Biochim. biophys. acta*. 1336 : 171—179.
- Chernysh S., Kim S. I., Bekker G., Pleskach V. A., Filatova N. A., Anikin V. B., Platonov V. G., Bullet P. 2002. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 99 : 12 628—12 632.
- Cwiral S. E., Balasubramanian P., Duffen D. J., Wagstrom C. R., Gates C. M., Singer S. C., Davis A. M., Tansik R. L., Mathtakis L. C., Boytas C. M., Schatz P. J., Paccanar D. P., Wrigh-ton N. C., Barret R. W., Dower R. W. 1996. Peptide against of the thrombopoietin receptor of potent as the natural cytokine. *Science*. 276 : 1696—1699.
- Dawson D. W., Volpert O. V., Pearce F. A., Schneider A. J., Silverstein A. J., Henkin J., Bouck N. J. 1999. Three distinct D-amino acid substitutions confer potent antiangiogenic activity on an inactive peptide derived from a trombospondin-1 type 1 repeat. *Mol. Pharmacol.* 2 : 332—338.
- Day F. H., Zhang Yu., Clair P., Grobstein K. H., Mazel M., Rees A. R., Kaczorek M., Tamsamani J. 2003. Induction of antigen-specific CTL responses using antigens conjugated to short peptide vectors. *J. Immunol.* 170 : 1498—1503.
- Delano W. L., Ultsch M. Y., de Vos A. M., Wells J. A. 2000. Convergent solutions to binding at protein-protein interface. *Science*. 287 : 1279—1283.
- DeVita V. T., Chu E. 2008. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*. 68 : 8643—8653.
- Fujihara S. M., Cleaveland J. S., Grosmaire L. S., Berry K. K., Kennedy K. A., Blake J. J., Lay J., Rankin B. M., Ledbetter J. A., Nadler S. G. 2000. A D-amino acid peptide inhibitor of NF-κB

nuclear localization is efficacious in models of inflammatory disease. *J. Immunol.* 185 : 1004—1012.

Haque M. F., Hawes J. W., Blum J. S. 2001. Cystenylation of MHC class II ligands: peptide endocytosis and reduction within APS influence T cell recognition. *J. Immunol.* 166 : 4543—4551.

Hyde-De Ruyscher R., Paige L. A., Cristensen D. J., Hyde-De Ruyscher N., Lim A., Fredericks Z. L., Kranz J., Gallant P., Zhang J., Rocklage S. M., Fowlkes D. M., Wendler P. A., Hamilton P. T. 1999. Detection of small-molecule enzyme inhibitors with peptides isolated from phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Chem. Biol.* 7 : 17—25.

Johnstone S. A., Gelman K., Mayer L. D., Hancock R. E., Balby M. 2000. *In vitro* characterization of the anticancer activity of membrane-active cationic peptides. I. Peptide-mediated cytotoxicity and peptide-enhanced cytotoxic activity of doxorubicin against wild type and p-glycoprotein overexpressing tumor cell lines. *Anti-cancer Drug Design.* 15 : 151—160.

Joliot A., Prochiantz A. 2004. Transduction peptides: from technology to physiology. *Nature Cell Biol.* 6 : 189—196.

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

Kay B. K., Kurakin A. V., Hyde-De Ruyscher R. 1998. From peptides to drugs via phage display. *Drug Discov. Today.* 8 : 370—378.

Kerkis A., Hayashi M. A. F., Yamane T., Kerkis I. 2008. Properties of cell penetrating peptides (CPPs). *Intern. Union Biochem. and Mol. Biol. Life.* 58 : 7—13.

Linn H., Ermekova K. S., Rentschler S., Sparks A. B., Kay B. K., Sudol M. 1997. Using molecular repertoires to identify high affinity peptide ligands of the WW domain of human and mouse YAP. *Biol. Chem.* 378 : 531—537.

Livnah O., Stura E. A., Johnson D. L., Mideleton S. A., Mulcaht L. S., Wrighton N. C., Dower W. J., Jolliffe L. K., Wilson I. A. 1996. Functional mimicry of a protein hormone by a peptide against the EPO receptor complex at 2.8 Å. *Science.* 273 : 464—471.

Magzoub M., Gräslund A. 2004. Cell-penetrating peptides: small from inception to application. *Quart. Rev. Biophys.* 37 : 147—195.

Matsuzaki K., Harada M., Funkoshi S., Fuji N., Miyajimo K. 1991. Physicochemical determinants for the interaction of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. *Biochim. biophys. acta.* 1063 : 162—170.

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

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

Papo N., Shai Y. 2003. New latic peptides based on D, L amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared with normal cells. *Biochemistry.* 42 : 9346—9354.

Rousselle C., Smirnova M., Clair P., Lefauconnier J.-M., Chavanien A., Calos B., Scherrman J.-M., Tamsamani J. 2001. Enhanced delivery of doxorubicin into the brain via a peptide-vector-mediated strategy: saturation kinetics and specificity. *Pharmacology.* 296 : 124—131.

Russel J. H., Keiler K. C. 2007. Peptide signals encode protein localization. *J. Bacteriol.* 189 : 7581—7585.

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

Waldmann T. A. 2003. Immunotherapy: past, present and future. *Nature Med.* 9 : 269—277.

Wang Z., Wang G. 2004. APD: the antimicrobial peptide database. *Nucl. Acids Res.* 32 : 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 20 IX 2010

REGULATION OF PROLIFERATION AND VIABILITY OF TUMOR CELLS *IN VITRO* BY ALLOFERON-1 AND ALLOSTATIN-1

V. A. Pleskach,¹ I. V. Kozhucharova,¹ L. L. Alekseenko,¹ N. M. Pleskach,¹ V. B. Anikin,² S. I. Chernysh³

¹ Institute of Cytology RAS, ² Institute of Influenza RAMS, St. Petersburg,
and ³ Biological Institute of St. Petersburg State University;
e-mail: gmdmk@mail.cytspb.rssi.ru

Alloferon-1 (AF) and allostatin-1 (AS) cytotoxic and growth modulating activities have been compared. AF is cationic oligopeptide isolated from the hemolymph of experimentally infected blow fly *Calliphora vicina*. AS is AF synthetic analog that differs from the parent molecule in two amino acids substituted. It has been shown that both AF and AS have no direct cytotoxic activity in concentrations ranging from $1 \cdot 10^{-5}$ to 10 $\mu\text{g/ml}$, however, the peptides demonstrated significant effect on tumor cells proliferation *in vitro*. Both peptides displayed growth modulating activity in mass cell cultures and boosted growth inhibiting activity of doxorubicin in the course of P388D1 cells cloning, although AS potentated doxorubicin cytostatic activity to a greater extent. Similarly, AS boosted anti-clonogenic activity of cyclophosphamide applied in a subthreshold concentration. Experiments with peptide-fluorescein complex have demonstrated that AF and AS belong to the group of cell-penetrating peptides. Moreover, the experiments displayed AF ability to bind with chromosomes.

Key words: cell line, proliferative activity, peptide, growth modulating effect, clonogenicity, fluorescence.