

# ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИНДОЛИЦИДИНА И ЕГО СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ

Артамонов А.Ю., Шанин С.Н., Орлов Д.С.,  
Шамова О.В., Колодкин Н.И.<sup>1</sup>, Рыбакина Е.Г.

<sup>1</sup> Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

**Резюме.** Проведено исследование иммуномодулирующей активности нативного антимикробного пептида индолицидина и его синтетических структурных аналогов (индолицидины 7, 8, 20, 21, 22) с пространственным разобщением гидрофобных и гидрофильных участков молекул и различным зарядом. Установлено, что индолицидины 7 и 22 в концентрациях соответственно 0,6 мкМ и 5 мкМ подавляют цитотоксическую активность натуральных киллерных клеток селезенки в отношении опухолевых клеток К-562, а индолицидины 8, 20 и 21 в концентрациях 1,3 мкМ, 2,5 мкМ и 1,3 мкМ, соответственно не изменяют ее. Впервые показано, что нативный индолицидин и его структурные аналоги индолицидины 8 и 20 не вызывают усиления пролиферативной активности спленоцитов, в то время как индолицидины 7 и 22 оказывают прямое митогенное действие на клетки. В работе продемонстрировано ингибирующее действие всех исследованных пептидов на реакцию бласттрансформации спленоцитов при их стимуляции конканавалином А. Индолицидин и его структурные аналоги также подавляют комитогенное действие цитокина интерлейкина-1 на пролиферацию спленоцитов. Полученные результаты позволяют заключить, что модификация структуры природного индолицидина приводит к появлению новой иммуномодулирующей активности пептидов, а способы модификации указывают на возможные пути направленного изменения их биологических свойств.

**Ключевые слова:** антимикробные пептиды, индолицидин, структурные аналоги, иммуномодулирующая активность.

*Artamonov A. Yu., Shanin S. N., Orlov D. S., Shamova O. V., Kolodkin N. I., Rybakina E. G.*

## IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE INDOLICIDIN AND ITS STRUCTURAL ANALOGUES

**Abstract.** Immunomodulatory activity of a native antimicrobial peptide indolicidin and its synthetic structural analogues (indolicidin 7, 8, 20, 21, 22), with spatial uncoupling of hydrophobic and hydrophilic parts of the molecule and different net charges was under investigation. It was revealed that indolicidin 7 and 22 at concentrations of, respectively, 0.6  $\mu$ M and 5  $\mu$ M suppressed cytotoxic activity of natural killer spleen cells against tumor cells (K-562 line), while indolicidins 8, 20 and 21 at the concentrations of 1.3  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M and 5  $\mu$ M respectively, did not influence it. It was shown for the first time, that native indolicidin and its structural analogues indolicidin 8 and 20 did not increase activity of cell division, whereas indolicidin 7 and 22 had a direct mitogenic activity on spleen cells. The investigated peptides showed inhibitory effect upon mitogenic transformation of splenocytes induced by Con A. In addition, indolicidin and its structural analogues suppressed co-mitogenic activity of Interleikin-1 towards splenocytes. The results obtained allow of a conclusion that the structural changes of indolicidin molecule lead to emergence of novel immunomodulatory activities of the peptides, whereas the methods of structural modifications demonstrate potential approaches to directed design of molecules with optimal biological properties. (*Med. Immunol.*, vol. 11, N 1, pp 101-104)

### Адрес для переписки:

Артамонов Александр Юрьевич,  
ГУ НИИЭМ РАМН  
197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, д. 12.  
Тел.: (812) 313-02-03, 234-15-83.  
Факс: (812) 313-02-03, 234-94-93.  
E-mail: auartamonov@bk.ru

Антимикробные катионные пептиды из нейтрофильных гранулоцитов, в том числе индолицидин (Ind), играют ключевую роль в механизмах врожденного иммунитета [1, 4, 6]. Индолицидин токсичен для эритроцитов [2] и лимфоцитов [7]. При синтезе и изучении свойств структурных аналогов Ind [3] основное внимание уделяется снижению его токсического действия на клетки живого организма, а также усилению антимикробных, противогрибковых и противовирусных свойств и увеличению устойчивости молекул пептидов к действию протеаз. Иммуномодулирующие свойства нативного индолицидина и его структурных аналогов до настоящего времени остаются малоизученными.

Целью работы явилось исследование иммуномодулирующей активности Ind и его структурных аналогов, а именно влияния этих пептидов на цитотоксическую и пролиферативную активность спленоцитов.

Спленоциты выделяли из селезенок крыс Wistar массой 200–220 г. В качестве мишеней для натуральных киллерных клеток (НК-клеток) селезенки использовали клетки эритромиелейкоза человека К-562 (ГУ «Институт цитологии РАН», Россия). В работе использованы пептиды индолицидин (Ind; ILPWKWPWWPWR) и его структурные аналоги: Ind 7 (ILPWKKPWKPWR), Ind 8 (IKPWKWPWKPWRR), Ind 20 (IKPWKWPWKPWAR), Ind 21 (KKPWKWPWKPWRR), Ind 22 (IKKWKKPWKKWRR), полученные методом твердофазного синтеза. Пептиды вносили в инкубационную среду в конечной концентрации, равной удвоенной минимальной

ингибирующей концентрации (МИК) в отношении *E. coli*, штамм ML-35p. Цитотоксическое действие пептидов непосредственно на клетки К-562 изучали с помощью метода МТТ [8].

Для оценки цитотоксической активности НК-клеток, суспензии клеток-эффекторов ( $2,5 \times 10^6$  кл/мл) и клеток-мишеней ( $1,0 \times 10^5$  кл/мл), меченых 3H-уридином (В/О «Изотоп», Россия), инкубировали с пептидами в течение 20 ч при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности. Цитотоксическую активность клеток рассчитывали по формуле: цитотоксичность (%) =  $(1 - \text{с.р.м. в тест-клетке} / \text{с.р.м. в контроле}) \times 100$  %.

В реакции бласттрансформации спленоцитов (РБТС) суспензию клеток ( $5 \times 10^6$  кл/мл) инкубировали с 0,75 мкг/мл конканавалина А (Con A, Sigma) и/или с рекомбинантным интерлейкином-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , Sigma) со специфической активностью  $1,0 \times 10^7$  ед./мг белка в дозе 250 нг/мл и с пептидами в течение 72 ч при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности. Интенсивность РБТС оценивали по уровню 3H-тимидина (РНЦ «Прикладная химия», Россия), включенного в ДНК делящихся клеток.

Статистическая обработка результатов проведена по t-критерию Стьюдента в программном пакете Statistica 6.0 (Statsoft Inc., США).

Изученные пептиды не оказывали непосредственного цитотоксического действия на опухолевые клетки К-562 (IC<sub>50</sub> составляла более 100 мкМ), кроме Ind, для которого IC<sub>50</sub> не превышала 40 мкМ.

В исследовании влияния пептидов на цитотоксическую активность спленоцитов оптимальное соотношение эффектор:мишень составляло 25:1.

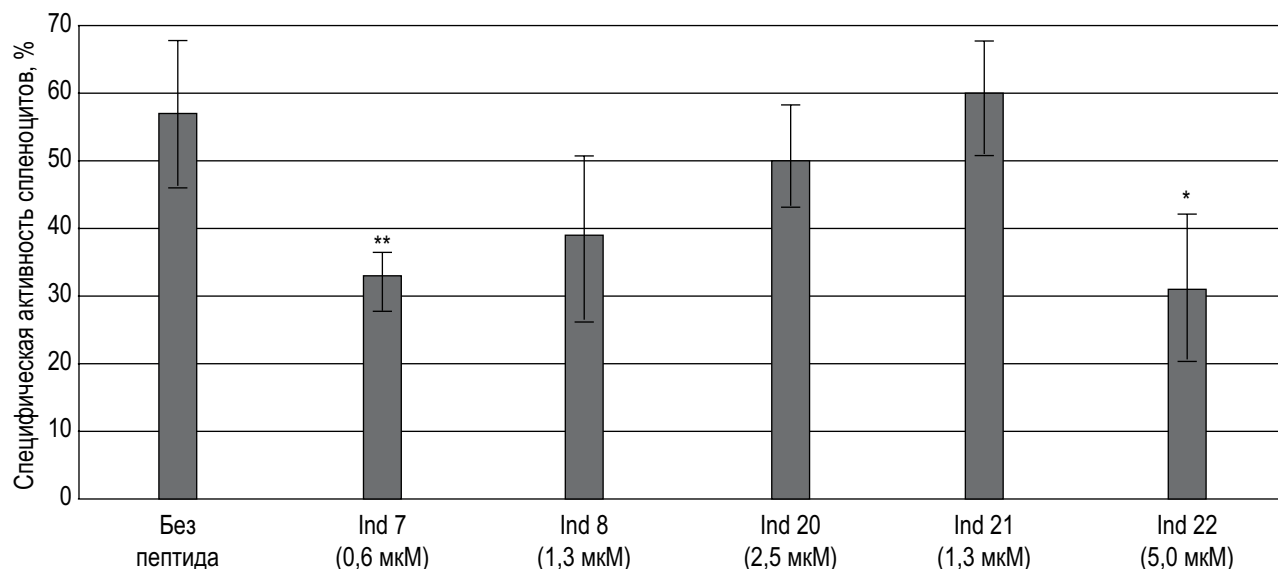


Рисунок 1. Цитотоксическая активность спленоцитов крыс Wistar после добавления пептидов Ind и его структурных аналогов Ind 7, Ind 8, Ind 20, Ind 21, Ind 22

Примечание. В круглых скобках у пептидов указаны конечные концентрации в образцах.

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$  – по сравнению с цитотоксичностью клеток в пробах без добавления пептидов.

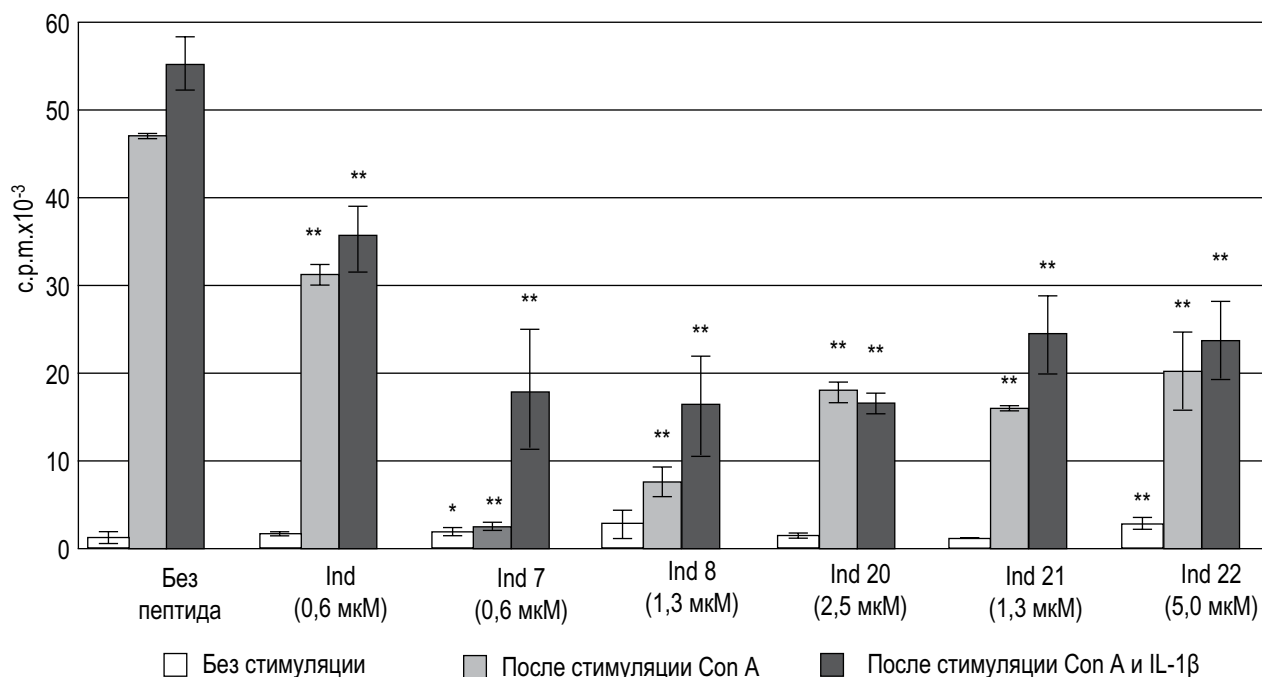


Рисунок 2. Реакция бласттрансформации спленоцитов крыс Wistar после добавления Con A, IL-1β и исследуемых пептидов Ind и его структурных аналогов Ind 7, Ind 8, Ind 20, Ind 21, Ind 22

В круглых скобках у пептидов указаны конечные концентрации в образцах.

белым цветом – без стимуляции; заштрихованные – после стимуляции Con A;

черным цветом – после стимуляции Con A и IL-1β.

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$  – по сравнению с РБТС клеток без добавления пептидов.

Пептиды Ind 7 (МИК = 0,3 мкМ) в концентрации 0,6 мкМ и Ind 22 (МИК = 2,5 мкМ) в концентрации 5 мкМ подавляли специфическую активность спленоцитов в отношении опухолевых клеток К-562, а Ind 8 (МИК = 0,6 мкМ), Ind 20 (МИК = 1,3 мкМ) и Ind 21 (МИК = 0,6 мкМ) в концентрациях 1,3 мкМ, 2,5 мкМ и 1,3 мкМ, соответственно, не изменяли ее (рис. 1).

При сопоставлении физико-химических характеристик молекул пептидов и их влияния на специфическую активность спленоцитов установлено, что изменение заряда пептидов Ind 7 (+7), Ind 8 (+6), Ind 20 (+5), Ind 21 (+8), Ind 22 (+9) по сравнению с природным Ind (+4) не влияло на цитотоксичность НК-клеток селезенки.

Нативный пептид Ind (МИК = 0,3 мкМ) и его структурные аналоги Ind 8, Ind 20 при внесении в инкубационную среду не вызвали усиления пролиферативной активности спленоцитов (рис. 2), в то время как Ind 7 и Ind 22 оказывали митогенное действие на клетки. Однако при стимуляции клеток Con A в субоптимальной дозе все пептиды ингибировали РБТС. Индолицидин и его структурные аналоги также подавляли комитогенное действие цитокина IL-1β на пролиферацию спленоцитов.

Увеличение заряда аналогов Ind по сравнению с зарядом нативного пептида, а также пространственное разобщение гидрофобных и гидрофиль-

ных участков молекул приводило к усилению их ингибирующего действия на РБТС, стимулированную Con A, а также Con A в сочетании с IL-1β.

Таким образом, сравнительное исследование эффектов действия антимикробного пептида Ind и его синтетических структурных аналогов показало, что эти пептиды обладают также и иммуномодулирующей активностью. В то время, как сам Ind и его структурные аналоги подавляют пролиферативную активность спленоцитов, вызванную Con A и IL-1β, Ind 7 и Ind 22 оказывают прямое митогенное действие на пролиферацию клеток. Возможно, что эффект диссоциации биологических свойств пептидов в результате модификации их структуры и появление у них активности, направленной на подавление интенсивности РБТС, индуцированной действием Con A и IL-1β, в какой-то мере обусловлены наибольшей уязвимостью мембран клеток спленоцитов в период их деления [5]. Необходимо отметить, что именно Ind 7 и Ind 22, в структуре которых триптофан в шестом положении заменен на лизин, оказывают подавляющее действие и на цитотоксическую активность спленоцитов.

Результаты исследования позволяют заключить, что модификация структуры природного индолицидина приводит к появлению новой иммуномодулирующей активности пептидов, а способы модификации указывают на возмож-

ные пути направленного изменения их биологических свойств.

Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-01759.

## Список литературы

1. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. — СПб.: Наука, 2006. — 261 с.

2. Ahmad I., Perkins W.R., Lupan D.M., Selsted M.E., Janoff A.S. Liposomal entrapment of the neutrophil-derived peptide indolicidin endows it with in vivo antifungal activity // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1995. — Vol. 1237. — P. 109-114.

3. Carol L. Friedrich, Rozek A., Patrzykat A., Hancock R.E.W. Structure and Mechanism of Action of an Indolicidin Peptide Derivative with Improved Activity against Gram-positive Bacteria // *J. Biol. Chem.*, 2001. — Vol. 276, N 26. — P. 24015-24022.

4. Frank R.W., Gennaro R., Schneider K. et al. Amino acid sequences of two praline — rich bactericins // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 256, N 31. — P. 18871-18874.

5. Friedrich C., Scott M.G., Korunaratne N., Yan H., Hancock R.E. W. Salt-Resistant Alpha-Helical Cationic Antimicrobial Peptides // *Antimicrobial Agents Chemother.* — 1999. — Vol. 43, N 7. — P. 1542-1548.

6. Kokryakov V.N., Harwing S.S., Panyutich E.A. et al. Protegrins: Leukocyte antimicrobial peptides combine features of corticostatic defensins and tachyplesins // *FEBS Lett.* — 1993. — Vol. 327, N 2. — P. 231-236.

7. Schluesner, H. J., Radermacher S., Melms A., Jung S. Leukocytic antimicrobial peptides kill autoimmune T-cells // *J. Neuroimmunol.* — 1993. — Vol. 47. — P. 199-202.

8. Wan H., Williams R., Doherty P., Williams D.F. A study of the reproducibility of the MTT test // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine Springer Netherlands*. — Vol. 5, N 3. — 1994. — P. 154-159.

*поступила в редакцию 06.10.2008*

*отправлена на доработку 09.11.2008*

*принята к печати 12.01.2009*