



Исследование противоопухолевых эффектов гидролизата плаценты человека на культурах клеток РС-3, ОАВ-42, ВТ-474

О.А. Громова^{✉1}, М.В. Филимонова^{2,3}, И.Ю. Торшин¹, Д.Е. Фролова^{1,4}

¹ФИЦ «Информатика и управление» Российской академии наук, Москва, Россия;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Москва, Россия;

³Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия;

⁴ФГБОУ ВО «Ивановский государственный медицинский университет» Минздрава России, Иваново, Россия

Аннотация

Цель. Исследовать противоопухолевые эффекты пептидов гидролизата плаценты человека (ГПЧ) на трех гормонозависимых линиях клеток человека: аденокарциномы простаты, карциномы молочной железы и рака яичника посредством метаболического анализа культур клеток.

Материалы и методы. Проведены оценки эффектов ГПЧ на опухолевые и контрольные линии опухолевых клеток. Этапы исследования: (А) *de novo* секвенирование пептидов методом коллизионно-индуцированной диссоциации масс-спектрометрии; (Б) выявление пептидов с противоопухолевыми свойствами; (В) экспертный анализ полученных списков пептидов.

Результаты. Показаны дозозависимые цитотоксические эффекты ГПЧ на трех опухолевых клеточных линиях: РС-3 (аденокарциномы простаты человека), ОАВ-42 (рака яичника человека), ВТ-474 (карциномы молочной железы человека) и получены значения констант IC50 (1,3–2,8 мг/мл). Представлены результаты анализа пептидной фракции ГПЧ, указывающие на более чем 70 пептидов с противоопухолевыми свойствами в составе данного ГПЧ (ингибиторы киназ: митоген-активируемых протеинкиназ, киназы ингибитора нуклеарного фактора каппа-би, АКТ серин/треонинкиназы 1, Z-протеинкиназы С, киназы 4, ассоциированной с рецептором интерлейкина-1 и циклинзависимой киназы 1).

Заключение. Результаты исследования позволяют утверждать не только онкобезопасность применения ГПЧ при терапии, но и слабые противоопухолевые эффекты данного ГПЧ, проявляющиеся при высоких концентрациях.

Ключевые слова: молекулярная фармакология, плацентарная терапия, постгеномная медицина, биоинформатика, онкобезопасность препаратов

Для цитирования: Громова О.А., Филимонова М.В., Торшин И.Ю., Фролова Д.Е. Исследование противоопухолевых эффектов гидролизата плаценты человека на культурах клеток РС-3, ОАВ-42, ВТ-474. Терапевтический архив. 2024;96(3): .

DOI: 10.26442/00403660.2024.03.202624

© ООО «КОНСИЛИУМ МЕДИКУМ», 2024 г.

ORIGINAL ARTICLE

Study of antitumor effects of human placenta hydrolysate on PC-3, OAW-42, BT-474 cell cultures

Olga A. Gromova^{✉1}, Marina V. Filimonova^{2,3}, Ivan Yu. Torshin¹, Daria E. Frolova^{1,4}

¹Computer Science and Control of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

²National Medical Research Radiological Centre, Moscow, Russia;

³Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Centre, Obninsk, Russia;

⁴Ivanovo State Medical University, Ivanovo, Russia

Abstract

Aim. To investigate the antitumor effects of human placenta hydrolysate (HPH) peptides on three hormone-dependent human cell lines: prostate adenocarcinoma, breast carcinoma, and ovarian cancer by metabolic analysis of cell cultures.

Materials and methods. The effect of HPH on tumor and control tumor cell lines was evaluated. Study stages: (A) *de novo* peptide sequencing by collision-induced dissociation mass spectrometry; (B) detection of peptides with anti-tumor properties; (C) expert analysis of the obtained lists of peptides.

Results. Dose-dependent cytotoxic effects of HPH on three tumor cell lines are shown: PC-3 (human prostate adenocarcinomas), OAW-42 (human ovarian cancer), BT-474 (human breast carcinomas), and IC50 constants (1.3–2.8 mg/ml) were obtained. The analysis of the HPH peptide fraction showed more than 70 peptides with antitumor properties in the composition of this HPH, including kinase inhibitors: mitogen-activated protein kinases, kappa-bi nuclear factor inhibitor kinase, AKT serine/threonine kinase 1, protein kinase C zeta, interleukin-1 receptor-associated kinase 4 and cyclin-dependent kinase 1.

Conclusion. The results of the study indicate not only the oncological safety of the HPH used in therapy but also the mild antitumor effects of this HPH at high concentrations.

Keywords: molecular pharmacology, placental therapy, postgenomic medicine, bioinformatics, oncological safety of drugs

For citation: Gromova OA, Filimonova MV, Torshin IYu, Frolova DE. Study of antitumor effects of human placenta hydrolysate on PC-3, OAW-42, BT-474 cell cultures. Terapevticheskii Arkhiv (Ter. Arkh.). 2024;96(3): . DOI: 10.26442/00403660.2024.03.202624

Информация об авторах / Information about the authors

[✉]Громова Ольга Алексеевна – д-р мед. наук, проф., вед. науч. сотр. ФИЦ ИУ РАН. E-mail: unesco.gromova@gmail.com; ORCID: 0000-0002-7663-710X; Scopus ID: 7003589812

[✉]Olga A. Gromova. E-mail: unesco.gromova@gmail.com; ORCID: 0000-0002-7663-710X; Scopus ID: 7003589812

Филимонова Марина Владимировна – д-р мед. наук, д-р биол. наук, проф. ФГБУ «НМИЦ радиологии», зав. лаб. радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии». ORCID: 0000-0002-9690-4746

Marina V. Filimonova. ORCID: 0000-0002-9690-4746

Введение

Работы В.П. Филатова положили начало изучению и клиническому применению гидролизатов плаценты человека (ГПЧ). Исследования пептидного состава ГПЧ, экспериментальные и клинические исследования стандартизированных ГПЧ указывают на комплекс молекулярных механизмов воздействия ГПЧ при заболеваниях печени, атопическом дерматите, вирусных инфекциях (герпесвирусе, COVID-19, вирусном гепатите), болезнях перегрузки железом и синдроме хронической усталости [1].

Исследования состава и фармакологических свойств ГПЧ, равно как и других гидролизатов природного происхождения, – важное направление поиска перспективных молекул-кандидатов в современной фармакологии. При исследовании природных гидролизатов особое внимание безопасности их применения у пациентов с опухолевыми заболеваниями.

Имеющаяся информация о пептидном составе ГПЧ указывает на возможность использования стандартизированных ГПЧ при проведении химиотерапии. Дело в том, что подавляющее большинство химиотерапевтических средств проявляют высокую гепато- и нефротоксичность. В то же время в составе стандартизированного ГПЧ найдено 27 пептидов с гепатопротекторными свойствами, которые (1) поддерживают инозитолфосфатзависимые сигнальные пути гепатоцитов, (2) активируют целевые белки RARA, AMPK и (3) ингибируют целевые белки Notch1, GSK-3, PAK1 и TLR4, проявляя противовоспалительные, антифибротические, вазодилаторные, антиатеросклеротические и антидиабетические свойства [2].

В составе ГПЧ также найдены 48 нефропротекторных пептидов, биологически активных фрагментов нефропротекторных адреномедуллинов, пептидов-ингибиторов ряда киназ (FYN, SHN, WNK1/4, SGK1, IRAK4, ROCK1/2 и фиброгенных рецепторов PDGFR, TGFβ1/1), способствующих нефропротекции через снижение воспаления, антистрессорные эффекты и предотвращение фибротических изменений ткани почек [3].

Выводы, сделанные по результатам исследований пептидного состава ГПЧ, подтверждаются в эксперименте. В частности, ГПЧ снижает гепатотоксичность метотрексата – антифолатного препарата, используемого в химиотерапии. Самцам крыс перорально вводили метотрексат (5 мг/кг/сут, 2 нед). В группе опыта животные также получали подкожные инъекции ГПЧ (10 мг/кг/сут). Вызванное метотрексатом повышение уровней аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, общего билирубина и общего холестерина компенсировались применением ГПЧ. Стандартизированный ГПЧ также достоверно снижал окислительный стресс и воспаление (фактор некроза опухоли α, интерлейкин (ИЛ)-6 на фоне повышения уровней глутатиона, антиоксидантных ферментов каталазы и супероксиддисмутазы). Гистопатологический анализ также указал на сохранение архитектоники паренхимы печени при использовании ГПЧ [4].

Аналогичные результаты показало и исследование нефропротекторных свойств ГПЧ при использовании метотрексата. Инъекции ГПЧ нормализовали уровни мочевины, креатинина, Na⁺ и способствовали сохранению цитоархитектоники ткани почек [5].

Вопросы онкобезопасности включают необходимость исследования прямых про- или противоопухолевых эффектов препаратов [6]. Целью настоящего исследования являлась оценка противоопухолевых свойств стандартизированного ГПЧ Лаеннек посредством метаболического анализа культур клеток и анализа пептидного состава ГПЧ.

Материалы и методы

Данное исследование включило 2 компоненты: (1) оценку эффектов ГПЧ на опухолевых и контрольных клеточных линиях и (2) установление в составе ГПЧ пептидов с возможным противоопухолевым действием.

Препарат и дозировка

В качестве стандартизированного ГПЧ использован препарат Лаеннек (Japan Bio Products Co., Ltd., Япония). Рекомендуемые дозы для человека при внутримышечном введении составляют от 2 мл (112 мг сухого веса ГПЧ) до 6 мл (336 мг ГПЧ). Следовательно, терапевтические концентрации для человека (массой тела 70 кг) составляют от 1,6 мг/кг (0,0016 мг/мл) до 4,8 мг/кг (0,0048 мг/мл). При внутривенном введении используется до 10 мл (560 мг ГПЧ), так что терапевтическая концентрация составляет до 8 мг/кг (0,008 мг/мл).

Оценка эффектов ГПЧ на линиях клеток

Объектами исследования являлись 3 опухолевые клеточные линии: РС-3 (аденокарциномы простаты человека), ОАВ-42 (рака яичника человека), ВТ-474 (карциномы молочной железы человека) и иммортализованные фибробласты человека линии Фб-hTERT (контроль).

Клеточные линии рака яичников ОАВ-42 и аденокарциномы простаты РС-3 культивировали в питательной среде Игла, модифицированной по Дульбекко, карциномы молочной железы ВТ-474 – в питательной среде RPMI (Roswell Park Memorial Institute), CO₂-инкубаторе при температуре 37°C. Пересев всех клеточных линий производили каждые 3–4 сут.

Открепление клеток от субстрата из культурального флакона и инкубирование проводили по стандарту в течение 1 мин при комнатной температуре, добавляли 630–660 мкл 0,25% раствора трипсина и инкубировали при температуре 37°C в течение 3 мин (в случае клеточных линий ОАВ-42 и Фб-hTERT). Клеточную линию РС-3 с раствором Версена и трипсином инкубировали при температуре 37°C 30 мин. В случае клеточной линии ВТ-474 добавляли только раствор Версена и инкубировали 40 мин при температуре 37°C. Убедившись, что клетки готовы открепиться, переносили их из монослоя в суспензию в полной питательной среде, осуществляли подсчет клеток с использованием камеры Горяева.

Информация об авторах / Information about the authors

Торшин Иван Юрьевич – канд. физ.-мат. наук, канд. хим. наук, вед. науч. сотр. ФИЦ ИУ РАН. ORCID: 0000-0002-2659-7998; Scopus ID: 7003300274; WoS Researcher ID: C-7683-2018; SPIN-код: 1375-1114

Фролова Дарья Евгеньевна – канд. мед. наук, науч. сотр. ФИЦ «Информатика и управление» РАН, ассистент каф. онкологии, акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО ИГМУ. ORCID: 0000-0001-6207-5575; SPIN-код: 6668-6245

Ivan Yu. Torshin. ORCID: 0000-0002-2659-7998; Scopus ID: 7003300274; WoS Researcher ID: C-7683-2018; SPIN code: 1375-1114

Daria E. Frolova. ORCID: 0000-0001-6207-5575; SPIN code: 6668-6245

Таблица 1. Исследованные концентрации (мг/мл) препарата Лаеннек: дизайн 96-луночного микротитрационного планшета**Table 1. Laennec tested concentrations (mg/mL): 96-well microtiter plate design**

Концентрация	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Бланк	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0,04375	0,04375	0,04375	0,04375	0,04375	0,04375	0,04375	0,04375	0,04375	0,04375	0,04375	0,04375
C	0,0875	0,0875	0,0875	0,0875	0,0875	0,0875	0,0875	0,0875	0,0875	0,0875	0,0875	0,0875
D	0,175	0,175	0,175	0,175	0,175	0,175	0,175	0,175	0,175	0,175	0,175	0,175
E	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
F	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
G	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
H	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8

Для проведения микротитрационных тестов в лунки 96-луночных планшетов вносили 5000 клеток в 100 мкл культуральной среды, лунка A1 использовалась в качестве бланка, в нее помещали 100 мкл культуральной среды без содержания клеток (табл. 1). Затем клетки культивировали в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях в течение 24 ч для адгезии клеток к субстрату.

Методом раститровки с добавлением полной питательной среды готовили серию разведений исходного препарата так, чтобы получить растворы с последовательно снижающейся в 2 раза концентрацией. В контрольные лунки вносили 100 мкл полной питательной среды. После внесения исследуемых веществ клетки культивировали в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях в течение 72 ч. Краситель МТТ (желтый тетразол, восстанавливается в пурпурный формазан в живых клетках) растворяли в деионизированной воде (5 мг/мл) и вносили по 20 мкл раствора в лунку планшета и инкубировали в CO₂ 4 ч. В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл диметилсульфоксида, инкубировали 5–10 мин. Появившееся фиолетовое окрашивание детектировали на планшетном ридере при 492 нм (референтная длина волны – 630 нм).

Полученные результаты МТТ-тестов обрабатывали с помощью программного обеспечения Excel, Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США) и OriginPro 8. Рассчитывали процент жизнеспособных клеток в каждой лунке относительно положительного контроля, жизнеспособность которых принимали за 100%. Далее строили графики зависимости жизнеспособности клеток, выражаемые в процентах относительно десятичного логарифма концентраций добавленного препарата. Полученную кривую подвергли анализу Non-linear Curving Fitting – Logistic в программном обеспечении OriginPro 8 и рассчитывали концентрацию, при которой наблюдалось полумаксимальное ингибирование роста клеток (IC₅₀).

Исследование пептидного состава ГПЧ

Процесс экспериментального исследования пептидного состава Лаеннека состоял из 4 основных этапов: очистки препарата (отделения липидов, обессоливания), хроматографического разделения пептидов и определения масс-спектра пептидной фракции и *de novo* секвенирования пептидов.

Очистка препарата состояла в отделении липидной фракции методом Брокерхоффа–Даусона–Хюбшера [7].

Обессоливание пептидной фракции проводили на мини-колонке при помощи центрифугирования [8]. В ми-

ни-колонку 0,75×4,5 см (Rainin Instruments LLC, США) наливали 2 мл сефадекса G-10 (Pharmacia, Швеция), декантированного в смеси метанол : вода (85:15, v/v).

Хроматографическое разделение пептидов. Пептиды в составе выделенной пептидной фракции разделялись с использованием параллельной системы хроматографического разделения UltiMate™ 3000 RSLCnano-system (Dionex / Thermo Fisher Scientific, США).

Масс-спектрометрия с параллельной идентификацией пептидов. Масс-спектрометрический анализ осуществляли с использованием масс-спектрометра Q-Exactive (Thermo Scientific, Германия).

De novo секвенирование пептидов. *De novo* секвенирование пептидов проводилось на основании данных коллизионно-индуцированной диссоциации. Для получения аминокислотных последовательностей пептидов нами разработан комплекс программ DNVSEQP, основанный на применении теории топологического, метрического [9, 10], комбинаторного [11] подходов к анализу больших данных [12, 13] и на теории анализа хемографов [14, 15]. Для автоматической аннотации последовательностей пептидов использован биоинформационный метод анализа функциональных взаимосвязей, подробно описанный в монографии [16].

Результаты и обсуждение

В работе исследована цитотоксичность ГПЧ в отношении ряда иммортализованных и опухолевых клеточных культур: аденокарциномы простаты человека, рака яичника человека, карциномы молочной железы человека и линии Ф6-hTERT (иммортализованных фибробластов человека). ГПЧ использовали в широком диапазоне концентраций (см. табл. 1), что позволило оценить как динамику нарастания цитотоксичности, так и средние показатели IC₅₀. В результате обработки данных, считанных с планшетного ридера для опухолевых клеточных линий OAW-42, PC-3, BT-474 и иммортализованных фибробластов, построены общие графики выживаемости клеток в зависимости от концентрации ГПЧ (рис. 1).

Анализ результатов МТТ-теста показал, что исследованный ГПЧ реализует цитотоксическое действие в концентрациях 0,04375–2,8 мг/мл, которые значительно превышают используемые терапевтические концентрации (0,0016–0,0048 мг/мл, см. Методы). Самой устойчивой к ГПЧ Лаеннек оказалась клеточная линия OAW-42 (рака яичников): значение IC₅₀ было достаточно высоким – 2,8 мг/мл. На клеточной линии BT-474 (рака протока мо-

лочной железы) ГПЧ также показал невысокую цитотоксичность ($IC_{50}=2,16$ мг/мл; табл. 2). Наибольшую цитотоксичность (в рамках исследованных концентраций) ГПЧ оказал на клеточную линию рака простаты – PC-3 ($IC_{50}=1,27$ мг/мл).

Иммортализованные фибробласты Фб-hTERT характеризовались наименьшей устойчивостью к ГПЧ ($IC_{50}=0,704$ мг/мл). Данная линия клеток близка к фенотипу фибробластов, образующихся при патологических келоидных рубцах [17].

Идентификация пептидов с противоопухолевым действием в составе ГПЧ

В ходе исследования изучен состав образцов пептидной фракции ГПЧ при различных условиях эксперимента; проведено 20 параллельных протеомных экспериментов. Идентифицированные пептиды, которые могут проявлять противоопухолевые свойства, приведены в табл. 3 и 4. Данные пептиды являются ингибиторами киназ: митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), киназы ингибитора нуклеарного фактора каппа-би (IKK/NF-κB), АКТ серин/треонинкиназы 1 (АКТ1), Z-протеинкиназы С (PRKCSZ), киназы 4, ассоциированной с рецептором ИЛ-1 (IRAK4) и циклинзависимой киназы 1 (CDK1).

Ингибирование МАРК пептидами ГПЧ

Сигнальные пути МАРК контролируют транскрипцию генов, деление, выживание клеток. Сигнал по путям МАРК передается от рецепторов ростовых факторов, хемокинов, нейротрансмиттеров. Избыточная активация сигнальных путей МАРК инициирует рост опухолей и развитие хронического воспаления [18], поэтому ингибирование пептидами Лаеннека ряда МАРК1, МАРК3, МАРК8, МАРК9, МАРК10, МАРК14, МАРК2К2, МАРК2К3, МАРК2К4, МАРК2К6) может соответствовать противоопухолевому действию. В составе ГПЧ установлено наличие 17 пептидов – ингибиторов МАРК (табл. 3).

Пептид AASGPAG соответствует пептиду AASSPAG 24–30 белка SIRT1, в котором аминокислоты 26-серин и 27-серин фосфорилируются посредством киназы МАРК8 [19]. При этом замена остатка 27S→A значительно уменьшает фосфорилирование МАРК8 [20]. Пептид AASGPAG, связывающийся с активным центром МАРК8, будет специфически ингибировать активность этой киназы.

В составе ГПЧ Лаеннек найдено более 50 пептидов, которые характеризуются противовоспалительным действием. Многие из этих пептидов ингибируют сигнальный путь NF-κB (табл. 4).

Нарушение регуляции NF-κB вызывает воспаление, аутоиммунные заболевания и повышает риск опухолевых заболеваний [21]. NF-κB активируется целым рядом стимулов, включая цитокины (например, фактор некроза опухоли α и ИЛ-1) и факторы стресса (например, активные формы кислорода) [22]. В цитоплазме клетки NF-κB находится в неактивном состоянии в комплексе с ингибиторным белком IκB. Стимулирующий агент активизирует IKK-β, которая фосфорилирует IκB, что приводит к деградации IκB на протеасоме. В результате провоспалительный фактор – NF-κB – высвобождается, транслоцируется в ядро и активирует транскрипцию контролируемых им провоспалительных генов [23]. Ингибиторы киназы IKK-β изучаются как потенциальные средства для лечения опухолевых заболеваний [24].

Пептиды Лаеннека AYLSSPL (соответствует остаткам AYLSSPL 373-379 белка IKKβ), LFSPLAL (LSSPLAL 375-381 белка IKKβ) и SNPLAL (SSPLAL 376-381 белка

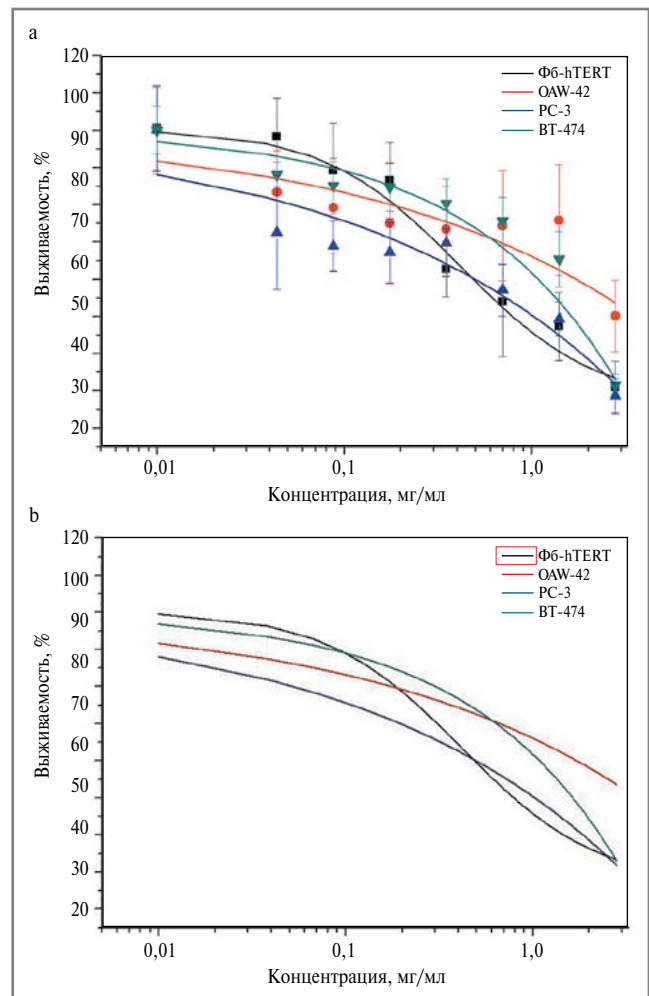


Рис. 1. Выживаемость опухолевых клеток и иммортализованных фибробластов в зависимости от концентрации ГПЧ: а – общий график выживаемости клеточных линий; б – общий график выживаемости клеточных линий (без дисперсии).

Fig. 1. Survival of tumor cells and immortalized fibroblasts vs concentration of human placenta hydrolysates: a – overall plot of cell line survival; b – overall plot of cell line survival (no dispersion).

Таблица 2. Показатели цитотоксических концентраций IC_{50} ГПЧ Лаеннек в отношении иммортализованных и опухолевых клеточных культур

Table 2. Cytotoxic concentrations of IC_{50} of human placenta hydrolysates (Laennec) for immortalized and tumor cell cultures

Клеточная линия	IC_{50} , мг/мл
Фб-hTERT	0,704
ОАВ-42	2,8
РС-3	1,27
ВТ-474	2,16

IKKβ) являются таргетными пептидами фермента IKK-β. IKK-β активирует провоспалительный транскрипционный фактор NF-κB, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла.

Таблица 3. Пептиды ГПЧ Лаеннек, ингибирующие MAPK**Table 3. Human placenta hydrolysate peptides (Laennec) inhibiting mitogen-activated protein kinases**

Пептид Лаеннека	Белок	Название белка	Таргетный белок
TGYV	MAPK14	Митоген-активируемая протеинкиназа 14	MAP2K3, 2K4/2K6
FVTD	NR2C1	Внутриядерный рецептор 2C1	MAPK1
TPLF	RSPH3	Белок RSPH3	MAPK1
VDGLGT	ELK1	Белок, содержащий домен ETS	MAPK1
LCQF	DUSP16	Протеинфосфатаза-16 двойной специфичности	MAPK1
TEYV	MAPK1	Митоген-активируемая протеинкиназа 1	MAPK1, MAP2K2
LLGPFS	GRB10	Белок-10 рецептора фактора роста	MAPK1/3
LPGPLNP	MYOCD	Миокардин	MAPK1/3
GPLYPT	MCTS1	Белок MCTS1	MAPK1/3
PGPLNP	MYOCD	Миокардин	MAPK1/3
PAGLPQ	RPS6KA5	Киназа α -5 рибосомального белка S6	MAPK1/3/14
PAPALPQ	RPS6KA5	Киназа α -5 рибосомального белка S6	MAPK1/3/14
NPLM	RPS6KA5	Киназа α -5 рибосомального белка S6	MAPK1/3/14
DAGVTP	APP	Белок β -амилоида A4	MAPK10
FVPPVV	SMAD2	Сигнальный белок SMAD2	MAPK3
AASGPAG	SIRT1	НАД-зависимая деацетилаза сиртуин-1	MAPK8
FGLGAP	NFATC4	Нуклеарный фактор-4 Т-клеток	MAPK8/9

Таблица 4. Примеры пептидов ГПЧ Лаеннек с противовоспалительным действием**Table 4. Examples of Laennec human placenta hydrolysate peptides with anti-inflammatory effects**

Пептид Лаеннека	Белок протеома	Фрагмент белка	Роль пептида
AYLSLSP	IKBKГ	AYLS-SP 373-378	Инактивация NF- κ B
LFSPAL	IKBKГ	LSSPLAL 375-381	Инактивация NF- κ B
SNPLAL	IKBKГ	SSPLAL 376-381	Инактивация NF- κ B
SENALVA	GRB10	SENSLVA 428-434	Ингибирование киназы AKT1
HVLEFAL	MAF1	HVLE-AL 54-59	Ингибирование киназы AKT1

В частности, пептид AYLSLSP соответствует пептиду AYLS-SP 373-378 белка IKBKG, в котором аминокислота 376-серин фосфорилируется киназой IKK- β [25]. IKK- β фосфорилирует ингибиторы NF- κ B, что приводит к деградации этих ингибиторов на протеасоме и активации NF- κ B. Пептид AYLSLSP, наряду с пептидами LFSPAL (соответствует пептиду LSSPLAL 375-381 того же белка) и SNPLAL (соответствует пептиду SSPLAL 376-381), будет ингибировать IKK- β и противодействовать активации NF- κ B.

Аналогичным образом действуют пептиды LFSPAL и SNPLAL. Пептид LFSPAL, найденный в составе препарата Лаеннек, соответствует аминокислотной последовательности LSSPLAL 375-381 белка IKBKG, в которой IKK- β фосфорилирует остаток ser-376 (LSSPLAL) [25]. Однако в последовательности пептида Лаеннека в соответствующей позиции серин заменен на фенилаланин (LFSPAL), поэ-

тому данный пептид является специфическим ингибитором IKK- β .

Известно, что в активации NF- κ B принимают участие ряд протеинкиназ, в том числе AKT/PKB, PKC/PRKCZ, PKD1, MAPK14, IKBKV/IKK- β и PDPK1. Определенные пептиды Лаеннека могут являться специфическими ингибиторами этих киназ. Так, *протеинкиназа AKT1/PKB* регулирует выживаемость клеток, ангиогенез, транскрипцию NF- κ B-зависимых генов. Фосфорилируя белок BAD, AKT1 стимулирует проапоптотическую активность этого белка. Пептид Лаеннека FAQPGL, который встречался в 83% исследованных образцов, соответствует остаткам 236-241 FSQPGL белка TBC1D1, в котором остаток серин-235 фосфорилируется AKT1 [26].

Протеинкиназа PKC/PRKCZ участвует в сигнальном пути фосфатидилинозитол-3-киназы PI3K и передаче сигналов от рецепторов ИЛ-1 через сигнальный путь NF- κ B [27]. В эндотелиальных клетках, обработанных в культуре окислителем пероксинитритом, протеинкиназа C фосфорилирует киназу STK11, что приводит к ингибированию передачи сигналов AKT1 и к усилению апоптоза эндотелиоцитов. Пептид GALLLHG (50% образцов) соответствует остаткам 10-16 GALLLRG белка STOML2, в котором остаток серин-17 фосфорилируется киназой PKC.

IRAK4, участвует в провоспалительных сигнальных путях Toll-подобных рецепторов (TLR) и рецепторов ИЛ-1. IRAK4 фосфорилирует белок IRAK1, тем самым стимулируя убиквитинирование этого белка. Затем убиквитинсвязывающий домен IKBKG объединяет комплексы IRAK1-MAP3K7 и TAK1-TRAF6, тем самым активируя IKK- α и IKK- β , *транслокацию и активацию NF- κ B* [28]. Пептид Лаеннека DDVLLGL соответствует фрагменту 99-105 DDVLEL белка MYD88, где расположенный слева аргинин-98 взаимодействует с IRAK4 и NF- κ B. Пептид LSLFL соответствует фрагменту 33-37 LSLFL белка MYD88, где серин-34 взаимодействует с NF- κ B и IRAK4 [29]. Таким образом, пептиды DDVLLGL и LSLFL могут тормозить воспаление и осуществлять нефропротек-

цию одновременно по двум механизмам: ингибирование IRAK1 и ингибирование NF-κB.

Ингибирование CDK1

В составе Лаеннека найдены многочисленные пептиды, ингибирующие CDK1 (ген CDK1). К этим пептидам относятся пептиды, схожие с фрагментами казеинкиназы Па (PGPLGPL, TRAPLG, PLGPAGS, LGGLAGS, PGASTPV), пептид QAAGPA, схожий с фрагментом протеинтирозинфосфатазы-1, пептидный фрагмент виментина (PGGLYA) и др. CDK1 играет ключевую роль в контроле пролиферации клеток посредством модуляции формирования centrosом, на которых происходит инициация деления клеток (митоза). Новый класс препаратов – ингибиторов CDK1 и других циклинзависимых киназ, изучен в доклинических и клинических испытаниях как противораковые лекарственные средства, блокирующие CDK для торможения неконтролируемой пролиферации клеток [30].

Например, пептид Лаеннека PGPLGPL соответствует пептидному фрагменту PSPLGPL 361-367 казеинкиназы Па. Биохимические данные показывают, что данный фрагмент казеинкиназы Па является сайтом специфического фосфорилирования циклинзависимой киназой, которая ковалентно присоединяет фосфатные группы к остаткам thr-360 ((T)PSPLGPL) и ser-362 (PSPLGPL) [31]. Отметим, что в пептиде Лаеннека PGPLGPL отсутствуют и треонин, и серин. Следовательно, данный пептид будет связываться с активным сайтом CDK1, по причине отсутствия подлежащих фосфорилированию остатков, будет являться конкурентным ингибитором фермента.

Пептид Лаеннека LGPLGG, соответствующий пептиду LGPLAG 364-369 белка CSNK2A1, расположен перед остатком серин-370, фосфорилируемым CDK1 [31]. Пептид Лаеннека RGLGPN, соответствующий пептиду RGLAPN 475-480 белка PRC1, расположен перед треонином-481, который фосфорилирует CDK1 и замена которого на аланин приводит к потере фосфорилирования. Пептид Лаеннека QGLVAE, соответствующий пептиду QGLVPE 68-73 белка DLGAP5, расположен после остатка серина-67, фосфорилируемого CDK1 [32]. Поскольку все перечисленные пептиды не содержат остатков серина/треонина в соответствующих позициях аминокислотной последовательности, они являются ингибиторами CDK1.

Заключение

В настоящее время проводится обширный цикл работ по изучению особенностей противоопухолевой и антиметастатической активности различных соединений и природных экстрактов. Важным элементом в этих исследованиях является экспериментальное изучение биохимической и фармакологической активности этих соединений

антиангиогенной и гипоксия-цитотоксической направленности, которое проводится с применением комплекса биохимических и радиометрических методов.

В данном исследовании представлены результаты исследования противоопухолевых свойств стандартизированного ГПЧ (ГПЧ Лаеннек, Japan Bio Products Co., Ltd., Япония). Установлен антипролиферативный эффект ГПЧ на трех гормонозависимых опухолевых клеточных линиях: РС-3 (аденокарциномы простаты человека), ОАВ-42 (рака яичника человека), ВТ-474 (карциномы молочной железы человека) и на фибробластах линии Фб-hTERT (фибробластах человека) и получены значения констант IC50 (1,3–2,8 мг/мл). Представлены результаты анализа пептидного состава, указывающие на противоопухолевые пептиды в данном ГПЧ (ингибиторы киназ: MAPK, IKK/NF-κB, CDK1). Проведенные исследования позволили оценить антинеопластический потенциал полифункциональных пептидов в составе изучаемого ГПЧ и обосновать перспективность их дальнейшей разработки в качестве новых противоопухолевых средств или для профилактики осложнений химио- и радиотерапии.

Благодарность. Работа выполнена с использованием инфраструктуры Центра коллективного пользования «Высокопроизводительные вычисления и большие данные» ФИЦ «Информатика и управление» РАН.

Gratitude. The work was carried out within the using the infrastructure of the Federal Research Center “Computer Science and Control” of the Russian Academy of Sciences.

Раскрытие интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Disclosure of interest. The authors declare that they have no competing interests.

Вклад авторов. Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработка концепции статьи, получение и анализ фактических данных, написание и редактирование текста статьи, проверка и утверждение текста статьи.

Authors' contribution. The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Авторы декларируют отсутствие внешнего финансирования для проведения исследования и публикации статьи.

Funding source. The authors declare that there is no external funding for the exploration and analysis work.

Список сокращений

ГПЧ – гидролизаты плаценты человека
ИЛ – интерлейкин
AKT1 – АКТ серин/треонинкиназа 1
CDK1 – циклинзависимая киназа 1

IKK/NF-κB – киназы ингибитора нуклеарного фактора каппа-би
IRAK4 – киназа 4, ассоциированная с рецептором интерлейкина-1
MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы
PRKCZ – Z-протеинкиназа C

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Громова О.А., Торшин И.Ю., Чучалин А.Г., Максимов В.А. Гидролизаты плаценты человека: от В.П. Филагова до наших дней. *Терапевтический архив*. 2022;94(3):434-41 [Gromova OA, Torshin IYu, Chuchalin AG, Maksimov VA. Human placenta hydrolysates: From V.P. Filatov to the present day. *Terapevticheskii Arkhiv (Ter. Arkh.)*. 2022;94(3):434-41 (in Russian)]. DOI:10.26442/00403660.2022.03.201408
2. Громова О.А., Торшин И.Ю., Тихонова О.В., Згода В.Г. Гепатопротекторные пептиды препарата Лаеннек. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2022;203(7):21-30 [Gromova OA, Torshin IYu, Zgoda VG, Tikhonova OV. Hepatoprotective peptides of the drug Laennec. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2022;203(7):21-30 (in Russian)]. DOI:10.31146/1682-8658-ecg-203-7-21-30

3. Громова О.А., Торшин И.Ю., Громов А.Н., Тихонова О.В. Нефропротекторные пептиды препарата Лаеннек® в контексте фармакотерапии нефрогепатометаболических нарушений. *Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2023;16(4):570-86 [Gromova OA, Torshin IYu, Gromov AN, Tikhonova OV. Nephroprotective peptides of Laennec® in the context of pharmacotherapy for nephro-hepato-metabolic disorders. *Farmakoekonomika. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*. 2023;16(4):570-86 (in Russian)]. DOI:10.17749/2070-4909/farmakoekonomika.2023.215
4. Ghoneum M, El-Gerbed MSA. Human placental extract ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via regulating antioxidative and anti-inflammatory responses. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2021;88(6):961-71. DOI:10.1007/s00280-021-04349-4
5. Mahran HA, Khedr YI, Gawaan YM, El-Gerbed MSA. Possible ameliorative effect of human placental extract on methotrexate-induced nephrotoxicity in albino rats. *JoBAZ*. 2022;83:39. DOI:10.1186/s41936-022-00302-w
6. Nurieva EV, Trofimova TP, Alexeev AA, et al. Synthesis and antihypotensive properties of 2-amino-2-thiazoline analogues with enhanced lipophilicity. *Mendelev Communications*. 2018;28(4):390-2. DOI:10.1016/j.mencom.2018.07.016
7. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975 [Keits M. Tekhnika lipidologii. Moscow: Mir, 1975 (in Russian)].
8. Дарбре А. Практическая химия белка. М.: Мир, 1989 [Darbre A. Prakticheskaya khimiya belka. Moscow: Mir, 1989 (in Russian)].
9. Torshin IY, Rudakov KV. Combinatorial analysis of the solvability properties of the problems of recognition and completeness of algorithmic models. Part 1: Factorization approach. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2017;27(1):16-28. DOI:10.1134/S1054661817010151
10. Torshin IYu, Rudakov KV. Combinatorial analysis of the solvability properties of the problems of recognition and completeness of algorithmic models. Part 2: Metric approach within the framework of the theory of classification of feature values. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2017;27(2):184-99. DOI:10.1134/S1054661817020110
11. Torshin IY. Optimal dictionaries of the final information on the basis of the solvability criterion and their applications in bioinformatics. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2013;23(2):319-27. DOI:10.1134/S1054661813020156
12. Torshin IYu, Rudakov KV. On the theoretical basis of the metric analysis of poorly formalized problems of recognition and classification. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2015;25(4):577-87. DOI:10.1134/S1054661815040252
13. Torshin IYu, Rudakov KV. On metric spaces arising during formalization of problems of recognition and classification. Part 2: Density properties. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2016;26(3):483-96. DOI:10.1134/S1054661816030202
14. Torshin IY, Rudakov K.V. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs. Part 1: Fundamentals of modern chemical bonding theory and the concept of the chemograph. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2014;24(1):11-23. DOI:10.1134/S1054661814010209
15. Torshin IYu, Rudakov KV. On the procedures of generation of numerical features over partitions of sets of objects in the problem of predicting numerical target variables. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2019;29(4):654-67. DOI:10.1134/S1054661819040175
16. Torshin IYu. Sensing the change from molecular genetics to personalized medicine. Ed. OA Gromova. New York: Nova Biomedical Books, 2009.
17. Шадрин В.С., Кожин П.М., Шошина О.О., и др. Теломеризованные фибробласты как потенциальный объект для 3D-моделирования патологических гипертрофических рубцов in vitro. *Вестник РГМУ*. 2020;(5):82-90 [Shadrin VS, Kozhin PM, Shoshina OO, et al. Telomerized fibroblasts as a candidate 3D in vitro model of pathological hypertrophic scars. *Bulletin of RSMU*. 2020;(5):82-90 (in Russian)]. DOI:10.24075/vrgmu.2020.057
18. Burkhard K, Shapiro P. Use of inhibitors in the study of MAP kinases. *Methods Mol Biol*. 2010;661:107-22. DOI:10.1007/978-1-60761-795-2_6
19. Sasaki T, Maier B, Koclega KD, et al. Phosphorylation regulates SIRT1 function. *PLoS One*. 2008;3(12):e4020. DOI:10.1371/journal.pone.0004020
20. Nasrin N, Kaushik VK, Fortier E, et al. JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PLoS One*. 2009;4(12):e8414. DOI:10.1371/journal.pone.0008414
21. Pan Y, Wang Y, Xu J, et al. TG and VLDL cholesterol activate NLRP1 inflammasome by Nuclear Factor- κ B in endothelial cells. *Int J Cardiol*. 2017;234:103. DOI:10.1016/j.ijcard.2016.12.156
22. Nabel GJ, Verma IM. Proposed NF- κ B/I κ B family nomenclature. *Genes Dev*. 1993;7(11):2063. DOI:10.1101/gad.7.11.2063
23. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986;46(5):705-16. DOI:10.1016/0092-8674(86)90346-6
24. Llona-Minguez S, Baiget J, Mackay SP. Small-molecule inhibitors of I κ B kinase (IKK) and IKK-related kinases. *Pharm Pat Anal*. 2013;2(4):481-98. DOI:10.4155/ppa.13.31
25. Carter RS, Pennington KN, Ungurait BJ, Ballard DW. In vivo identification of inducible phosphoacceptors in the IKK γ /NEMO subunit of human I κ B kinase. *J Biol Chem*. 2003;278(22):19642-8. DOI:10.1074/jbc.M301705200
26. Bian Y, Song C, Cheng K, et al. An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. *J Proteomics*. 2014;96:253-62. DOI:10.1016/j.jprot.2013.11.014
27. Fu X, Xu M, Song Y, et al. Enhanced interaction between SEC2 mutant and TCR $\nu\beta$ induces MHC II-independent activation of T cells via PKC θ /NF- κ B and IL-2R/STAT5 signaling pathways. *J Biol Chem*. 2018 Dec 21;293(51):19771-19784. DOI: 10.1074/jbc.RA118.003668
28. Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, et al. Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes. *Mol Immunol*. 2014;58(1):66-76. DOI:10.1016/J.MOLIMM.2013.11.008
29. George J, Motshwene PG, Wang H, et al. Two human MYD88 variants, S34Y and R98C, interfere with MyD88-IRAK4-myddosome assembly. *J Biol Chem*. 2011;286(2):1341-53. DOI:10.1074/jbc.M110.159996
30. Balakrishnan A, Vyas A, Deshpande K, Vyas D. Pharmacological cyclin dependent kinase inhibitors: Implications for colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22(7):2159-64. DOI:10.3748/wjg.v22.i7.2159
31. Daub H, Olsen JV, Bairlein M, et al. Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Mol Cell*. 2008;31(3):438-48. DOI:10.1016/j.molcel.2008.07.007
32. Zhou H, Di Palma S, Preisinger C, et al. Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. *J Proteome Res*. 2013;12(1):260-71. DOI:10.1021/pr300630k

Статья поступила в редакцию / The article received: 24.10.2023.