

ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ФРАГМЕНТА ФАКТОРА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ HLDF В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

А. В. Батенева¹, О. А. Бабенко¹, Е. Д. Даниленко¹, В. Д. Порываев¹,
Н. Н. Карпышев¹, Е. П. Гончарова¹, И. А. Костанян², В. И. Масычева¹

На первичной культуре клеток лимфосаркомы мышей исследовали цитотоксические свойства липосомальной формы пептида HLDF6. Показано, что липосомальный HLDF6 обладал способностью ингибировать пролиферацию и усиливать гибель клеток лимфосаркомы штаммов LS и RLS, различающихся по чувствительности к цитостатическим препаратам. Эффект препарата обусловлен его антипролиферативным и апоптогенным воздействием на клетки. Свободный HLDF6 проявлял меньшую цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток.

Ключевые слова: фрагмент фактора дифференцировки клеточной линии HL-60 HLDF6, липосомальная форма, лимфосаркома штаммов LS и RLS, цитотоксическая активность, митоз, апоптоз

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, патогенез многих злокачественных опухолей связан с отклонениями в нормальном процессе клеточной дифференцировки. В связи с этим одним из перспективных направлений разработки средств противоопухолевой терапии является поиск препаратов, вызывающих дифференцировку опухолевых клеток.

В лаборатории белков гормональной регуляции Института биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова (Москва) из культуральной среды клеток промиелоцитарного лейкоза человека HL-60 был выделен белок HLDF с молекулярной массой 8,2 кДа, который вызывал дифференцировку клеток по гранулоцитарному пути [4, 8]. В структуре пептида был обнаружен шестичленный фрагмент HLDF6 (TGENHR), который воспроизводил способность полноразмерного фактора индуцировать дифференцировку и ингибировать пролиферацию клеток HL-60, проявлял противоопухолевую активность на модели перевивной NSO миеломы мышей [5], что позволяет рассматривать данный пептид как перспективное противоопухолевое средство.

Существенным ограничением для применения противоопухолевых препаратов пептидной природы является их быстрая деградация в организме и неселективный характер накопления опухолевыми клетками. Решение этой проблемы может быть обеспечено

использованием систем направленной доставки (например, липосомальной природы), способных обеспечить защиту пептидов от действия протеаз, изменить их фармакокинетику и биораспределение [1, 6].

В связи с этим целью данной работы являлось получение липосомальной формы пептида HLDF6 и оценка ее цитотоксической активности в сравнении со свободным пептидом в культуре клеток двух штаммов лимфосаркомы, различающихся по чувствительности к действию алкилирующих препаратов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пептид HLDF6 синтезировали методом активированных эфиров в растворе по авторской методике. Оценку чистоты и подтверждение заданной структуры пептида проводили методами ВЭЖХ, аминокислотного анализа, масс-спектрометрии. Для включения гидрофильного HLDF6 в липидный бислой липосом пептид синтезировали в виде липофильного конъюгата с жирной кислотой путем модификации его N-концевого остатка N-гидроксисукцинимидным эфиром пальмитиновой кислоты. Для приготовления препаратов липосом со встроенным пептидом спиртовую смесь яичного лецитина и липофильного пептидного конъюгата высушивали под вакуумом в виде липидной пленки, эмульгировали водой и проводили последовательную экструзию эмульсии под высоким давлением через гидрофобные фильтры (трековые мембраны) с уменьшающимся диаметром пор (от 0,8 до 0,1 мкм) [6]. При таком методе пептид экспонируется как на внешней, так и на внутренней поверхностях липидного бислоя. В результате были получены однородные липосомы размером около 150 нм. Применение метода фильтрации дополнительно обеспечивало стерилизацию препарата.

¹ ФГУН “Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, п.г.т. Кольцово, Новосибирская область, 630559;

² Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

В качестве экспериментальных моделей использовали клетки двух штаммов лимфосаркомы, LS и RLS, полученные из Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Опухолевые клетки поддерживали путем внутрибрюшинных переживок самцам мышей линии СВА. Через пять суток после внутрибрюшинной трансплантации клетки асцита отмывали раствором Хенкса и вносили в 24-луночные культуральные планшеты ($2,5 \cdot 10^5$ клеток в лунку). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 5 % сыворотки новорожденных телят, 10 мМ HEPES и 40 мкг/мл гентамицина сульфата при температуре 37 °С, 5 % CO₂ и 85 % влажности.

Препараты вносили в лунки планшетов одновременно с опухолевыми клетками. Диапазон исследуемых концентраций липосомального пептида (ЛП) для клеток LS составлял 0,1; 1 и 10 мкг пептида/мл. В качестве препаратов сравнения использовали свободный HLDF6 (0,1; 1 и 10 мкг/мл) и препарат “пустых” липосом в концентрациях, эквивалентных их содержанию в ЛП (2,33; 23,3 и 233 мкг/мл по лецитину). Отрицательным контролем служили интактные клетки, положительным — клетки, обработанные цитостатиком алкераном в концентрациях 0,1 и 1 мкг/мл.

Исследования на культуре клеток лимфосаркомы RLS проводили аналогичным образом. В лунки с опухолевыми клетками пептиды вносили в дозах 1, 10 и 100 мкг/мл. Препарат “пустых” липосом использовали в концентрациях 20, 200 и 2000 мкг/мл (по лецитину). Алкеран добавляли в концентрациях 1 и 10 мкг/мл.

Через 24, 48 и 72 ч от начала культивирования подсчитывали общее количество клеток в лунках, определяли число погибших клеток по окрашиванию 0,2 % раствором трипанового синего. Параллельно подсчитывали процентное содержание клеток, находящихся в состоянии митоза и апоптоза, в мазках, окрашенных по методу Нохта-Максимова (смесь красителей азур II — эозин Н). Подсчет числа клеток в состоянии митоза и апоптоза проводили с помощью светооптического микроскопа Axioskop 40 при анализе 250 клеток. Признаками митоза считали образование веретена деления, расхождение хромосом к противоположным полюсам и деление тела клетки. Проявлением апоптоза в клетках считали каріопикноз, блеббинг (выпячивание ядерной мембраны), распад ядер с появлением плотных частиц хроматина и вакуолизацию цитоплазмы клеток.

Исследование способности липосомального и свободного пептида проникать через клеточную мембрану проводили на клетках лимфосаркомы LS с использованием препаратов, меченных флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ). Препараты в среду инкубации вносили в концентрации 250 мкг/мл (по пептиду). В качестве контроля использовали ФИТЦ в концентрации, эквивалентной его содержанию в препаратах —

150 мкг/мл. Через 24, 48 и 72 ч лунки просматривали под люминесцентным микроскопом Olympus.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета статистических программ Statgraphics Plus, ver. 5.0.1. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По данным, полученным авторами работ [3, 7] на мышцах-опухоленосителях, клетки лимфосаркомы LS отличаются высокой чувствительностью к воздействию циклофосфана и некоторых других алкилирующих агентов, а основным механизмом торможения роста опухоли является апоптоз. Штамм лимфосаркомы RLS, напротив, отличается резистентностью к химиотерапии и устойчивостью к индукции апоптоза [2].

Аналогичные закономерности были обнаружены в ходе исследований, проведенных в культуре клеток этих штаммов лимфосаркомы. Так, показано, что внесение алкерана в концентрации 1 мкг/мл в среду культивирования клеток штамма LS приводило к торможению прироста опухолевых клеток и повышению их гибели (в 4 и 9,3 раза, соответственно, по сравнению с контрольными показателями; 48 ч культивирования). Цитотоксический эффект алкерана в отношении клеток лимфосаркомы RLS, сравнимый по интенсивности с его эффектом на клетках LS, наблюдался в значительно более высокой концентрации, 10 мкг/мл, что свидетельствует о сниженной чувствительности этого штамма к цитостатику.

Инкубация клеток лимфосаркомы LS в среде, содержащей пептид HLDF6, хотя и не приводила к статистически значимому изменению общего количества и числа погибших клеток, но снижала число митозов (во всех использованных концентрациях; 48 ч культивирования, рис. 1) и повышала количество клеток в состоянии апоптоза (1 мкг/мл, 72 ч). Действие препарата “пустых” липосом на клетки этой линии было аналогично эффекту свободного пептида (рис. 1). Эти результаты согласуются с ранее полученными данными о том, что пептид HLDF6 увеличивает подвижность липидных молекул клеточной мембраны и тем самым изменяет аффинность связывания с клеточной поверхностью цитокинов, вовлеченных в процессы пролиферации и дифференцировки [5].

Культивирование клеток лимфосаркомы LS с ЛП в максимальной из использованных концентраций (10 мкг/мл) уже к концу первых суток приводило к выраженному ингибированию пролиферации, что проявлялось в резком снижении общего количества клеток (в 3,6 раза) и увеличении числа погибших клеток (в 4,7 раза). Эффект торможения сохранялся до конца эксперимента. Препарат вызывал повышение числа апоптозов (через 24 и 48 ч от начала культивирования) и уменьшение числа митозов (через 48 ч), более выраженное, чем после инкубации клеток со свободным

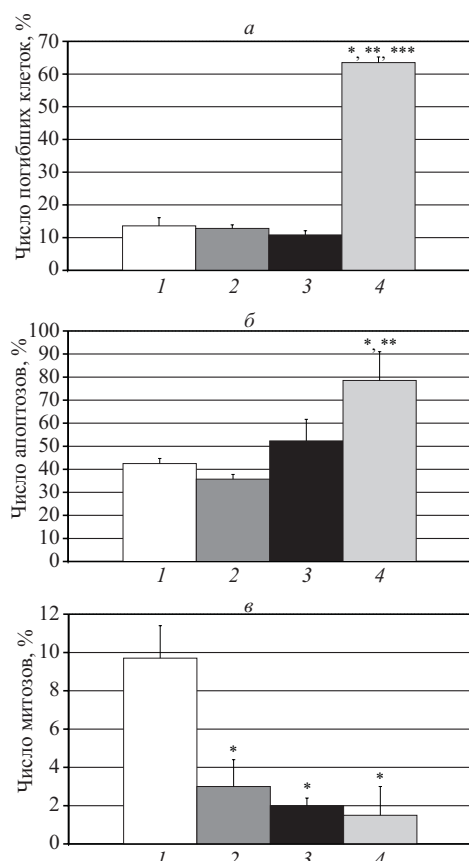


Рис. 1. Влияние липосомального пептида HLDF6 в сравнении с его компонентами на количество погибших клеток (а), апоптозов (б) и митозов (в) в культуре клеток лимфосаркомы LS через 48 ч культивирования.

1 — отрицательный контроль (интактные клетки); 2 — свободный HLDF6 (10 мкг/мл); 3 — “пустые” липосомы (233 мкг/мл); 4 — липосомальный HLDF6 (10 мкг/мл). Здесь и на рис. 2 различия достоверны ($p < 0,05$) по отношению: * — к отрицательному контролю, ** — к показателям в лунках с добавлением свободного HLDF6, *** — к показателям в лунках с добавлением препарата “пустых” липосом.

пептидом (рис. 1). Снижение концентрации ЛП в среде культивирования приводило к исчезновению цитотоксического эффекта.

Результатом воздействия пептида HLDF6 на клетки штамма лимфосаркомы RLS также, как и штамма LS, являлось увеличение числа апоптозных клеток (в 1,4 и 1,5 раза, через 48 и 72 ч, соответственно) и снижение количества митозов (в 2,4 раза, 72 ч), хотя на клетках RLS для проявления эффекта препарата требовались его более высокие концентрации (100 мкг/мл).

Препарат “пустых” липосом в дозе, эквивалентной их содержанию в ЛП (2000 мкг/мл по лецитину), вызывал снижение общего числа клеток и индукцию апоптоза, не приводя к усилению клеточной гибели. По-видимому, антипролиферативные и апоптогенные свойства “пустых” липосом, которые были обнаружены на обоих штаммах лимфосаркомы, могут быть обусловлены их способностью связываться с плазматической мембраной клеток, вызывая ее модификацию [6],

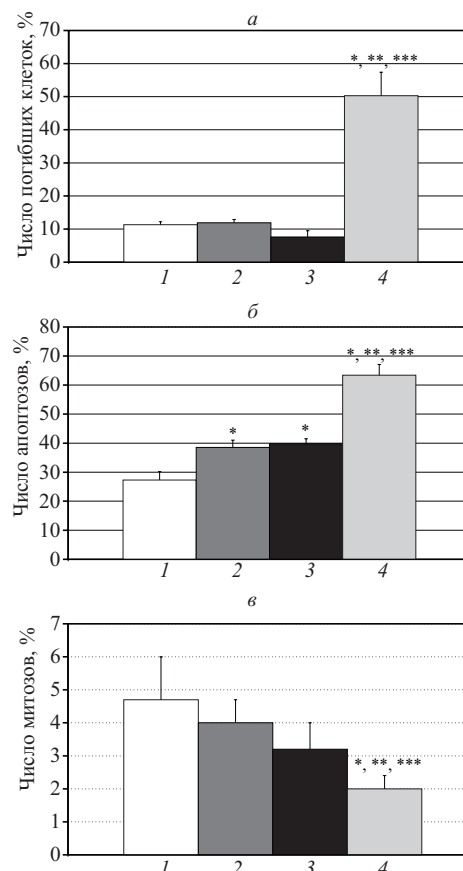


Рис. 2. Влияние липосомального пептида HLDF6 в сравнении с его компонентами на количество погибших клеток (а), апоптозов (б) и митозов (в) в культуре клеток лимфосаркомы RLS через 48 ч культивирования.

1 — отрицательный контроль; 2 — свободный HLDF6 (100 мкг/мл); 3 — “пустые” липосомы (2000 мкг/мл); 4 — липосомальный HLDF6 (100 мкг/мл).

Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

и оказывать тем самым опосредованное воздействие на процессы клеточной жизнедеятельности.

ЛП обладал более выраженной цитотоксической активностью в отношении клеток RLS по сравнению со свободным пептидом и липосомами, что проявлялось в стабильном и значительном по величине изменении всех тестируемых показателей. Общее количество клеток в течение двух суток культивирования под действием препарата в концентрации 100 мкг/мл снижалось в 11,7 раза, число погибших клеток возрастало в 4,5 раза (рис. 2). Процентное содержание апоптозов на протяжении всего эксперимента более чем в 2 раза превышало данный показатель в контрольных лунках. Начиная со вторых суток культивирования, в лунках, куда вносили ЛП, отмечали прогрессирующее снижение митотической активности клеток (с 240 % через 48 ч до 430 % через 72 ч от начала культивирования). При этом следует отметить, что, как и на клетках лимфосаркомы LS, более низкие концентрации препарата не влияли на рост клеток RLS.

Иными словами, как свободный, так и липосомальный HLDF6 обладали цитотоксической и апоптогенной активностью в отношении штаммов лимфосаркомы с разной цитостатической устойчивостью, хотя для достижения эффекта в случае штамма RLS требовались концентрации препарата, в 10 раз большие, чем для LS. Введение пептида в состав липосом приводило к усилению его противоопухолевой активности.

Изучение способности HLDF6 к транспорту через мембрану клеток лимфосаркомы LS с использованием пептида, меченного ФИТЦ, показало, что свободный HLDF6 не проникал в опухолевые клетки (рис. 3). Следовательно, его способность индуцировать апоптоз и ингибировать митотические процессы, скорее всего, реализуется с поверхности клетки. В отличие от свободного HLDF6, ЛП накапливался в клетках лимфосаркомы. Эти данные позволяют предположить, что более выраженные цитотоксические свойства липосомального HLDF6 могут быть обусловлены его проникновением через клеточную мембрану и активацией внутриклеточных механизмов ингибирования пролиферации и индукции апоптоза.

Наличие у липосомального HLDF6 противоопухолевой активности в отношении клеток лимфосаркомы разных штаммов, в том числе лекарственно устойчивого, может представлять интерес с точки зрения разработки на его основе нового лекарственного препарата для лечения гемобластозов.

ВЫВОДЫ

1. Липосомальная форма пептида HLDF6, шестичленного фрагмента фактора дифференцировки HLDF, обладает способностью тормозить рост и усиливать гибель клеток лимфосаркомы штаммов LS и RLS.

2. Цитотоксический эффект липосомального HLDF6 обусловлен его антимиотическим и апоптогенным воздействием на опухолевые клетки и зависит от чувствительности штамма опухолевых клеток к химиопрепаратам.

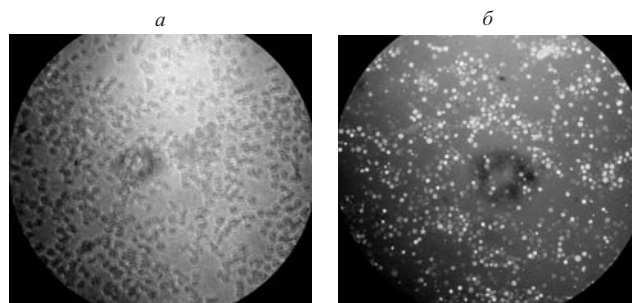


Рис. 3. Асцитные клетки лимфосаркомы LS после суток инкубации с пептидом HLDF6, меченным ФИТЦ, $\times 140$: а — свободный пептид; б — липосомальная форма HLDF6.

3. Липосомальный пептид проявляет более выраженные токсические свойства в отношении клеток лимфосаркомы, в сравнении со свободным пептидом, что может быть связано с его внутриклеточной доставкой в опухолевые клетки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Международного научно-технического центра (проект ISTC №2641).

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Грегориадис, А. Аллисон (ред.), *Липосомы в биологических системах*, Медицина, Москва (1983).
2. А. Ю. Гришанова, В. И. Каледин, Т. В. Зуева и др., *Вопр. биомед. химии*, **49**, 2 – 7 (2003).
3. В. И. Каледин, В. П. Николин, Т. А. Агеева и др., *Вопр. онкол.*, **46**, 588 – 593 (2000).
4. И. А. Костанян, М. В. Астапова, Е. В. Старовойтова, *Биоорг. химия*, **21**(4), 243 – 248 (1995).
5. И. А. Костанян, М. В. Астапова, Е. В. Наволоцкая и др., *Биоорг. химия*, **26**(7), 505 – 511 (2000).
6. Л. Б. Марголис, Л. Д. Бергельсон, *Липосомы и их взаимодействие с клетками*, Наука, Москва (1986).
7. V. I. Kaledin, V. P. Nikolin, O. A. Timofeeva, et al., *Experimental Oncology*, **24**, 55 – 58 (2002).
8. I. A. Kostanyan, M. V. Astapova, E. V. Starovoytova, et al., *FEBS Lett.*, **356**, 327 – 329 (1994).

Поступила 02.09.08

ANTITUMOR PROPERTIES OF A LIPOSOMAL FORM OF HLDF DIFFERENTIATION FACTOR FRAGMENT IN CELL CULTURE

A. V. Bateneva¹, O. A. Babenko¹, E. D. Danilenko¹, V. D. Poryvaev¹, N. N. Karpyshev¹, E. P. Goncharova¹, I. A. Kostanyan², and V. I. Masycheva¹

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 630559, Russia

² Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997, Russia

Cytotoxic properties of a liposomal form of the HLDF6 hexapeptide, representing an HL-60 cell differentiation factor fragment, have been studied on a murine primary lymphosarcoma cell culture. It is established that the liposomal HLDF6 peptide is capable of inhibiting proliferation and enhancing death of the cells of both LS and RLS lymphosarcoma strains distinguished by their sensitivity to cytostatic agents. The effect of the preparation is determined by its antiproliferative and apoptogenic actions on the cells. Free HLDF6 peptide showed a lower cytotoxic activity with respect to the tumor cells as compared to the liposomal preparation.

Key words: HL-60 cell differentiation factor, HLDF6 hexapeptide, liposomal form, LS and RLS lymphosarcoma strains, cytotoxic activity, mitosis, apoptosis