

УДК 546.100.0УДК 2.3:547.15/17

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПЕПТИДНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ДОКСОРУБИЦИНА НА *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

© 2021 г. А. Н. Позднякова^{1,*}, Е. Г. Черемных¹, О. Ю. Соколов¹, Н. В. Кост¹, К. В. Шевченко², В. П. Шевченко², И. Ю. Нагаев², Л. А. Андреева², академик РАН Н. Ф. Мясоедов²

Поступило 05.12.2020 г.
После доработки 31.12.2020 г.
Принято к публикации 03.01.2021 г.

Исследована цитотоксичность доксорубина (Dox) и его пептидных модификаций Z-Gly-Pro-Dox и Вос-Gly-Pro-Dox. В качестве тест системы использовали *Tetrahymena pyriformis*, что позволило за счет короткого жизненного цикла и высокой скорости размножения инфузорий проследить их реакцию на воздействие токсикантов на протяжении нескольких поколений. Установлено, что пептидная модификация молекулы Dox заметно снижает ее цитотоксические и цитостатические свойства. Модификация Z-Gly-Pro-Dox обладает меньшим цитотоксическим и цитостатическим эффектом по сравнению с Вос-Gly-Pro-Dox. При определении способности препаратов (в концентрации 100 мкМ) препятствовать бактериальному загрязнению проб, показано, что наименьшая степень зарастания была зафиксирована в присутствии Dox (опт.ед. $_{600nm}$ 81.1). Вос-Gly-Pro-Dox также обладал бактериостатическим действием, но менее выраженным (опт.ед. $_{600nm}$ 93.8). Степень зарастания в присутствии Z-Gly-Pro-Dox была близка к показателям дистиллированной воды. Полученные на инфузориях результаты не противоречили данным, полученным при проведении подобных же исследований на мышах.

Ключевые слова: доксорубин, пептидные производные, *Tetrahymena Pyriformis*, цитотоксический эффект, цитостатический эффект

DOI: 10.31857/S2686738921020220

Создание селективных лекарственных средств является актуальнейшей задачей современной онкофармакологии. Часто эффективные препараты вызывают угрожающие жизни осложнения, что существенно ограничивает их применение. Так, для одного из этих препаратов – доксорубина (Dox), была выявлена значительная кардиотоксичность [1–3]. При использовании этого препарата отмечены случаи, когда у больных проявлялись симптомы тяжелой сердечной недостаточности, что могло приводить к смерти пациента [1].

Предполагается, что побочные эффекты таких цитостатиков, как Dox, могут быть снижены путем пептидной модификации их молекул. Из-

вестно, что быстро делящиеся опухолевые клетки экспрессируют большее количество пептидаз, в частности, пролиназу, чем нормальные. В нормальных клетках гидролиз амидной связи у пролинсодержащих пептидов маловероятен. Используя эту особенность, можно создавать низкотоксичные пептидные модификации цитостатиков, устойчивые в здоровых тканях и превращающиеся в активные токсичные формы непосредственно в клетках опухоли. Действительно, в работе [4] было показано, что пептиды, содержащие Dox, могут подвергаться в опухолевых клетках протеолизу по связи Pro-Dox. Для исследований в настоящей работе были использованы Z-Gly-Pro-Dox и Вос-Gly-Pro-Dox, синтезированные с использованием известного набора приемов [5, 6].

Цель работы – сравнительный анализ цитотоксичности Dox и его пептидных модификаций Z-Gly-Pro-Dox и Вос-Gly-Pro-Dox на водных простейших *Tetrahymena pyriformis*.

Инфузории *Tetrahymena pyriformis* широко применяются в фармакологии, медицине, ветеринарии и экологии на первом этапе оценки безопасности и/или эффективности различных соединений. *Tetrahymena pyriformis* имеют линейные размеры 50 × 30 мкм и являются удобными объек-

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение Научный центр психического здоровья (НЦПЗ), Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” (НИИ “Курчатовский институт” – ИМГ), Москва, Россия

*e-mail: fanianastya@gmail.com

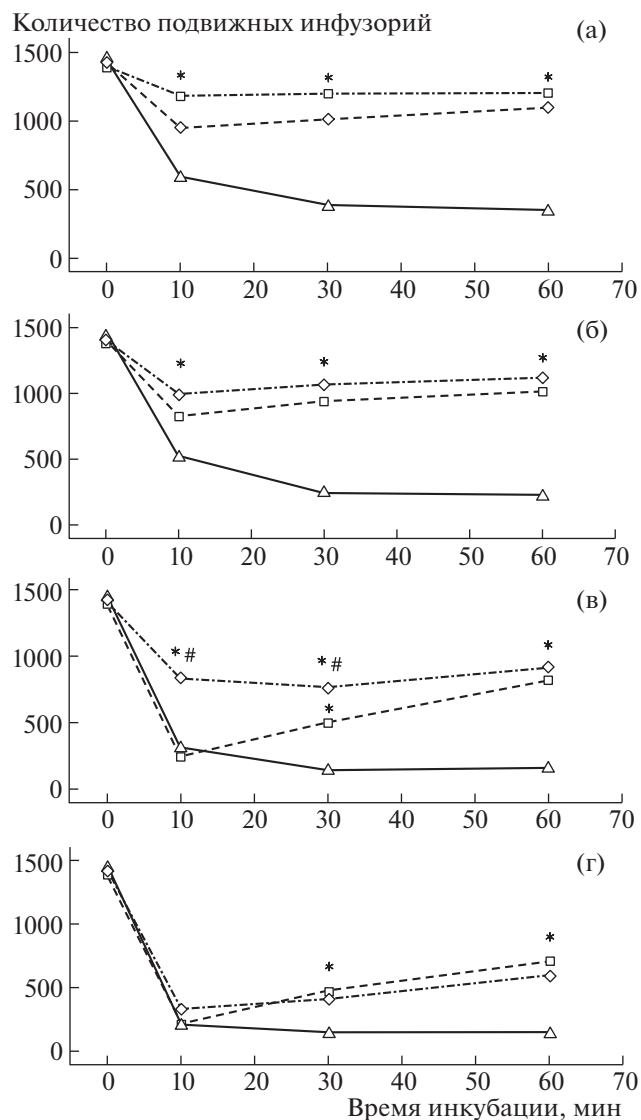


Рис. 1. Острый цитотоксический эффект доксорубина и его модификаций (▲ – Dox; ■ – Z-Gly-Pro-Dox; ◆ – Вос-Gly-Pro-Dox; * – отличие от доксорубина, $p < 0.05$; # – отличие от Z-Gly-Pro-Dox, $p < 0.05$): а – при использовании 12.5 мкМ вещества; б – 25 мкМ; в – 50 мкМ; г – 100 мкМ.

тами для исследований ввиду простой постановки опытов, основой которых является подсчет клеток, а также низкой стоимости культивирования, короткого жизненного цикла, позволяющего за счет высокой скорости размножения проследить их реакцию на воздействие токсиканта в ряду поколений за короткое время (6–96 ч). При этом показано, что результаты, полученные на инфузориях, имеют высокий коэффициент корреляции с данными подобных же исследований на мышах, крысах, кроликах и других животных [7–9].

Особенно ценным для данной работы было то, что с помощью инфузорий возможна оценка цитотоксичности не только водорастворимых соединений, но и соединений, растворимых в воде с

добавлением дополнительного растворителя. Пробы не растворимых в воде препаратов Z-Gly-Pro-Dox и Вос-Gly-Pro-Dox получены в виде водных эмульсий с добавлением диметилсульфоксида (ДМСО). Z-Gly-Pro-Dox и Вос-Gly-Pro-Dox растворяли в 3% водном растворе ДМСО. Предварительные эксперименты показали, что ДМСО в указанной концентрации не оказывал никакого влияния на жизнедеятельность инфузорий.

Инфузии *Tetrahymena pyriformis* из собственной коллекции штаммов ФГБНУ НЦПЗ культивировались при стабильной температуре 25°C на стерильной 4-х компонентной среде: 1% пептон, 0.5% глюкоза, 0.2% дрожжевой экстракт, 0.1% хлористый натрий. На четвертые сутки после пересева на свежую среду инфузии использовали

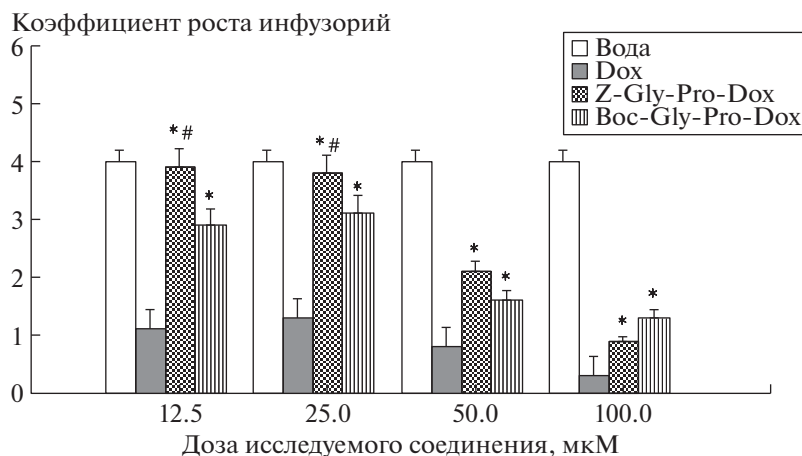


Рис. 2. Цитостатический эффект доксорубина и его модификаций в зависимости от дозы вещества (* — отличие от доксорубина, $p < 0.05$, # — отличие от Z-Gly-Pro-Dox, $p < 0.05$) (по оси ординат — коэффициент роста инфузорий; по оси абсцисс — доза исследуемого соединения, мкМ).

в опытах. Оценивали общее количество подвижных клеток в пробах при действии различных концентраций исследуемых веществ: от 10 до 100 мкМ. Каждую пробу оценивали в 3 повторениях, результат усредняли. В работе использовали автоматический анализатор БиоЛаТ (ГОСТ 31674-2012). Прибор БиоЛаТ [10] представляет собой оптико-механическое устройство, позволяющее вводить изображения лунок (емкости диаметром 10 и 15 мм) в компьютер и обрабатывать с помощью специальной программы AutoCiliata. Особенностью алгоритма подсчета клеток является оценка только подвижных объектов, которая основана на свойствах инфузорий этого вида — непрерывно двигаться, т.е. если организм жив — он движется. Общий алгоритм биотестирования состоит в циклическом подсчете инфузорий во всех лунках с пробами. На основании произведенных подсчетов инфузорий по каждой пробе вычисляли относительные количества выживших тест-организмов и проводили сравнительный анализ токсичности Dox и его модификаций Z-Gly-Pro-Dox и Boc-Gly-Pro-Dox.

На первом этапе проводили два вида тестирования:

— острый опыт (10–30–60 минут), определяли концентрации препаратов, при которых происходит гибель и/или снижение подвижности 50% клеток в опыте (EC50) по сравнению с контролем — дистиллированной водой (цитотоксический эффект).

— хронический опыт (24 ч), определяли концентрации препаратов, при которых происходит снижение прироста популяции на 50% по сравнению с контролем (IC50) — дистиллированной водой (цитостатический эффект).

В остром опыте было установлено, что все три препарата дозозависимо снижают подвижность инфузорий. Самой высокой цитотоксичностью обладал немодифицированный Dox ($EC_{50} < 10$ мкМ), наименьшей Z-Gly-Pro-Dox ($50 < EC_{50} < 100$ мкМ), Boc-Gly-Pro-Dox занимал промежуточное положение ($25 < EC_{50} < 50$ мкМ) (рис. 1).

Интересно отметить, что клетки реагировали на введение Z-Gly-Pro-Dox и Boc-Gly-Pro-Dox резким снижением подвижности (точка 10 мин), которая затем частично восстанавливалась. Эффект был дозозависимым. Для немодифицированного Dox он не отмечался.

В суточном тесте ингибирование роста популяции клеток инфузорий, по сравнению с контролем (дистиллированной водой), наибольшим цитостатическим эффектом обладал Dox ($IC_{50} < 10$ мкМ), соответствующий эффект Boc-Gly-Pro-Dox и Z-Gly-Pro-Dox оказался достоверно ниже ($IC_{50} 38 \pm 4$ и 50 ± 5 мкМ соответственно) (рис. 2).

На втором этапе изучали отдаленные цитотоксические эффекты препаратов. На пятые сутки культивирования определяли способность препаратов (в концентрации 100 мкМ) препятствовать спонтанному бактериальному загрязнению проб. По данным сравнительной турбидиметрии, наименьшая степень зарастания была зафиксирована в присутствии нативного Dox (опт.ед._{600nm} 81.1). Boc-Gly-Pro-Dox также обладал бактериостатическим действием, но менее выраженным (опт.ед._{600nm} 93.8). Степень зарастания в присутствии Z-Gly-Pro-Dox была близка к показателям дистиллированной воды (опт.ед._{600nm} 105.2 и 111.2 соответственно).

На заключительном этапе изучили токсичность исследуемых веществ на мышах. Беспород-

Таблица 1. Определение токсичности доксорубина и его пептидных модификаций на мышах

Соединение	Доза, мкг/кг	Количество животных			LD50, мкг/кг
		Всего	Выжило	Погибло	
Dox	15	4	3	1	16 ± 2
	25	4	0	4	
	50	4	0	4	
Z-Gly-Pro-Dox	15	4	4	0	>50
	25	4	4	0	
	50	4	3	1	
Woc-Gly-Pro-Dox	15	4	4	0	>50
	25	4	4	0	
	50	4	3	1	

ным самцам (возраст 6 мес, вес 20–25 г) однократно вводили внутривенно Dox и его пептидные модификации. Затем в течение 14 дней фиксировали гибель животных (табл. 1). Дозу LD50 рассчитывали по методу Кернера. Тестирование на мышах подтвердило низкую токсичность Woc-Gly-Pro-Dox и Z-Gly-Pro-Dox. LD50 нативного Dox составило 16 ± 2 мкг/кг, а для обеих модификаций LD50 оказалось выше 50 мкг/кг.

В результате проведенного исследования впервые при использовании тест-системы, основанной на использовании инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, показано, что пептидная модификация молекулы антрациклинового антибиотика Dox снижает ее цитотоксические и цитостатические свойства. При этом можно отметить заранее не предсказуемый дозозависимый эффект, наблюдаемый при добавлении пептидных производных Dox, который заключался на первом этапе в резком снижении подвижности клеток, которая затем частично восстанавливалась (для немодифицированного Dox он не отмечался). Это, по-видимому, может указывать на то, что со временем при взаимодействии производных Dox с клетками инфузорий *Tetrahymena pyriformis* за счет пептидной компоненты действие Dox-фрагмента может быть выведено из процессов, влияющих на подвижность клеток и тем самым частично восстановить их жизнедеятельность. Модификация Z-Gly-Pro-Dox обладает меньшим цитотоксическим и цитостатическим эффектом по сравнению с Woc-Gly-Pro-Dox. Но, так как эти различия не велики, а как показали исследования [11], синтезированный Woc-Gly-Pro-Dox легче проникает через искусственные мембраны и более устойчив к действию пролиназы из клеток флавобактерий (Sigma-Aldrich, США), чем Z-Gly-Pro-Dox, оба этих соединения являются перспективными кандидатами для дальнейших исследований на опухолевых клетках. На это же указывают и данные,

полученные и при изучении токсичности исследуемых веществ на теплокровных животных.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводились в соответствии с руководящими принципами Директивы ЕС 2010/63/EU. Протокол исследования был одобрен Этической комиссией НЦПЗ (протокол № 26 от 16.12.2019 г.)

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работу проводили по плановому госзаданию № АААА-А19-119022590101-1, по теме: “Исследование структуры и функции природных пептидов с целью создания новых лекарственных препаратов, оптимизация структуры кандидатных пептидов, разработка схем синтеза, включая получение меченных дейтерием и тритием физиологически активных соединений”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семенова А.И. // Практическая онкология. 2009. Т. 10. № 3. С. 168–176.
2. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., et al. // Pharmacol. Rev. 2004. V. 56. № 2. P. 185–229.
3. Octavia Y., Tocchetti C.G., Gabrielson K.L., et al. // J. Mol. Cell. Cardiol. 2012. V. 52. № 6. P. 1213–1225.
4. Huang S., Fang R., Xu J., et al. // J. Drug Targeting. 2011. V. 19. № 7. P. 487–496.
5. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. Москва, изд-во Мир 1965.
6. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Химический синтез пептидов. Киев, изд-во Наукова Думка. 1992.
7. Богдан А.С. // Вопросы питания. 1983. № 1. С. 62–65.
8. Богдан А.С. // Материалы объединенного Пленума Республиканской проблемной комиссии по гигиене и Правления научного общества гигиенистов.

- Под ред. Филонова В.П., Соколова С.М. Минск: Республиканский центр гигиены и эпидемиологии. 2000. С. 106–107.
9. Зарицкая Е.В., Полозова Е.В., Богачева А.С. // Гигиена и санитария. 2017. Т. 96. № 7. С. 671–674.
10. Черемных Е.Г., Покатаев А.С., Гридунова В.Н. Прибор для биологических исследований // Патент РФ № 2361913, 2009. Бюл. № 20.
11. Шевченко В.П., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., и др. // Доклады академии Наук. 2019. Т. 488. № 6. С. 682–684.

ASSESSMENT OF THE CYTOTOXICITY OF PEPTIDE MODIFICATIONS OF DOXORUBICIN ON *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

A. N. Pozdnyakova^{a, #}, E. G. Cheremnykh^a, O. Yu. Sokolov^a, N. V. Kost^a, K. V. Shevchenko^b, V. P. Shevchenko^b, I. Yu. Nagaev^b, L. A. Andreeva^b, and Academician of the RAS N. F. Myasoedov^b

^a The Mental Health Research Center (MHRC), Moscow, Russian Federation

^b Institute of Molecular Genetics of National Research Centre “Kurchatov Institute” (NRC “Kurchatov Institute” – IMG), Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: fanianastya@gmail.com

The cytotoxicity of doxorubicin (Dox) and its peptide modifications Z-Gly-Pro-Dox and Boc-Gly-Pro-Dox were studied. *Tetrahymena pyriformis* was used as a test system, which made it possible, due to the short life cycle and high reproduction rate of ciliates, to trace their response to the effects of toxicants over several generations. It has been found that peptide modification of the Dox molecule markedly reduces its cytotoxic and cytostatic properties. The Z-Gly-Pro-Dox modification has less cytotoxic and cytostatic effect compared to Boc-Gly-Pro-Dox. When determining the ability of drugs (at a concentration of 100 μM) to prevent bacterial contamination of samples, it was shown that the smallest degree of overgrowth was recorded in the presence of Dox ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ 81.1). Boc-Gly-Pro-Dox also had a bacteriostatic effect, but less pronounced ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ 93.8). The degree of overgrowth in the presence of Z-Gly-Pro-Dox was close to that of distilled water. The results obtained on ciliates did not contradict the data obtained when conducting similar studies on mice.

Keywords: doxorubicin, doxorubicin derivatives, *Tetrahymena Pyriformis*, cytotoxic effect, cytostatic effect