

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА RYQLHPYR НА КЛЕТКАХ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н. П. Акентьева^{1,2}, С. С. Шушанов³

¹ФГБУН «Институт проблем химической физики РАН»; Россия, 142432 Черноголовка, пр-т акад. Семенова, 1;

²Научно-образовательный центр «Медицинская химия» ГОУ ВО МО «Московский государственный областной университет»; Россия, 142432 Черноголовка, пр-т акад. Семенова, 1;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Наталья Павловна Акентьева na_aken@icr.ac.ru

Введение. RHAMM (опосредованный гиалуронатом рецептор подвижности) избыточно экспрессируется во многих типах рака человека, а повышенный синтез RHAMM обычно коррелирует с плохим прогностическим фактором. В ходе исследования мы синтезировали пептид RYQLHPYR, модулирующий активность RHAMM, и рассмотрели терапевтический потенциал этого RHAMM-таргет-пептида как противоопухолевого реагента.

Цель исследования — изучение влияния синтетического пептида RYQLHPYR на жизнеспособность, апоптоз, некроз, активность каспаз-3/7 и инвазивность клеток рака предстательной железы.

Материалы и методы. Пептид RYQLHPYR был получен твердофазным синтезом. Изучались клетки рака предстательной железы человека (PC3 m-LN₄), мышинные эмбриональные фибробласты (неинвазивные, нормальные клетки) и мышинные эмбриональные фибробласты (RHAMM^{-/-}). Для количественной оценки влияния пептида на апоптоз и некроз клеток использовали метод ELISA^{PLUS}. Определение активности каспаз-3/7 проводили колориметрическим методом. Антиметастатическое действие пептида *in vitro* оценивалось по инвазивности клеток методом количественного анализа площади деградации флуоресцентного желатина.

Результаты. Установлено, что пептид RYQLHPYR ингибировал рост опухолевых клеток PC3 m-LN₄ при концентрации 10 мкг/мл (2×10^{-7} М) через 24 ч на ~80 %. Показано, что пептид стимулировал повышение уровня апоптоза в раковых клетках примерно в 10 раз и ускорял некротическую гибель опухолевых клеток в 2,5 раза. В ходе исследований выявлено, что пептид повышал в 2 раза активность каспаз-3/7 в опухолевых клетках. В то же время показано, что RHAMM-таргет-пептид не оказывал значительного эффекта на апоптоз и некроз нормальных клеток и RHAMM^{-/-}. Установлено, что пептид ингибировал инвазивность опухолевых клеток на ~99,86 % при концентрации 10 мкг/мл (2×10^{-7} М).

Выводы. Полученные результаты указывают, что пептид RYQLHPYR обладает противоопухолевой активностью и, следовательно, имеет терапевтический потенциал для лечения рака предстательной железы.

Ключевые слова: пептиды, апоптоз, некроз, рак предстательной железы, инвазивность

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-40-50

STUDY OF ANTITUMOR ACTIVITY OF SYNTHETIC PEPTIDE RYQLHPYR ON THE PROSTATE CANCER CELLS

N. P. Akentieva^{1,2}, S. S. Shushanov³

¹Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences; 1 Prospect Akademika Semenova, Chernogolovka 142432, Russia;

²Scientific-educational center "Medical chemistry" of the Moscow State Regional University;

1 Prospect Akademika Semenova, Chernogolovka 142432, Russia;

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrsкое Sh., Moscow 115478, Russia

Introduction. The RHAMM (hyaluronan mediated mobility receptor) is overexpressed in many types of human cancer and increased synthesis of the RHAMM usually correlates with a poor prognostic factor. In this paper, we synthesized the peptide-RYQLHPYR modulating the activity of the RHAMM and examined the therapeutic potential of this RHAMM-targeting peptide as an antitumor agent.

Objective. Study the effect of the synthetic peptide RYQLHPYR on viability, apoptosis, necrosis, caspase-3/7 activity, and invasion of prostate cancer cells.

Materials and methods. The peptide RYQLHPYR was prepared by solid phase synthesis. Human prostate cancer cells (PC3 m-LN₄), murine embryonic fibroblasts and murine embryonic fibroblasts (RHAMM^{-/-}). To quantify the effect of the peptide on apoptosis and cell necrosis, ELISA^{PLUS} was used. The activity of caspase-3/7 was determined by the colorimetric method. Evaluation of the anti-metastatic effect of the peptide *in vitro* was evaluated by invasion of cells by quantitative analysis of the area of degradation of fluorescent gelatin.

Results. It was found that the peptide RYQLHPYR inhibited the growth of tumor cells PC3 m-LN4 at a concentration of 10 µg/ml (2×10^{-7} M) after 24 h by ~80 %. It was shown that the peptide stimulated the level of apoptosis in cancer cells, approximately 10-fold. It was found that the peptide increased the necrotic death of tumor cells by 2.5 times. During the research it was revealed that the peptide increased the caspase-3/7 activity in tumor cells by 2 times. At the same time, it was shown that RHAMM-targeting peptide had no significant effect on apoptosis and necrosis of normal cells (fibroblasts) and fibroblasts (RHAMM^{-/-}). It was found that the peptide inhibited invasion of tumor cells by ~99.86 % at a concentration of 10 µg/ml (2×10^{-7} M).

Conclusions. The obtained results indicate that the peptide RYQLHPYR has antitumor activity and, therefore, has a therapeutic potential for the treatment of prostate cancer.

Key words: peptides, apoptosis, necrosis, prostate cancer, invasion

Введение

Частота возникновения онкологических заболеваний в мире растет в геометрической прогрессии. Согласно статистике, к 2020 г. смертность от рака составит 40 % общего числа смертей [1]. Рак предстательной железы (РПЖ) остается 2-й ведущей причиной гибели в мире (после рака легких). Кроме того, лечение онкологических заболеваний является крайне дорогостоящим. Несмотря на определенные успехи в лечении, основная проблема в онкологии заключается в отсутствии селективности противоопухолевых препаратов. Поэтому разработка механизмов таргетной терапии раковых заболеваний — самая актуальная и активно развивающаяся область биомедицины.

Таргетная, адресная химиотерапия позволяет избирательно и эффективно локализовать препарат на молекулярных мишенях в клетке (например, на рецепторах), в то же время ограничить его доступ к нормальной клетке и таким образом получить максимальный терапевтический эффект, снизив токсичность препарата. На протяжении последних лет использование пептидов как перспективных терапевтических агентов для лечения онкологических заболеваний, стремительно растет. Терапевтические пептиды завоевывают все большую популярность для применения в различных аспектах медицины, в том числе в виде противоопухолевых вакцин, в составе антимикробной терапии, для доставки нуклеиновых кислот [2–9]. Недавно установлено, что антимикробный пептид низин обладает противоопухолевой активностью, индуцирует апоптоз и подавляет пролиферацию клеток астроцитомы человека (SW1088) [10].

В ходе исследований было выявлено, что пептиды обладают разными физиологическими активностями и эффектами воздействия на опухолевые клетки. Многие природные и синтетические проапоптотические пептиды индуцируют ферменты апоптоза и вызывают гибель клеток. Например, катионный антимикробный пептид, выделенный из бразильского тарантула, обладает не только бактериостатическими свойствами, но и проявляет противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo* [11]. Так называемые клеточно-проникающие пептиды усиливают эффект химиотерапевтических препаратов, в то же время мембранолитические, катионные антимикробные пеп-

тиды разрушают мембраны раковых клеток [12–16]. Недавно показано, что пептиды, выделенные из австралийской лягушки, ингибируют деление клеток рака молочной железы [17]. Химерные пептиды проявляют противоопухолевую активность и понижают множественную лекарственную устойчивость опухолей [18]. Известно, что клеточно-проникающий пептид dNP2 может ускорять накопление противоопухолевых препаратов в клетке и тем самым повышать эффективность лечения рака [19].

Под воздействием различных неблагоприятных факторов нормальная клетка может перерождаться в раковую, которая характеризуется повышенным уровнем экспрессии рецепторов, белков или ферментов, являющихся молекулярными мишенями опухолевой клетки. Существует категория противоопухолевых пептидов (пептидных антагонистов), которые преимущественно связываются с известным рецептором и модулируют его активность, активируют или блокируют его функции и тем самым влияют на процессы развития и прогрессии рака [20–26]. Недавние исследования показали, что белок 2 (Grb²), связанный с рецептором фактора роста, представляет собой адаптер, который в значительной степени вовлечен в опухолевые новообразования, а блокирование этого белка пептидами приводит к подавлению роста опухоли [27].

В последнее время эфрин-рецепторы киназной системы привлекают все большее внимание как основной класс потенциальных мишеней для лекарств [28]. Были идентифицированы пептиды, которые специфично связываются с эфрин-рецепторами с высоким сродством [29]. Эти пептиды, как правило, являются антагонистами, которые ингибируют связывание эфрина и передачу сигналов на эфрин-рецептор, но некоторые являются агонистами, имитирующими активацию эфрин-рецептора [30]. Помимо модуляции функции эфрин-рецептора такие пептиды могут служить в качестве диагностических и терапевтических средств, а также для доставки различных наночастиц в опухоли и другие пораженные ткани, представляющие мишени эфрин-рецепторов [31, 32]. Пептидные антагонисты имеют большие перспективы, потому что их основной механизм действия нацелен на конкретную молекулярную мишень опухолевых клеток, что приводит к их гибели.

RHAMM/НММР-онкорецептор (опосредованный гиалуронатом рецептор подвижности) является такой молекулярной мишенью для диагностических, прогностических и терапевтических целей в области лечения онкологических заболеваний. RHAMM синтезируется в избытке в метастатических агрессивных опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками. В ряде работ было показано, что повышенное содержание RHAMM наблюдается в клетках рака молочной и предстательной желез, толстой кишки, в солидных опухолях и в клетках рака крови, при миелоидном лейкозе, множественной миеломе, и обычно повышенный синтез RHAMM коррелирует с плохим прогнозом [33–36].

Идея нашей работы состоит в том, чтобы с помощью пептида-антагониста ингибировать активность RHAMM-онкорецептора, понизить выживаемость, инвазивность раковых клеток и тем самым заблокировать развитие опухоли на самой ранней стадии. Последовательности пептидов, обладающих высоким сродством к RHAMM, были идентифицированы методом биоинформатики и создания библиотеки пептидов [37]. Такие RHAMM-пептиды-антагонисты, специфично взаимодействующие с RHAMM, были охарактеризованы ранее [37, 38]. Показано, что RHAMM-пептиды специфично связываются с RHAMM с высоким сродством (константа связывания около 30 нМ), блокируют центр связывания гиалуроновой кислоты (физиологического лиганда RHAMM), легко проходят через цитоплазматическую мембрану клеток [37]. Пептиды-антагонисты, способные блокировать центр связывания гиалуроновой кислоты на RHAMM, представляют собой новую стратегию раковой терапии, направленную на индукцию процессов апоптоза, некроза и ингибирование инвазивности опухолевых клеток. В настоящее время RHAMM-таргет-пептиды известны как биомаркеры для ранней диагностики рака яичников, предстательной и молочной желез [38–40]. Кроме того, показано, что RHAMM-таргет-пептиды индуцируют апоптоз и некроз клеток рака молочной железы, а также ингибируют их инвазивность [41, 42].

Поиск новых RHAMM-таргет-пептидов, селективно блокирующих RHAMM и его сигнальные пути, является одним из перспективных подходов для лечения РПЖ. Однако в настоящее время физиологический эффект RHAMM-таргет-пептидов на апоптоз, некроз и инвазивность опухолевых клеток предстательной железы изучен не полностью. Поэтому в данной работе мы синтезировали пептид RYQLHPYR в соответствии с методом, описанным ранее, и изучили его терапевтический потенциал [37, 38].

Цель исследования — изучение противоопухолевой активности пептида RYQLHPYR на культуре раковых клеток предстательной железы. Задачи включали

такой важный аспект, как изучение влияния пептида RYQLHPYR на жизнеспособность, апоптоз, некроз и инвазивность опухолевых клеток PC3 m-LN4.

Материалы и методы

Препараты и реактивы. В работе использовали ростовую среду DMEM (низкое содержание глюкозы (–1 г/л), L-глутамин, 25 mM HEPES, пируват натрия, Biowest, Франция), эмбриональную бычью сыворотку (FBS, ультранизкое содержание эндотоксина, Biowest, Франция), трипсин 0,25 % – ЭДТА 0,02 % в HBSS (Biowest, Франция), гентамицин (10 mg/ml, Biowest, Франция), QCMTM Gelatin Invadopodia Assay (red) набор (Millipore, США), Fluoro-Gel II (Millipore, США). В работе была использована пластиковая посуда (чашки Петри, одноразовые пипетки) фирмы BD Falcon (США).

Линии клеток. Для исследований *in vitro* были использованы 3 линии клеток: адгезивные клетки карциномы предстательной железы человека (PC3 m-LN4), характеризующиеся повышенной экспрессией RHAMM, мышинные эмбриональные фибробласты (MEF) – неинвазивные, нормальные клетки и эмбриональные фибробласты мыши (RHAMM^{–/–}). Клеточные линии фибробластов RHAMM^{–/–} были получены, как описано ранее [43]. Клеточные линии PC3 m-LN4 и MEF получены из ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Способ культивирования: адгезивный в среде DMEM с 10 % эмбриональной бычьей сывороткой при 37 °C, 5 % CO₂ и 95 % влажности.

Синтез пептида. Пептид RYQLHPYR был получен твердофазным методом, как описано ранее [37, 38, 44].

Оценка жизнеспособности клеток флуоресцентным методом (Alamar Blue). Для анализа действия пептида на жизнеспособность клеток использовали метод Alamar Blue® Cell Viability Assay (Thermo Fisher Scientific, США). Данный метод позволяет определить активность митохондриальных никотинамидадениндинуклеотид- (НАДН) – дегидрогеназ живых клеток, которые расщепляют НАДН на НАД и Н⁺, и образующийся Н⁺ восстанавливает нефлуоресцентный краситель резазурин в сильно флуоресцентный резозуридин [45]. PC3 m-LN4, MEF-клетки засеивали в 96-луночные планшеты по 1 тыс. клеток в лунке в 200 мкл ростовой среды, клетки выращивали в течение 24 ч в инкубаторе при 37 °C, 5 % CO₂ и 95 % влажности. Затем в лунки добавляли пептид (до конечной концентрации 10 мкг/мл, 2×10^{-7} М), а в контрольные добавляли равное количество фосфатно-солевого буфера (0,01 М, pH = 7,2) и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C. На каждую дозу препарата и контроль использовали не менее 3 лунок. Затем добавляли Alamar Blue-реагент (10 мкл, Thermo Fisher Scientific, USA) непосредственно к клеткам в ростовую

среду и проводили измерения через 24 ч. Интенсивность флуоресценции измеряли при 570/590 нм, используя спектрофлуориметр Wallac 1420 (Perkin Elmer). Жизнеспособность клеток при действии пептида оценивалась сравнением флуоресценции в экспериментальных лунках с флуоресценцией в контрольных. Все измерения дублировались 3 раза, и данные представлены как средние от 3 повторных экспериментов.

Оценка влияния пептида на апоптоз и некроз опухлевых клеток. Клетки РПЖ РС3 m-LN4, MEF, RHAMM^{-/-} высевали на плоскодонные 96-луночные планшеты при плотности 1 тыс. клеток в лунке, клетки выращивали в течение 24 ч в инкубаторе при 37 °C, 5 % CO₂ и 95 % влажности. Затем в лунки добавляли пептид (до конечной концентрации 10 мкг/мл, 2×10^{-7} М), а в контрольные культуры добавляли равное количество фосфатно-солевого буфера и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C. Для количественной оценки апоптоза и некроза клеток под действием пептида использовали иммуоферментный метод Cell Death ELISA^{PLUS} Kit (Roche Diagnostic, США). Индукцию апоптоза и некроза с помощью пептида определяли измерением гистоновых компонентов моно-, олигонуклеосом (гистоны H1, H2A, H3 и H4), являющихся индикаторами апоптоза и некроза [46, 47]. Оптическую плотность измеряли при 405/490 нм на спектрофлуориметре Wallac 1420 (Perkin Elmer). Все измерения дублировались 3 раза, данные представлены как средние от 3 повторных экспериментов.

Определение активности каспаз-3/7 колориметрическим методом. Клетки РПЖ человека РС3 m-LN4, MEF засеивали плотностью 1 тыс. клеток в лунке в 24-луночные платы и инкубировали 24 ч в ростовой среде DMEM (Multicell) с 10 % эмбриональной бычьей сывороткой. Затем пептид (конечная концентрация 2×10^{-7} М) добавляли к клеткам и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C. В контрольные культуры добавляли обычную ростовую среду, содержащую 10 % сыворотки. Для количественного измерения активности каспаз-3/7 был использован Caspase-3 Colorimetric Assay Kit (Gen Script, США). Активацию каспаз-3/7 определяли измерением расщепления колориметрического субстрата, специфичного для каспаз-3/7, (DEVD-p-нитроанилида). Субстрат, DEVD-p-нитроанилид состоит из хромофора p-нитроанилида и синтетического тетрапептида, DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), который и отщепляется каспазами-3/7. После расщепления субстрата каспазами 3/7 высвобождается окрашенный хромофор p-нитроанилин (pNA), который определяется спектрофотометрически [48]. Измерение оптической плотности каждой лунки проводилось с использованием многорядного счетчика Wallac 1420 (Perkin

Elmer) при 405 нм. Все измерения дублировались 3 раза, данные представлены как средние от 3 повторных экспериментов.

Метод деградации флуоресцентного желатина для исследования инвазивности клеток. Для изучения инвазивности клеток использовали QCMTM Gelatin Invadopodia Assay (Red) Kit (Millipore, США). Данный метод основан на быстром обнаружении деградации флуоресцентно-меченого желатина клетками [49, 50]. Эффект пептида на образование инваподий исследовали по его влиянию на степень деградации желатина. Поверхность покровного стекла вначале обрабатывали поли-L-лизином, затем — разбавленным раствором глутаральдегида, чтобы бифункционально «активировать» поверхность для дальнейшего связывания желатина. После этого стекло инкубировали с желатином, флуоресцентно-меченым с Cu³, в результате чего образовывалась ковалентная связь между поли-L-лизином и желатином через реакционноспособные альдегидные (-CHO) группы. Затем стекло, покрытое желатином, подготавливали для культивирования клеток путем дезинфекции в 70 % этаноле и добавляли ростовую среду для гашения свободных альдегидов. Клетки высевали на стекла, покрытые желатином, при концентрации ~500 клеток на лунку, добавляли ростовую среду и выращивали при 37 °C в 5 % CO₂ в течение 24 ч. Для эксперимента по влиянию пептида на инвазивность клеток пептид (конечная концентрация 40 µg/ml) добавляли к ростовой среде и инкубировали в течение 40 ч. После этого ростовую среду удаляли и клетки фиксировали в течение 30 мин при 37 °C формальдегидом (3,7 %). Для визуализации цитоскелетного актина и ядер клетки окрашивали флуоресцентно-меченым FITC-фаллоидином (2 мг/мл) и DAPI (1 мг/мл) соответственно, чтобы анализировать одновременно локализацию деградации с клеточными признаками. После окрашивания клетки фиксировали на покровном стекле с помощью Fluoro-Gel II и анализировали методом конфокальной микроскопии при 358, 494 и 550 нм. Конфокальные изображения получали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа (Fluoview FV-1000; Olympus) при увеличении $\times 20$ для количественного анализа. На конфокальных изображениях флуоресцентно-меченый желатин красного цвета (Cu³), актин клеток имеет зеленую окраску (FITC-фаллоидин), ядра клеток — синие (DAPI), а область деградации желатина — черного цвета (флуоресценция отсутствует). Изображения снимали с помощью программы Fluoview Software (FV10-ASW version 01.07; Olympus). Количественный анализ изображений, подсчет числа и площади клеток, а также площади деградации желатина проводили, используя программу ImageJ software (NIH, USA). На изображениях, полученных с помощью

этой программы, ядра клеток и площадь черного цвета, а площадь деградации желатина белого цвета.

Для статистического анализа готовили 3 слайда на каждый тип обработки и снимали 5 изображений со слайда. Свыше 100 клеток анализировали в каждом образце, чтобы получить процент площади деградации желатина по отношению к общей площади. Данные представляются как средние от 3 повторных экспериментов.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка всех полученных данных была выполнена с помощью компьютерной программы GraphPad Prizm с использованием метода анализа One-Way ANOVA. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Пептид RYQLHPYR ингибирует жизнеспособность клеток PC3 m-LN4

Мы изучали влияние пептида RYQLHPYR на жизнеспособность клеток РПЖ PC3 m-LN4, для которых характерна повышенная экспрессия RHAMM [51]. Чтобы понять, может ли пептид ингибировать рост раковых клеток, PC3 m-LN4 обрабатывались пептидом при концентрации 10 мкг/мл (2×10^{-7} М) в течение 24 ч. В качестве контроля мы использовали MEF, которые обрабатывали аналогично. Деление клеток анализировали с помощью резазурина (Alamar Blue-реагент), как описано в разделе «Материалы и методы». Результаты показали, что пептид ингибировал жизнеспособность опухолевой клеточной культуры через 24 ч на ~80 %, однако не влиял на рост фибробластов мыши (рис. 1). Это свидетельствует о том, что пептид RYQLHPYR, связываясь с RHAMM, значительно ингибирует активность митохондриальных дегидрогеназ клетки, которые играют центральную роль в процессах клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования, около 40 % протонного градиента для синтеза аденозинтрифосфата создается именно этим комплексом [52]. Таким образом, результаты показали, что RYQLHPYR-пептид обладает цитотоксическим действием за счет модуляции RHAMM.

Следует подчеркнуть, что жизнеспособность клеточных культур РПЖ значительно подавлялась низкими концентрациями пептида (2×10^{-7} М). Это указывает на то, что пептид является перспективным кандидатом в качестве противоопухолевого препарата.

Пептид RYQLHPYR индуцирует апоптоз и некроз раковых клеток предстательной железы

Известно, что реализация апоптоза может происходить в результате комбинирования 2 основных сигнальных путей — рецепторзависимого и митохондриального [53, 54]. Внешний сигнальный путь осуществляется через поверхностные рецепторы смерти

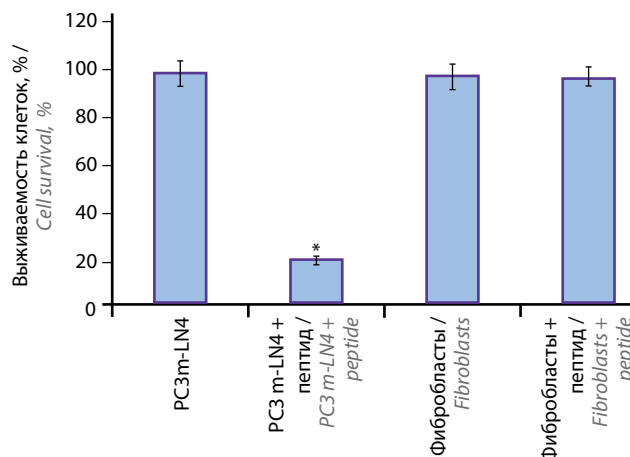


Рис. 1. Эффект пептида RYQLHPYR на жизнеспособность фибробластов и опухолевых клеток предстательной железы (PC3 m-LN4)
*Различия являются статистически значимыми при $p < 0,05$; $M \pm m$, $n = 3$

Fig. 1. Effect of the RYQLHPYR peptide on viability of fibroblasts and prostate tumor cells (PC3 m-LN4)

*Significant differences at $p < 0,05$; $M \pm m$, $n = 3$

клетки, специально предназначенные для включения программы апоптоза [53, 55]. Такими рецепторами смерти являются рецепторы Fas, TNFR1, DR3, DR4, DR5 [53–58]. Сигнальный путь апоптоза индуцируется физиологическими факторами-индукторами апоптоза, такими как гормоны, ростовые факторы, цитокины и др. [59, 60]. Посредством рецепторов смерти могут быть активированы 3 иницирующие каспазы: 2, 8 и 10 [61]. В отличие от внешнего сигнального пути апоптоза, митохондриальный путь его активации индуцируется действием цитотоксических агентов, радиации, повреждением ДНК, глюкокортикоидами, изменением теломеров [54]. Внутренний, митохондриальный путь сопровождается активацией белка P53 и экспрессией генов, кодирующих белки семейств Bcl-2, Bax и Bid [54]. Эти белки вызывают пермеабиллизацию митохондриальной мембраны, высвобождение цитохрома C, прокаспаз 2, 3, 7 и 9, белка AIF в цитоплазму, истощение митохондриального пула аденозинтрифосфата, что и приводит к апоптозу [62–65].

Поскольку мы показали, что жизнеспособность клеток PC3 m-LN4 значительно подавлялась пептидом, было важно классифицировать, какой тип гибели (апоптоз, некроз) наблюдается в клетках PC3 m-LN4. Анализ типа гибели клеток проводили методом ELISA, как описано в «Материалах и методах». Клетки, не обработанные пептидом, показали небольшой уровень апоптоза, поскольку каждая экспоненциально растущая клеточная культура содержит некоторое количество мертвых клеток (в норме приблизительно 3 %) вследствие спонтанной дифференциации и взросления клеточной линии. В то же время клетки, обработанные пептидом (концентрация

2×10^{-7} М), продемонстрировали высокий уровень апоптоза, а именно: пептид увеличивал апоптоз в опухолевых клетках приблизительно в 10 раз (см. таблицу). Эти результаты указывают на то, что RYQLHPYR-пептид и RHAMM вовлечены в апоптозные пути, которые индуцируют потерю энергии, и ингибирование работы мембранных насосов клетки [66].

Затем мы исследовали эффект пептида на некроз клеточной линии PC3 m-LN4. Наши результаты показали, что пептид стимулировал некротическую гибель опухолевых клеток приблизительно в 2,5 раза. Эти результаты свидетельствуют о том, что индукция апоптоза под действием пептида сопровождается последующим развитием некроза опухолевых клеток. Следует отметить, что в современной онкологии индукция некроза используется как один из методов лечения злокачественных опухолей. Для подтверждения специфичности действия пептида RYQLHPYR на опухолевые клетки мы изучали влияние его на апоптоз и некроз нормальных фибробластов и RHAMM^{-/-}. Результаты показали, что пептид не оказывал значительного эффекта на апоптоз и некроз нормальных клеток. Как видно из таблицы, уровень апоптоза

в фибробластах был практически одинаковым до обработки пептидом и после (оптическая плотность 0,621 и 0,656 ед. соответственно). Установлено, что изначально уровень некроза в фибробластах был 2,324 ед., а после добавки пептида он составил 2,231 ед. Анализ данных показал, что наблюдаемые незначительные различия в уровне апоптоза и некроза в контрольных и обработанных пептидом фибробластах не являются статистически значимыми. Это свидетельствует о том, что пептид не влияет на уровень апоптоза и некроза в фибробластах, потому что в них нет такого высокого уровня экспрессии RHAMM, который наблюдается в опухолевых клетках. В раковых клетках пептид связывается с RHAMM и таким образом индуцирует апоптоз и некроз через сигнальные пути рецептора.

Чтобы подтвердить участие RHAMM в апоптозе и некрозе, мы исследовали влияние пептида на апоптоз и некроз RHAMM^{-/-}, в которых отсутствует данный рецептор. Как видно из таблицы, пептид не влиял на уровни апоптоза и некроза в RHAMM^{-/-}. Наблюдаемые незначительные различия в уровне апоптоза (некроза) в контрольных фибробластах и обработанных пептидом не являются статистически значимыми. Эти данные указывают на то, что индукция апоптоза и некроза в опухолевых клетках под действием пептида RHAMM-опосредована.

Таким образом, результаты показали, что пептид RYQLHPYR селективно влияет на опухолевые клетки, не затрагивая жизнеспособность нормальных клеток, и его действие осуществляется через RHAMM. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными о специфичности действия RHAMM-таргет пептидов на опухолевые клетки молочной железы [41, 42].

Влияние пептида RYQLHPYR на активность каспаз-3/7

Из литературы известно, что существует 2 основных пути апоптоза в клетке: митохондриальный и через рецепторы апоптоза [67]. Оба пути приводят к активации каспаз и запуску каскада реакций, приводящих к гибели клетки. Митохондрии являются ключевым регулятором каспазного каскада и апоптоза, при этом наблюдаются выброс цитохрома С в цитоплазму, активация каспазы 9 и затем каспаз-3/7 [67].

Поскольку мы наблюдали цитостатический эффект и индукцию апоптоза (некроза) в опухолевых клетках под действием пептида, то исследовали влияние данного пептида на митохондриальный тип апоптоза. Активация каспаз 3/7 является основным индикатором митохондриального апоптоза, поэтому мы изучали эффект пептида на активность каспаз-3/7 в PC3 m-LN4-клетках. Фибробласты мыши использовали в качестве контрольных клеток.

Влияние пептида RYQLHPYR на апоптоз и некроз клеточной линии PC3 m-LN4, фибробластов и (RHAMM^{-/-}) клеток

Effect of the RYQLHPYR peptide on apoptosis and necrosis of the PC3 m-LN4, fibroblast and (RHAMM^{-/-}) cell lines

Типы клеток Cell type	Апоптоз (оптическая плотность при 405 нм, ед.) Apoptosis (absorbance at 405 nm, u.)	Некроз (оптическая плотность при 405 нм, ед.) Necrosis (absorbance at 405 nm, u.)
PC3 m-LN4	0,257	0,114
PC3 m-LN4 + пептид PC3 m-LN4 + peptide	2,213*	0,277*
Фибробласты Fibroblasts	0,621	2,324
Фибробласты + пептид Fibroblasts + peptide	0,656	2,231
Фибробласты (RHAMM ^{-/-}) Fibroblasts (RHAMM ^{-/-})	0,423	2,269
Фибробласты (RHAMM ^{-/-}) + пептид Fibroblasts (RHAMM ^{-/-}) + peptide	0,690	1,710

*Различия являются статистически значимыми при $p < 0,05$.

*Significant differences at $p < 0.05$.

К клеткам добавляли пептид (2×10^{-7} М) и инкубировали в течение 24 ч. Затем активность каспаз-3/7 измеряли методом расщепления меченого субстрата DEVD-р-нитроанилида. Результаты показали, что активность каспаз-3/7 увеличилась примерно в 2 раза

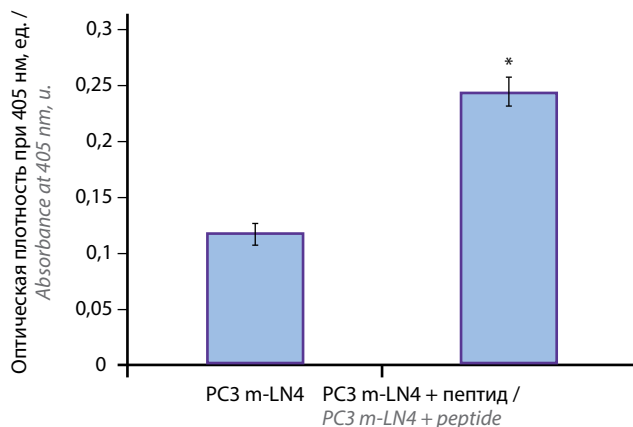


Рис. 2. Влияние пептида RYQLHPYR на активность каспаз-3/7 в опухолевых клетках предстательной железы (PC3 m-LN4)
*Различия являются статистически значимыми при $p < 0,05$; $M \pm m$, $n = 3$

Fig. 2. Effect of the RYQLHPYR peptide in caspase-3/7 activity in prostate tumor cells (PC3 m-LN4)

*Significant differences at $p < 0.05$; $M \pm m$, $n = 3$

в PC3 m-LN4-клетках, обработанных пептидом, по сравнению с необработанными (рис. 2). Пептид не оказывал влияния на активность каспаз в фибробластах. Эти данные подтверждают участие каспаз-3/7 в индукции апоптоза в опухолевых клетках PC3 m-LN4, так как пептид значительно повышал активность каспаз-3/7.

Наши результаты показали, что под действием пептида наблюдается активация каспаз-3/7, что свидетельствует об индукции митохондриального пути апоптоза. Таким образом, RHAMM участвует в передаче сигналов в митохондриальный путь апоптоза.

Влияние пептида RYQLHPYR на инвазивность клеток РПЖ

Чтобы анализировать, может ли пептид ингибировать инвазивность клеток РПЖ, клетки высевали на Sy^3 -флуоресцеин-желатиновые подложки, затем добавляли пептид или только ростовую среду (DMEM, контроль) и выращивали клетки в течение 40 ч. После фиксации и окраски клеток согласно протоколу, описанному в «Материалах и методах», снимали изображения и анализировали площадь деградации желатина клетками. На рис. 3а–жс представлены изображения клеток PC3 m-LN4 без обработки пептидом. Показано, что инвазивные клетки PC3 m-LN4

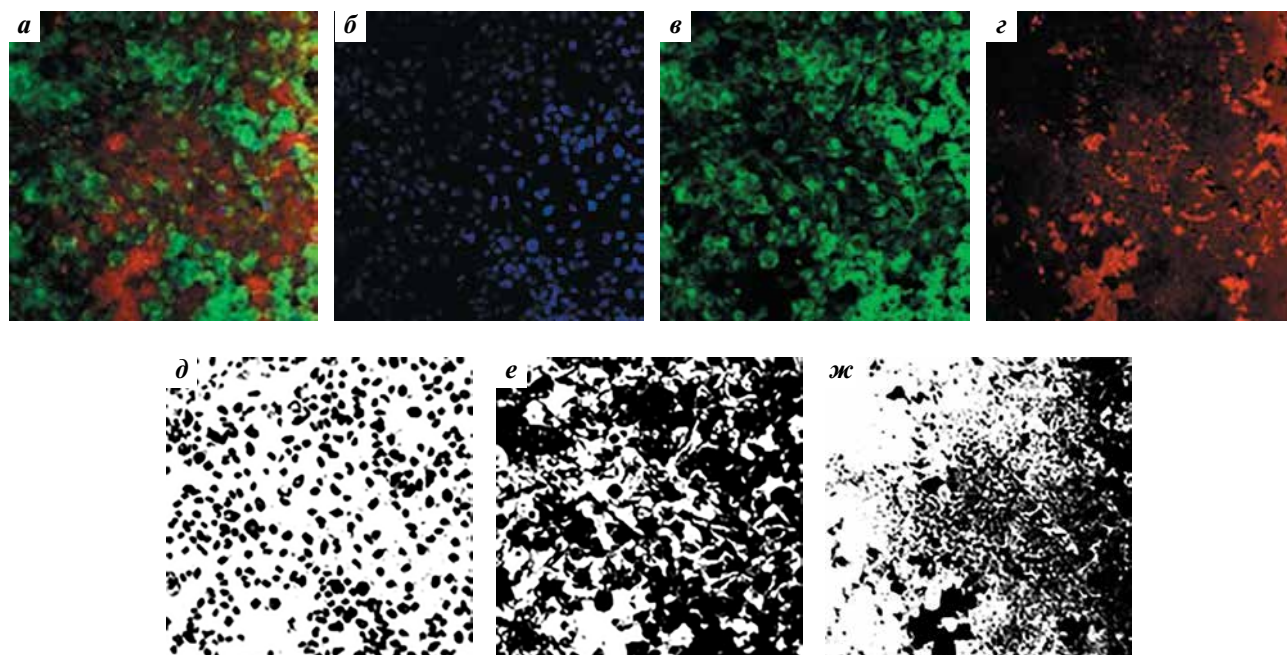


Рис. 3. Анализ инвазивности клеток PC3 m-LN4. Конфокальные изображения клеток (а), ядер (б), актина (в) и деградации желатина (г). Желатин окрашен Sy^3 (красная флуоресценция), ядро клеток окрашено DAPI (синяя флуоресценция), актин клеток окрашен FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Изображения клеток, полученные с помощью программы ImageJ software: д — число клеток, е — площадь клеток (черный цвет), жс — площадь деградации желатина (белый цвет). $\times 20$

Fig. 3. Analysis of PC3 m-LN4 cell invasiveness. Confocal photos of cells (a), nuclei (b), actin (v), and gelatin degradation (z). Gelatin is stained with Sy^3 (red fluorescence), nuclei are stained with DAPI (blue fluorescence), actin is stained with FITC-phalloidin (green fluorescence). Cell photos were obtained using the ImageJ software: d — number of cells, e — cell area (black), жс — gelatin degradation area (white). $\times 20$

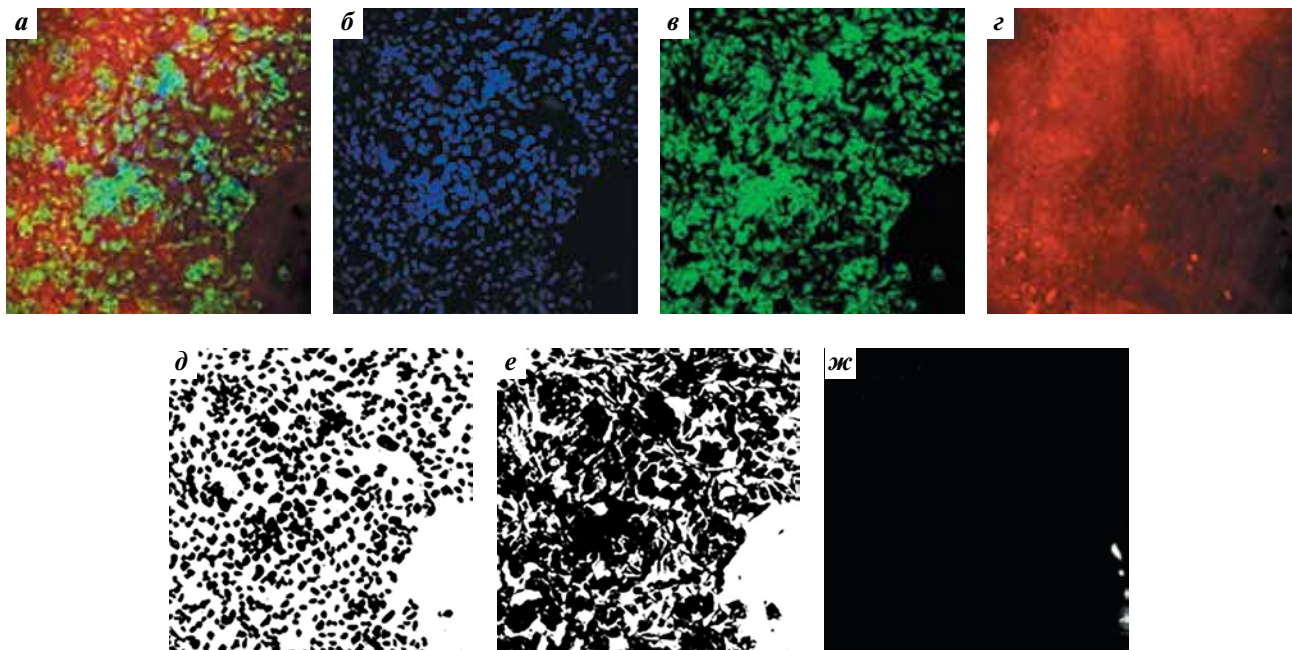


Рис. 4. Эффект пептида на инвазивность опухолевых клеток. Конфокальные изображения клеток (а), ядер (б), актина (в) и деградации желатина (г): PC3 m-LN4 клетки, обработанные пептидом. Желатин окрашен к Cy³ (красная флуоресценция), ядро клеток окрашено DAPI (синяя флуоресценция), актин клеток окрашен FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Изображения клеток, полученные с помощью программы ImageJ software: д – число клеток, е – площадь клеток (черный цвет), ж – площадь деградации желатина (белый цвет). ×20

Fig. 4. Effect of the peptide on invasiveness of tumor cells. Confocal images of cells (a), nuclei (b), actin (c), and gelatin degradation (d): PC3 m-LN4 cells treated with the peptide. Gelatin is stained with Cy³ (red fluorescence), nuclei are stained with DAPI (blue fluorescence), actin is stained with FITC-phalloidin (green fluorescence). Cell photos were obtained using the ImageJ software: d – number of cells, e – cell area (black), ж – gelatin degradation area (white). ×20

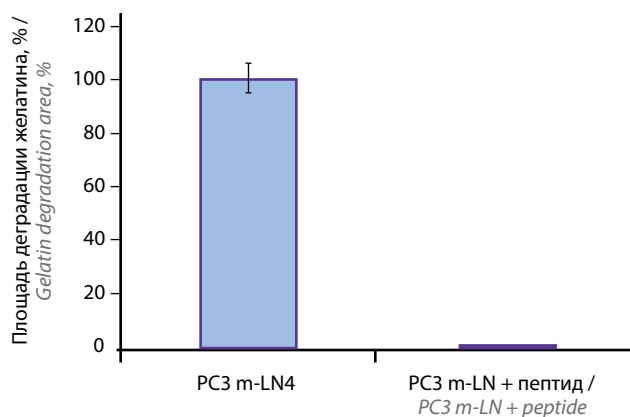


Рис. 5. Количественный анализ деградации желатина клетками PC3 m-LN4 и клетками, обработанными пептидом RYQLHPYR, с помощью ImageJ программы.

*Различия являются статистически значимыми при $p < 0,05$; $M \pm m$, $n = 3$

Fig. 5. Quantitative analysis of gelatin degradation by PC3 m-LN4 cells and cells treated with the RYQLHPYR peptide performed using the ImageJ software.

*Significant differences at $p < 0.05$; $M \pm m$, $n = 3$

вызывают лизис желатина, относящийся к образованию инвадоподий в виде областей, в которых отсутствует флуоресценция желатина, — на конфокальных изображениях это область черного цвета (рис. 3а, г).

Инвазивные клетки PC3 m-LN4 имеют большое количество инвадоподий и высокую концентрацию актина на концах клетки (рис. 3а, в). Количественный анализ изображений показал, что клетки PC3 m-LN4, не обработанные пептидом, значительно деградировали желатин, и площадь его деградации составляет около 90 % общей площади клеток (рис. 3г, ж). Однако клетки, обработанные пептидом, претерпели морфологические изменения, количество инвадоподий уменьшилось, и площадь деградации желатина резко сократилась, что свидетельствует о подавлении инвазивности клеток (рис. 4а, г). На рис. 3ж и 4ж представлены изображения, полученные с помощью программы ImageJ software, показывающие число и площадь клеток (черного цвета) и площадь деградации желатина (белого цвета). Количественный анализ площади деградации желатина с помощью ImageJ software показал, что клетки, обработанные пептидом, деградировали только 0,14 % площади желатина по отношению к общей площади клеток, что свидетельствует об ингибировании инвазивности клеток на 99,86 % в сравнении с контролем (рис. 5).

Эти результаты показали, что пептид RYQLHPYR значительно ингибирует инвазивность опухолевых клеток предстательной железы. Данные согласуются с ранее опубликованными результатами, свидетельствующими,

что RHAMM-таргет-пептиды ингибируют инвазивность опухолевых клеток молочной железы [40–42, 68, 69]. Таким образом, исследование показало, что пептид RYQLHPYR обладает антиметастатическим действием.

Заключение

Наши результаты продемонстрировали, что пептид RYQLHPYR при низкой концентрации (2×10^{-7} М)

ингибирует жизнеспособность, индуцирует апоптоз и некроз клеток предстательной железы. Индукция апоптоза происходит по митохондриальному пути. Пептид RYQLHPYR ингибирует инвазивность опухолевых клеток предстательной железы. Полученные результаты свидетельствуют, что пептид RYQLHPYR обладает противоопухолевой активностью и имеет терапевтический потенциал для лечения РПЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359–86. DOI: 10.1002/ijc.29210.
2. Lehrer R.I. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(9):727–38. DOI: 10.1038/nrmicro976.
3. Hancock R.E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* 2001;1(3):156–64. DOI: 10.1016/S1473-3099(01)00092-4.
4. Koczulla A.R., Bals R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs* 2003;63(4):389–406. DOI:10.2165/00003495-200363040-00005.
5. Otvos L.Jr. Antibacterail peptides and proteins with multiple cellular targets. *J Pept Sci* 2005;11(11):697–706. DOI: 10.1002/psc.698.
6. Nicolaou K.C., Jinyou X., Murphy F. et al. Total synthesis of sanglifehrin A. *Chem Int Ed Engl* 1999;38(16):2447–51.
7. Xia Z., Smith C.D. Total synthesis of dendroamide A, a novel cyclic peptide that reverses multiple drug resistance. *J Org Chem* 2001;66(10):3459–66.
8. Davies J.S. the cyclization of peptides and depsiptides. *J Peptide Sci* 2003;9(8):471–501. DOI: 10.1002/psc.491.
9. Lyu P., Ge L., Ma R. et al. Identification and pharmaceutical evaluation of novel frog skin-derived serine proteinase inhibitor peptide-PE-BBI (Pelophylax esculentus Bowman-Birk inhibitor) for the potential treatment of cancer. *Sci Rep* 2018;8(1):14502. DOI: 10.1038/s41598-018-32947-5.
10. Zainodini N., Hassanshahi G., Hajizadeh M. et al. Nisin Induces Cytotoxicity and Apoptosis in Human Astrocytoma Cell Line (SW1088). *Asian Pac J Cancer Prev* 2018;19(8):2217–22. DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.8.2217.
11. Tanner J.D., Deplazes E., Mancera R.L. the Biological and Biophysical Properties of the Spider Peptide Gomesin. *Molecules* 2018;23(7):E1733. DOI: 10.3390/molecules23071733.
12. Veloria J.R., Chen L., Li L. et al. Novel cell-penetrating-amyloid peptide conjugates preferentially kill cancer cells. *MedChemComm* 2017;9(1):121–30. DOI: 10.1039/c7md00321h.
13. Lindgren M., Rosenthal-Aizman K., Saar K. et al. Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide. *Biochem Pharmacol* 2006;71(4):416–25. DOI: 10.1016/j.bcp.2005.10.048.
14. Liang J.F., Yang V.C. Synthesis of doxorubicin-peptide conjugate with multidrug resistant tumor cell killing activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2005;15(22):5071–5. DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.07.087.
15. Brogden K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005;3(3):238–50. DOI: 10.1038/nrmicro1098.
16. Mader J.S., Hoskin D.W. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs* 2006;15(8):933–46. DOI: 10.1517/13543784.15.8.933.
17. Yuan J., You X., Ni G. et al. Iodine-125 labeled Australian frog tree host-defense peptides caerin 1.1 and 1.9 better inhibit human breast cancer cells growth than the unlabeled peptides. 125I-caerin 1.9 may better be used for the treatment of breast cancer. *Hell J Nucl Med* 2018;21(2):115–20. DOI: 10.1967/s002449910803.
18. Уханова Т.М., Кулинич Е.А., Кудинова В.К. Терапевтические дозовые характеристики химерного пептида MM-D37K при парентеральном введении мышам BALB/C NUDE с колоректальным раком человека HCT-116. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(2):36–41. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-36-41. [Ukhanova T.M., Kulinich E.A., Kudina V.K. Therapeutic dose characteristics of the chimeric peptide MM-D37K when administered parenterally to BALB/C NUDE mice with human colorectal cancer HCT-116. *Rossiyskiy bioterapevicheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2017;16(2):36–41. (In Russ.)].
19. Xiang Y., Shan W., Huang Y. Improved anticancer efficacy of doxorubicin mediated by human-derived cell-penetrating peptide dNP2. *Int J Pharm* 2018;551(1–2):14–22. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.011.
20. Kritzer J.A., Stephens O.M., Guaracino D.A. et al. β -Peptides as inhibitors of protein–protein interactions. *Bioorg Med Chem* 2005;13(1):11–6. DOI: 10.1016/j.bmc.2004.09.009.
21. Qvit N., Mochly-Rosen D. Highly Specific Modulators of Protein Kinase C Localization: Applications to Heart Failure. *Drug Discov Today Dis Mech* 2010;7(2):e87–e93. DOI: 10.1016/j.ddmec.2010.07.001.
22. Zhang X.X., Eden H.S., Chen X. Peptides in cancer nanomedicine: drug carriers, targeting ligands and protease substrates. *J Control Release* 2012;159(1):2–13. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.10.023.
23. Thayer A.M. Improving peptides. *C&EN* 2011;89(22):13–20.
24. Borghouts C., Kunz C., Groner B. Current strategies for the development of peptide-based anticancer therapeutics. *J Pept Sci* 2005;11(11):713–26. DOI: 10.1002/psc.717.
25. Platt V.M., Szoka F.C.Jr. Anticancer Therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor. *Mol Pharm* 2008;5(4):474–86. DOI: 10.1021/mp800024g.
26. Vives E., Schmidt J., Pelegrin A. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochim Biophys Acta* 2008;1786(2):126–38. DOI: 10.1016/j.bbcan.2008.03.001.

27. Ijaz M., Wang F., Shahbaz M. et al. the Role of Grb2 in Cancer and Peptides as Grb2 Antagonists. *Protein Pept Lett* 2018;24(12):1084–95. DOI: 10.2174/0929866525666171123213148.
28. Lisabeth E.M., Falivelli G., Pasquale E.B. Eph receptor signaling and ephrins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(9):a009159. DOI: 10.1101/cshperspect.a009159.
29. Lamberto I., Lechtenberg B.C., Olson E. et al. Development and structural analysis of a nanomolar cyclic peptide antagonist for the EphA4 receptor. *ACS Chem Biol* 2014;9:2787–95. DOI: 10.1021/cb500677x.
30. Wang Y., Menendez A., Fong C. et al. Ephrin B2/EphB4 mediates the actions of IGF-I signaling in regulating endochondral bone formation. *J Bone Miner Res* 2014;29:1900–13. DOI: 10.1002/jbmr.2196.
31. Accardo A., Aloj L., Aurilio M. et al. Receptor binding peptides for target-selective delivery of nanoparticles encapsulated drugs. *Int J Nanomedicine* 2014;9:1537–57. DOI: 10.2147/IJN.S53593.
32. Patel A.R., Chougule M., Singh M. EphA2 targeting pegylated nanocarrier drug delivery system for treatment of lung cancer. *Pharm Res* 2014; 31:2796–809. DOI: 10.1007/s11095-014-1377-4.
33. Maxwell C.A., McCarthy J., Turley E. Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions? *J Cell Sci* 2008;121(Pt 7):925–32. DOI: 10.1242/jcs.022038.
34. Turley E. A., Naor D. RHAMM and CD44 peptides-analytic tools and potential drugs. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012;17:1775–94.
35. Tabarkiewicz J., Giannopoulos K. Definition of a target for immunotherapy and results of the first Peptide vaccination study in chronic lymphocytic leukemia. *Transplant Proc* 2010;42(8):3293–6. DOI: 10.1016/j.transproceed.2010.07.022.
36. Casalegno-Garduño R., Schmitt A., Schmitt M. Clinical peptide vaccination trials for leukemia patients. *Expert Rev Vaccines* 2011;10(6):785–99. DOI: 10.1586/erv.11.56.
37. Esguerra K.V., Tolg C., Akentieva N. et al. Identification, Design and Synthesis of Tubulin-Derived Peptides as Novel Hyaluronan Mimetic Ligands for the Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility (RHAMM/HMMR). *Integr Biol (Camb)* 2015;7(12):1547–60. DOI: 10.1039/c5ib00222b.
38. Luyt L.G., Turley E.A., Esguerra K.V. Rhamm binding peptides. International Patent WO2011/150495. 2011. London Health Sciences Centre Research Inc.
39. Turley E.A., Noble P.W., Bourguignon L.Y. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem* 2002;277(7):4589–92. DOI: 10.1074/jbc.R100038200.
40. Akentieva N.P., Shushanov S.S. Visualization of Ovarian Cancer Cells with Peptide VEGEGEGEEY. *Biochemistry (Moscow), Suppl A: Membrane and Cell Biology* 2018; 12(2):189–98. DOI: 10.1134/S1990747818020022.
41. Акентьева Н.П., Шушанов С.С., Котельников А.И. Эффект RHAMM-селективных пептидов на выживаемость клеток рака молочной железы. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2015;159(5):618–21. DOI: 10.1007/s10517-015-3041-3. [Akentieva N.P., Shushanov S.S., Kotelnikov A.I. Effects of RHAMM/HMMR-Selective Peptides on Survival of Breast Cancer Cells. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2015;159(5):618–21. (In Russ.)].
42. Акентьева Н.П., Шушанов С.С. Ингибирующий эффект RHAMM-таргет пептидов на инвазивность клеток рака молочной железы. Вопросы онкологии 2016;62(6):831–7. ISSN 0507-3758. [Akentieva N.P., Shushanov S.S. Inhibitory effect of RHAMM-target peptides on invasion of breast cancer cells. *Voprosy onkologii = Problems in oncology* 2016;62(6):831–7 (In Russ.)].
43. Tolg C., Hamilton S.R., Nakrieko K.A. et al. Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1, 2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair. *J Cell Biol* 2006;175(6):1017–28. DOI: 10.1083/jcb.200511027.
44. Mäde V., Els-Heindl S., Beck-Sickinger A.G. Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides. *Beilstein J Org Chem* 2014;10:1197–212. DOI: 10.3762/bjoc.10.118.
45. Schreer A., Tinson C., Sherry J.P., Schirmer K. Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Anal Biochem* 2005;344(1):76–85. DOI: 10.1016/j.ab.2005.06.009.
46. Terui Y., Furukawa Y., Kikuchi J. et al. Apoptosis during HL-60 cell differentiation is closely related to a G0/G1 cell cycle arrest. *J Cell Physiol* 1995;164(1):74–7. DOI: 10.1002/jcp.1041604110.
47. Liu C.Y., Takemasa A., Liles W.C. et al. Broad-spectrum caspase inhibition paradoxically augments cell death in TNF- α -stimulated neutrophils. *Blood* 2003;101(1):295–304. DOI: 10.1182/blood-2001-12-0266.
48. Pradhan N., Pratheek B.M., Garai A. et al. Induction of apoptosis by Fe (salen) Cl through caspase-dependent pathway specifically in tumor cells. *Cell Biol Int* 2014;38(10):1118–31. DOI: 10.1002/cbin.10308.
49. Artym V.V., Yamada K.M., Mueller S.C. ECM degradation assays for analyzing local cell invasion. *Methods Mol Biol* 2009;522:211–9. DOI: 10.1007/978-1-59745-413-1_15.
50. Xu C., Wang Y., Yu X. et al. Evaluation of human mesenchymal stem cells response to biomimetic bioglass-collagen-hyaluronic acid-phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2009;88(1):264–73. DOI: 10.1002/jbm.a.31931.
51. Rizzardi A.E., Vogel R.I., Koopmeiners J.S. et al. Elevated hyaluronan and hyaluronan-mediated motility receptor are associated with biochemical failure in patients with intermediate-grade prostate tumors. *Cancer* 2014;120(12):1800–9. DOI: 10.1002/cncr.28646.
52. Efremov R.G., Baradaran R., Sazanov L.A. the architecture of respiratory complex I *Nature* 2010;465(7297):441–5. DOI: 10.1038/nature09066.
53. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. М.: Эдиториал УРСС, 2002. [Baryshnikov A.Yu., Shishkin Yu.V. Immunological problems of apoptosis. М.: Editorial URSS, 2002. (In Russ.)].
54. Льюин Б., Кассимерис Л., Лингаппа В. и др. Клетки. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. [Lewin B., Kassimeris L., Langappa V. et al. *Cells*. Moscow: Binom. *Laboratoriya znaniy*, 2011. (In Russ.)].
55. Гордеева А.В., Лабас Ю.А., Звягильская Р.А. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция. Биохимия 2004;69(10):1301–13. [Gordeeva A.V., Labas Yu.A., Zvyagil'skaya R.A. Apoptosis of unicellular organisms: mechanisms and evolution. *Biokhimiya = Biochemistry* 2004;69(10):1301–13. (In Russ.)].
56. Cory S. Apoptosis. Fascinating death factor. *Nature* 1994;367(6461):317–8. DOI: 10.1038/367317a0.
57. Smith C.A., Farrah T., Goodwin R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994;76(6):959–62.
58. Wiley S.R., Schooley K., Smolak P.J. et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that

- induces apoptosis. *Immunity* 1995;3(6):673–82.
59. Pitti R.M., Marsters S.A., Ruppert S. et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996;271(22):12687–90.
 60. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88(3):355–65.
 61. Tartaglia L., Goeddel D.V. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992;13(5):151–3. DOI: 10.1016/0167-5699(92)90116-O.
 62. Peter M.E., Neufelder A.E., Hengartner M.O. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(24):12736–7.
 63. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. *Molecular biology of the cell*. 5th Edn. Garland Sci 2008.
 64. Qian T., Nieminen A.L., Herman B. et al. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997;273(6 Pt 1):1783–92.
 65. Petit P.X., Susin S.A., Zamzami N. et al. Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett* 1996;396(1):7–13.
 66. Манских В.Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение. *Цитология* 2007;49(11):909–15. [Manskikh V.N. Pathways of cell death and their biological importance. *Tsitologiya* = *Citology* 2007;49(11):909–15 (In Russ.)].
 67. Bröker L.E., Kruyt F.A., Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 2005;11(9):3155–62. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2223.
 68. Akentieva N. RHAMM-target peptides inhibit invasion of breast cancer cells. *EBTJ* 2017;1:138–148. DOI: 10.24190/ISSN2564-615X/2017/02.05.
 69. Akentieva N.P., Shushanov S.S. Inhibition of cancer cell invasiveness by the synthetic peptides GEGEEGEE and DFGEEAEE. *Biochemistry (Moscow), Suppl A: Membrane and Cell Biology* 2017;11(1):24–34. DOI: 10.1134/S1990747816040127.

Вклад авторов:

Н.П. Акентьева: разработка дизайна исследования, постановка экспериментов, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи.

С.С. Шушанов: культивирование клеточных линий (PC3 m-LN4 и MEF), постановка экспериментов по влиянию пептида на апоптоз клеток, анализ полученных данных.

Authors' contributions

N.P. Akentieva: study design; experimental set up, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data; manuscript preparation; literature review on the subject of the article.

S.S. Shushanov: cell line cultures (PC3 m-LN4 and MEF), experiments on the effect of the peptide on cell apoptosis, analysis of the obtained data.

ORCID авторов/ORCID of authors

Н.П. Акентьева/N.P. Akentieva: <https://orcid.org/0000-0002-9126-3070>

С.С. Шушанов/S.S. Shushanov: <https://orcid.org/0000-0002-2273-3024>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа проводилась по тематической карте Минобрнауки РФ в соответствии с государственным заданием (регистрационный № 0089-2019-0014). Исследование выполнено без спонсорской поддержки.

Financial support. The study was performed per the subject card of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation in accordance with the state task (registration № 0089-2019-0014). The study wasn't supported by external sources.

Статья поступила: 11.09.2018. Принята в печать: 12.04.2019.

Article received: 11.09.2018. Accepted for publication: 12.04.2019.