



УДК 577.175.82.05 : 612.112.94

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА МИЕЛОПЕПТИДОВ С ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2010 г. Л. А. Фонина*, Е. В. Кудрявцева**, Ж. Д. Беспалова**, М. А. Ефремов*,
А. А. Михайлова*, Е. А. Кирилина**

*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

**НИИ экспериментальной кардиологии ФГУ Российский кардиологический научно-производственный
комплекс Росздрава, Москва

Поступила в редакцию 10.10.2009 г. Принята к печати 25.12.2009 г.

Классическим и твердофазным методами пептидной химии синтезированы костномозговые пептиды Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro (МП-4) и Val-Asp-Pro-Pro (МП-6) и изучена их дифференцировочная активность на лейкозных клеточных линиях HL-60 и К-562. Показано, что оба пептида индуцируют терминальную дифференцировку лейкозных бластов, однако механизм действия этих пептидов различен.

Ключевые слова: миелопептиды МП-4 и МП-6, синтез, дифференцировочная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Иммунорегуляторные пептиды костномозговой природы (миелопептиды, МП) участвуют в сложной цепи иммунорегуляторных процессов, происходящих в живых организмах. Они проявляют широкий спектр биологических активностей (иммунокорригирующую, макрофагстимулирующую, дифференцировочную) в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [1]. В настоящее время можно считать доказанным, что МП являются иммунорегуляторными пептидами, действие которых направлено на сохранение нормального состояния иммунного статуса организма.

На ранних этапах изучения МП было показано, что выделяемая из костного мозга смесь МП содержит факторы, способные индуцировать терминальную дифференцировку миелоидных клеток. При добавлении смеси МП к клеткам лейкозных линий снижалось количество активно пролиферирующих бластов и появлялись более зрелые клетки [2]. После выделения индивидуальных МП, их идентификации и синтеза, было установлено, что одним из таких факторов является октапептид Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro (МП-4), который индуцирует дифференцировку лейкозных клеточных линий HL-60 (миелобластный лейкоз) и К-562 (эритробластный лейкоз) [3, 4]. Было установлено, что под влиянием МП-4 увеличивается экспрессия дифференцировочных антигенов CD14 и CD38 на поверх-

ности клеток линии HL-60 и антигена CD44 на поверхности клеток линии К-562 [5].

В предварительных экспериментах нами было установлено, что выделенный из смеси МП тетрапептид Val-Asp-Pro-Pro (МП-6) также проявляет дифференцировочный эффект, индуцируя дифференцировку лейкозных клеточных линий HL-60 и К-562.

Данная работа посвящена синтезу и сравнительному изучению дифференцировочной активности миелопептидов МП-4 и МП-6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пептид МП-4 синтезировали, используя сочетание твердофазного и классического методов синтеза. Поскольку С-концевой аминокислотой в МП-4 является пролин, для предотвращения образования дикетопиперазина в процессе наращивания пептидной цепи С-концевой трипептид Met-Thr-Pro синтезировали классическими методами пептидной химии в растворе. Полученный трипептид присоединяли к полимерному носителю (хлорметилированный сополимер стирола с 1% дивинилбензола, содержание хлора 1 ммоль/г) методом цезиевых солей. Дальнейшее наращивание пептидной цепи проводили твердофазным методом, используя стандартную Вос-методологию. α-Аминогруппы блокировали Вос-группой, ОН-группу треонина – Bzl-группой, гуанидинофункцию аргинина – Mtr-группой. По окончании синтеза пептид МП-4 отщепляли от носителя в условиях, описанных в работе [6].

Сокращения: Bzl – бензил; BSA – бис(О,N-триметилсилил)ацетамид; Mtr – 4-метокси-2,3,6-триметилсульфонил; PMA – форбол 12-миристал 13-ацетат; МП – миелопептиды.

* Автор для связи (тел.: (495) 330-72-56; эл. почта: kirilinaelen@yandex.ru).

Таблица 1. Изменения пролиферации^a клеток HL-60 и K-562 под влиянием МП-4

| Добавляемый агент (концентрация) | Пролиферация клеток, % от контроля | |
|-------------------------------------|------------------------------------|-------------|
| | HL-60 | K-562 |
| – (контроль) | 100 | 100 |
| PMA (10 нг/мл) | 53 ± 5.4** | |
| DMSO (0.5%) | | 67 ± 8.4** |
| МП-4 (1 × 10 ⁻⁴ М) | 104 ± 11.3 | 82 ± 14.5* |
| (1 × 10 ⁻⁵ М) | 102 ± 8.1 | 79 ± 14.8* |
| (1 × 10 ⁻⁶ М) | 68 ± 22.2** | 42 ± 17.2** |
| (1 × 10 ⁻⁷ М) | 77 ± 15.8** | 76 ± 19.2* |
| (1 × 10 ⁻⁸ М) | 91 ± 11.2 | 101 ± 7.5 |

^a Включение [³H]тимидина в ДНК; *–*p* < 0.05; **–*p* < 0.01.

Таблица 2. Изменения пролиферации^a клеток HL-60 и K-562 под влиянием МП-6

| Добавляемый агент (концентрация) | Пролиферация клеток, % от контроля | |
|-------------------------------------|------------------------------------|------------|
| | HL-60 | K-562 |
| – (контроль) | 100 | 100 |
| PMA (10 нг/мл) | 43 ± 17.4** | |
| DMSO (0.5%) | | 77 ± 18.9* |
| МП-6 (1 × 10 ⁻⁴ М) | 75 ± 19.1* | 82 ± 14.6* |
| (1 × 10 ⁻⁵ М) | 76 ± 19.4* | 71 ± 11.1* |
| (1 × 10 ⁻⁶ М) | 68 ± 4.8** | 79 ± 14.7* |
| (1 × 10 ⁻⁷ М) | 69 ± 13.2** | 73 ± 7.3** |
| (1 × 10 ⁻⁸ М) | 111 ± 19.0 | 83 ± 14.1* |

^a Включение [³H]тимидина в ДНК; *–*p* < 0.05; **–*p* < 0.01.

Пептид МП-6 синтезировали классическими методами пептидной химии в растворе. Целевые пептиды МП-4 и МП-6 выделяли и очищали методом обращенно-фазовой хроматографии, они охарактеризованы данными ВЭЖХ, масс-спектрометрии и секвенирования. По данным аналитической ВЭЖХ содержание целевых пептидов МП-4 и МП-6 было более 97%.

Дифференцировочные свойства МП-4 и МП-6 определяли по изменению метаболизма клеток, характерному для процесса дифференцировки: снижению пролиферации клеток линии HL-60 и K-562. Эти две клеточные линии характеризуются тем, что способны спонтанно пролиферировать, при этом в популяции таких пролиферирующих клеток появляются лишь отдельные дифференцированные (зрелые) формы. Дифференцировка таких клеток происходит лишь под влиянием дифференцировочных факторов, конечным итогом действия которых является появление зрелых клеток,

сопровождаясь снижением уровня пролиферации и, соответственно, снижением уровня синтеза ДНК. В качестве контроля в работе мы использовали известные дифференцировочные вещества: PMA, вызывающий дифференцировку клеточной линии HL-60 по моноцитарному ряду и DMSO, который оказывает дифференцировочный эффект на эритробластную клеточную линию K-562.

Как видно из табл. 1, наиболее выраженное снижение синтеза ДНК в клетках линии HL-60 наблюдалось при использовании МП-4 в концентрациях – 1 × 10⁻⁶ и 1 × 10⁻⁷ М, при этом эффект данного пептида сравним с действием PMA. На клеточной линии K-562 действие МП-4 проявлялось в более широком диапазоне концентраций – как при высоких 1 × 10⁻⁴ и 1 × 10⁻⁵ М, так и при более низких – 1 × 10⁻⁶–1 × 10⁻⁷ М, при этом степень выраженности эффекта МП-4 сравнима в данном случае с эффектом DMSO.

Таким образом, синтетический аналог эндогенного иммунорегуляторного пептида МП-4 вызывает изменения метаболизма клеток, характерные для процесса дифференцировки, что показано на двух лейкозных клеточных линиях HL-60 и K-562.

Результаты экспериментов по изучению влияния МП-6 на метаболизм клеток линий HL-60 и K-562 представлены в табл. 2. Как видно из таблицы, наиболее выраженное действие на клетки HL-60 оказывает пептид в концентрациях 1 × 10⁻⁶ и 1 × 10⁻⁷ М. Однако и более высокие концентрации МП-6 – 1 × 10⁻⁴ и 1 × 10⁻⁵ М также приводят к снижению синтеза ДНК. Таким образом, МП-6 оказывает на метаболизм клеток линии HL-60 действие в более широком диапазоне концентраций, чем МП-4.

Что касается влияния МП-6 на клетки линии K-562, то из табл. 2 видно, что наиболее выраженные изменения в метаболизме наблюдаются при концентрациях пептида 1 × 10⁻⁵–1 × 10⁻⁷ М, т.е. при тех же, что и для клеток линии HL-60. При этом можно отметить, что МП-4 в концентрации 1 × 10⁻⁶ М вызывает максимальное снижение синтеза ДНК в клетках линии K-562 (58% от контроля).

Из представленных данных можно сделать вывод о том, что оба пептида обладают способностью влиять на метаболизм клеток двух лейкозных линий: HL-60 и K-562, и их дифференцировочное действие сравнимо по степени выраженности. Однако следует подчеркнуть, что пептид МП-6 оказывает свое влияние в более широком диапазоне концентраций, чем МП-4.

Наличие дифференцировочной активности обоих пептидов было показано также по увеличению экспрессии маркеров CD14 и CD38 (маркеры зрелых моноцитов и макрофагов) на клетках линии HL-60 [5, 7]. Данные цитометрического анализа клеток линии HL-60 показывают, что МП-4 в максимально эффективной концентрации 1 × 10⁻⁶ М вызывает усиление экспрессии антигенов CD14 и CD38 в 8 и 7 раз по сравнению с уровнем спонтан-

ной дифференцировки этих клеток, а МП-6 в той же дозе (1×10^{-6} М) — до 1.5 и 1.4 раза соответственно. То же самое наблюдалось и в отношении клеток линии К-562. МП-4 (1×10^{-6} М) вызывал усиление экспрессии маркеров зрелых клеток CD44 в 2.75 раза, а МП-6 в той же дозе — в 1.9 раза [5, 7, 8]. Таким образом, действие МП-4 на экспрессию маркеров зрелых клеток в несколько раз превышает выраженность действия МП-6.

Исследуемые пептиды отличаются по первичной структуре, однако конечный эффект их воздействия на клетки лейкозных линий одинаков: оба пептида индуцируют терминальную дифференцировку лейкозных бластов. Несмотря на одинаковый конечный эффект, механизм действия пептидов различен. Ранее было показано, что меченный флуоресцеином по *N*-концу пептид МП-4 сохраняет биологическую активность, присущую исходному пептиду; он вытесняется немеченым пептидом, но не вытесняется пептидом МП-6. Кроме того, показано, что меченый МП-4 способен проникать внутрь клетки и концентрироваться вокруг ядра, что, по-видимому, и обуславливает его дифференцировочное действие [7].

Результаты проведенных экспериментов показали, что оба исследуемых пептида являются дифференцировочными факторами для клеток линии HL-60 и К-562. Они снижают пролиферацию и увеличивают количество зрелых клеток, несущих маркеры дифференцировки CD14, CD38 и CD44 [5, 7, 8]. Под влиянием этих двух пептидов в популяциях лейкозных линий появляются зрелые, функционально активные клетки.

Эти пептиды могут быть перспективны для разработки на их основе лекарственных препаратов для коррекции нарушений кроветворения, которые при этом не оказывают негативного влияния на нормальные клетки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерческие аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия; Fluka, Швейцария) или производные, полученные по стандартным методикам. Индивидуальность полученных соединений на промежуточных стадиях синтеза проверяли с помощью ТСХ на пластинках с силикагелем фирмы "Merck" (Германия) в системах растворителей: хлороформ—метанол—32% CH_3COOH , 60 : 45 : 20 (А); хлороформ—метанол—32% CH_3COOH , 5 : 3 : 1 (Б); хлороформ—метанол, 9.5 : 0.5 (В); хлороформ—метанол, 8 : 2 (Г); хлороформ—метанол, 9 : 1 (Д). Вещества обнаруживали с помощью ninгидрина.

Аналитическую ВЭЖХ проводили с использованием хроматографической системы LC-10ADvp (Shimadzu, Япония) на колонке Ультрасфера С18 (4.6×250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% трифторуксусной кислоте (0–80%,

32 мин). Скорость элюции 1.6 мл/мин, детектирование при длине волны 214 и 280 нм.

Препаративную ВЭЖХ конечных пептидов выполняли на колонке (50×250 мм) Диасорб С 16-Т в градиенте концентрации буфера Б в буфере А. Буфер А 0.1% TFA, буфер Б — 80% ацетонитрил в буфере А. Скорость потока 50 мл/мин, детекция при 226 нм.

Аминокислотный анализ выполняли на автоматическом анализаторе Biotronik 5001 (Германия). Для этого пептиды гидролизовали 6 М HCl, содержащей 2% тиогликолевой кислоты, в течение 27 ч при 110°C.

Аминокислотные последовательности пептидов определяли на газовом секвенаторе (Applied Biosystem 477A, США), соединенном с автоматическим анализатором фенилтиогидантоинов аминокислот.

Молекулярные массы, определенные масс-спектрометрически на приборе Thermo Bioanalysis Vision 2000 (Англия), составляли 1017 для МП-4 и 428 для МП-6.

Синтез Val-Asp-Pro-Pro (МП-6)

Вос-Val-Asp(OBzl)-OH. К раствору 1.84 г (8.24 ммоль) β -бензилового эфира аспарагиновой кислоты и 1.39 г бикарбоната натрия в 15.0 мл воды прибавляли раствор 2.59 г (8.24 ммоль) Вос-Val-ONSu в 15.0 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали в вакууме, остаток растворяли в 70.0 мл этилацетата, промывали 2% раствором серной кислоты (2×50 мл) и водой до нейтральной реакции. Этилацетатный раствор сушили над сульфатом натрия и упаривали досуха. Остаток растирали с диэтиловым эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили на воздухе. Выход 2.44 г (70%). Т. пл. 130–132°C. R_f 0.31 (В), 0.75 (Г).

Вос-Val-Asp(OBzl)-Pro-OH. К раствору 1.0 г (2.38 ммоль) Вос-Val-Asp(OBzl)-OH в смеси диоксан—хлористый метилен (2 : 1) прибавляли 0.34 г (2.97 ммоль) *N*-гидроксисукцинимид, охлаждали до 0°C и добавляли 0.69 г *N,N*-дициклогексилкарбодимид. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°C и 12 ч при 20°C. Осадок отделяли, растворитель удаляли в вакууме. Маслообразный остаток растирали с гексаном, супернатант декантировали, кристаллы использовали в качестве карбоксильного компонента.

К раствору 0.3 г (3 ммоль) пролина в смеси с 1.4 мл BSA и 2.0 мл хлористого метилена при 20°C прибавляли раствор карбоксильного компонента в 3 мл хлористого метилена. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 20°C, растворитель удаляли в вакууме. Остаток растворяли в 70.0 мл 5% раствора бикарбоната натрия и промывали диэтиловым эфиром (2×20 мл). Водный слой подкисляли твердой лимонной кислотой до pH 3 и экстрагировали этилацетатом (5×20 мл). Органический слой промыва-

ли водой до нейтральной реакции и сушили над сульфатом натрия. Растворитель удаляли в вакууме, остаток растирали с диэтиловым эфиром. Образовавшиеся кристаллы отфильтровывали, промывали эфиром, сушили на воздухе. Выход 0.90 г (70.0%). Т. пл. 74–76°C, R_f 0.16 (Д), 0.58 (Г).

Val-Asp-Pro-Pro (МП-6). Промежуточное соединение Boc-Val-Asp(OBzl)-Pro-Pro-OH получали аналогично соединению Boc-Val-Asp(OBzl)-Pro-OH, исходя из 0.90 г (1.73 ммоль) последнего и 0.2 г (1.73 ммоль) пролина. Полученный Boc-Val-Asp(OBzl)-Pro-Pro-OH растворяли в 50 мл этанола и гидрировали над 5% Pd/C до исчезновения исходного соединения (контроль ТСХ). Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток обрабатывали 50.0 мл TFA 1 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали, масло растирали с эфиром, осадок отфильтровывали, сушили над NaOH в вакууме. Полученный трифторацетат Val-Asp-Pro-Pro растворяли в воде и очищали методом препаративной ВЭЖХ в градиенте концентрации буфера В в буфере А (см. выше) от 0 до 40% за 80 мин. Фракции, соответствующие основному пику, объединяли, ацетонитрил упаривали, остаток разбавляли водой и лиофилизировали. Выход 0.5 г (67%). Аминокислотный анализ: Asp 0.98 (1), Val 0.93 (1), Pro 1.85 (2). Масс-спектр: вычислено 425, найдено 428. Время удерживания МП-6 составляло 6.13 ± 0.6 мин. Хроматографию проводили на колонке Ultrasphere ODS C18 (4.6×250 мм, 5 мкм) в градиенте ацетонитрила 0–100% в 0.1% TFA за 32 мин. Скорость потока 1.5 мл/мин. Длина волны 214 нм.

Синтез Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro (МП-4)

CF₃COOH · Н-Thr(Bzl)-Pro-OH. К 1.5 г (0.013 моль) пролина добавляли 7.4 мл тритона Б, упаривали в вакууме водоструйного насоса. Остаток растворяли в 100 мл диметилформамида, добавляли 6.6 г (0.012 моль) Boc-Thr(Bzl)-OPcp и перемешивали 12 ч при 20°C. Растворитель из реакционной смеси удаляли упариванием, остаток растворяли в 150 мл 5% водного раствора NaHCO₃ и промывали этилацетатом (1 × 100 мл). Водную фазу подкисляли 20% серной кислотой до pH 3, экстрагировали основное вещество этилацетатом (2 × 100 мл), органический слой промывали водой до нейтральной реакции, этилацетат упаривали. Маслообразный продукт растворяли в 100 мл трифторуксусной кислоты, выдерживали 1 ч при 20°C. Трифторуксусную кислоту упаривали, добавляли сухой диэтиловый эфир. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром, сушили в вакуум-эксикаторе над NaOH. Выход 3.85 г (78%). R_f 0.65 (А), 0.32 (Б).

Boc-Met-Thr(Bzl)-Pro-OH. К раствору 3.85 г (0.009 моль) CF₃COOH · Н-Thr(Bzl)-Pro-OH в 50 мл диметилформамида прибавляли 3.14 мл (0.018 моль) диизопропилэтиламина и 3.4 г (0.009 моль) Boc-Met-ONp и перемешивали 12 ч при 20°C. Реакцион-

ную смесь упаривали, остаток хроматографировали на колонке (15 × 230 мм), заполненной суспензией силикагеля (Serva 60, 90–130 мкм) в хлороформе. Элюцию проводили хлороформом, затем ступенчато смесями хлороформ–метанол в соотношении 9 : 1, 9 : 2, 9 : 3. Фракции, содержащие целевое соединение, упаривали. Выход 4.5 г (91%). R_f 0.83 (А), 0.52 (Б).

Boc-Met-Thr(Bzl)-Pro-полимер. К раствору 4.0 г (0.0073 моль) Boc-Met-Thr(Bzl)-Pro-OH в 24 мл этилового спирта прибавляли раствор 1.195 г (0.0037 моль) Cs₂CO₃ в 6 мл воды. Реакционную смесь упаривали досуха, удаляли остатки влаги с бензолом, высушивали в вакуум-эксикаторе над пятиокисью фосфора до постоянного веса. Цезиевую соль трипептида растворяли в 20 мл DMF, прибавляли 5 г полимера Меррифила (хлорметилированный сополимер стирола с 1% дивинилбензола, содержание хлора 1 ммоль/г) и перемешивали 12 ч при 50°C. Пептидил-полимер отфильтровывали, промывали DMF, смесью DMF–H₂O, метанолом, дихлорметаном, сушили в вакуум-эксикаторе до постоянного веса. Получали 7 г тетрапептидил-полимера (Boc-Met-Thr(Bzl)-Pro-полимер) со степенью замещения 0.46 ммоль/г. Степень замещения определяли пикриновым методом [9] и по привесу.

Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro (МП-4). Присоединение следующих аминокислот проводили на автоматическом пептидном синтезаторе Applied Biosystems, модель 431 А, исходя из 0.1 ммоль Boc-Met-Thr(Bzl)-Pro-полимера (0.217 г). Воспроизводные аминокислот присоединяли по стандартной программе фирмы для однократной конденсации и включали все необходимые промежуточные промывки пептидил-полимера. По окончании синтеза пептидил-полимер промывали дихлорметаном и сушили в вакууме. Полученные 0.35 г октапептидил-полимера суспензировали в смеси: 0.5 мл тиоанизола, 0.25 мл этандитиола, 0.25 мл диметилсульфида, 5 мл TFA, перемешивали 10 мин при 20°C, добавляли 0.5 мл трифторметансульфокислоты, перемешивали 3 ч. Полимер отфильтровывали, вещество высаживали диэтиловым эфиром, отфильтровывали и пересаждали из TFA. Сырой продукт очистили методом ВЭЖХ на колонке Диасорб С 16-Т в градиенте концентрации от 0 до 50% буфера В в буфере А за 150 мин. Выход 0.07 г (43% в расчете на Boc-Met-Thr(Bzl)-Pro-полимер).

Аминокислотный анализ: Phe 1.01 (1), Arg 2.16 (2), Pro 1.92 (2), Ile 1.0 (1), Thr 0.81 (1), Met 0.92 (1). Масс-спектр: вычислено 1017.22, найдено 1017. Время удерживания МП-4 составляло 11.61 ± 0.5 мин. Хроматографию проводили на колонке Ultrasphere ODS C18 (4.6×250 мм, 5 мкм) в градиенте концентрации ацетонитрила 0–100% в 0.1% TFA за 32 мин. Скорость потока 1.5 мл/мин. Длина волны 214 нм.

Культивирование клеток. Культивирование клеток линии HL-60 и K-562 проводили в стандартной

среде RPMI-1640 (ICN, США), содержащей 7% эмбриональной телячьей сыворотки (GIBCO, Англия), 20 мМ HEPES-буфера (Flow Laboratories, Англия), 2 мМ L-глутамин (Flow Laboratories, Англия) и 50 мкг/мл гентамицина (Брынцалов Ферейн, Россия). Клетки культивировали в полистироловых флаконах в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C во влажной атмосфере и 5% CO₂. Каждые 48 ч клетки просматривали в микроскопе и, в зависимости от нарощенного количества клеток, либо добавляли полную среду для инкубации (RPMI-1640), либо клетки рассеивали в новые флаконы и инкубировали снова до тех пор, пока не накапливали нужного для эксперимента количества клеток. Количество живых клеток после инкубации с пептидами отслеживалось в каждой серии экспериментов.

Включение радиоактивной метки – [³H]тимидина. Клетки HL-60 и K-562 высевали в 96-луночные планшеты в количестве 50000 клеток/лунку (в 150 мкл полной среды RPMI-1640). Через 24 ч в лунки (кроме контрольных) добавляли дифференцировочные факторы в разных концентрациях в 50 мкл среды: МП-4, МП-6, PMA или DMSO. В контрольные лунки помещали эквивалентное количество полной среды. Для каждой дозы пептида и контроля делали по 6 повторов (6 лунок клеток), в конце инкубации, перед внесением [³H]тимидина одну из лунок красили трипановым синим и подсчитывали количество живых и мертвых клеток. В среднем процент мертвых клеток составлял 5–7% от эксперимента к эксперименту (всего было поставлено 6 экспериментов). [³H]тимидин (1 мкКи на лунку) вносили на 4-е сутки культивирования. Планшеты помещали на 4.5 ч в CO₂-инкубатор, затем переносили на 24 ч в холодильник (при –28°C). Перед измерением включения [³H]тимидина планшеты размораживали и содержимое каждой лунки переносили на отдельный фильтр из целлюлозы. Образцы оставляли при комнатной температуре на 24 ч до полного высыхания. Далее каждый фильтр

помещали в отдельный флакон со сцинтилляционной жидкостью.

Измерение меченой ДНК проводили на сцинтилляционном счетчике LKB (Швеция).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета компьютерных программ STATGRAPH и пакета функций для статистической обработки программы Excel.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петров Р.В., Михайлова А.А., Фомина Л.А., Степаненко Р.Н. Миелопептиды. М.: Наука, 2000. С. 133–144.
2. Стрелков Л.А., Михайлова А.А. // Иммунология. 1989. № 6. С. 32–36.
3. Стрелков Л.А., Михайлова А.А., Гурьянов С.А., Ефремов М.А., Петров Р.В. // ДАН. 1998. Т. 358. С. 134–136.
4. Strelkov L.A., Mikhailova A.A., Fonina L.A., Petrov R.V. // FEBS Lett. 2000. V. 270. P. 281–284.
5. Кирилина Е.А., Суворов Н.И., Попова С.С., Хайдуков С.В., Рапопорт Е.М., Фомина Л.А., Михайлова А.А. // Бюлл. экспер. биол. и мед. 2005. Т. 140. С. 565–569.
6. Yajima H., Fujii N. // The Peptides: Analysis, Synthesis and Biology. V. 5. /Eds E. Gross, J. Meienhofer. New York: Acad. Press, 1983. P. 65–109.
7. Gur'yanov S.A., Kirilina E.A., Khaidukov S.V., Suvorov N.I., Molotkovskaya I.M., Mikhailova A.A. // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2006. V. 32. P. 517–520 (Гурьянов С.А., Кирилина Е.А., Хайдуков С.В., Суворов Н.И., Молотковская И.М., Михайлова А.А. // Биоорган. химия. 2006. Т. 32. С. 574–578).
8. Кирилина Е.А., Михайлова А.А., Ефремов М.А., Петров Р.В. // ДАН. 2008. Т. 421. С. 705–708.
9. Stewart J.M., Young J.D. // Solid Phase Peptide Synthesis. Second Ed. Rockford, IL.: Pierce Chemical Co., 1984.

Synthesis and Properties of the Myelo-peptides with Differentiating Activity

L. A. Fonina*, E. V. Kudryavtseva**, Zh. D. Besspalova**, M. A. Efremov*,
A. A. Mikhailova*, E.A. Kirilina**

*Phone: +7 (495) 330-7256; e-mail: kirilinaelen@yandex.ru

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

**Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiological Research and Production Complex,
Russian Agency of Public Health and Social Development, Moscow, Russia

The bone marrow myelo-peptides Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro (MP-4) and Val-Asp-Pro-Pro (MP-6) have been synthesised by a classical method and by a solid phase synthesis. The differentiating activity of MP-4 and MP-6 in human leukemia cells HL-60 and K-562 has been studied. Both peptides induce terminal differentiation of these cell lines but the mechanism of action of peptides MP-4 and MP-6 is distinguished.

Key words: myelo-peptide MP-4 and MP-6, synthesis, differentiating activity