

Цитопротективный эффект неопиатного аналога лей-энкефалина в первичной культуре пульмональных фибробластов в условиях окислительного стресса

Елена Николаевна Сазонова^{1,2*}, Ольга Антоновна Лебедько^{1,2},
Галина Александровна Денисюк¹, Константин Вячеславович Жмеренецкий¹,
Вячеслав Анатольевич Добрых¹

¹Дальневосточный государственный медицинский университет, г. Хабаровск, Россия;

²Хабаровский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания —
Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, г. Хабаровск, Россия

Реферат

Цель. Анализ цитопротективного влияния неопиатного аналога лей-энкефалина (Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) в первичной культуре пульмональных фибробластов в условиях окислительного стресса.

Методы. Инкубацию пульмональных фибробластов с неопиатным аналогом лей-энкефалина (Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) проводили в течение 6 ч при концентрации пептида в культуральной среде 0,1 мкМ. Для моделирования окислительного стресса в культуральную среду на 2 ч добавляли 60 мкМ H₂O₂. Экспериментальные серии включали: (1) «контроль»; (2) «неопиатный аналог лей-энкефалина» (пептид добавляли в культуральную среду через 44 ч после заключительного пересева); (3) «окислительный стресс» (H₂O₂ добавляли в культуральную среду через 48 ч после заключительного пересева); (4) «неопиатный аналог лей-энкефалина + окислительный стресс» (пептид добавляли в культуральную среду через 44 ч, H₂O₂ — через 48 ч после заключительного пересева). Для оценки процессов образования пульмональными фибробластами радикалов супероксид-аниона использовали метод люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Состояние клеток оценивали с помощью компьютерной морфометрии нуклео-нуклеолярного аппарата фибробластов, окрашенных азотнокислым серебром по методу AgNOR: измеряли площадь ядер фибробластов и суммарную площадь ядрышек в ядре, определяли количество ядрышек в ядре. Указанные параметры коррелируют с активностью анаболических процессов в клетке.

Результаты. Воздействие H₂O₂ на первичную культуру пульмональных фибробластов вызывало повышение генерации фибробластами радикалов супероксид-аниона, уменьшение размеров ядер фибробластов, снижение количества и размеров ядрышек. Предварительная инкубация пульмональных фибробластов с неопиатным аналогом лей-энкефалина уменьшала индуцированное H₂O₂ образование радикалов супероксид-аниона, корректировала вызванные окислительным стрессом изменения нуклео-нуклеолярного аппарата фибробластов. В проведённых ранее исследованиях аналогичный эффект на сходной модели демонстрировал неселективный агонист μ/δ -опиатных рецепторов аналог дерморфина пептид седатин. В качестве механизмов реализации цитопротективного эффекта неопиатного аналога лей-энкефалина предполагается его взаимодействие с рецепторами ноцицептина (NOR-рецепторами), что требует дальнейшего исследования.

Вывод. Результаты проведённого исследования указывают на наличие у пептида Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg (неопиатного аналога лей-энкефалина) прямого цитопротективного эффекта в условиях окислительного стресса.

Ключевые слова: биологически активные пептиды, окислительный стресс, ядрышки, цитопротективный эффект.

Для цитирования: Сазонова Е.Н., Лебедько О.А., Денисюк Г.А. и др. Цитопротективный эффект неопиатного аналога лей-энкефалина в первичной культуре пульмональных фибробластов в условиях окислительного стресса. *Казанский мед. ж.* 2019; 100 (1): 153–157. DOI: 10.17816/KMJ2019-153.

Cytoprotective effect of non-opioid leu-enkephalin analogue in primary culture of pulmonary fibroblasts in oxidative stress

E.N. Sazonova^{1,2}, O.A. Lebed'ko^{1,2}, G.A. Denisjuk¹, K.V. Zhmerenetskiy¹, V.A. Dobrykh¹

¹The Far-Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russia;

²Khabarovsk Branch of Far-Eastern Research Center of Physiology and Pathology of Respiration, Scientific Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk, Russia

Abstract

Aim. Analysis of the cytoprotective effect of non-opioid leu-enkephalin analogue (Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) in the primary culture of pulmonary fibroblasts in conditions of oxidative stress.

Methods. Pulmonary fibroblasts were incubated with the peptide of non-opioid leu-enkephalin analogue (Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) in the concentration 0.1 μ M for 6 hours. To simulate oxidative stress, 60 μ M H₂O₂ was added to the culture medium for 2 hours. Experimental series included (1) «control»; (2) «non-opiate leu-enkephalin analogue» (the peptide was added to the culture medium 44 hours after the final passage); (3) «oxidative stress» (H₂O₂ was added to the culture medium 48 hours after the final passage); (4) «non-opiate leu-enkephalin analogue + oxidative stress» (the peptide and H₂O₂ were added to the culture medium 44 and 48 hours respectively after the final passage). In order to evaluate the generation of superoxide anion by pulmonary fibroblasts, the method of lucigenin-dependent chemiluminescence was used. Computer morphometry of the nucleo-nucleolar apparatus of fibroblasts stained with silver nitrate by the AgNOR method was used to assess the cell state: the area of fibroblast nuclei, the total nucleoli area in the nucleus, and the number of nucleoli in the nucleus were measured. These parameters correlate with the activity of anabolic processes in the cells.

Results. The effect of H₂O₂ on the primary culture of pulmonary fibroblasts caused an increase of superoxide anion generation by the fibroblasts, reduction of fibroblast nuclei size, decrease of nucleoli amount and size. Pre-incubation of pulmonary fibroblasts with a non-opioid leu-enkephalin analogue reduced the H₂O₂-induced generation of superoxide anion, corrected changes in the nucleo-nucleolar apparatus of fibroblasts caused by oxidative stress. In our previous studies, similar effect in the same model was shown for non-selective μ/δ -opioid receptor agonist peptide sedatin (dermorphin analogue). The mechanism of cytoprotective effect of non-opioid leu-enkephalin analogue may include the affinity of this peptide to nociceptin receptors (NOR receptors) that requires further studies.

Conclusion. The results of the study indicate a direct cytoprotective effect of the peptide Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg (non-opioid leu-enkephalin analogue) in oxidative stress.

Keywords: biologically active peptide, oxidative stress, nucleoli, cytoprotective effect.

For citation: Sazonova E.N., Lebed'ko O.A., Denisjuk G.A. et al. Cytoprotective effect of non-opioid leu-enkephalin analogue in primary culture of pulmonary fibroblasts in oxidative stress. *Kazan medical journal*. 2019; 100 (1): 153–157. DOI: 10.17816/KMJ2019-153.

Опиоидные пептиды представляют собой часть стресс-лимитирующей системы организма [1]. Агонисты опиатных рецепторов проявляют нейропротективный [2], кардиопротективный [3] и гастропротективный [4] эффекты при различных патологических состояниях, сопровождающихся окислительным стрессом. Однако применение агонистов опиатных рецепторов в клинической практике ограничивается опасностью формирования центральных эффектов и зависимости.

Ранее мы провели экспериментальные исследования *in vivo* по анализу эффектов неопиатного аналога лей-энкефалина (НАЛЭ). Пептид НАЛЭ не имеет аффинности к опиатным рецепторам, поскольку вместо тирозина содержит в N-концевом положении аминокислотной цепи фенилаланин [5]. Была выявлена высокая эффективность пептида НАЛЭ при последствиях антенатальной гипоксии, сравнимая

с эффективностью применения неселективного агониста δ/μ -опиатных рецепторов пептида даларгина [6]. Однако было неясно: обладает пептид НАЛЭ прямым цитопротективным влиянием или эффект пептида НАЛЭ *in vivo* опосредован регуляторными системами организма.

Целью исследования был анализ прямого цитопротективного влияния пептида НАЛЭ в первичной культуре пульмональных фибробластов в условиях окислительного стресса.

Для получения первичной культуры пульмональных фибробластов биоптат левого лёгкого 2-суточной белой крысы линии Вистар механически дезагрегировали и обрабатывали коллагеназой поджелудочной железы краба (Биолот, Россия) в концентрации 500 ед./мл в течение 15 мин в условиях термостата (37 °С). Затем полученную суспензию центрифугировали; осадок пипетировали с раствором Хенкса (Биолот, Россия). Процедуру отмывки от коллагеназы

Таблица 1. Интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции в суспензированной первичной культуре пульмональных фибробластов ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	НАЛЭ	Окислительный стресс	НАЛЭ + окислительный стресс
Светосумма люцигенин-зависимого свечения, отн.ед.	0,554±0,020	0,507±0,017	0,909±0,023, *p=0,000003	0,723±0,025, *p=0,0004, #p=0,001

Примечание: * по отношению к контролю; # по отношению к группе «окислительный стресс»; НАЛЭ — неопиатный аналог лей-энкефалина.

повторяли дважды. Полученный материал высевали в культуральные флаконы в среду DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma, США). Культивирование осуществляли в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) в газовой среде с 5% содержанием CO₂. Использовали клетки пятого пассажа.

Инкубацию пульмональных фибробластов с пептидом НАЛЭ (Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg; ООО «Алмабион», Россия) проводили в течение 6 ч при концентрации пептида в культуральной среде 0,1 мкМ. Для моделирования окислительного стресса в культуральную среду на 2 ч добавляли 0,001 мл 3% H₂O₂ (60 мкМ) [7]. Экспериментальные серии включали: (1) «контроль»; (2) «НАЛЭ» (пептид добавляли в культуральную среду через 44 ч после заключительного пересева); (3) «окислительный стресс» (H₂O₂ добавляли в культуральную среду через 48 ч после заключительного пересева); (4) «НАЛЭ + окислительный стресс» (пептид добавляли в культуральную среду через 44 ч, H₂O₂ — через 48 ч после заключительного пересева).

Методом люцигенин-зависимой хемилюминесценции определяли образование радикала супероксид-аниона в культуре фибробластов [8, 9]. Для этого монослой фибробластов снимали с подложки с помощью раствора трипсина-версена (Биолот, Россия) и трижды промывали в растворе Хенкса. Для хемилюминесцентного анализа использовали суспензию клеток: 1×10⁶ клеток в 0,1 мл раствора Хенкса. Количество клеток в суспензии фибробластов подсчитывали в камере Фукса–Розенталя. Регистрацию хемилюминесценции проводили на люминесцентном спектрометре LS 50B «PERKIN ELMER», стандартизацию сигнала осуществляли с помощью программы «Finlab». Люцигенин (Sigma-Aldrich) добавляли в конечной концентрации 5 мкМ. Определяли светосумму свечения за 5 мин, показатель выражали в относительных единицах.

Оценку параметров нуклео-нуклеолярного аппарата клеток проводили на компьютерном анализаторе изображения МЕКОС-Ц. Для этого

монослой фибробластов окрашивали азотно-кислым серебром по методу AgNOR [10]. Параметры нуклеологенеза служат морфологическим отражением активности транскрипции рибосомальных генов [11] и достоверной количественной характеристикой функционального состояния клетки [12]. Проводили морфоцитометрию площади ядер фибробластов, оценку количества ядрышек, суммарной площади ядрышек в ядре. Площади ядер и ядрышек рассчитывали на основании измерения в 50 клетках. Для анализа количества ядрышек просматривали 200 ядер фибробластов в каждом монослое.

Результаты исследования обрабатывали с использованием программы Statistica 6.0. Для сравнения контрольной и опытной серий использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок, различия между контрольной и опытными сериями считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Всего в эксперименте было исследовано 35 монослоев фибробластов. На проведение исследования было получено разрешение этического комитета Дальневосточного государственного медицинского университета.

В культуре пульмональных фибробластов, подвергнутых 2-часовому воздействию 60 мкМ перекиси водорода (серия 3 — «окислительный стресс»), регистрировали достоверное повышение интенсивности люцигенин-зависимой хемилюминесценции на 64% (табл. 1).

При проведении морфоцитометрии фибробластов этой экспериментальной серии наблюдали уменьшение площади ядер фибробластов на 28,6%, суммарной площади ядрышек — на 39,95%, количества ядрышек в ядрах фибробластов — на 9,3% (табл. 2). Снижение показателей ядрышкового аппарата клеток в условиях окислительного стресса обусловлено угнетением синтеза рибосомальной рибонуклеиновой кислоты [12, 13].

Предварительная инкубация клеток с пептидом НАЛЭ (0,1 мкМ) существенно уменьшила выраженность индуцированных воздействием перекиси водорода отклонений исследуемых

Таблица 2. Морфометрические параметры нуклео-нуклеолярного аппарата в первичной культуре пульмональных фибробластов исследуемых экспериментальных серий (M±m)

Параметры	Контроль	НАЛЭ	Окислительный стресс	НАЛЭ + окислительный стресс
Площадь ядра	180,28±3,97	160,69±4,89, *p=0,0015	128,25±4,03, *p=0,0002	155,09±4,34, *p=0,0011, #p=0,0035
Суммарная площадь ядрышек	20,80±0,50	14,10±0,47, *p=0,007	12,49±0,37, *p=0,0001	13,97±0,37, *p=0,001, #p=0,02
Количество ядрышек	3,917±0,091	3,705±0,105	3,551±0,070, *p=0,019	3,846±0,071, #p=0,03

Примечание: *по отношению к контролю; #по отношению к группе «окислительный стресс»; НАЛЭ — неопиатный аналог лей-энкефалина.

параметров (серия 4). Образование радикала супероксид-аниона в образцах культуры серии «НАЛЭ + окислительный стресс», по данным люцигенин-зависимой хемилюминесценции, оставалось достоверно выше контрольного параметра (на 30,5%), однако было достоверно (на 20,5%) ниже аналогичного параметра группы «окислительный стресс» (см. табл. 1). Площадь ядер фибробластов группы «НАЛЭ + окислительный стресс» была достоверно (на 14%) меньше, чем в контроле, но больше, чем в группе «окислительный стресс» (на 20,9%). Суммарная площадь ядрышек фибробластов, подвергнутых воздействию окислительного стресса на фоне влияния НАЛЭ, была также достоверно ниже (на 32,8%) аналогичного показателя в группе контроля, однако на 11,8% выше по сравнению с группой «окислительный стресс». Количество ядрышек не имело отличий от контрольных показателей (см. табл. 2). Следовательно, предварительная инкубация культивируемых клеток с пептидом НАЛЭ существенно ослабляла негативные изменения, индуцированные воздействием перекиси водорода.

Добавление пептида НАЛЭ в культуральную среду в концентрации 0,1 мкМ (группа 2) без воздействия перекиси водорода также приводило к изменению морфометрических показателей: происходили снижение площади ядер фибробластов на 10,9% и уменьшение суммарной площади ядрышек на 32,2% (см. табл. 2). Механизм уменьшения размеров ядер и ядрышек клеток при воздействии пептида требует дальнейшего исследования. Нужно отметить, что выявленные в первичной культуре пульмональных фибробластов эффекты пептида НАЛЭ сходны с описанными нами ранее в этой же экспериментальной модели эффектами неселективного агониста μ/δ -опиатных рецепторов пептида седатина [14].

Результаты проведенного исследования указывают на наличие у НАЛЭ собственного прямого цитопротективного свойства в условиях окислительного стресса. При анализе возможных механизмов реализации эффекта пептида НАЛЭ обращает внимание сходство структуры этого пептида с начальным фрагментом молекулы ноцицептина — лиганда NOP-рецепторов [15]. Известно, что активация NOP-рецепторов приводит к реализации внутриклеточных сигнальных путей, сходных с опосредуемыми опиатными рецепторами: угнетение аденилатциклазы, уменьшение внутриклеточной концентрации ионов кальция [15], что может обусловить цитопротективный эффект. Наличие выраженного защитного эффекта, реализуемого как *in vivo*, так и *in vitro*, при отсутствии аффинности к опиатным рецепторам определяет перспективу создания на основе пептида НАЛЭ лекарственных препаратов и их доклинического исследования.

ВЫВОДЫ

1. Введение в культуральную среду 60 мкМ H_2O_2 повышает генерацию радикала супероксид-аниона в первичной культуре пульмональных фибробластов, уменьшает размер ядер фибробластов, снижает количество и суммарную площадь ядрышек.

2. Предварительная инкубация клеток с неопиатным аналогом лей-энкефалина (Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, 0,1 мкМ) снижает эффекты негативного воздействия H_2O_2 ; зарегистрированы уменьшение активности генерации радикала супероксид-аниона, существенная коррекция параметров нуклео-нуклеолярного аппарата культивируемых фибробластов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В. и др. Эндогенная опиоидная система как звено срочной и долговременной адаптации организма к экстремальным воздействиям. Перспективы клинического применения опиоидных пептидов. *Вестн. РАМН*. 2012; (6): 73–82. [Lishmanov Yu.B., Maslov L.N., Naryzhnaya N.V. et al. Endogenous opioid system as part of the urgent and long-term adaptation of the organism to extreme effects. Perspectives of clinical use of opioid peptides. *Vestnik RAMN*. 2012; (6): 73–82. (In Russ.)] DOI: 10.15690/vramn.v67i6.287.
2. Staples M., Acosta S., Tajiri N. et al. Delta opioid receptor and its peptide: a receptor-ligand neuroprotection. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14 (9): 17 410–17 419. DOI: 10.3390/ijms140917410.
3. He H., Huh J., Wang H. et al. Mitochondrial events responsible for morphine's cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2016; 290: 66–73. DOI: 10.1016/j.taap.2015.11.019.
4. Животова Е.Ю., Лебедько О.А., Тимошин С.С. Влияние структурных аналогов лей-энкефалина на процессы синтеза ДНК и свободнорадикальное окисление в слизистой оболочке желудка белых крыс. *Дальневосточный мед. ж.* 2012; (1): 109–112. [Zhivotova E.Yu., Lebed'ko O.A., Timoshin S.S. The effect of structural analogues of leu-enkephalin on the DNA synthesis and free radical oxidation in the stomach mucosa of albino rats. *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal*. 2012; (1): 109–112. (In Russ.)]
5. Metzger T.G., Ferguson D.M. On the role of extracellular loops of opioid receptors in conferring ligand selectivity. *FEBS Lett.* 1995; 375 (1–2): 1–4. DOI: 10.1016/0014-5793(95)01185-H.
6. Симанкова А.А., Лебедько О.А., Сазонова Е.Н. Влияние регуляторных пептидов семейства опиоидов на ранние постнатальные церебральные последствия антенатальной гипоксии. *Дальневосточный мед. ж.* 2015; (4): 76–80. [Simankova A.A., Lebed'ko O.A., Sazonova E.N. Effect of regulatory opioid peptides on early postnatal cerebral consequences of antenatal hypoxia. *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal*. 2015; (4): 76–80. (In Russ.)]
7. Самохвалов В.А., Сметанина М.Д., Мусейкина Н.Ю. и др. Влияние низкой концентрации перекиси водорода на метаболизм клеток крови. *Биомед. хим.* 2003; (2): 122–127. [Samokhvalov V.A., Smetanina M.D., Museykina N.Yu. et al. The influence of low concentration of hydrogen peroxide on blood cell metabolism. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2003; (2): 122–127. (In Russ.)]
8. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биол. хим.* 2009; 49: 341–388. [Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V. Free radicals and cell chemiluminescence. *Uspekhi biologicheskoy himii*. 2009; 49: 341–388. (In Russ.)]
9. O'Donnell V.B., Azzi A. High rates of extracellular superoxide generation by cultured human fibroblasts: involvement of a lipid-metabolizing enzyme. *Biochem. J.* 1996; 318 (Pt. 3): 805–812. DOI: 10.1042/bj3180805.
10. Коржевский Д.Э. Импрегнация нитратом серебра внутриядерных структур нервных клеток после фиксации в жидкости Карнуа. *Морфология*. 2001; (2): 67–69. [Korzhevskiy D.E. Impregnation with silver nitrate of intranuclear structures of nerve cells after fixation in Carnoy fluid. *Morfologiya*. 2001; (2): 67–69. (In Russ.)]
11. Фролова О.Е. Морфофункциональная характеристика моноцитов. Значение исследования нуклеолярного аппарата. *Клин.-лаб. диагностика*. 1998; (10): 3–8. [Frolova O.E. Morphofunctional characteristics of monocytes. The significance of the research of the nucleolar apparatus. *Kliniko-laboratornaya diagnostika*. 1998; (10): 3–8. (In Russ.)]
12. Мамаев Н.Н., Мамаева С.Е. Структура и функция ядрышкообразующих районов хромосом: молекулярные, цитологические и клинические аспекты. *Цитология*. 1992; 34 (10): 3–15. [Mamaev N.N., Mamaeva S.E. Structure and function of nucleolus organizing regions of chromosomes: molecular, cytological and clinical aspects. *Citologiya*. 1992; 34 (10): 3–15. (In Russ.)]
13. Wnuk M., Lewinska A., Bugno M. et al. Oxidant-induced decrease of the expression of nucleolar organizer regions in pig lymphocytes can be useful for monitoring the cellular effects of oxidative stress. *Mutat. Res.* 2008; 653 (1–2): 124–129. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.04.006.
14. Сазонова Е.Н., Самарина Е.Ю., Лебедько О.А. и др. Цитопротективное влияние агониста μ/δ -опиоидных рецепторов пептида седатин на первичную культуру пульмональных фибробластов белых крыс в условиях оксидативного стресса. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2016; 161 (1): 51–54. [Sazonova E.N., Samarina E.Y., Lebed'ko O.A. et al. Cytoprotective effect of peptide sedatin, an agonist of μ/δ -opioid receptors, on primary culture of pulmonary fibroblasts of albino rats under conditions of oxidative stress. *Bulleten' Experimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2016; 161 (1): 51–54. (In Russ.)] DOI: 10.1007/s10517-016-3340-3.
15. Toll L., Bruchas M.R., Calo G. et al. Nociceptin/Orphanin FQ receptor structure, signaling, functions and interactions with opioid systems. *Pharmacol. Rev.* 2016; 68: 419–457. DOI: 10.1124/pr.114.009209.