

УДК: 613.2:796.0:61: 577.2.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДА IPH LGA

Бочарова К.А.^{1,2}, Коршун Е.И.², Санчес Е.А.²

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет

²Академия постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России

В статье описаны доказательные данные биологических и клинических протекторных эффектов пептида IPH LGA. Представлены данные, что имеется высокая биологическая активность пептида IPH LGA в отношении контроля нормального формирования гормонального фона, регулирующего действия на функциональную активность семенников и сперматогенез у человека на генетическом уровне по данным экспрессии генов на культуре клетки. В статье доказано, что пептид IPH LGA обладает противовоспалительным и нормализующим действием в отношении клеток семенников на основе данных экспериментальной модели, а также повышает репродуктивную функцию за счет повышения активности сперматозоидов по данным экспериментальных исследований.

Ключевые слова: пептид, семенники, сперматогенез, тестостерон, протекторные эффекты, биологические эффекты.

THE BIOLOGICAL EFFECTS OF THE PEPTIDE IPH LGA

Bocharova K.A., Korshun E.I., Sanches E.A.

¹Belgorod State National Research University

²Academy of Postgraduate Education FGBU FNCC FMBA of Russia

The article describes the evidence-based biological and clinical protective effects of the IPH LGA peptide. Data are presented that there is a high biological activity of the IPH LGA peptide in terms of controlling the normal formation of the hormonal background, regulating the effect on the functional activity of the testes and spermatogenesis in humans at the genetic level according to gene expression data on cell culture. The article proves that the IPH LGA peptide has an anti-inflammatory and normalizing effect on testicular cells based on the experimental model data, and also increases the reproductive function by increasing the activity of spermatozoa according to experimental studies.

Key words: peptide, testes, spermatogenesis, testosterone, protective effects, biological effects.

Актуальность проблемы.

В настоящее время большой интерес представляет изучение свойств пептидов [3]. Пептиды имеют ту же структуру, что и белки (протеины), но размер этих молекул меньше. Важно также отметить, что короткие пептиды, являясь естественным продуктом обмена веществ, присутствующих в организме, не могут быть выявлены в крови или моче. В связи с этим интерес представляет изучение свойств отдельных структур на клеточных культурах [7].

Пептид IPH LGA представляет собой пептидный комплекс, содержащий определённую последовательность аминокислот, обладающий регулирующим действием на

органы репродуктивной системы и оказывающий регулирующее действие на функциональную активность семенников [2,6,8].

Результаты экспериментальных исследований показали, что пептид IPH LGA обладает избирательным тканеспецифическим действием на клетки семенников, улучшает их трофику и оказывает регулирующее действие на обменные процессы в них, способствует нормализации функциональных и морфологических изменений в семенниках, снижая риск возникновения различных патологических процессов [4].

Цель исследования. Выявить биологические и клинические протекторные эффекты пептида IPH LGA.

Материал и методы.

Для выявления биологических и клинических эффектов изучаемого пептида нами были проведены 3 направления исследований:

1. Исследование эффектов пептида на клетке.
2. Исследование эффектов пептида в эксперименте.

Для оценки цитостатических и онкопротекторных свойств пептида IPH LGA в отношении моче-половой системы нами были выбраны эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), которые относятся к плюрипотентному типу, это значит, что они могут дифференцироваться во все три первичных зародышевых листка: эктодерму, энтодерму и мезодерму, из которых в дальнейшем образуются органы и железы моче-половой и других систем. Эмбрион человека достигает стадии бластоцисты, из которой получают стволовые клетки, спустя 5-6 дней после оплодотворения. Нами было принято решение оценить экспрессию гена LHRH, ответственного за синтез основных мужских гормонов и сперматогенез, чтобы выявить свойство пептида IPH LGA в отношении половой функции у мужчин и способности нормализации гормонального фона. Нами была оценка маркерных биологических активных молекул иммунофлуоресцентным методом с использованием первичных антител к SSEA-4 (1:150, Abcam) и белку p53 (1:50, Abcam). Группы для исследования: измерение экспрессии молекул до начала исследования, контроль (добавление питательной среды, инкубирование сывороточным альбумином), добавление контрольного пептида дипептида Glu-Trp в концентрации 100 микрограммов (мкг); добавление пептида IPH LGA в концентрации 100 микрограммов (мкг). Для исследования использовали пептиды IPH LGA и Glu-Trp в форме лиофилизированного порошка, которые растворяли стерильной водой для инъекций в объёме 10 мл до конечной концентрации пептидов 100 мкг. Для измерения уровня экспрессии генов применяли PCR-метод с использованием собственных праймеров и реагентов фирмы Novocasta и наборы моноклональных антител производства

фирмы Biosource (Бельгия). Изучение препаратов проводили в конфокальном микроскопе Olympus FluoView FV1000 при увеличении 200, 400, 600. Проводили измерение относительной площади экспрессии в %. Относительную площадь экспрессии рассчитывали, как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Динамика экспрессии генов измерена в условных единицах, базовый уровень принят за 10. Статистическая обработка экспериментальных данных включала в себя подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась в программе Statistica 11.0. Если данные подчинялись нормальному распределению, различия в средних определялись с помощью критерия Стюдента (t).

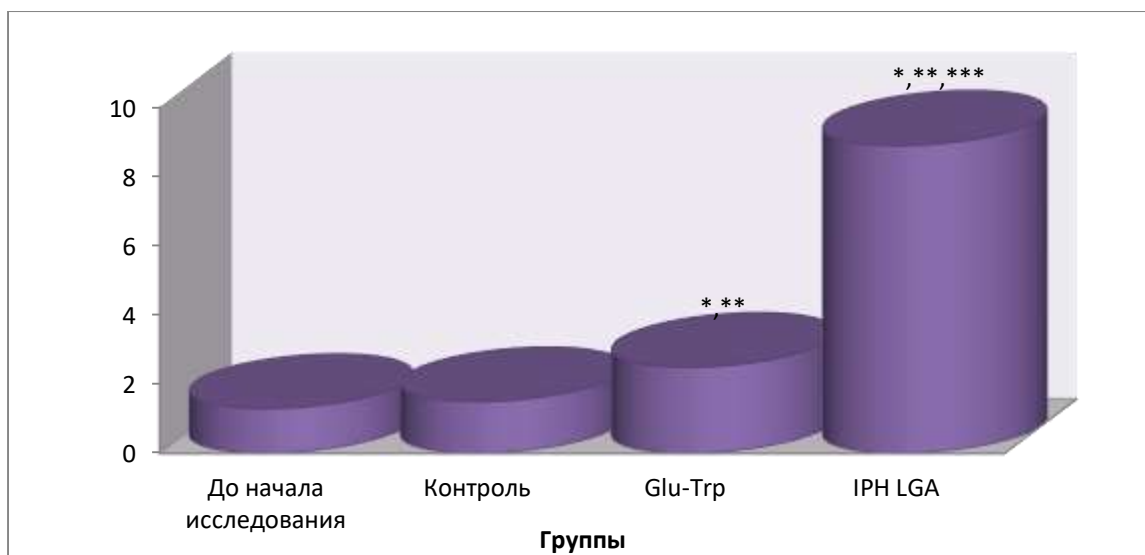
Для эксперимента нами был выбран наиболее часто используемый вид лабораторных животных для исследований свойств пептидов, рекомендуемый МЗ РФ в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств, - это крысы [1]. Для изучения свойств пептида IPH LGA нами была создана экспериментальная модель развития хронического воспалительного процесса в семенниках у крыс. Данная модель инициации хронического воспаления семенников обусловлена провоцированием развития хронического простатита у крыс. Согласно данной модели предполагается индуцирование первой фазы воспаления — альтерации (повреждения) тканей и клеток с выделением медиаторов путем инициации патологической венозной гиперемии предстательной железы [5]. Воспаление вызывали однократным введением в прямую кишку крыс 1 мл патогенной смеси химического раздражителя, в данном эксперименте метаксилола с 10%-м раствором димексида для обеспечения проводниковой функции в соотношении 1 : 3. Для облегчения процедуры инстиляции смеси в прямую кишку использовали специальный нетравматичный полужесткий катетер длиной 25 мм и диаметром 3 мм. Нами было исследовано 50 взрослых крыс (самцов) в возрасте $14,1 \pm 1,2$ месяца и весом $387,1 \pm 5,6$ г. После этого крысы были разделены на 2 группы – контрольную (n=25) и основную (n=25). Крысам основной группы перорально через пипетку-дозатор, позволяющую контролировать объём и факт потребления жидкости, вводился раствор, состоящий из воды для инъекций в дозировке 1 мл, в которой растворен лиофилизированный порошок пептидов IPH LGA в концентрации 0,59 микрограммов (мкг) в расчете на массу тела крысы в сутки (минимальная дозировка, при которой отмечаются признаки улучшения показателей по многолетнему опыту применения пептидов), на протяжении 30 дней. Препарат вводился *per os* прямо в ротовую полость под наблюдением и отслеживанием его проглатывания. Через 30 суток самцам подсажали по 4 самки и через 7 дней проводили подсчет оплодотворённых самок. Оплодотворяющую

способность самцов учитывали по результатам их скрещивания с самками. Спустя 37 суток крыс умертвляли, затем удаляли семенники, фиксировали с помощью погружения в раствор 4% параформальдегида в фосфатном буфере (PBS pH = 7,3) в течение 24 часов при температуре 4°C. Изготавливали срезы толщиной 20 мкм с помощью криотома фирмы Leica модели CM 1510S (Германия). Затем срезы монтировались на предметном стекле и окрашивали гематоксилином и эозином. Для исследования нами применялся микроскоп Olympus IX81. Микроскоп был снабжен цифровой камерой Olympus DP72 (Япония), соединенной с персональным компьютером. Результаты микроскопии полученных срезов реакций выражали в виде процентного отношения окрашенных клеток к общему числу клеток в препарате. Для оценки достоверности различия результатов, полученных в группах до применения лекарственных препаратов, по сравнению с группами после применения лекарственных препаратов использовали критерий Даннета.

Результаты и обсуждение.

Биологические протекторные эффекты пептида IPH LGA на культуре клетки

Влияние пептида IPH LGA на экспрессию гена LHRH, ответственного за формирование мужской гормональной системы и сперматогенез, представлено на рисунке 1. Так, на рисунке 1 нами показано, что пептид IPH LGA достоверно увеличивает в 6,8 раз экспрессию гена LHRH, отвечающего за нормальное образование факторов, формирующих мужскую гормональную систему и сперматогенез.



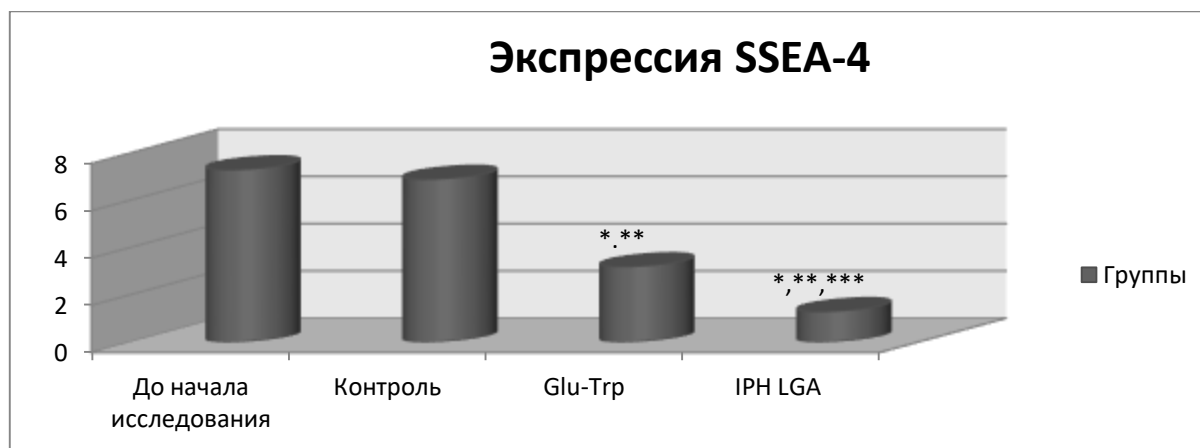
* $p < 0,05$ по сравнению с исходными данными;

** $p < 0,05$ по сравнению с контролем;

*** $p < 0,05$ между показателями уровня экспрессии при применении Glu-Trp и IPH LGA.

Рисунок 1. Экспрессия гена LHRH.

Влияние пептида IPH LGA на экспрессию SSEA-4 и белка p53 в культурах клетки человека представлено на рисунке 2 и 3. На рисунке 2 показано, что применение пептида IPH LGA снижает экспрессию SSEA-4 в 5,6 раз от исходного уровня, который выявляется в большом количестве при раке предстательной железы и других новообразованиях в организме человека.



* $p < 0,05$ по сравнению с исходными данными;

** $p < 0,05$ по сравнению с контролем;

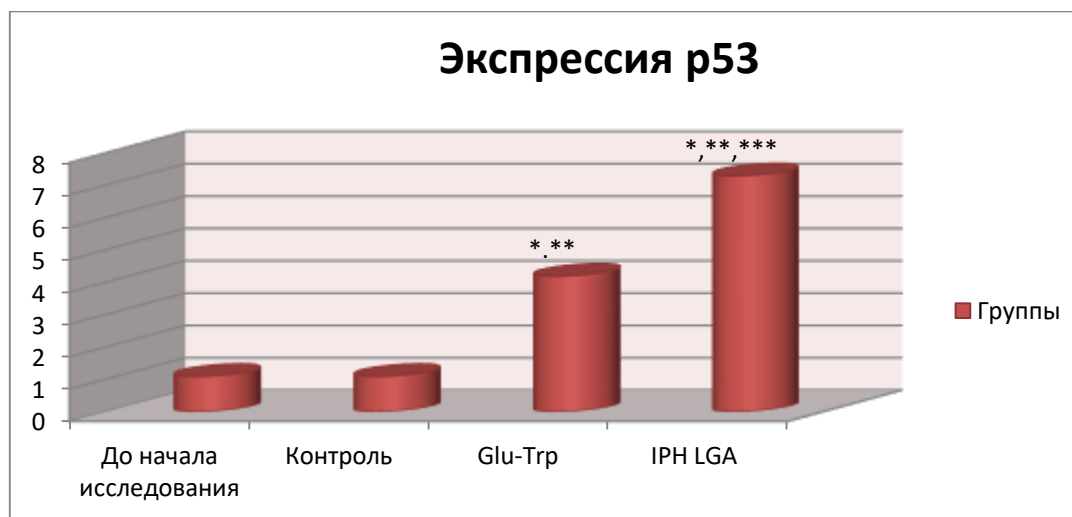
*** $p < 0,05$ между показателями уровня экспрессии при применении Glu-Trp и IPH LGA.

Рисунок 2. Влияние пептида IPH LGA на экспрессию SSEA-4 в культуре клеток человека.

Таким образом, применение пептида IPH LGA носит выраженный онкопротекторный характер, в частности, при злокачественных новообразованиях моче-половой системы по данным уровня экспрессии маркера SSEA-4 на культуре клетки человека.

На рисунке 3 показано, что применение пептида IPH LGA увеличивает выработку белка p53, который является транскрипционным фактором, выполняющим функцию супрессора образования злокачественных опухолей путем активации апоптоза в тканях организма, что позволяет сделать вывод о противоопухолевых свойствах изучаемого пептида.

p53-зависимый апоптоз также позволяет избежать накопления мутаций, а, в случае, когда они уже возникли, p53-зависимый апоптоз позволяет элиминировать такие потенциально опасные для организма клетки, что позволяет сделать вывод о цитопротекторном действии изучаемого пептида.



* $p < 0,05$ по сравнению с исходными данными;

** $p < 0,05$ по сравнению с контролем;

*** $p < 0,05$ между показателями уровня экспрессии при применении Glu-Trp и IPH LGA.

Рисунок 3. Влияние пептида IPH LGA на экспрессию белка p53 в культуре клеток человека.

Полученные данные свидетельствуют о высокой онкопротекторной активности пептида IPH LGA в отношении клеток репродуктивной системы мужчин по данным экспрессии биологических молекул на культуре клетки.

Биологические протекторные эффекты пептида IPH LGA на экспериментальной модели

В ходе эксперимента нами было обнаружено, что при развитии хронического воспаления в семенниках у крыс контрольной группы выявлялась гипертрофия тканей семенников. Увеличение объёма произошло в 2,4 раза по сравнению с нормальными данными. В основной группе увеличение объёма семенников отмечалось только в 1,3 раза от нормы.

В срезах семенников крыс контрольной группы были выявлены очаги ишемии в объёме $56,1 \pm 1,1\%$ распространения от всех площади. В то время как у крыс основной группы были выявлены очаги ишемии в 1,2 раза достоверно меньше, чем у крыс контрольной группы, что составило $45,2 \pm 0,9\%$ распространения от всех площади, $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой. Вероятно, это обусловлено повышением давления в семенниках за счет развития застойных явлений в предстательной железе на фоне развившегося иммунного воспаления.

Все эти данные свидетельствуют о противовоспалительной и нормализующей функции пептида IPH LGA в отношении клеток семенников на основе данных экспериментальной модели.

В данном эксперименте было установлено повышение репродуктивной функции у самцов, которым дополнительно вводили пептид IPH LGA.

Так, у крыс основной группы концентрация сперматозоидов на срезе была в 2,4 раза больше, чем у крыс контрольной группы. Сперматозоидов патологического характера в контрольной группе отмечалось $34,6 \pm 1,1\%$, что достоверно выше, чем в основной группе, что составило $23,1 \pm 0,7\%$, $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (Рисунок 4).



* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Рисунок 4. Патологические сперматозоиды (%).

Самцы в контрольной группе демонстрировали падение оплодотворяющей способности при спаривании с самками: количество осемененных самок было сниженным на $23,5 \pm 1,3\%$, а количество беременных самок составило всего $56,6 \pm 1,6\%$ вместо $82,6 \pm 1,5\%$ в основной группе.

Таким образом, применение пептида IPH LGA оказывает протекторное действие на клетки семенников и повышает оплодотворяющую способность на экспериментальной модели у крыс за счет повышения активности сперматозоидов.

Заключение

Выполненные исследования подтверждают высокую биологическую активность пептида IPH LGA в отношении контроля нормального формирования гормонального фона, регулирующего действия на функциональную активность семенников и сперматогенез у человека на генетическом уровне по данным экспрессии генов на культуре клетки.

Полученные данные свидетельствуют о высокой онкопротекторной активности пептида IPH LGA в отношении клеток репродуктивной системы мужчин по данным экспрессии биологических молекул на культуре клетки.

Также было доказано, что пептид IPH LGA обладает противовоспалительным и нормализующим действием в отношении клеток семенников на основе данных экспериментальной модели, а также повышает репродуктивную функцию за счет повышения активности сперматозоидов по данным экспериментальных исследований.

Список литературы.

1. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств// Коллектив авторов. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
2. Мутовин Г.Р. Основы клинической генетики (геномика и протеомика наследственной патологии). Учебное пособие для вузов в 2-х томах. Вып. 3. М.: ГЭОТАР-медиа, 2008.
3. Хавинсон В.Х. Пептидная регуляция старения. СПб.: Наука, 2009. - 50 с.
4. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Линькова Н.С., Проняева В.Е. Влияние пептидных регуляторов и цитокинов на продолжительность жизни и возрастные изменения системы гемостаза. // Успехи физиол. наук. 2013. Т. 44. № 1. С.39-53. 3.
5. Цветков И.С., Макарова О.В., Мхитаров В.А. Структурно-функциональная характеристика предстательной железы крыс// Клиническая и экспериментальная морфология.- 2013- № (4)- с. 69-74. 2.
6. Arshad H., Ahmad Z., Hasan S.H. Gliomas: correlation of histologic grade, Ki67 and p53 expression with patient survival // Asian Pac J Cancer Prev. – 2010. – Vol. 11. – N 6. – P. 1637-1640;
7. Kageyama S, Ii H, Taniguchi K, Kubota S, Yoshida T, Isono T, Chano T, Yoshiya T, Ito K, Yoshiki T, Kawauchi A, Nakata S. Mechanisms of Tumor Growth Inhibition by Depletion of γ -Glutamylcyclotransferase (GGCT): A Novel Molecular Target for Anticancer Therapy// Int J Mol Sci. -2018 - № 19(7). –p.20-34.
8. Lin L, Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development// Sex Dev. -2008;2(4-5):200-209.