

Научно-исследовательская работа «Изучение свойств пептида IPH — AVN в культурах клеток человека»

ДАТА ПУБЛИКАЦИИ: 30.11.2019

В настоящее время большой интерес представляет изучение свойств пептидов [Dudgeon W. D. и др., 2016]. Пептиды имеют ту же структуру, что и белки, но размер этих молекул меньше. Также важно отметить, что короткие пептиды, являясь естественным продуктом метаболизма, присутствующим в организме, не могут быть идентифицированы в крови или моче. В этом случае изучение свойств отдельных структур может быть проведено только на клеточных культурах.

Пептид IPH — AVN содержит низкомолекулярный пептид, обладает ангиопротекторными и вазопротекторными свойствами и оказывает нормализующее действие на сосудистую систему.

Экспериментальные исследования показали, что пептид IPH — AVN регулирует обменные процессы в сосудах, снижает проницаемость сосудистой стенки, увеличивает резервные возможности организма, что позволяет прогнозировать эффективность пептида IPH — AVN для нормализации функций сосудистой системы человека при нарушениях различного происхождения.

Таким образом, целью настоящего исследования было изучение ангиопротекторных и других свойств пептидов.

Дизайн исследования

1 этап.

Чтобы оценить цитостатические и ангиопротекторные свойства пептида IPH-AVN по отношению к сосудистой системе, мы выбрали эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), которые являются плюрипотентным типом, что означает, что их можно дифференцировать во все три первичных зародышевых листа: эктодерму, энтодерму и мезодерму, из которых в дальнейшем формируются ткани сосудистой системы. Человеческий эмбрион достигает стадии бластоцисты, из которой на 5-6 - й день после оплодотворения получают стволовые клетки.

Гены, ответственные за формирование сосудистой системы, составляют комплекс генов ACE, AGT, AGTR2, NOS3, MTHFR. Ген ACE (ангиотензин-1 — превращающий фермент-ACE) отображен в локусе 17q23. ГЕНЫ AGT и AGTR1, которые кодируют

ангиотензиноген и рецептор 1 — го типа к ангиотензину II, а также продукт гена NOS3-NO — синтаза-ключевой фермент в регуляции тонуса кровеносных сосудов, гладкой мускулатуры сосудистой стенки и тромбоза. Ген метиленетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) регулирует метаболизм гомоцистеина в клетке. Полиморфизмы генов NOS3 и MTHFR связаны с предрасположенностью к сердечно-сосудистым заболеваниям.

На основании этих данных мы решили изучить активность этого комплекса генов при применении пептида IPH — AVN.

Мы оценили экспрессию генов, ответственных за онтогенез сосудистой системы.

2 этап.

Вторым этапом экспериментального исследования была оценка маркерных биологически активных молекул методом иммунофлуоресценции с использованием первичных антител к белку VEGF (1:250, Abcam) и белку p53 (1:50, Abcam).

Мы выбрали следующие маркерные биологически активные молекулы:

1) VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) — сигнальный белок, вырабатываемый клетками для стимуляции васкулогенеза (формирования эмбриональной сосудистой системы) и ангиогенеза (роста новых сосудов в существующей сосудистой системе) [Anteby E. Y. и др., 2004].

2) Старение полипотентных клеток в культуре связано с повышенной активностью гена p53. У мышей с мутацией в гене p53 наблюдалась повышенная устойчивость к развитию опухолей в сочетании со снижением продолжительности жизни. Белок P53 играет ключевую роль в эндогенных противоопухолевых механизмах [Donekover et al., 2002]. Белок P53 контролирует ход процессов клеточного цикла, а также отсутствие повреждений в геноме, которые могли бы привести к дальнейшему развитию патологии. Белок p53 является транскрипционным фактором, который служит в качестве супрессора злокачественных опухолей, активируя апоптоз в тканях организма. Белок p53 активируется при повреждении ДНК, а также факторов, которые могут привести к такому повреждению или сигналу старения клетки и нарушениям ее функциональной активности [Arshad H. и др., 2010]. P53-зависимый апоптоз предотвращает накопление мутаций, и, когда они уже произошли, p53-зависимый апоптоз позволяет устранить такие потенциально опасные клетки [Burtis C., Ashwood E., Bruns D., 2006].

Исследования

Для изучения свойств пептида IPH - AVN мы использовали следующие культуры клеток российской коллекции культур клеток позвоночных (RCVCC):

SC5

Происхождение: человек, эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), бластоциста (5-6 дней роста), полученные в результате ЭКО

Наука. 1998. 282: 1145 – 1147; Онтогенез. 2011. 42 (4): 249 – 263;

Цитология. 2012. 54 (1): 5 – 16.

Морфология: колонии округлых клеток с высоким соотношением ядра и цитоплазмы.

Способ культивирования: монослой; колонии, прикрепленные к митотически инактивированному (митомицин-С) питательному слою мезенхимальных клеток костного мозга человеческого эмбриона.

Условия культивирования: средняя нокаутлируемая сыворотка Dulbecco, модифицированная орлами, средняя сыворотка — Замена нокаутлируемой сыворотки 20% другие ингредиенты – NEAA 1%, L-глутамин 2 мм, 2 — меркаптоэтанол 0,1 мм, bFGF — 8 нг/мл

Процедура повторного посева – механическая пересадка культуры ESC проводилась под контролем микроскопа путем деления колонии на фрагменты с помощью одноразового скальпеля и переноса их на новый слой кормушки; ежедневная смена среды, повторный посев каждые 5-6 дней.

Криоконсервация — питательная среда, 10% ДМСО, 5×10^5 клеток/мл в ампуле.

Жизнеспособность после криоконсервации: 60 % (трипановый синий при нулевом проходе)

Контроль загрязнения: бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены.

Контроль идентичности вида: кариологический анализ.

Кариология: $2n=46$, номер модальной хромосомы 46 (98,0+0,9 %), нормальный кариотип человека (46, XX), количество полиплоидов (0,2 + 0,2%).

Профиль ДНК (STR): Амелогенин: X, X

CSF1PO: 12, 13

D13S317: 8, 11

D16S539: 9, 12

D5S818: 9, 11

D7S820: 8,10,12

THO1: 6, 9,3

ОСПА: 10, 11

vWA: 17,17

Другая характеристика:

Среднее время удвоения популяции одной клетки составляет 28,2 часа.

Увековеченная линия прошла более 120, удвоив популяцию клеток.

Экспрессия поверхностных антигенов, типичных для ЭСК человека: SSEA-4, TRA-1-60 и факторов транскрипции Oct-4, Nanog.

Способность спонтанно дифференцироваться в производные 3 зародышевых листьев.

Способность образовывать тератомы *in vivo*, содержащие производные 3 зародышевых листьев.

Область применения: клеточная биология, эмбриология.

Коллекции: Институт цитологии Российской академии наук (рисунок 1) (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии Российской академии наук, http://www.cytspb.rssi.ru/eotk/infbull_ru.htm), М. С. Богданова, Г. Г. Полянская, А. М. Кольцова Информационный бюллетень «Культуры клеток». Проблема. 34 (2018), http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/katalog1n_2017_with_figs.pdf).

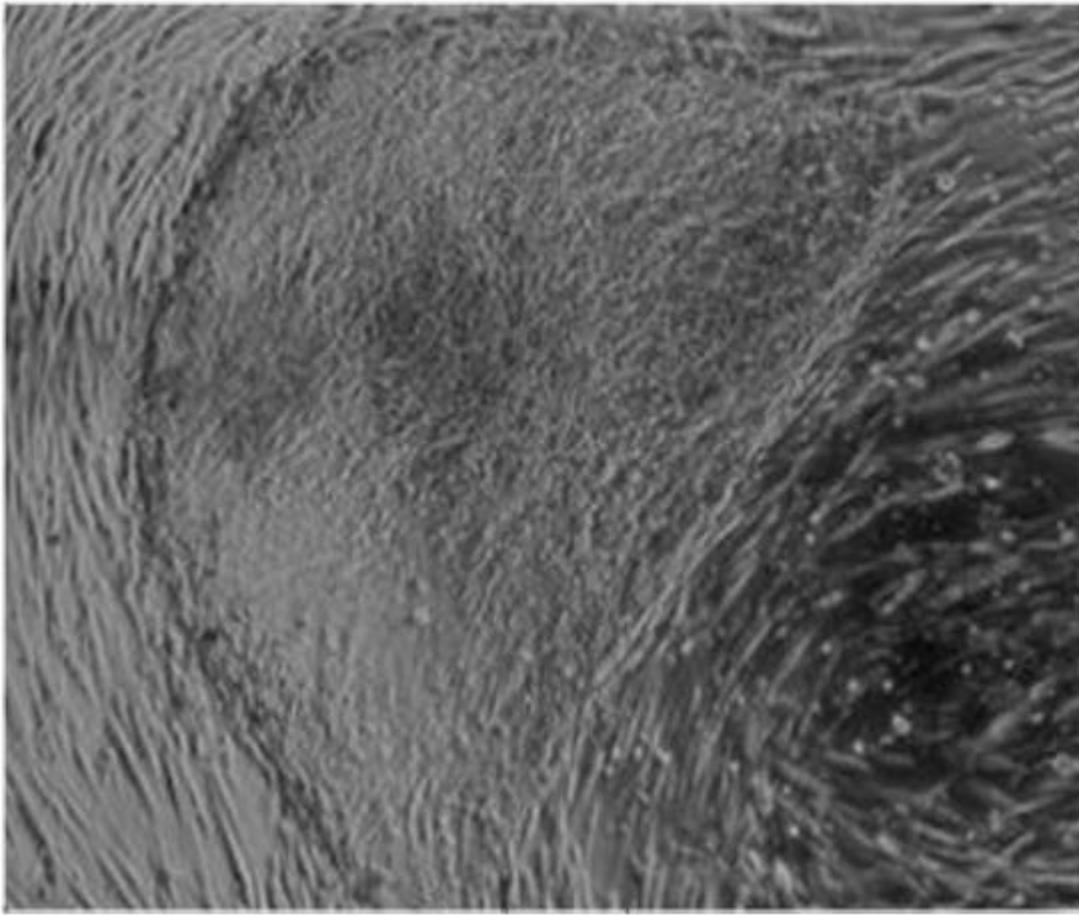


Figure 1. Culture of embryonic stem cells SC 5. Light microscopy, x400.

Метод исследования

Группа для исследования:

Группа 1 – измерение экспрессии молекул перед исследованием,

Группа 2 — контроль (добавление питательной среды, инкубация сывороточного альбумина),

Группа 3 – добавление контрольного пептида дипептида Glu-Trp в концентрации 100 мкг (мкг);

Группа 4 – добавление пептида IPH - AVN в концентрации 100 мкг (мкг).

В исследовании использовали пептиды IPH - AVN и Glu-Trp в виде лиофилизированного порошка, которые растворяли стерильной водой для инъекций в объеме 10 мл до конечной концентрации пептида 100 мкг.

Для большинства диссоциированных клеточных культур, как было показано ранее, наиболее эффективной является концентрация пептидов 100 мкг/мл, основанная на многолетнем опыте работы с пептидами [Линкова Н. С. и др., 2016; Хавинсон В. и др., 2017].

Для контроля был выбран иммунопротекторный пептид Glu-Trp, свойства которого известны и хорошо описаны в литературе [Морозов В. Г., Хавинсон В. Х., Малинин В. В., 2000, Хавинсон В. Х., Морозов В. Г., 2001, Хавинсон В. Х., Кузник Б. И., Линькова Н. С., Проняева В. Е., 2013].

Для измерения уровня экспрессии генов использовали ПЦР-метод с использованием собственных праймеров и реагентов Novocasta и наборов моноклональных антител (производства фирмы Biosource (Бельгия)).

Мазки клеток обрабатывали соответствующими первичными антителами в соответствии со стандартным протоколом:

1. Тройная промывка фосфатно-солевым буфером — FSB(pH=7,2) в течение 5 мин
2. Пермеабелизация клеток 0,1% тритоном X-100, растворенным в FSB, в течение 15 мин.
3. Полоскание в три смены ФСБ (в течение 5 мин.)
4. Инкубация в 1% бычьем сывороточном альбумине (разведенный FSB, pH 7,5) в течение 30 мин для блокирования неспецифического связывания;
5. Инкубация с первичными антителами, 60 мин;
6. Полоскание в три смены ФСБ (в течение 5 мин.)
7. Инкубация со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa Fluor 488 (1:1000, Abcam), 30 мин при комнатной температуре в темноте;
8. Полоскание в три смены ФСБ (в течение 5 мин.);
9. окрашивание ядер клеток красителем Hoechst 33258 (Sigma, США) (1:100 из раствора отходов в dH₂O) в течение 1 мин (краситель используется в качестве флуоресцентного ДНК-маркера, при связывании с которым его флуоресценция увеличивается).
10. Промывание в ФСБ (в течение 5 мин.);
11. упаковка подготовленных специй под покровным стеклом в монтажную среду Dako Флуоресцентная монтажная среда (Dako).

Исследование образца проводилось в конфокальном микроскопе Olympus FluoView FV1000 при увеличении 200, 400, 600. Синий цвет флуоресцирует экспрессию исследуемого маркера. Проведено измерение относительных площадей экспрессии в %. Относительную площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммуноположительными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Динамика экспрессии генов измеряется в условных единицах, базовый уровень принимается равным 10.

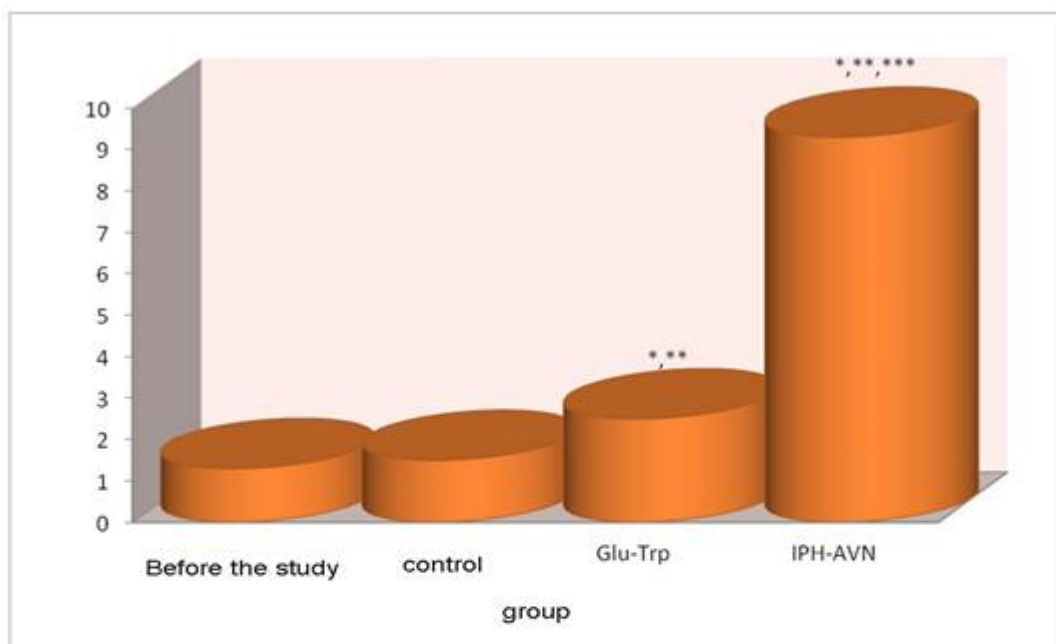
Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка экспериментальных данных включала вычисление среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась в программе Statistica 11.0. Если данные распределялись нормально, то различия в средних значениях определялись с помощью теста Стьюдента (t).

Результаты исследования и обсуждение

Влияние пептида IPH-AVN на экспрессию генов, ответственных за формирование сосудистой системы

Таким образом, на рисунке 2 мы представляем, что пептид IPH-AVN значительно повышает экспрессию комплекса генов ACE, AGT, AGTR2, NOS3, MTHFR, ответственных за нормальное формирование и формирование сосудистой системы, в частности, регулируя тонус кровеносных сосудов, гладкую мускулатуру сосудистой стенки и процессы тромбоза.



* $p < 0.05$ compared to baseline data;

** $p < 0.05$ compared to control;

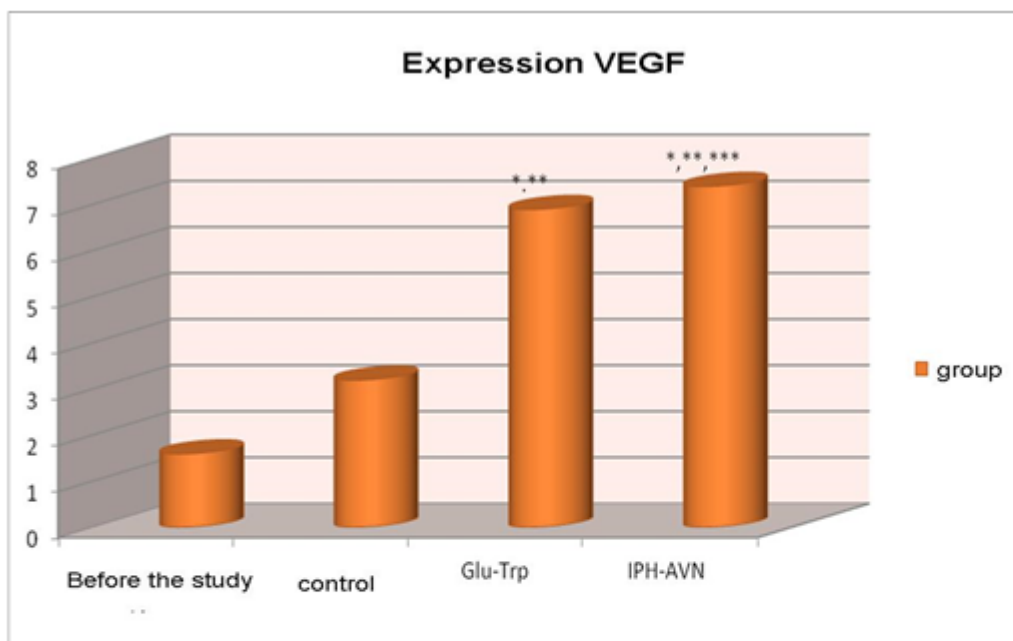
*** $p < 0.05$ between the indicators of the level of expression in the application of Glu-Trp and IPH-AVN.

Figure 2: Expression of a complex of ACE, AGT, AGTR2, NOS3, MTHFR genes involved in the formation and regulation of the vascular system.

Таким образом, из приведенных выше данных видно, что под влиянием пептида IPH-AVN в культуре клеток человека наблюдается статистически значимое повышение экспрессии генов, ответственных за онтогенез сосудистой системы. Эти данные свидетельствуют о том, что пептид IPH-AVN значительно увеличивает в культуре клеток человека «каскад» сигнальных молекул, который необходим для активации пролиферации и дифференцировки стволовых клеток в клетках сосудистой системы, формирования сосудистой системы, регуляции метаболизма в эпителиальных клетках, регуляции тонуса кровеносных сосудов, гладкой мускулатуры сосудистой стенки и тромбоза.

Влияние пептида IPH-AVN на экспрессию белка VEGF в культурах клеток человека

На рисунке 3 показано, что использование пептида IPH-AVN увеличивает экспрессию белка VEGF в 4,5 раза от исходного уровня, что является фактором роста эндотелия сосудов.



* $p < 0.05$ compared to baseline data;

** $p < 0.05$ compared to control;

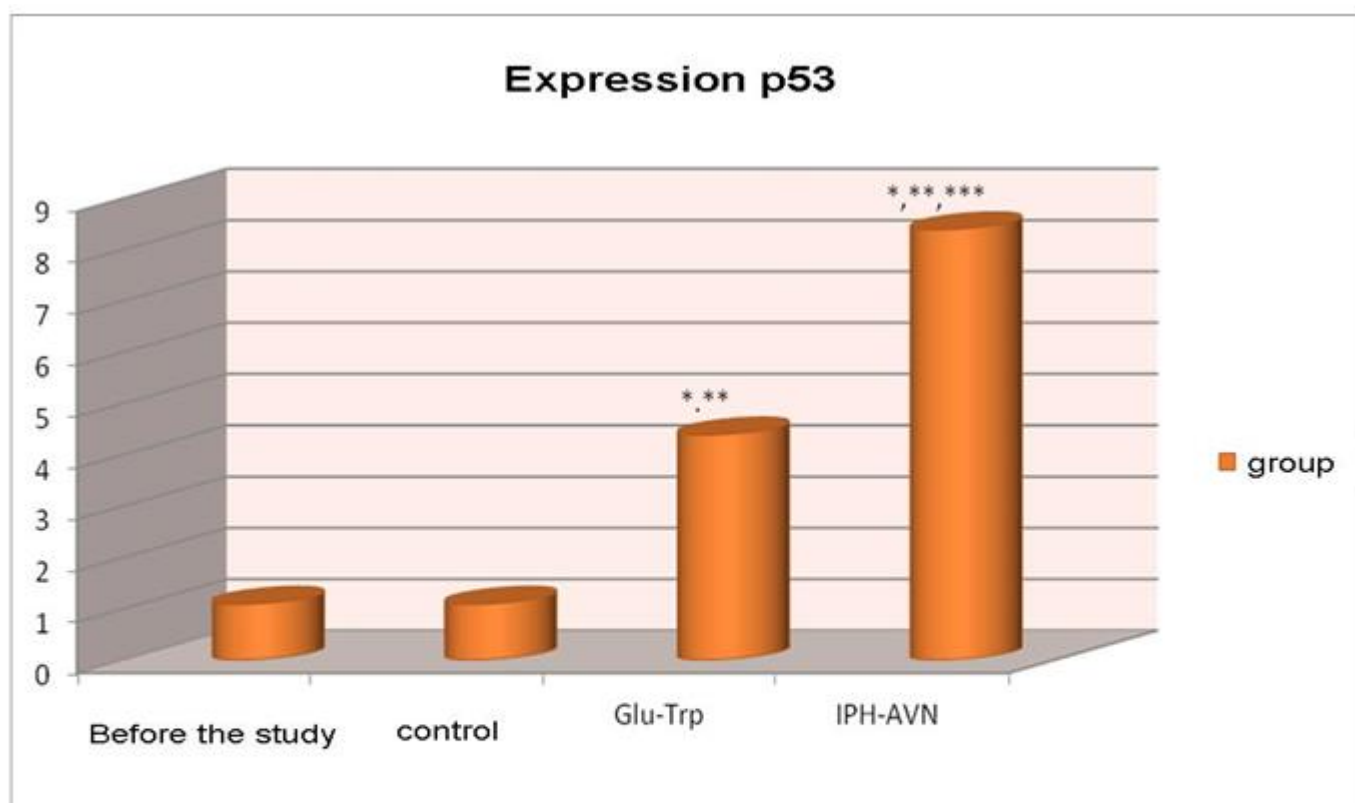
*** $p < 0.05$ between the indicators of the level of expression in the application of Glu-Trp and IPH-AVN.

Figure 3: The effect of the peptide IPH-AVN on the expression of VEGF protein in culture of human cells.

Таким образом, применение пептида IPH-AVN имеет ангиопротекторный характер, в частности, индуцирует дифференцировку полипотентных миогенных клеток в направлении нормального формирования сосудистой системы и стимулирует васкулогенез (формирование эмбриональной сосудистой системы) и ангиогенез (рост новых сосудов в существующей сосудистой системе).

Влияние пептида IPH-AVN на экспрессию белка p53 в культурах клеток человека

На рисунке 4 показано, что использование пептида IPH-AVN увеличивает выработку белка p53, который является фактором транскрипции, который служит супрессором злокачественных опухолей за счет активации апоптоза в тканях организма, что позволяет сделать вывод об противоопухолевых свойствах исследуемого пептида.



* $p < 0.05$ compared to baseline data;

** $p < 0.05$ compared to control;

*** $p < 0.05$ between the indicators of the level of expression in the application of Glu-Trp and IPH-AVN.

p53-зависимый апоптоз также позволяет избежать накопления мутаций, и, в случае, когда они уже возникли, p53-зависимый апоптоз позволяет устранить такие потенциально опасные для организма клетки, что позволяет сделать вывод о цитопротекторном эффекте исследуемого пептида. Полученные данные свидетельствуют о высокой онкологической защитной активности пептида IPH-AVN в отношении клеток сосудистой системы в соответствии с экспрессией биологических молекул в культуре клеток.

Заключение

Проведенные исследования подтверждают высокую биологическую активность пептида IPH — AVN в отношении контроля нормального формирования сосудистой системы у человека на генетическом уровне по экспрессии генов, ответственных за онтогенез сосудистой системы, за нормальное формирование и формирование сосудистой системы, в частности, регулирующих тонус кровеносных сосудов, гладкую мышцу сосудистой стенки и процессы тромбоза.

Пептид IPH-AVN значительно увеличивает в культуре клеток человека «каскад» сигнальных молекул, который необходим для активации пролиферации и дифференцировки стволовых клеток в клетках сосудистой системы, формирования сосудистой системы, регуляции обмена веществ в эпителиальных клетках, регуляции тонуса сосудов, гладкой мускулатуры сосудистой стенки и тромбоза.

Применение пептида IPH-AVN имеет ангиопротекторную природу, в частности, индуцирует дифференцировку полипотентных миогенных клеток в направлении нормального формирования сосудистой системы и стимулирует васкулогенез (формирование эмбриональной сосудистой системы) и ангиогенез (рост новых сосудов в существующей сосудистой системе).

Полученные данные свидетельствуют о высокой онкологической защитной активности пептида IPH-AVN в отношении клеток сосудистой системы в соответствии с экспрессией биологических молекул в клеточной культуре.

Литература

1. Баранов В. С. Генетический паспорт — основа индивидуальной и прогностической медицины / Под ред. В. С. Баранова. — СПб.: Издательство Н-Л, 2009. — 528 с.: Ил. 2009
2. Линькова Н. С., Дробанцева А. О., Орлова О. А., Кузнецова Е. П., Полякова О. В., Кветной И. М., Хинсон В. Х. Х. Пептидная регуляция функций фибробластов кожи при старении *in vitro* // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2016. — №1. 40-44.
3. Мутовин Г. Р. Основы клинической генетики (геномика и протеомика наследственной патологии). Учебник для вузов в 2-х томах. Проблема. 3. М.: ГЕОТАР-медиа, 2008.
4. Хавинсон В. Х. Пептидная регуляция старения. СПб.: Наука, 2009. — 50 с.
5. Аршад Х., Ахмад З., Хасан С. Х. Глиомы: корреляция гистологической степени, экспрессии Ki67 и p53 с выживаемостью пациентов // *Asian Pac J Cancer Prev.* — 2010. — Т. 11. — N 6. — С. 1637-1640;

Орехов А. Н., Андреева Е. Р., Бобрышев Ю. В. Клеточные механизмы атеросклероза человека: роль межклеточных связей в функциях субэндотелиальных клеток // *Клетка ткани.* -2016.-Т. 48. — N 1. — С. 25-34.