

Исследование протекторных свойств агониста TrkA-рецептора GK-2 на модели окислительного стресса в культуре клеток сосудистого эндотелия человека (HUVEC)

Антипова Т.А., Николаев С.В., Крыжановский С.А., Пекельдина Е.С.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. Окислительный стресс приводил к достоверному снижению жизнеспособности клеток по сравнению с контролем (78 ± 5 % и 100 ± 6 % соответственно, $p \leq 0,05$). Внесение как GK-2, так и NGF предотвращало снижение жизнеспособности клеток HUVEC под действием H_2O_2 (95 ± 3 % для GK-2 и 97 ± 4 % для NGF против 78 ± 5 % для H_2O_2 , $p \leq 0,05$). В контроле количество клеток с конденсированным хроматином составило 9 ± 2 , после внесения H_2O_2 78 ± 9 ($p \leq 0,05$ по сравнению с контролем). Внесение NGF или GK-2 после H_2O_2 достоверно снижало число таких клеток (44 ± 9 и 41 ± 8 соответственно) ($p \leq 0,05$ по сравнению с перекисью водорода) и препятствовало развитию морфологических изменений ядерного хроматина. Таким образом, GK-2, подобно NGF, в культуре клеток эндотелия человека HUVEC препятствует развитию процесса апоптоза, вызванного окислительным стрессом.

Ключевые слова: NGF; димерный дипептидный миметик GK-2; HUVEC клетки эндотелия человека; окислительный стресс; апоптоз

Для цитирования:

Антипова Т.А., Николаев С.В., Крыжановский С.А., Пекельдина Е.С. Исследование протекторных свойств агониста TrkA-рецептора GK-2 на модели окислительного стресса в культуре клеток сосудистого эндотелия человека (HUVEC) // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 1. – С. 18–21. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10035.

Research of neuroprotective properties of TrkA-receptor agonist GK-2 on model of oxidative stress in human vascular endothelial cells (HUVEC)

Antipova T.A., Nikolaev S.V., Kryzhanovsky S.A., Pekeldina E.S.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. Oxidative stress resulted to decrease in cells viability compared to the control (78 ± 5 % and 100 ± 6 %, respectively, $p \leq 0,05$). GK-2 and NGF prevented H_2O_2 -induced HUVEC cells damages (95 ± 3 % for HA-2 and 97 ± 4 % for NGF vs. 78 ± 5 % for H_2O_2 , $p \leq 0,05$). In control the number of cells with condensed chromatin was 9 ± 2 , after the addition of H_2O_2 78 ± 9 ($p \leq 0,05$ compared with the control). The addition of NGF or GK-2 after H_2O_2 significantly reduced the number of such cells (44 ± 9 and 41 ± 8 , respectively) ($p \leq 0,05$ compared to hydrogen peroxide) and prevented the development of morphological changes in nuclear chromatin. Thus GK-2, like NGF, in human endothelial cell culture HUVEC prevented the apoptosis development caused by hydrogen peroxide.

Keywords: NGF; dimeric dipeptide mimetic GK-2; HUVEC; oxidative stress; apoptosis

For citations:

Antipova TA, Nikolaev SV, Kryzhanovsky SA, Pekeldina ES. Research of neuroprotective properties of TrkA-receptor agonist GK-2 on model of oxidative stress in human vascular endothelial cells (HUVEC). *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;1:18–21. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10035.

Введение

Хронические ишемические состояния, в том числе ишемическая болезнь сердца и хроническая ишемия нижних конечностей лидируют в структуре летальности и инвалидизации. Одним из возможных подходов к лечению этих состояний является использование биоподобных фармакологических агентов, способных посредством стимуляции ангиогенеза обеспечить адекватное кровоснабжение ишемизированных тканей. Такое направление терапии получило название терапевтический ангиогенез или биологическое шунтирование [1]. Наиболее перспективным в этом направлении представляется разработка и внедрение в клиническую практику экзогенных аналогов эндогенных факторов роста [2]. Известно, что фактор роста нервов (NGF) помимо центральной нервной системы синтезируется и экскретируется эндотелиальными и гладкомышечными клетками сосудов, а на их клеточной мембране имеются специфичные для NGF TrkA рецепторы, через которые реализуются его ангиогенные эффекты [3]. В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова синтезиро-

ван димерный дипептидный миметик 4 петли NGF – соединение GK-2, обладающий свойствами агониста TrkA рецепторов [4]. Ранее нами в экспериментах, выполненных на культуре клеток эндотелия человека (HUVEC), было показано, что GK-2 проявляет выраженную ангиогенную активность, соизмеримую с таковой у NGF [5].

Цель исследования

Целью настоящей работы было исследование ангиопротекторных свойств димерного дипептидного миметика 4-й петли NGF GK-2 в условиях окислительного стресса на культуре клеток эндотелия человека – HUVEC.

Материалы и методы

Для экспериментов использовались реактивы: среда DMEM (HyClone), фетальная бычья сыворотка FBS (Gibco), L-глутамин (ICN) HEPES (ICN), гепарин (Панфарма), желатин (БиолоТ), ECGF (Sigma Aldrich),

MTT (Sigma Aldrich), ДМСО (Panreac), PBS (Sigma Aldrich).

Эндотелиальные клетки пупочной вены человека HUVEC культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 20мМ буфера HEPES, 5 ЕД/мл гепарина, 200 мкг/мл ECGF, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Клетки рассеивались в 96-луночные планшеты, покрытые желатином, с плотностью 5 тыс. клеток на лунку. Через 24 ч инкубации добавляли перекись водорода (H₂O₂) в конечной концентрации 200 мкМ. Спустя 24 ч культуральную среду, содержащую H₂O₂, заменяли на нормальную, вносили NGF в качестве положительно-контроля в конечной концентрации 100 нг/мл (10⁻⁹М) и ГК-2 (10⁻⁶М). Затем NGF и ГК-2 вносили каждые 48 ч в течение 6 суток. Через 24 ч после последнего внесения оценивали жизнеспособность клеток и количество клеток с нарушенной структурой хроматина.

Жизнеспособность клеток измеряли с использованием МТТ-теста. По окончании эксперимента среду отбирали, добавляли 0,5 % раствор 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ) в PBS, содержащем 0,9 мМ CaCl₂ и 0,5 мМ MgCl₂. Для растворения образующихся кристаллов формазана использовали ДМСО. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Multiscan EX при длине волны 600 нм [6]. Количество клеток с нарушенной структурой хроматина определяли после окрашивания ядерным красителем Хёхст 33258 (1 мкг/мл) в течение 30 мин. Клетки фотографировали при увеличении 200х с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100-F (Япония) при длине волны возбуждения 340–380 нм и длине волны испускания 435–485 нм. Подсчитывали количество клеток с измененной структурой хроматина в 5 полях зрения в каждой лунке (24 лунки в каждой экспериментальной группе).

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA). Данные представлены в виде *m. ± s.d.* Данные считались достоверными при *p* ≤ 0,05.

Результаты и обсуждение

Для моделирования окислительного стресса использовали H₂O₂ (200 мкМ), которая согласно литературным данным стимулирует программируемую гибель клеток – апоптоз [7], сопровождающуюся рядом биохимических и морфологических изменений в клетке: конденсация хроматина, фрагментация ДНК, повышение проницаемости мембран, сжатие клетки.

Показано, что окислительный стресс приводил к достоверному снижению жизнеспособности клеток по сравнению с контролем (78 ± 5 и 100 ± 6 % соответственно, *p* ≤ 0,05) (табл. 1).

NGF (10⁻⁹М) и ГК-2 (10⁻⁶М) в условиях окислительного стресса проявляли выраженную цитопро-

Таблица 1

Влияние ГК-2 на жизнеспособность клеток эндотелия человека (HUVEC) в условиях окислительного стресса (МТТ-тест) (M ± m)

Группы (n = 16)	Жизнеспособность клеток (% от Контроля)
Контроль	100 ± 6
H ₂ O ₂ (200 мкМ)	78 ± 5 *
H ₂ O ₂ (200 мкМ) + NGF (10 ⁻⁹ М)	97 ± 4 ^
H ₂ O ₂ (200 мкМ) + ГК-2 (10 ⁻⁶ М)	95 ± 3 ^

Примечание: * – *p* ≤ 0,05 от Контроля, ^ – *p* ≤ 0,05 от H₂O₂ (критерий Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну).

текторную активность, предотвращая снижение жизнеспособности клеток HUVEC под действием H₂O₂ (95 ± 3 % для ГК-2 и 97 ± 4 % для NGF против 78 ± 5 % для H₂O₂, *p* ≤ 0,05). Поскольку данная концентрация перекиси водорода вызывает, по литературным данным, повреждение хроматина ядра клетки, проводили окрашивание ядерным красителем Хёхст 33258.

В контроле количество клеток с конденсированным хроматином составило 9 ± 2, после внесения H₂O₂ 78 ± 9 (*p* ≤ 0,05 по сравнению с контролем). NGF или ГК-2 внесенные после H₂O₂ достоверно снижали число таких клеток (44 ± 9 и 41 ± 8 соответственно) (*p* ≤ 0,05 по сравнению с перекисью водорода) и препятствовали развитию морфологических изменений ядерного хроматина (рис. 1а, 1б).

Таким образом, ГК-2, подобно NGF, в условиях окислительного стресса не только препятствует снижению жизнеспособности эндотелиальных клеток HUVEC, но и предотвращает повреждение ядерного хроматина.

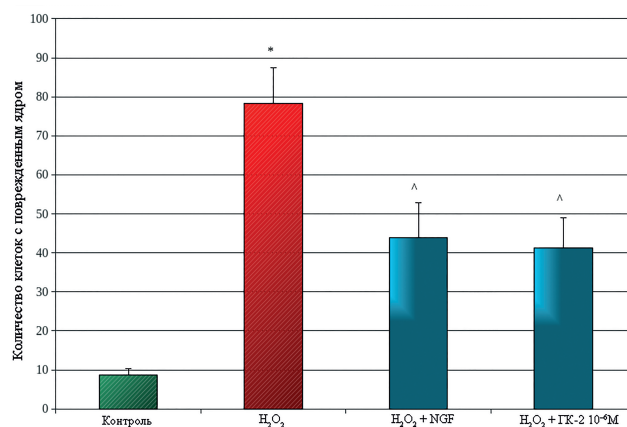


Рис. 1а. Влияние ГК-2 и NGF на повреждение ядер клеток эндотелия человека (HUVEC) в условиях окислительного стресса.

Примечания: Окрашивание ядерным красителем Хёхст 33258. Увеличение 200х. Достоверность отличий от Контроля – * *p* ≤ 0,05, от H₂O₂ – ^ *p* ≤ 0,05 по критерию Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну. Результаты подсчёта.

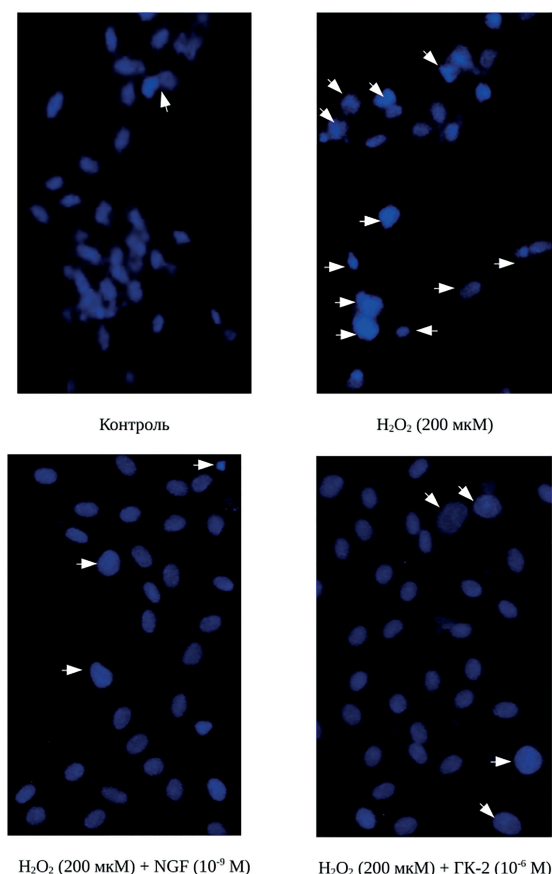


Рис. 16. Влияние GK-2 и NGF на повреждение ядер клеток эндотелия человека (HUVEC) в условиях окислительного стресса.

Примечания: Окрашивание ядерным красителем Хёхст 33258. Увеличение 200х. Достоверность отличий от Контроля — * $p \leq 0,05$, от H_2O_2 — $\wedge p \leq 0,05$ по критерию Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну. Оригинальные снимки.

Конденсация хроматина — это наиболее характерное проявление апоптоза. Хроматин конденсируется по периферии, под мембраной ядра, при этом обра-

зуются чётко очерченные плотные массы различной формы и размеров. Ядро может разрываться на два или несколько фрагментов. Механизм конденсации хроматина обусловлен расщеплением ядерной ДНК в местах, связывающих отдельные нуклеосомы, что приводит к развитию большого количества фрагментов. Ранее нами было показано, что внесение как ГК-2, так и NGF в культуру гиппокампальных клеток линии HT-22 приводило к синтезу белков HSP70 [8]. Хорошо известно, что увеличение содержания HSP70 приводит к возрастанию уровня антиапоптотических белков Bcl-2 и снижению проапоптотических Bax [9]. Кроме того, HSP70 блокирует вовлечение прокаспазы-9 в апоптосому, а также саму каспазу-9 [10]. HSP70 может связываться с эндонуклеазой EndoG и блокировать транслокацию этого проапоптотического фактора в ядро [11]. Таким образом, антиапоптотическое действие GK-2 может быть опосредовано его влиянием на синтез белков теплового шока HSP70, являющихся основным звеном защиты клеток от повреждений, в том числе вызванных окислительным стрессом.

Вывод

Димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF — соединение GK-2, подобно NGF, в культуре клеток эндотелия человека HUVEC препятствует развитию процесса апоптоза, вызванного окислительным стрессом.

Участие авторов. Антипова Т.А. — разработка модели, анализ и интерпретация результатов, написание текста, редактирование и финальное утверждение рукописи. Николаев С.В. — выполнение экспериментальной работы, написание текста, подготовка иллюстраций. Крыжановский С.А. — написание текста, редактирование и финальное утверждение рукописи. Пекельдина Е.С. — выполнение экспериментальной работы, написание текста.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Николаев Сергей Владимирович
 Автор, ответственный за переписку
 e-mail: cergej.nikolajev@gmail.com
 ORCID: 0000-0003-4584-746X
 SPIN-код: 1144-0269
 н. с. лаборатории фармакологии
 нейропротекции ФГБНУ «НИИ фармакологии
 имени В.В. Закусова», Москва

Антипова Татьяна Алексеевна
 ORCID: 0000-0002-9309-4872
 SPIN-код: 7723-6008
 к. б. н., заведующая лабораторией
 фармакологии нейропротекции ФГБНУ «НИИ
 фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Nikolaev Sergey
 Corresponding author
 e-mail: cergej.nikolajev@gmail.com
 ORCID: 0000-0003-4584-746X
 SPIN-code: 1144-0269
 researcher scientist of psychopharmacology department
 FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology»,
 Moscow

Antipova Tatyana
 ORCID: 0000-0002-9309-4872
 SPIN-code: 7723-6008
 Candidate of Biological Sciences, head of the Laboratory of pharmacology of neuroprotection, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Крыжановский Сергей Александрович

ORCID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., зав. лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kryzhanovskii Sergey

ORCID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-code: 6596-4865

Doctor of Medical Sciences, head of the laboratory of pharmacological screening, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Пекельдина Евгения Сергеевна

SPIN-код: 3225-9216

н. с., лаборатория фармакологического скрининга, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Pekeldina Evgeniya

SPIN-code: 3225-9216

Research Officer, head of the laboratory of pharmacological screening, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы // *Кардиологический вестник*. – 2017. – Т. 2. – № 2(14). – С. 5–14. [Parfenova EV, Tkachuk VA. Therapeutic angiogenesis: advances, problems, prospects. *Kardiologicheskij vestnik*. 2007;2(2(14)):5–15. (In Russ).]
2. Ko SH, Bandyk DF. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia. *Semin. Vasc. Surg.* 2014;27:1:23–31.
3. Blais M, L vesque P, Bellenfant S, Berthod F. Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and glial-derived neurotrophic factor enhance angiogenesis in a tissue-engineered in vitro model. *Tissue Eng. Part A*. 2013;19(15–16):1655–1664.
4. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Серединин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов // *ДАН*. – 2010. – Т. 434. – № 4. – С. 549–552. [Gudasheva TA, Antipova TA, Seredenin SB. Novel low-molecular-weight mimetics of the nerve growth factor. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2010;434(4):549–552. (In Russ).]
5. Крыжановский С.А., Антипова Т.А., Цорин И.Б., и др. Ангиогенные эффекты димерного дипептидного миметика четвертой петли фактора роста нервов // *Бюл. эксперим. биол. и медицины*. – 2016. – Т. 161. – № 4. – С. 503–507. [Kryzhanovskii SA, Antipova TA, Tsorin IB. Angiogenic effects of dimeric dipeptide mimetic of loop 4 of nerve growth factor. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016;161(4):513–517. (In Russ).]
4. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 2000;87(10):840–844.
5. Berry C, Brosnan MJ, Fennell JP, et al. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2001;10(2):247–255.
6. Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer.* 1987;56:279–285.
7. Mu P, Liu Q, Zheng R. Biphasic regulation of H₂O₂ on angiogenesis implicated NADPH oxidase. *Cell Biology International*. 2010;34(10):1013–1020.
8. Антипова Т.А. Нейропротекторное действие низкомолекулярного пептидного миметика фактора роста нервов NGF ГК-2 связано с активацией синтеза белков теплового шока HSP32 и HSP70 и увеличением фосфорилирования TrkA // *Эксперим. и клин. фармакол.* – 2010. – Т. 73. – № 12. – С. 6–8. [Antipova TA. Neuroprotective effect of low-molecular peptide mimetic (GK-2) of nerve growth factor is related to activated synthesis of heat shock proteins (HSP32 and HSP70) and increased phosphorylation of TrkA receptor. *Ekspirim. i klin. Farmakol.* 2010;73(12):6–8. (In Russ).] DOI: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2010-73-12-6-8>.
9. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, et al. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J. Biol. Chem.* 2005;280(46):38729–38739.
10. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the APAF-1 apoptosome by HSP70. *Nat. Cell Biology.* 2000;2(8):476–483.
11. Kalinowska M, Garncarz W, Pietrowska M, et al. Regulation of the human apoptotic DNase/RNase Endonuclease G: Involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis*. 2005;10(4):821–830.