

<https://doi.org/10.29188/2222-8543-2022-15-3-18-26>

Биологическая активность лекарственного препарата из полипептидов семенников в модели окислительного стресса *in vitro*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Ю.А. Хоченкова¹, Ю.С. Мачкова¹, Д.А. Хоченков^{1,2}, Э.Р. Сафарова³, Н.А. Бастрикова³

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; д. 24, Каширское шоссе, Москва, 115478, Россия

² ФГБОУ ВО «Тольяттинский государственный университет»; д. 14, ул. Белорусская, Тольятти, 445667, Россия

³ ООО «ПептидПро»; д. 52с1Б, Космодамианская набережная, Москва, 115054, Россия

Контакт: Сафарова Эльмира Рафизовна, elsaf2308@bk.ru

Аннотация:

Введение. Мужское бесплодие является одной из основных причин вынужденной бездетности пар во всем мире. В настоящий момент на рынке представлено ограниченное число лекарственных препаратов для лечения мужского бесплодия. В комплексной терапии часто используются биологически активные добавки (БАДы), в состав которых входит L-карнитин. В настоящей работе представлены результаты определения терапевтической активности нового лекарственного препарата – пептидного комплекса, полученного из семенников крупного рогатого скота (КРС) – PP-R-001, предназначенного для лечения мужского бесплодия, а также сравнение его эффективности с L-карнитином на моделях индукции окислительного стресса в клеточных культурах.

Материал и методы. Исследование было проведено на клеточных линиях перевиваемых тестикул поросенка (ПТП) и тестикул эмбриона быка (ТЭБ). Для индукции окислительного стресса (ОС) в клетках тестикул использовали два экспериментальных подхода: сокультивирование клеток либо ПТП, либо ТЭБ с цисплатином (cis-Pt), или перекисью водорода (H₂O₂). Протективное действие пептидного комплекса PP-R-001 определяли по результатам оценки индукции апоптоза и гибели клеток тестикул, миграционной активности, количеству клеток с двунитевыми разрывами ДНК, уровню активных форм кислорода, митохондриальной активности клеток в условиях ОС.

Результаты. Выявлено достоверно более эффективное влияние PP-R-001 в сравнении с L-карнитином на выживаемость и снижение количества апоптотических клеток ПТП и ТЭБ и в условиях ОС. Препарат PP-R-001 достоверно увеличивал миграционную активность клеток обеих линий. Установлено, что PP-R-001 достоверно снижал уровень внутриклеточных повреждений, приводящих к апоптотической гибели клеток ТЭБ и ПТП при воздействии как cis-Pt, так и H₂O₂; препарат повышал активность митохондрий, снижал количество двунитевых разрывов ДНК и активных форм кислорода (АФК).

Заключение. Полученные данные показывают, что PP-R-001 оказывает мультимодальное воздействие на клетки тестикул ТЭБ и ПТП на моделях окислительного стресса, превосходящее эффект L-карнитина, широко применяемого в составе БАДов для повышения мужской фертильности.

Ключевые слова: мужское бесплодие; пептидные препараты; L-карнитин; окислительный стресс; регуляторные пептиды; апоптоз; антиоксидантная терапия; пептидная терапия PP-R-001.

Для цитирования: Хоченкова Ю.А., Мачкова Ю.С., Хоченков Д.А., Сафарова Э.Р., Бастрикова Н.А. Биологическая активность лекарственного препарата из полипептидов семенников в модели окислительного стресса *in vitro*. Экспериментальная и клиническая урология 2022;15(3)18-26; <https://doi.org/10.29188/2222-8543-2022-15-3-18-26>

<https://doi.org/10.29188/2222-8543-2022-15-3-18-26>

Biological activity of a drug, polypeptides derived from testes in a model of oxidative stress *in vitro*

EXPERIMENTAL STUDY

Yu.A. Khochenkova¹, Yu.S. Machkova¹, D.A. Khochenkov^{1,2}, E.R. Safarova³, N.A. Bastrikova³

¹ N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia; 24, Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

² Togliatti State University; 14, Belorusskaya ul., Togliatti, 445667, Russia

³ «PeptidPro» Ltd; 52c1B, Kosmodamianskaya Naberezhnaya, Moscow, 115054, Russia

Contacts: Elmira R. Safarova, elsaf2308@bk.ru

Summary:

Introduction. Male infertility is one of the main causes of forced childlessness of couples around the world. Currently, a limited number of drugs for the treatment of male infertility are available on the market. Biologically active supplements (dietary supplements) containing L-carnitine are often used in the complex therapy. The results of determining the therapeutic activity of a new drug, a peptide complex obtained from cattle testes (PP-R-001) for the treatment of male infertility and comparing its effectiveness with L-carnitine in the models of oxidative stress induction in cell cultures are presented.

Material and methods. The study was carried out on cell lines of transplanted piglet testicle (PTP) and bovine embryonic testicle (TEB). Two experimental approaches were used to induce oxidative stress (OS) in testicular cells: co-culturing cells of either PTP or TEB with cisplatin (cis-

Pt) or hydrogen peroxide (H_2O_2). The protective effect of the PP-R-001 peptide complex was assessed by the induction of apoptosis and testicular cell death, migration activity, the number of cells with DNA double-strand breaks, the level of reactive oxygen species, mitochondrial activity of cells under OS conditions.

Results. The effect of PP-R-001 significantly exceeded the effect of L-carnitine on the survival rate and decrease of apoptotic cell number of PTP and TEB under OS conditions. PP-R-001 significantly increased the migration activity of both cell lines. It was found that PP-R-001 significantly reduced the level of intracellular lesions that lead to apoptotic death of TEB and PTP cells exposed to both cis-Pt and H_2O_2 ; the drug increased the activity of mitochondria and decreased the number of DNA double-strand breaks and reactive oxygen species (ROS).

Conclusion. The data obtained indicate that PP-R-001 has a multimodal effect on testicular TEB and PTP cells in the oxidative stress models, which is superior to the effect of L-carnitine widely used in male fertility supplements.

Key words: male infertility; peptide pharmaceuticals; L-carnitine, oxidative stress; regulatory peptides; apoptosis; antioxidant therapy; peptide complex PP-R-001.

For citation: Khochenkova Yu.A., Machkova Yu.S., Khochenkov D.A., Safarova E.R., Bastrikova N.A. Biological activity of a drug, polypeptides derived from testes in a model of oxidative stress in vitro. *Experimental and Clinical Urology* 2022;15(3)18-26; <https://doi.org/10.29188/2222-8543-2022-15-3-18-26>

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день диагноз «бесплодие» является глобальной проблемой здравоохранения: он затрагивает 187 миллионов пар репродуктивного возраста во всем мире и в 50% случаев ассоциирован с мужским фактором [1, 2].

По литературным данным, у 30–80% мужчин бесплодие связано с окислительным стрессом (ОС), который рассматривается как один из основных повреждающих факторов и обусловлен чрезмерным усилением окислительных процессов при недостаточном функционировании антиоксидантной системы [3].

Окислительные реакции в нормальных условиях обеспечивают созревание, капацитацию (приобретение оплодотворяющей способности сперматозоидом в ходе движения по женским половым путям, в том числе гиперактивации и акросомальной реакции сперматозоидов), однако при неблагоприятном воздействии внешней среды, факторов образа жизни и ряда заболеваний, способствующих избыточной продукции активных форм кислорода (АФК), происходит повреждение биологических мембран сперматозоидов, вызывающих нарушение их подвижности, а также появление разрывов в цепочках ДНК (фрагментации ДНК), приводящих к ошибкам слияния генетического материала родителей, неправильному развитию эмбриона и замиранию беременности на ранних сроках [3].

Было показано, что выраженность ОС имеет значительную отрицательную корреляцию с концентрацией, подвижностью и количеством морфологически нормальных форм сперматозоидов [4]. Показатели ОС в значительной степени положительно коррелируют с фрагментацией ДНК сперматозоидов [1, 4].

В исследовании S. Belloc и соавт. у 4345 бесплодных мужчин (среди которых 1974 имели нормозооспермию) была подтверждена положительная корреляция индекса фрагментации (ИФ) ДНК, признанного маркером ОС, с возрастом ($r=0,17$) и отрицательная корреля-

ция ИФ ДНК с прогрессивной подвижностью сперматозоидов ($r = -0,26$). Очень высокий ИФ ДНК ($> 30\%$) был выявлен у 5% мужчин с нормозооспермией [4].

В соответствии с Европейскими и Российскими клиническими рекомендациями по лечению мужского бесплодия в состав комплексной терапии для повышения качества эякулята включены антиоксидантные средства, являющиеся биологически активными добавками [5-7].

Одним из основных компонентов данных БАДов является L-карнитин, обладающий свойствами прямого и опосредованного антиоксиданта, а также участвующий в энергетическом обмене и регуляции активности митохондрий. В число механизмов действия L-карнитина относится влияние на клеточную редокс-сигнализацию (систему внутриклеточной передачи сигнала) и на совокупность факторов транскрипции генов, контролирующих антиоксидантные и противовоспалительные процессы [6].

Новым классом рецептурных лекарственных средств для терапии мужского бесплодия являются препараты на основе пептидов, обладающих регуляторным механизмом действия, реализующимся через каскад сигналов. В семенниках обнаружено свыше 6000 пептидов, задействованных в регуляции биологических процессов [1]. В частности, пептиды, секретируемые клетками Сертоли, играют важную роль в поддержании сперматогенеза [8].

Среди механизмов действия регуляторных пептидов описаны важные для терапии бесплодия эффекты, в том числе предотвращение повреждения ДНК и усиление репаративных процессов, антиоксидантные и противовоспалительные свойства, подтвержденные многочисленными исследованиями *in vitro* и *in vivo* и имеющие важное значение для замедления развития возраст-ассоциированных патологий [6, 7, 9].

PP-R-001 – первый негормональный инъекционный лекарственный препарат для патогенетического лечения различных форм мужского бесплодия, 

содержащий комплекс регуляторных пептидов семенников крупного рогатого скота (КРС).

Цель настоящей работы – исследовать предполагаемые механизмы действия препарата, связанные с антиоксидантной активностью, в сравнении с L-карнитином на моделях ОС, вызванного cis-Pt и H₂O₂ в культурах клеток тестикул поросенка и тестикул эмбриона быка (ТЭБ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. Перевиваемые тестикулы поросенка (ПТП) и ТЭБ были получены из «Специализированной коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных» криобанка ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Клеточные культуры ПТП и ТЭБ культивировали в полной питательной среде EMEM (Gibco, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, HyClone, США), 2 mM/L-глутамина (Sigma-Aldrich, Германия), 10 ME/мл смеси пенициллин/стрептомицина (Lonza, Швейцария) при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня.

При выполнении работы использовали: перекись водорода (Panreac, Испания), цисплатин (Teva, Израиль), ацетил-L-карнитин (Abcam, США), L-карнитин (Sigma-Aldrich, Китай).

Оценка цитотоксичности. Клетки в количестве 8×10^3 клеток/лунка вносили в 96-луночный планшет в полной среде EMEM. Через 24 ч. заменяли среду и добавляли цисплатин (цис-Pt) или перекись водорода (H₂O₂) в диапазоне концентрации 10^{-2} – 10^{-10} M в трехкратных повторях. Инкубацию проводили в течение 48 ч. при 37 °C и 5% CO₂. Затем вносили раствор МТТ (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид (Sigma-Aldrich, Германия) в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Клетки инкубировали еще 4 ч., затем среду отбирали и добавляли по 200 мкл/лунка диметилсульфоксида (ДМСО). Оптическую плотность (OD) раствора формазана определяли на спектрофотрическом анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific, США) при длине волны 570 нм, используя ДМСО как нулевой контроль. Выживаемость клеток рассчитывали по формуле: (OD экспериментальной группы – OD контрольной группы) / OD контрольной группы × 100%. Для каждого препарата строили график зависимости «доза-эффект» и определяли (полу)максимальную ингибирующую концентрацию) IC₅₀.

Оценка миграционной активности методом «заживления раны». Клетки ПТП и ТЭБ высевали в 24-луночные лунки в концентрации 2×10^4 клеток/мл и инкубировали в течение 24 ч. После того как клетки достигали конfluence, удаляли центральную

часть монослоя с помощью наконечника. Среду отбирали, промывали клетки фосфатно-солевым буфером (PBS, ПанЭко, Россия) и в каждую лунку добавляли культуральную среду, содержащую 0,1 μM H₂O₂ или 100 μM cis-Pt, или их в комбинации с 1 мкг/мл PP-R-001 или 2,5 mM L-карнитина и инкубировали в течение 48 ч. После инкубации монослой клеток фиксировали при помощи 1% раствора параформальдегида в течение 30 мин., затем клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым красителем и отмывали 2 раза дистиллированной водой. Миграционную активность клеток определяли как пролиферацию клеток и их миграцию в сформированную бесклеточную область (зону повреждения). Площадь прироста определяли количественно с помощью программного обеспечения ImageJ v.1.78 (NIH, США) – для каждой группы высчитывали отношение площади прироста в опытных группах по отношению к интактному контролю в %.

Проточная цитометрия. Количество апоптотических клеток определяли окрашиванием Annexin-V и propidium iodide (PI) с использованием набора Annexin-V-FITC (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. После инкубации с 0,1 μM H₂O₂ или 100 μM цисплатина, или данными агентами в комбинации с 1 мкг/мл PP-R-001 в течение 48 ч., клетки снимали, отмывали центрифугированием и ресуспендировали осадок клеток в 100 мкл PBS. Далее добавляли раствор, содержащий PI и аннексин V. Клетки инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин., затем добавляли 350–400 мкл связывающего буфера для остановки реакции.

Количество клеток с двунитевыми разрывами ДНК выявляли окрашиванием с помощью антитела против фосфорилированного γH2AX (Ser139) (R&D, США), который индуцируется в ответ на образование двухцепочечного разрыва (DSB), с последующим окрашиванием конъюгатом антивидовых антител (козьих IgG к IgG мыши), меченных флуорохромом Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США) [10].

Для оценки функционального состояния митохондрий в клетках использовали митохондриальный селективный флуоресцентный зонд MitoTracker Green FM (Invitrogen, США). Клетки линий ПТП и ТЭБ инкубировали с 0,1 μM H₂O₂ или 100 μM цисплатина, или в комбинации с 1 мкг/мл PP-R-001 в течение 48 ч. Клетки отмывали центрифугированием дважды в PBS, вносили к осадку клеток MitoTracker Green и инкубировали 30 мин. После отмывки клетки ресуспендировали в PBS для анализа методом проточной цитометрии.

Оценку индукции окислительного стресса проводили при помощи флуоресцентного красителя CellRox DeepRed (Invitrogen, США), который обнаруживает окислительный стресс в клетках, реагируя с АФК и приобретая флуоресцентную окраску с длиной волны

665 нм. Анализ данных (не менее 10 тыс. событий) проводили на проточном цитометре Novocyt 2000R с использованием программного обеспечения Novoexpress 1.3.5. (Agilent, США).

Иммуноцитохимическое исследование. Клетки ПТП и ТЭБ наращивали на стеклах до 80% монослоя, далее фиксировали в спирте и ацетоне, инкубировали с первичными антителами к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA) (Abcam, США) или виментину (Dako, Дания) при 4 °C в течение 18 ч. Клетки промывали и инкубировали с вторичными антивидовыми антителами, меченными AlexaFluor®488 (Life Technologies, США), а затем с ядерным красителем DAPI (Invitrogen, США). Клетки заключали под покровные стекла с использованием полимерной среды Fluorescent mounting medium (Dako, Дания). Интенсивность окрашивания оценивали на клеточном анализаторе InCell Analyzer 6000 (GE Healthcare, США) с использованием программного обеспечения InCell Investigator (GE Healthcare, США).

Статистический анализ. Все эксперименты были выполнены в трех повторах. Статистический анализ и графический интерфейс представлены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v.8.0. (GraphPad, США). Статистическую обработку проводили с использованием критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Одним из основных механизмов, лежащих в основе мужского бесплодия, является окислительный стресс, который может вызывать повреждения ДНК, поэтому антиоксиданты, такие как L-карнитин, рекомендованы в протоколах терапии мужского бесплодия. Для определения спектра биологической активности пептидного комплекса PP-R-001 на основе экстракта семенников КРС были использованы модели индукции окислительного стресса при помощи cis-Pt и H_2O_2 в клеточных линиях ПТП и ТЭБ.

При исследовании жизнеспособности клеток ПТП и ТЭБ методом МТТ было показано, что применение 100 μM цис-Рт (48 ч.) или 0,1 μM H_2O_2 (24 ч.) вызывает снижение количества живых клеток до 12–25%. Для определения, может ли PP-R-001 сохранять жизнеспособность клеток, мы провели совместное культивирование клеток с каждым из индукторов АФК и PP-R-001 (0,1–1 мкг/мл). В результате было установлено дозозависимое увеличение жизнеспособности клеток при добавлении PP-R-001 до 92–97% в обеих клеточных линиях при концентрации PP-R-001 1 мкг/мл, которую использовали в дальнейших экспериментах. Совместное культивирование клеточных линий с L-карнитином (2,5–5,0 мМ) вызывало менее

выраженное увеличение жизнеспособности клеток ТЭБ и ПТП в присутствии цис-Рт или H_2O_2 – 60–70%.

Миграция клеток является одним из базовых параметров оценки функционального состояния клеток, поэтому была проведена оценка изменения действия пептидного комплекса PP-R-001 и L-карнитина на миграционную активность клеток на модели «заживления раны» после формирования бесклеточного участка. Применение как цис-Рт, так и H_2O_2 подавляет миграцию клеток (рис. 1). Прирост монослоя клеток ПТП под действием цис-Рт составил $32,8 \pm 11,6\%$ и под действием H_2O_2 – $31,5 \pm 8,3\%$ от контроля. Схожее ингибирующее действие оказало и применение 100 μM цис-Рт ($31,1 \pm 4,6\%$) и 0,1 μM H_2O_2 ($37,9 \pm 7,6\%$) на клетках ТЭБ. Добавление PP-R-001 в концентрации 1 мкг/мл цис-Рт и H_2O_2 увеличивало миграционную активность клеток в поврежденную область и восстанавливало монослой клеток. Применение 1 мкг/мл PP-R-001 со 100 μM цис-Рт на клеточной линии ПТП приводило к увеличению площади монослоя клеток в 2,5 раза ($81,5 \pm 7,8\%$, $p < 0,05$), а в перекисной модели — в 1,9 раза ($59,6 \pm 9,9$, $p < 0,05$) по сравнению с группами без введения 1 мкг/мл PP-R-001. Аналогичный эффект применения 1 мкг/мл PP-R-001 с 100 μM цис-Рт и 0,1 μM H_2O_2 наблюдали на клеточной линии ТЭБ – ($44,9 \pm 5,1\%$ и $50,7 \pm 7,9\%$, соответственно, $p < 0,05$) по сравнению с группами без введения 1 мкг/мл PP-R-001. L-карнитин вызывал несколько меньшую стимуляцию миграционной активности ($42,5 \pm 7,8\%$ и $44,5 \pm 4,7\%$ на клеточной линии ПТП, и $41,4 \pm 6,4\%$, $43,5 \pm 3,7\%$ на клеточной линии ТЭБ) по

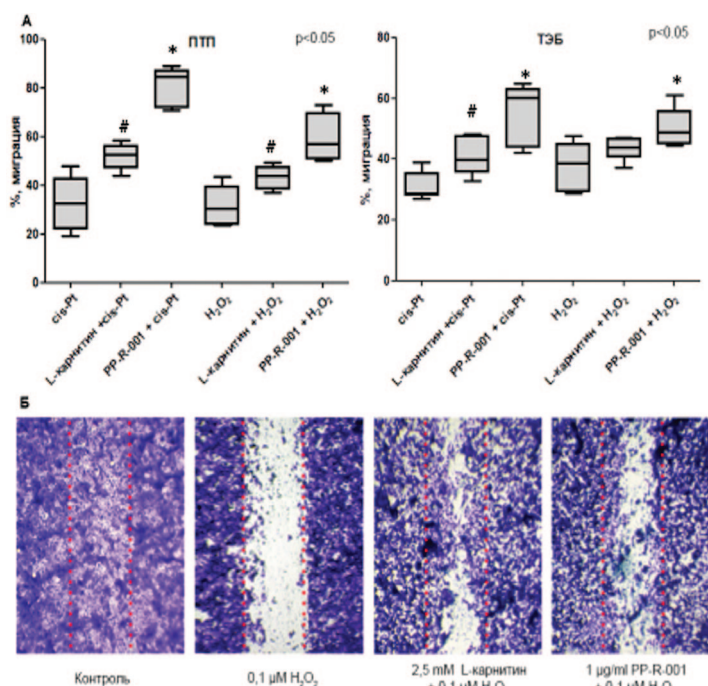


Рис. 1. Миграционная активность клеток ПТП и ТЭБ (А). Микрофотографии миграции клеток ПТП (Б), окраска метиленовым фиолетовым, увеличение $\times 100$. * - $p < 0,05$ – отличия от изменений без препарата, # - $p < 0,05$ – отличия между PPR-001 и L-карнитином

Fig. 1. Migration activity of PTP and TEB cells (A). Micrographs of PTP cell migration (B), stained with crystal violet, $\times 100$ magnification. * - $p < 0,05$ - differences from changes without the drug, # - $p < 0,05$ - differences between PPR-001 and L-carnitine

сравнению с PP-R-001 на обеих клеточных линиях. Таким образом, пептидный комплекс оказывает стимулирующее влияние на миграцию клеток тестикул ТЭБ и ПТП.

Для более углубленного изучения возможных механизмов действия PP-R-001 мы провели оценку индукции клеточной гибели, активности АФК, повреждения ДНК и митохондриальной активности на модели цис-Pt и H_2O_2 .

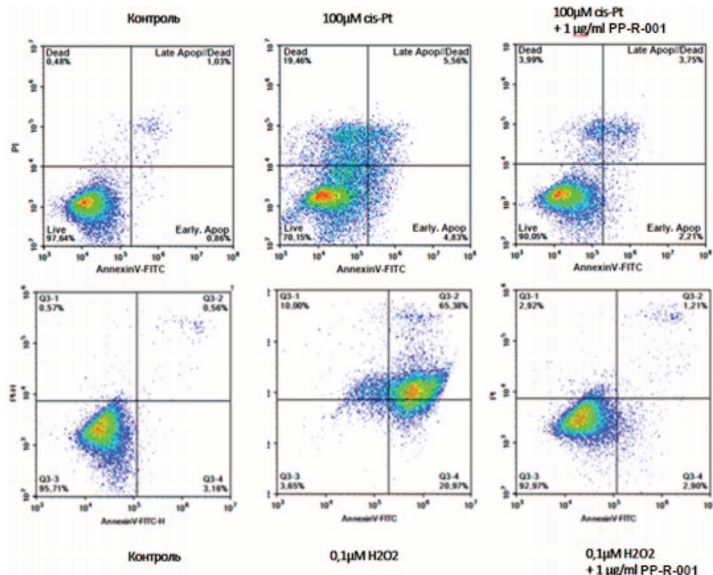


Рис. 2. Оценка апоптоза и гибели клеток линии ПТП под действием цисплатина и H_2O_2 в комбинации с PP-R-001 при помощи Annexin V/PI после 48 ч. инкубации с 0,1 μM H_2O_2 или 100 μM cis-Pt, или в комбинации с 1 мкг/мл PP-R-001. По оси абсцисс – количество апоптотических клеток, окрашенных Annexin V-FITC, по оси ординат – количество мертвых клеток, окрашенных PI

Fig. 2. Evaluation of apoptosis and death of PTP cells under the influence of cisplatin and H_2O_2 in combination with PP-R-001 using Annexin V/PI staining after 48 h incubation with 0,1 μM H_2O_2 or 100 μM cis-Pt, or in combination with 1 $\mu g/ml$ PP-R-001. The X-axis shows the number of apoptotic cells stained with Annexin V-FITC; the Y-axis shows the number of dead cells stained with propidium iodide

Оба примененных индуктора клеточного стресса вызывают индукцию апоптоза и гибель клеток ПТП и ТЭБ, что выражается в снижении доли живых клеток при двойной окраске PI и Annexin V-FITC. Для клеточной линии ПТП количество живых клеток снижалось с 95–97% до 70% при применении цис-Pt и до 3–5% при применении H_2O_2 (основная часть клеток находится в апоптозе). Введение PP-R-001 в среду культивирования позволяет восстановить содержание живых клеток до 90–92% (рис. 2). Сходные изменения были установлены и в случае клеточной линии ТЭБ.

Для оценки роли двунитевых разрывов ДНК (DSB) в индукции клеточной гибели под действием цис-Pt и H_2O_2 и восстановлении жизнеспособности клеток под действием PP-R-001 проводили окрашивание клеток ПТП и ТЭБ антителами к фосфорилированному $\gamma H2AX$ (Ser139), а также индикаторами активности митохондрий MitoTracker Green FM и активных форм кислорода (АФК) CellROX Deep Red. Количество позитивно окрашенных клеток определяли методом проточной цитометрии (рис. 3-5).

Согласно полученным данным, и цис-Pt, и H_2O_2 вызывают повышение количества клеток с DSB в клеточных линиях ТЭБ и ПТП по сравнению с интактным контролем. В зависимости от клеточной линии и применяемого агента число клеток с поврежденной ДНК различается: по отношению к цис-Pt более чувствительны клетки линии ПТП (72,8%), чем ТЭБ (7,6%). При применении H_2O_2 более чувствительны клетки линии ТЭБ (54,2%), чем ПТП (33,7%). Применение PP-R-001 статистически значимо снижало количество клеток с DSB в клеточных линиях ПТП до 40% при cis-Pt и 4,3% при H_2O_2 , для клеток ТЭБ – 20% и 53,5%, соответственно (рис. 3).

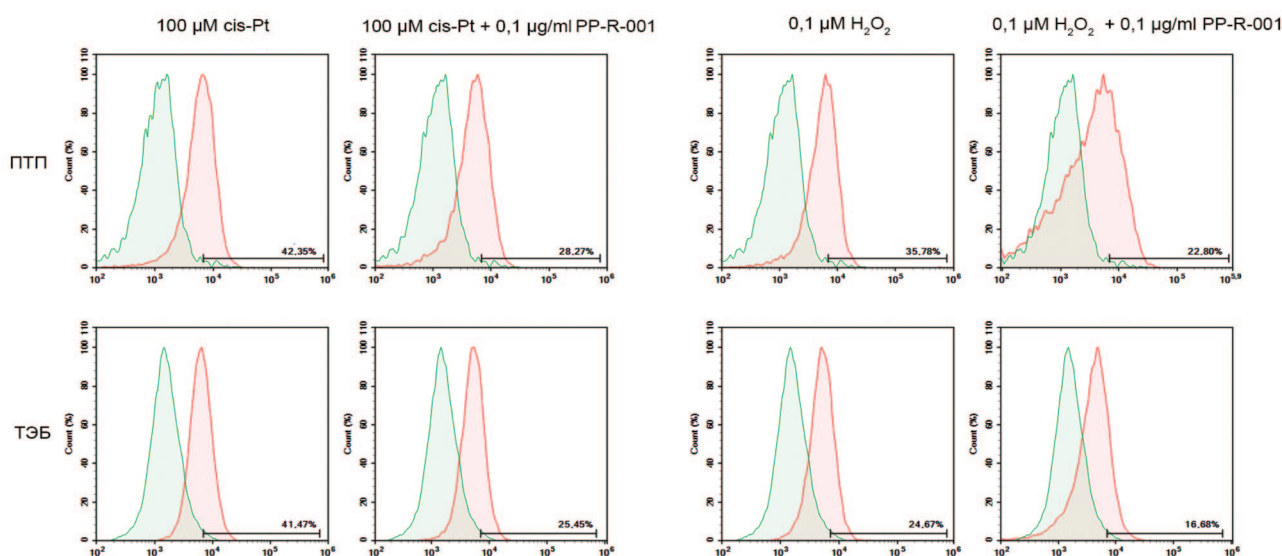


Рис. 3. Количество клеток с двунитевыми разрывами ДНК при окрашивании антителами к p- $\gamma H2AX$ (Ser139) после 48 ч. инкубации с 0,1 μM H_2O_2 или 100 μM cis-Pt, или в комбинации с 1 мкг/мл PP-R-001. Красная гистограмма – окраска антителами к p- $\gamma H2AX$ (Ser139) клеток опытных групп. Зеленая гистограмма – клетки контрольной группы

Fig. 3. The number of cells with DNA double-strand breaks when stained with antibodies to p- $\gamma H2AX$ (Ser139) after 48 h of incubation with 0,1 μM H_2O_2 or 100 μM cis-Pt, or in combination with 1 $\mu g/ml$ PP-R-001. Red histogram - staining with antibodies to p- $\gamma H2AX$ (Ser139) of cells from experimental groups. Green histogram - control group cells

При оценке активности митохондрий при помощи окраски MitoTracker Green установлено, что в клетках ПТП применение цис-Pt и H_2O_2 не вызывает изменений активности митохондрий и введение в систему PP-R-001 значимо не увеличивает окраску MitoTracker Green, а, следовательно, и активность митохондрий.

На клеточной линии ТЭБ при применении PP-R-001 после воздействия цис-Pt происходит увеличение количества положительно окрашенных клеток (79,4%), по сравнению с интактным контролем. При применении H_2O_2 также установлено снижение функций митохондрий по сравнению с контролем, которые восстанавливаются под действием PP-R-001.

Применение cis-Pt и H_2O_2 вызывает образование АФК, что выражается в увеличении количества клеток, окрашенных внутриклеточным индикатором АФК – CellROX Deep Red (рис. 5). При применении PP-R-001 количество АФК в клетках значимо снижается во всех экспериментальных группах, но не достигает уровня интактного контроля.

При иммуноцитохимической окраске клеток антителами к PCNA (Proliferating cell nuclear antigen - ядерному антигену пролиферирующих клеток), маркеру пролиферации, и виментину, маркеру клеточной адгезии, установлено, что применение цис-Pt и H_2O_2 на клеточных линиях ПТП и ТЭБ вызывает снижение

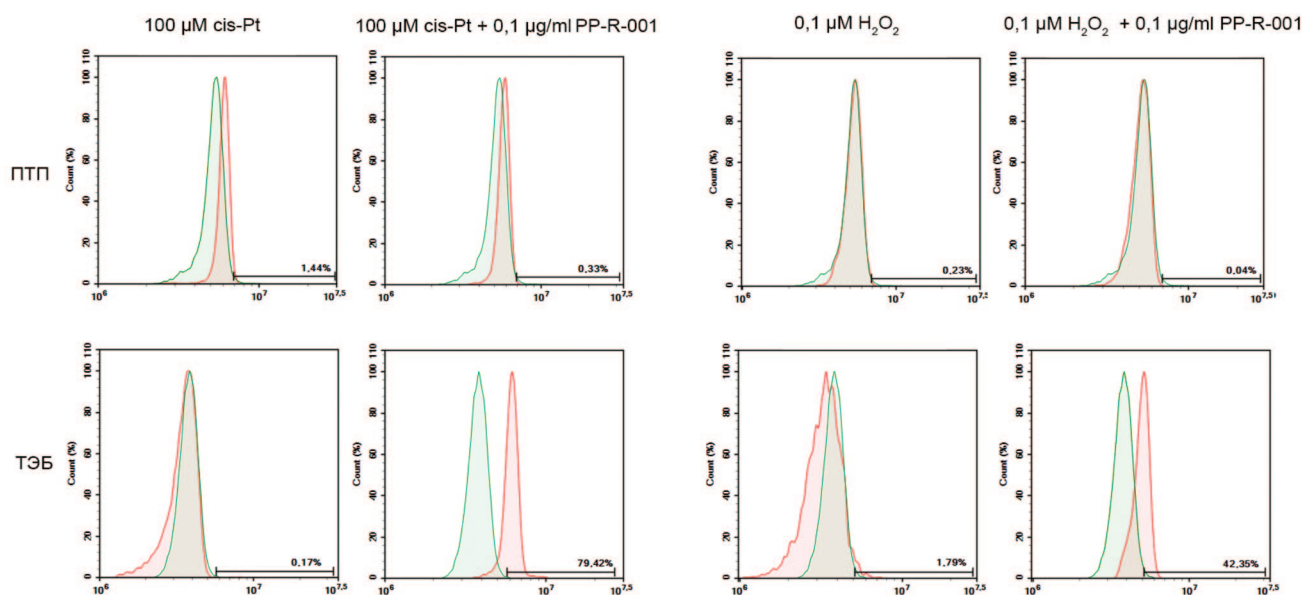


Рис. 4. Окраска клеток ПТП и ТЭБ индикатором активности митохондрий MitoTracker Green после 48 ч. инкубации с 0,1 μM H_2O_2 или 100 μM cis-Pt, или в комбинации с 1 мкг/мл PP-R-001. Красная гистограмма – окраска MitoTracker Green клеток опытных групп. Зеленая гистограмма – окраска MitoTracker Green клеток контрольной группы

Fig. 4. Staining of PTP and TEB cells with the indicator of mitochondrial activity MitoTracker Green after 48 h of incubation with 0.1 μM H_2O_2 or 100 μM cis-Pt, or in combination with 1 μg/ml PP-R-001. Red histogram - MitoTracker Green staining of experimental group cells. Green histogram - MitoTracker Green staining of control group cells

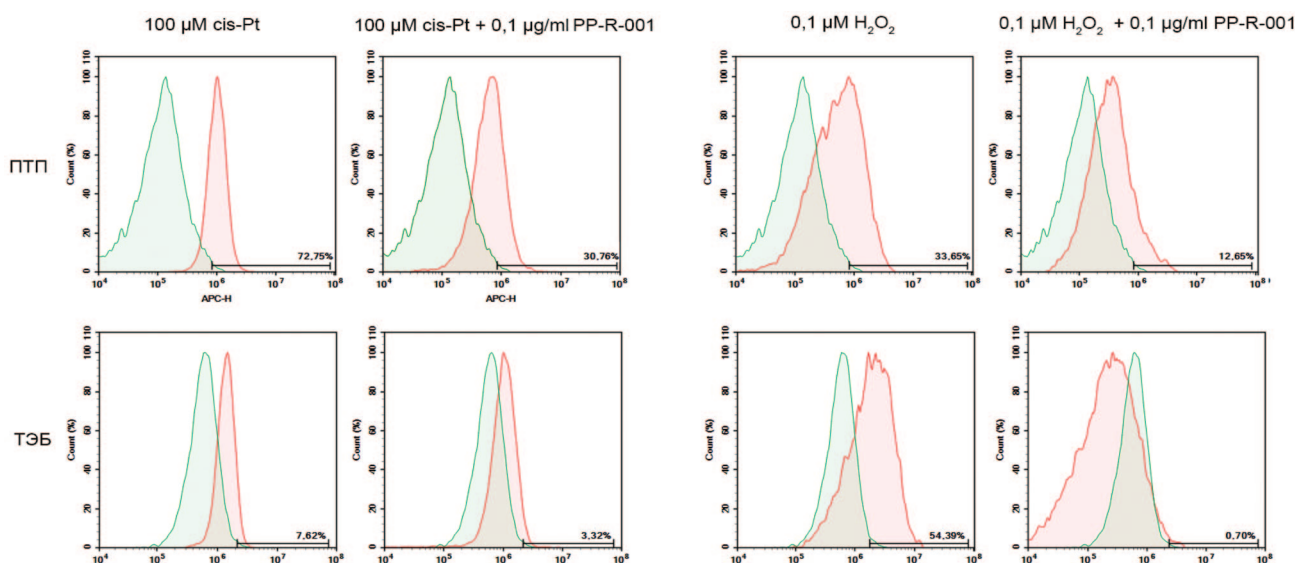


Рис. 5. Определение АФК в клетках ПТП и ТЭБ при помощи CellRox DeepRed после 48 ч. инкубации с 0,1 μM H_2O_2 или 100 μM cis-Pt, или в комбинации с 1 мкг/мл PP-R-001. Красная гистограмма – окраска CellRox DeepRed клеток опытных групп. Зеленая гистограмма – окраска CellRox DeepRed клеток контрольной группы

Fig. 5. Determination of ROS in PTP and TEB cells using CellROX Deep Red after 48 h incubation with 0.1 μM H_2O_2 or 100 μM cis-Pt, or in combination with 1 μg/ml PP-R-001. Red histogram - CellROX DeepRed staining of experimental group cells. Green histogram - CellROX DeepRed staining of control group cells

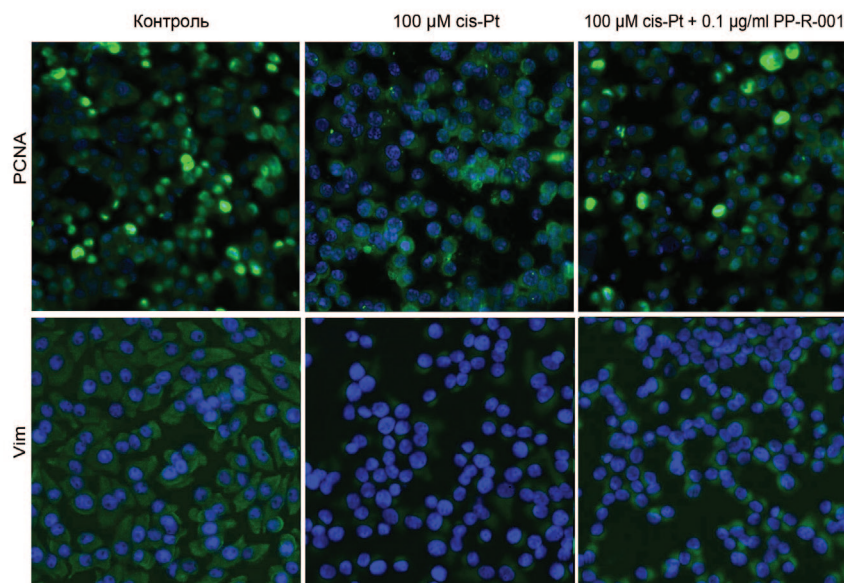


Рис. 6. Окраска клеток ПТП антителами к PCNA или Виментину (зеленая окраска) и ядер клеток при помощи DAPI (синяя окраска) после 48ч инкубации с 100 µM cis-Pt, или в комбинации с 1 мкг/мл PP-R-001

Fig. 6. Staining of PTP cells with anti-PCNA and anti-Vimentin antibodies (green stain) and cell nuclei with DAPI (blue stain) after 48 h incubation with 100 µM cis-Pt, or in combination with 1 µg/ml PP-R-001

количества PCNA-позитивных клеток, что связано со снижением пролиферации и коррелирует со снижением миграционной активности. Совместное применение PP-R-001 с цис-Pt или H_2O_2 вызывает восстановление пролиферации клеток. Аналогичные изменения установлены в отношении экспрессии виментина: снижение под действием цис-Pt и H_2O_2 и восстановление при комбинированном применении PP-R-001 с цис-Pt или H_2O_2 (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Бесплодие может развиваться как в результате гибели половых клеток, так и вследствие изменения их качества (фрагментация ДНК, изменение подвижности), которое, в том числе, обеспечивается поддерживающей ролью клеток тестикул. Используемые в

работе клеточные модели воспроизводят повреждение клеток тестикул, которые происходят в результате окислительного стресса – одного из важнейших индукторов гибели и нарушения функционирования клеток. Модели индукции клеточной гибели при помощи цис-Pt и H_2O_2 имеют отличия в индукции повреждения клеток [9]. Жизнеспособность клеток восстанавливалась более выражено и дозозависимо при сокультивировании клеток с PP-R-001, но не с L-карнитином. Миграционная активность, которая связана с жизнеспособностью клеток и активностью митохондрий, была статистически достоверно выше при добавлении PP-R-001 по сравнению с L-карнитином в обеих культурах.

Ранее было показано, что механизмы действия L-карнитина связаны с активацией MAPK (mitogen-activated protein kinase — митоген-активируемая про-

Таблица 1. Сравнительная эффективность препаратов на моделях окислительного стресса (по сравнению с результатами, полученными на индукторах окислительного стресса)

Table 1. Comparative efficacy of drugs in models of oxidative stress (compared to the results obtained on oxidative stress inducers)

Метод исследования Research method	Клеточная линия Cell lines	Модель индукции окислительного стресса Model of oxidative stress induction			
		Цисплатин Cisplatin		H_2O_2	
		+PP-R-001	+LC	+PP-R-001	+LC
Миграция клеток (изменение площади монослоя клеток) Cell migration (cell monolayer area change)	ПТП RTP	↑2,5*	↑1,6*,#	↑1,9*	↑1,4*,#
	ТЭБ TEB	↑1,8*	↑1,3*,#	↑1,3*	↑1,1

* - $p < 0,05$ – в сравнении с индукторами окислительного стресса, # $p < 0,05$ – сравнение между PPR-001 и L-карнитином

* - $p < 0.05$ - compared with oxidative stress inducers, # $p < 0.05$ - comparison between PPR-001 and L-carnitine

теинкиназа) – и Akt-зависимых (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase – RAC-альфа серин/треонин-протеин киназа) сигнальных путей [11]. Возрастные изменения в семенниках также сопровождаются изменением представленности белков в протеоме, выраженное в повышенном содержании нескольких небольших протеогликанов, богатых лейцином и белков внеклеточного матрикса, что может быть связано с нарушением миграции клеток и фиброзными явлениями [12].

Результаты, суммированные в таблице 1, свидетельствуют, что препарат PP-R-001 не только защищает клетки тестикул от гибели под действием индукторов окислительного стресса, но также усиливает способность ткани к восстановлению после повреждения, что выражается в увеличении миграционной активности по сравнению с L-карнитином, и может быть связано с активацией внутриклеточных сигнальных путей [13].

Жизнеспособность клеток, состояние митохондрий, двухнитевые разрывы ДНК и концентрация АФК различались на 2 клеточных линиях, что отражено в таблице 2 и на рисунках 3–5. Нарушение процесса гомологичной рекомбинации приводит к бесплодию, врожденным дефектам, связанным с анеуплоидией, и невынашиванием беременности [14]. Установленное снижение количества двухцепочечных разрывов ДНК (DSB – double-strand DNA breaks – двухнитевые разрывы ДНК) под действием PP-R-001 является одним из механизмов его действия. Ранее было показано, что пептидные гормоны также могут участвовать в регу-

ляции восстановления двухнитевых разрывов ДНК [15].

По результатам эксперимента наблюдалось восстановление уровня экспрессии PCNA под действием PP-R-001. В настоящее время имеются свидетельства, что PCNA участвует не только в пролиферации клеток, но и в восстановлении ДНК после ее повреждения в семенниках [16]. По литературным данным, экспрессия PCNA наблюдается в ядрах сперматогоний-А-светлых (в мета-, ана- и телофазы митоза) и сперматозоитов, а также в некоторых клетках Сертоли в препубертатном периоде постнатального онтогенеза [17]. Таким образом пептидный препарат PP-R-001 оказывает мультимодальное протективное действие на клеточные линии, использованные в работе, а именно: активация митохондрий, снижение уровня АФК, количества двухнитевых разрывов в ДНК и, как следствие, снижение количества клеток, находящихся в апоптозе и некрозе, при действии повреждающих агентов – цис-Рт и H₂O₂.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препарат на основе пептидов PP-R-001 обладает выраженным антиоксидантным и пролиферативным действием на клетки тканей семенников в экспериментальных моделях *in vitro* и является более эффективным протектором в отношении окислительного стресса по сравнению с L-карнитином, широко применяемым в составе БАДов при мужском бесплодии. ■

Таблица 2. Влияние PP-R-001 на клеточные механизмы гибели при окислительном стрессе на двух моделях в культурах клеток ТЭБ и ПТП (по сравнению с результатами, полученными на индукторах окислительного стресса)

Table 2. Effect of PP-R-001 on mechanisms of cellular death under oxidative stress using two models both in TEB and PTP cell cultures (compared to the results obtained on oxidative stress inducers)

Эффект Effect	Модель Model			
	Цисплатин + PP-R-001 Cisplatin + PP-R-001		H ₂ O ₂ + PP-R-001	
	ПТП PTP	ТЭБ TEB	ПТП PTP	ТЭБ TEB
Апоптоз, прирост живых клеток Apoptosis, growth of living cells	↑ 20%*	↑ >75%*	↑ >85%*	↑ >90%*
Двунитевые разрывы ДНК, % клеток Double strand breaks in DNA, % cell	↓ 66,8%*	↓ 61,3%*	↓ 63,%*	↓ 67,6%*
Активность митохондрий Mitochondrial activity	Без изменений No changes	↑ 39,5%*	↑ 8,1%*	↑ 46,7%*
Уровень АФК ROS level	↓ 65,9%*	↓ 70,3%*	↓ 62,5%*	↓ 50,8%*

* -p<0,05 – по сравнению с результатами, полученными на индукторах окислительного стресса

* -p<0.05 – compared with the results obtained on oxidative stress inducers

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Agarwal A, Majzoub A, Parekh N, Henkel R. A schematic overview of the current status of male infertility practice. *World J Mens Health* 2020(38):308–322. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190068>.
2. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci* 2015(8):191–6. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.170370>.
3. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008(14):243–258. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn004>.
4. Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, Dalleac A, Amar E, Zini A. Sperm deoxyribonucleic acid damage in normozoospermic men is related to age and sperm progressive motility. *Fertil Steril* 2014(101):1588–93. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.02.006>.
5. Ахвледiani Н.Д., Аполихин О.И., Бабенко А.Ю., Боголюбов С.В., Божедомов А.А., Виноградов И.В. и др. Мужское бесплодие. Клинические рекомендации. Министерство здравоохранения Российской Федерации (21.05.2021). URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_385208/8efd5f17af55cb35a770f73937590c642437b7eb/ [Ахвледiani Н.Д., Аполихин О.И., Бабенко А.Ю., Боголюбов С.В., Божедомов А.А., Виноградов И.В., et al. Male infertility. Clinical guidelines. Ministry of Health of the Russian Federation (21.05.2021). URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_385208/8efd5f17af55cb35a770f73937590c642437b7eb/ (In Russian)].
6. Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol* 2010(58):398–406. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.06.032>.
7. Calogero A, Condorelli R, Russo G, Vignera SL. Conservative nonhormonal options for the treatment of male infertility: antibiotics, anti-inflammatory drugs, and antioxidants. *Bio Med Res Int* 2017;2017:4650182. <https://doi.org/10.1155/2017/4650182>.
8. Wu S, Yan M, Ge R, Cheng CY. Crosstalk between sertoli and germ cells in male fertility. *Trends Mol Med* 2020(26):215–31. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.09.006>.
9. Nerush A, Orlova A, Maslennikova A, Brilkina A, Balalaeva I, Antonova N, et al. The study of hydrogen peroxide level under cisplatin action using genetically encoded sensor HyPer. *Prog Biomed Opt Imaging - Proc SPIE* 2014;8956. <https://doi.org/10.1117/12.2037737>.
10. Huang X, Halicka HD, Darzynkiewicz Z. Detection of histone H2AX phosphorylation on Ser-139 as an indicator of DNA damage (DNA double-strand breaks). *Curr Protoc Cytom* 2004;Chapter 7:Unit 7.27. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0727s30>.
11. Terruzzi I, Montesano A, Senesi P, Villa I, Ferraretto A, Bottani M, et al. L-carnitine reduces oxidative stress and promotes cells differentiation and bone matrix proteins expression in human osteoblast-like cells. *Bio Med Res Int* 2019;2019:e5678548. <https://doi.org/10.1155/2019/5678548>.
12. Stöckl JB, Schmid N, Flenkenthaler F, Drummer C, Behr R, Mayerhofer A, et al. Age-related alterations in the testicular proteome of a non-human primate. *Cells* 2021(10):1306. <https://doi.org/10.3390/cells10061306>.
13. Li H, Liu S, Wu S, Li L, Ge R, Cheng CY. Bioactive fragments of laminin and collagen chains – lesson from the testis. *Reprod Camb Engl* 2020(159):R111–R123. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0288>.
14. Guan Y, Lin H, Leu NA, Ruthel G, Fuchs SY, Busino L, et al. SCF ubiquitin E3 ligase regulates DNA double-strand breaks in early meiotic recombination. *Nucleic Acids Res* 2022;gkac304. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac304>.
15. Chesnokova V, Melmed S. Peptide Hormone Regulation of DNA damage responses. *Endocr Rev* 2020;41:bnaa009. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa009>.
16. Szczepanek K, Lesniewski EJ, Larner AC. Multi-tasking: nuclear transcription factors with novel roles in the mitochondria. *Trends Cell Biol* 2012(22):429–37. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.05.001>.
17. Tian P, Lv P, Shi W, Zhu M, Cong B, Wen B. Chronic stress reduces spermatogenic cell proliferation in rat testis. *Int J Clin Exp Pathol* 2019(12):1921–31.

Сведения об авторах:

Хоченкова Ю.А. – м.н.с. лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-8392-5495>

Мачкова Ю.С. – м.н.с. лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1138-8827>

Хоченков Д.А. – к.б.н., зав. лабораторией биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Москва, Россия; khochenkov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>

Сафарова Э.Р. – к.б.н., консультант по исследованиям и разработкам, ООО «ПептидПро»; Москва, Россия

Бастрикова Н.А. – к.б.н., медицинский директор, ООО «ПептидПро»; Москва, Россия

Вклад авторов:

Хоченкова Ю.А. – выполнение экспериментов, написание текста, 35%
 Мачкова Ю.С. – выполнение экспериментов, 10%
 Хоченков Д.А. – выполнение экспериментов, написание текста, 35%
 Сафарова Э.Р. – концепция и дизайн эксперимента, написание текста, 15%
 Бастрикова Н.А. – концепция и дизайн эксперимента, написание текста, 5%

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Исследование проведено при финансовой поддержке ООО «ПептидПро».

Статья поступила: 21.06.22

Результаты рецензирования: 19.07.22

Исправления получены: 23.07.22

Принята к публикации: 02.08.22

Information about authors:

Khochenkova Yu.A. – junior researcher Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia; Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-8392-5495>

Machkova Yu.S. – junior researcher Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia; Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1138-8827>

Khochenkov D.A. – PhD., head of Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia; Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>

Safarova E.R. – PhD, R&D consultant, PeptidPro LLC; Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-6619-6921>

Bastrikova N.A. – PhD, Medical Director, PeptidPro LLC; Moscow, Russia

Authors' contributions:

Khochenkova Yu.A. – performing experiments, article writing, 35%
 Machkova Yu.S. – performing experiments, 10%
 Khochenkov D.A. – performing experiments, article writing, 35%
 Safarova E.R. – concept and design of the experiment, article writing, 15%
 Bastrikova N.A. – concept and design of the experiment, article writing, 5%

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

Financing. The study was financially supported by PeptidPro Ltd.

Received: 21.06.22

Peer review: 19.07.22

Corrections received: 23.07.22

Accepted for publication: 02.08.22