



УДК 57.021,615.28,615.099.092

## ПЕПТИД HLDF-6-АМИД СНИЖАЕТ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ДОКСОРУБИЦИНА И АКТИВИРУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ ИНФУЗОРИЙ *Tetrahymena pyriformis*

© 2020 г. О. Ю. Соколов<sup>\*,#</sup>, А. Н. Позднякова<sup>\*</sup>, Е. Г. Черемных<sup>\*</sup>,  
Е. В. Васильева<sup>\*\*\*</sup>, Н. В. Кост<sup>\*</sup>, Ю. А. Золотарев<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>ФГБНУ Научный центр психического здоровья РАН, Россия, 115552 Москва, Каширское шоссе, 34

<sup>\*\*</sup>Институт молекулярной генетики РАН, Россия, 119334 Москва, пл. Курчатова, 4

<sup>\*\*\*</sup>ФГБНУ Институт фармакологии им. В.В. Закусова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Балтийская, 9

Поступила в редакцию 09.04.2020 г.

После доработки 16.04.2020 г.

Принята к публикации 29.04.2020 г.

Механизмы ряда биологических эффектов пептидного нейропротектора HLDF-6-амида до сих пор неизвестны и требуют дополнительного изучения. Нами впервые установлено, что HLDF-6-амид дозозависимо (1–100 мкМ) стимулирует пролиферацию инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, причем антагонист глутаматных NMDA-рецепторов MK801 частично блокирует данный эффект. Показано, что введение пептида (12.5–100 мкМ) дозозависимо снижает цитотоксический и цитостатический эффект доксорубицина (25 мкМ) на инфузориях. Радио-лигандный анализ выявил наличие мест специфического связывания [<sup>3</sup>H] Ас-HLDF-6-амида на клеточных мембранах коры головного мозга крыс, что свидетельствует о рецепторном механизме действия пептида. Таким образом, впервые показано, что HLDF-6-амид стимулирует пролиферацию и обладает цитопротекторными свойствами, что может лежать в основе его ранозаживляющего, ноотропного и нейропротекторного действия. Установлено участие глутаматной системы, в частности ионотропных NMDA-рецепторов, в реализации его эффектов.

**Ключевые слова:** пептид HLDF-6-амид, доксорубицин, MK 801, инфузории *Tetrahymena pyriformis*

**DOI:** 10.31857/S0132342320060329

### ВВЕДЕНИЕ

Гексапептид Thr-Gly-Glu-Asn-His-Arg, фрагмент 41–46 фактора дифференцировки лейкоцитов (HLDF), полностью воспроизводит действие полноразмерного фактора, обладает широким спектром ноотропной и нейропротективной активности. На основе модификаций молекулы HLDF-6 разрабатываются пептидные препараты для профилактики и лечения цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваний [1–3]. Недавно были выявлены другие лечебные эффекты одного из них, пептида HLDF-6-амида. Так в эксперименте на животных было показано, что HLDF-6-амид в составе геля ускоряет эпителизацию раневой поверхности ожога, причем в минимальной концентрации [4].

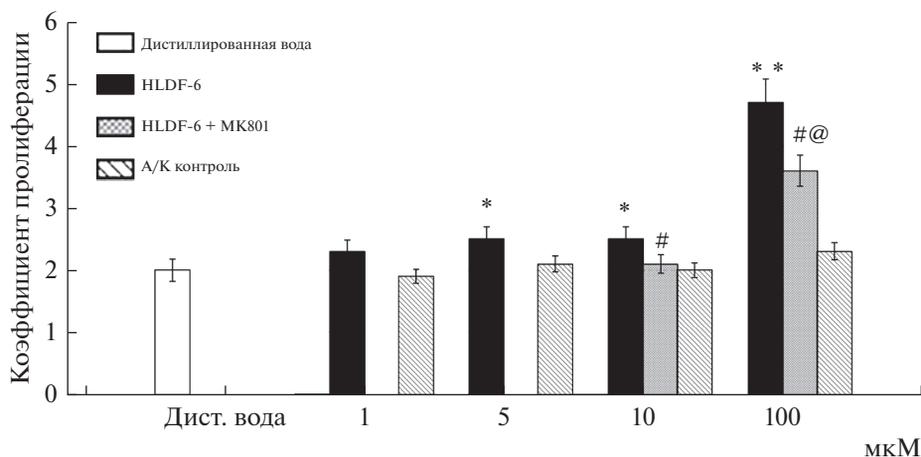
Целью исследования была проверка гипотезы о том, что в основе указанных биологических эффектов пептида может лежать его пролиферативная активность. В работе использовались инфузории рода *Tetrahymena*, широко применяющиеся в фармакологии на первом этапе оценки безопасности и/или эффективности различных соединений. Преимуществом инфузорий перед другими тест-организмами является высокая интенсивность обмена веществ, быстрый рост, возможность работы со стерильной культурой и стандартным штаммом [5]. Изучали влияние HLDF-6-амида на рост культуры в присутствии цитостатика доксорубицина и в норме. Молекулярный механизм обнаруженных эффектов пептида изучали с точки зрения его взаимодействия с глутаматными рецепторами.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Была изучена способность HLDF-6-амида влиять на рост числа инфузорий в суточной культуре. Было установлено, что введение пептида в культуру клеток дозозависимо стимулировало их раз-

Сокращения: HLDF-фактор дифференцировки лейкоцитов; HLDF-6 – пептидный фрагмент <sub>41</sub>TGENHR<sub>46</sub> фактора HLDF; HLDF-6-амид – амидная форма пептида HLDF-6.

<sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (903) 535-95-26; эл. почта: oleg-sokolov@yandex.ru).



**Рис. 1.** Проллиферативный эффект пептида HLDF-6-амида. Данные трех независимых экспериментов представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $m \pm SEM$ ). \*, \*\* – Проллиферативный эффект HLDF-6-амида, отличие от дистиллированной воды и аминокислотного контроля,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ . # – Ингибирующий эффект МК 801, отличие от HLDF-6-амида,  $p < 0.05$ . @ – Отличие от дистиллированной воды и аминокислотного контроля,  $p < 0.05$ .

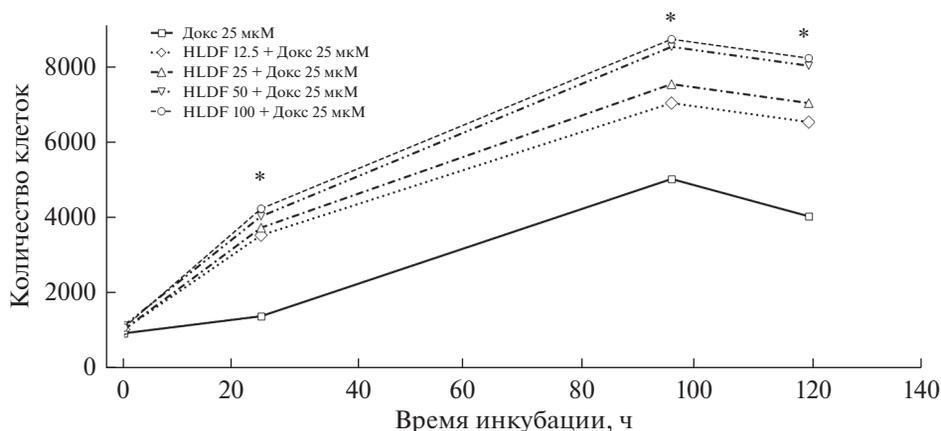
множение (рис. 1). Пептид оказывал статистически значимый ( $p < 0.05$ ) пролиферативный эффект уже в концентрации 5 мкМ. Наибольший эффект ( $p < 0.01$ ) логично наблюдался при его максимальной концентрации 100 мкМ. Эквивалентный аминокислотный контроль во всех использованных концентрациях (1–100 мкМ) данным эффектом не обладал и показывал значения, сходные с показателем, наблюдаемым при культивировании клеток в дистиллированной воде. Таким образом, можно сделать вывод о специфическом действии молекулы пептида, а не простом “подкормочном” эффекте. Обнаруженный нами пролиферативный эффект пептида хорошо согласуется с данными о влиянии нативного HLDF-6 на синтез белка в культуре гепатоцитов [6].

Предполагается, что функциональной мишенью специфического фармакологического эффекта пептида HLDF-6-амида являются глутаматные NMDA-рецепторы [3]. Мы исследовали возможность участия глутаматной системы в обнаруженной пролиферативной активности пептида на инфузориях. Было показано, что введение в культуру селективного антагониста NMDA-рецепторов МК801 в концентрации 10 мкМ значимо снижало ( $p < 0.05$ ) пролиферативный эффект 100 мкМ пептида, а в концентрации 1 мкМ МК801 полностью блокировал ( $p < 0.05$ ) эффект 10 мкМ HLDF-6-амида (рис. 1). Полученные результаты хорошо согласуются с данными об увеличении плотности именно NMDA-рецепторов в гиппокампе мозга мышей Balb/c при хроническом интраназальном введении HLDF-6-амида [3].

Ранее было показано, что нативный HLDF-6 снижает цитотоксическое действие фактора некроза опухоли на клетках линии HL-60 [7]. С другой стороны, он обладает выраженным цитотокси-

ческим действием на клетки лимфолейкоза P-388 и стимулирует цитотоксическую активность фагоцитов в отношении этих клеток [8]. Мы исследовали способность HLDF-6-амида снижать токсическое действие синтетического цитостатика доксорубина (25 мкМ) в культуре инфузорий при 24, 96 и 120 часовой инкубации. Было установлено, что пептид во всем диапазоне использованных концентраций (12.5–100 мкМ) и во всех трех временных точках достоверно ( $p < 0.05$ ) снижал эффект цитостатика при совместном введении. Показатели клеточного роста были значительно выше, чем в пробах, содержащих только доксорубин (рис. 2). Эффект пептида был дозозависимым. Наиболее ярко он проявлялся на 96 и 120 часовой культуре. Известно, что действие доксорубина на клетку связано как с индукцией оксидативного стресса (острый цитотоксический эффект), так и с ингибированием ДНК-топоизомеразы (хронический цитостатический эффект). Адаптация инфузорий к острому оксидативному стрессу обычно наступает в первые часы инкубации, далее все определяет их способность противостоять мутагенному действию цитостатика. Мы показали, что HLDF-6-амид значительно увеличивает адаптационные возможности инфузорий. Это свойство пептида открывает широкие перспективы его использования в комплексной, с цитостатиками, химиотерапии опухолей для снижения их побочных токсических эффектов на здоровые клетки организма.

Чтобы подтвердить возможность рецепторных механизмов в эффектах HLDF-6-амида, было проведено пилотное радио-рецепторное исследование с использованием меченого третиим ацетиламинного производного пептида [ $^3H$ ] Ас-HLDF-6-амида. Оно подтвердило наличие мест специфического связывания пептида на клеточных мембранах



**Рис. 2.** Влияние совместного введения HLDF-6-амида и доксорубина на пролиферацию инфузорий. \* — Антитоксический эффект HLDF-6-амида, отличие от доксорубина,  $p < 0.05$ .

коры головного мозга крыс. Анализ вытеснения показал сходную аффинность ацетиламидной и амидной форм пептида ( $IC_{50}$  0.75 и 0.53 мкМ соответственно), в то время как сродство нативного HLDF-6 к предполагаемым рецепторам было вдвое и втрое ниже ( $IC_{50}$  1.83 мкМ). Следует признать, что для окончательных выводов необходима дальнейшая характеристика сайтов рецепторного связывания с помощью селективных лигандов. Однако уже сейчас можно говорить о существовании рецепторных механизмов в биологических эффектах HLDF-6-амида.

Впервые на клетках эукариот *Tetrahymena pyriformis* было показано, что HLDF-6-амид стимулирует пролиферацию и обладает цитопротекторными свойствами, что может лежать в основе его ранозаживляющего, ноотропного и нейропротективного действия. Установлено участие NMDA-глутаматной системы, в частности ионотропных NMDA-рецепторов, в реализации его эффектов. Показана возможность получения эффективной оценки действия различных препаратов на живую клетку с помощью инфузорий.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали: доксорубин, МК 801, аминокислоты (Sigma). Пептиды HLDF-6, HLDF-6-NH<sub>2</sub>, Ac-HLDF-6-NH<sub>2</sub>, [<sup>3</sup>H] Ac-HLDF-6-NH<sub>2</sub> были получены в ИМГ РАН, как описано ранее [10].

### Автоматизированный биотест на инфузориях

Инфузории *Tetrahymena pyriformis* были получены из собственной коллекции штаммов ФГБНУ НЦПЗ. Измерения проводили на автоматическом анализаторе БиоЛаТ (ГОСТ 31674-2012). Оценивали общее количество подвижных клеток в пробах и его изменение под действием различных концентраций исследуемых веществ: HLDF-6-амид (1–100 мкМ), МК801 (1, 10 мкМ), доксору-

бицин (25 мкМ). В качестве контроля использовали дистиллированную воду и эквимольную смесь аминокислот, входящих в состав HLDF-6.

### Радио-рецепторный анализ

Инкубационная смесь 0.5 мл, 50 мМ Tris-HCl, pH 7.1, содержала 50 мкл 10 нМ [<sup>3</sup>H] Ac-HLDF-6-NH<sub>2</sub> (22 Кюри/ммоль), 200 мкл суспензии мембран коры головного мозга крыс, 50 мкл немеченых производных HLDF-6 в разных концентрациях (1 нМ–1 мМ). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 20 мМ немеченого Ac-HLDF-6-NH<sub>2</sub>. Специфическое связывание составляло 75–80%.

### Статистическая обработка данных

Использовали программу Statistica 6.0. Стандартные отклонения и статистическую значимость отличий вычисляли по *t*-критерию Стьюдента. Все измерения проводились в триплетах. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего ( $m \pm SEM$ ).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Костянян И.А., Жохов С.С., Сторожева З.И., Прошин А.Т., Сурина Е.А., Бабиченко И.И.,

- Шерстнев В.В., Липкин В.М.* // Биоорган. химия. 2006. Т. 32. С. 399–407. [*Kostanian I.A., Zhokhov S.S., Storozheva Z.I., Proshin A.T., Surina E.A., Babichenko I.I., Sherstnev V.V., Lipkin V.M.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2006. V. 32. P. 360–367.]  
<https://doi.org/10.1134/S1068162006040066>
2. *Костанян И.А., Сторожьева З.И., Семенова Н.А., Липкин В.М.* // Докл. акад. наук. 2009. Т. 428, С. 565–569. [*Kostanyan I.A., Storozheva Z.I., Semenova N.A., Lipkin V.M.* // Dokl. Biol. Sci. 2009. V. 428. P. 418–422.]  
<https://doi.org/10.1134/s0012496609050081>
  3. *Zolotarev Y.A., Kovalev G.I., Kost N.V., Voevodina M.E., Sokolov O.Y., Dadayan A.K., Kondrakhin E.A., Vasileva E.V., Bogachuk A.P., Azev V.N., Lipkin V.M., Myasoedov N.F.* // J. Psychopharmacol. 2016. V. 30 P. 922–935.  
<https://doi.org/10.1177/0269881116660705>
  4. *Зиновьев Е.В., Цыган В.Н., Арцимович И.В., Асадулаев М.С., Панях М.Б., Зубов В.В., Лукьянов С.А., Костяков Д.В., Жилин А.А., Лопатин И.М., Уманская А.А., Османов К.Ф., Кравцов С.Н., Апчел А.В., Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Дадаян К.А.* // Вестник российской военно-медицинской академии. 2018. Т. 63. С. 148–153.
  5. *Gromovykh T.I., Demchenko A.G., Cheremnykh E.G., Feldman N.B., Lyundup A.V., Balyasin M.V., Kiselyova O.I., Gromovykh P.S., Lutsenko S.V.* // Int. J. Nanotec. 2019. V. 16. P. 87–99.  
<https://doi.org/10.1504/IJNT.2019.102395>
  6. *Бродский В.Я., Золотарев Ю.А., Мальченко Л.А., Андреева Л.А., Лазарев Д.С., Буторина Н.Н., Козик В.С., Мясоедов Н.Ф.* // Онтогенез. 2019. Т. 50. С. 340–346.  
<https://doi.org/10.1134/S0475145019050033>
  7. *Гибанова Н.В., Ракутина Т.В., Липкин В.М., Костанян И.А.* // Биохимия. 2007. Т. 72. С. 49–60.  
<https://doi.org/10.1134/s0006297907010063>
  8. *Даниленко Е.Д., Сысоева Г.М., Устименко С.Ю., Сажуков В.В., Костанян И.А., Масычева В.И.* // Вопр. онкологии. 2009. Т. 55. № 6. С. 757–760.
  9. *Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Кост Н.В., Воеводи-на М.Э., Соколов О.Ю., Козик В.С., Шрам С.И., Азев В.Н., Бочаров Э.В., Богачук А.П., Липкин В.М., Мясоедов Н.Ф.* // Биоорган. химия. 2015. Т. 41. С. 644–656. [*Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Kost N.V., Voevodina M.E., Sokolov O.Y., Kozik V.S., Shram S.I., Bocharov E.V., Bogachuk A.P., Azev V.N., Lipkin V.M., Myasoedov N.F.* // Russ. J. Bioorg. Chem., 2015. V. 41. P. 578–589.]  
<https://doi.org/10.1134/S1068162015060205>

## HLDF-6-Amide Reduces the Cytotoxicity of Doxorubicin and Activates the Proliferation of *Tetrahymena pyriformis*

O. Yu. Sokolov<sup>\*,\*</sup>, A. N. Pozdnyakova<sup>\*</sup>, E. G. Cheremnykh<sup>\*</sup>, E. V. Vasileva<sup>\*\*\*</sup>,  
N. V. Kost<sup>\*</sup>, and Y. A. Zolotarev<sup>\*\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (903) 535-95-26; e-mail: oleg-sokolov@yandex.ru

<sup>\*</sup>Mental Health Research Center of RAS, Kashirskoe sh. 34, Moscow, 115552 Russia

<sup>\*\*</sup>Institute of Molecular Genetics of RAS, pl. Kurchatova 2, Moscow, 119334 Russia

<sup>\*\*\*</sup>Zakusov Institute of Pharmacology, ul. Baltiyskaya 8, Moscow, 119334 Russia

The mechanisms of a number of biological effects of the peptide neuroprotector HLDF-6-amide are still unknown and require further study. It was found that HLDF-6-amide dose-dependent (1–100  $\mu$ M) stimulates the proliferation of *Tetrahymena pyriformis* infusoria, and the MK801 glutamate NMDA receptor antagonist partially blocks this effect. The introduction of a peptide (12.5–100  $\mu$ M) reduces the cytotoxic and cytostatic effect of doxorubicin (25 microns) on infusoria. Radio-ligand analysis revealed the presence of specific binding sites of [<sup>3</sup>H]Ac-HLDF-6-amide on the cell membranes of the rat brain cortex, which indicates the receptor mechanism of action of the peptide. Thus, it was shown for the first time that HLDF-6-amide stimulates proliferation and has cytoprotective properties, which may underlie its wound-healing, nootropic and neuroprotective effects. The participation of the glutamate system, in particular ionotropic NMDA receptors, in these effects was established.

*Keywords:* peptide HLDF-6-amide, doxorubicin, MK 801, *Tetrahymena pyriformis* infusoria