

Изучение ангиотропной активности фактора роста нервов в опытах на культуре эндотелиальных клеток человека (HUVEC)

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

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

Резюме. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре клеток эндотелия человека (HUVEC), изучали ангиотропные эффекты фактора роста нервов NGF. На интактной культуре клеток показано, что NGF в концентрации 10^{-9} М проявляет ангиогенные свойства и стимулирует начальную стадию ангиогенеза – тубулогенез, о чём свидетельствует статистически значимое по сравнению с контролем увеличение средней суммарной длины микротрубочек. В условиях оксидативного стресса NGF нивелирует повреждающее действие перекиси водорода в высокой концентрации (200 мкМ) и не только проявляет ангиопротекторное действие, но и препятствует развитию морфологических изменений ядерного хроматина, характерных для апоптоза. В этих условиях NGF (10^{-9} М) статистически значимо по сравнению с контролем снижает число клеток с конденсированным и фрагментированным хроматином: соответственно 44 ± 9 и 78 ± 9 ($p \leq 0,05$). Полученные в работе результаты подтверждают данные о наличии у NGF ангиогенной активности и свидетельствуют о том, что в условиях повреждения эндотелиальных клеток сосудов оксидативным стрессом он проявляет выраженную ангиопротекторную и антиапоптотическую активность.

Ключевые слова: фактор роста нерва; клетки HUVEC; перекись водорода; оксидативный стресс; ангиопротекторная активность; антиапоптотическая активность

Для цитирования:

Пекельдина Е.С., Николаев С.В., Антипова Т.А., Крыжановский С.А. Изучение ангиотропной активности фактора роста нервов в опытах на культуре эндотелиальных клеток человека HUVEC // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – № 1. – С. 32–35. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10004.

Study of angiotropic activity of the nerve growth factor in experiments on human endothelial cell culture (HUVEC)

Pekeldina E.S., Nicolaev S.V., Antipova T.A., Kryzhanovskii S.A.
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. *In vitro* experiments performed on human endothelial cell culture (HUVEC), nerve growth factor (NGF) angiotropic effects were studied. An intact cell culture it was shown that NGF exhibited angiogenic properties and stimulated the initial stage of angiogenesis – tubulogenesis at a 10^{-9} M concentration, as evidenced by a statistically significant increase in the average total length of microtubules compared with the control. Under conditions of oxidative stress, NGF neutralizes the damaging effect of hydrogen peroxide in a high concentration (200 μ M) and not only shows an angioprotective effect, but also prevents the development of morphological changes in nuclear chromatin, characteristic for apoptosis. Under these conditions NGF (10^{-9} M) reduces statistically significant by comparison with the control the number of cells with condensed and fragmented chromatin: 44 ± 9 and 78 ± 9 ($p \leq 0,05$), respectively. The obtained results confirm the data about the NGF angiogenic activity and indicate that under conditions of the vessels endothelial cells damage by oxidative stress, it exhibits pronounced angioprotective and anti-apoptotic activity.

Keywords: nerve growth factor; HUVEC cells; hydrogen peroxide; oxidative stress; angioprotective activity; antiapoptotic activity

For citations:

Pekeldina ES, Nicolaev SV, Antipova TA, Kryzhanovskii SA. Study of angiotropic activity of the nerve growth factor in experiments on human endothelial cell culture (HUVEC). *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;1:32–35. (In Russ). DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10004.

Введение

Фактор роста нервов (nerve growth factor – NGF) относится к семейству регуляторных белков – нейротрофинов, принимающих участие в регуляции процессов пролиферации, дифференциации и миелинизации, а также поддержании функциональной активности центральных и периферических нейронов. Помимо этого, нейротрофины и, в частности NGF, играют важную роль в образовании синапсов и регуляции синаптической пластичности [1, 2]. Исторически NGF и его предшественник proNGF рассматривались как одни из основных регуляторов нейрональной функции. Однако

в настоящее время накоплен большой литературный материал, свидетельствующий о том, что биологическая роль NGF существенно шире и обусловлена его способностью регулировать процессы выживания клетки, апоптоза, клеточной пролиферации, воспаления, ангиогенеза и ремоделирования тканей [3]. В частности показано, что NGF является одним из ключевых эндогенных регуляторов ангиогенеза и, помимо ЦНС, синтезируется и экскретируется эндотелиальными и гладкомышечными клетками сосудов, а на их клеточной мембране представлены специфичные для NGF TrkA рецепторы [4, 5], посредством взаимодействия с которыми NGF реализует свои ангиогенные эффекты.

NGF-опосредованная активация TrkA рецепторов, расположенных на клеточных мембранах эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудов, влечёт за собой активацию PI3K-Akt, Ras-MAPK и PLC γ 1-IP3 внутриклеточных сигнальных путей, инициирующих неоангиогенез [6–8]. Этот феномен описан как для нормальных, так и патологически изменённых тканей.

Цель настоящего исследования — изучение ангиогенной активности NGF на интактной и повреждённой культуре изолированных клеток эндотелия человека HUVEC.

Материалы и методы

Интактные клетки. Оценку ангиогенной активности NGF (BD Bioscience) проводили на культуре клеток эндотелия человека (HUVEC). Клетки эндотелия рассаживали в среде DMEM (HyClone), содержащей 20 мМ Hepes (ICN), 2 мМ L-глутамина (ICN), гепарин (5 Ед/мл) (Панфарма), ECGF (200 мкг/мл) (Sigma), 10 % FBS (Invitrogen) с плотностью 4,0 тыс. на лунку в 96-луночные планшеты, покрытые поли-Д-лизином. NGF (10^{-9} М) вносили через 30 мин после рассеивания клеток на планшеты и затем каждые 48 ч (всего 3 внесения) в течение недели. Через 24 ч после последнего внесения NGF клетки фотографировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100-F (Япония) в фазовом контрасте при увеличении $\times 100$. Длину микротрубочек измеряли в 5 полях зрения каждой лунки с использованием программы WCIF ImageJ и выражали в микрометрах.

Повреждённые клетки. Эксперименты проводили на модели оксидативного стресса [9] в культуре эндотелиальных клеток человека (HUVEC), который вызывали добавлением в культуру клеток перекиси водорода (H_2O_2) в конечной концентрации 200 мкМ. Клетки культивировали в той же среде, что и интактные клетки в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °С в течение 24 ч. Далее среду, содержащую H_2O_2 , заменяли на нормальную и через 24 ч определяли жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста. Светопоглощение измеряли на спектрофотометре «Multiscan» (Thermo) при длине волны 600 нм. Ангиогенную активность NGF оценивали с помощью световой микроскопии при увеличении $\times 200$. NGF вносили после отмывки среды с H_2O_2 в конечной концентрации 10^{-9} М и далее каждые 48 ч в течение недели. Через 24 ч после последнего внесения NGF клетки фотографировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100-F (Япония) в фазовом контрасте при увеличении $\times 100$. Длину микротрубочек измеряли в 5 полях зрения каждой лунки с использованием программы WCIF ImageJ и выражали в микрометрах. В следующей серии экспериментов оценивали антиапоптотическую активность NGF. В качестве маркера апоптоза использовали флюоресцентный краситель Хехст (Hoechst 33258), который позволяет выявить клетки с конденсированным и фрагментированным хроматином, характерным для апоптоза и некроза.

Для этой цели клетки фиксировали метанолом. Далее проводили окрашивание клеток ядерным красителем Hoechst 33258 (10 мг/мл) (Serva, FRG) в течение 30 мин при комнатной температуре.

Статистическую обработку результатов проводили следующим образом: Нормальность распределения выборок проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка, гомогенность дисперсий — с помощью критерия Левена. Так как полученные данные были распределены по нормальному закону, а дисперсии выборок были негомогенны, то для определения статистической значимости различий использовали критерий Стьюдента в приближении для выборок с неравными дисперсиями, для учёта множественности сравнений использовали поправку Бонферрони. Результаты выражали в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

На интактной культуре изолированных клеток эндотелия человека (HUVEC) показано, что NGF в концентрации 10^{-9} М стимулирует начальную стадию ангиогенеза — тубулогенез, о чём свидетельствует статистически значимое ($p < 0,001$) по сравнению с контролем увеличение средней суммарной длины микротрубочек: контроль — 162 ± 6 мкм; NGF — 330 ± 9 мкм. Таким образом, в этой серии экспериментов нами были подтверждены известные данные литературы о том, что NGF обладает выраженной ангиогенной активностью [7, 10, 11].

В следующей серии экспериментов оценивали ангиопротекторную активность NGF на культуре клеток эндотелия человека (HUVEC), повреждённых перекисью водорода. На первом этапе исследования была отработана модель повреждения клеток сосудистого эндотелия человека высокой концентрацией перекиси водорода. Было показано, что перекись водорода в высокой концентрации (200 мкМ) инициирует повреждение клеток (HUVEC). Так, если длина интактных клеток (контроль) равнялась в среднем 125 ± 24 мкм, то в группе с H_2O_2 этот показатель был статистически значимо ниже ($p < 0,05$), чем в контроле и составлял 87 ± 10 мкм (рис. 1). На следующем этапе изучали ангиопротекторные эффекты NGF, который вносили в лунки после отмывки клеток от H_2O_2 . Нами показано, что NGF (10^{-9} М) в условиях оксидативного стресса проявляет значимую ($p < 0,05$) ангиопротекторную активность: длина клеток в группе NGF практически не отличалась от таковой в интактной группе и составляла соответственно 138 ± 14 мкм и 125 ± 24 мкм (рис. 1).

В последней серии экспериментов изучали антиапоптотические эффекты NGF на культуре (HUVEC), повреждённых перекисью водорода. Результаты экспериментов приведены на рис. 2. Как видно из приведённых данных, добавление в культуру клеток перекиси

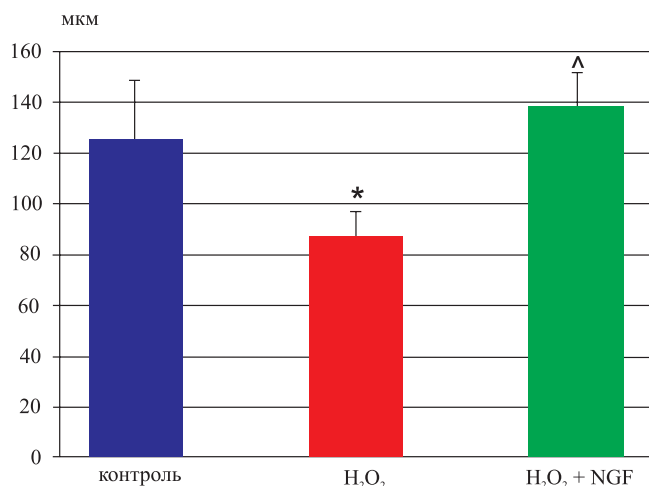


Рис. 1. Ангиопротекторное действие NGF (10^{-9} М) на модели оксидативного стресса в культуре клеток сосу­дистого эндотелия человека (HUVEC).
Статистическая значимость: от контроля * – $p \leq 0,05$; от перекиси водорода ^ – $p \leq 0,05$

водорода вызывает повреждение ядер клеток сосу­дистого эндотелия: в контроле число клеток с конденсирован­ным и фрагментированным хроматином составило 9 ± 2 , а после внесения перекиси водорода – 78 ± 9 ($p \leq 0,05$), что свидетельствует о том, что оксидативный стресс оказывает проапоптотическое действие. NGF (10^{-9} М) достоверно по сравнению с контролем снижает число повреждённых клеток, соответственно, 44 ± 9 и 78 ± 9 ($p \leq 0,05$), что позволяет говорить о том, что NGF препятствует развитию морфологических изменений ядерного хроматина, характерных для апоптоза.

Известно, что NGF-опосредованная активация TrkA рецепторов, расположенных на клеточных мембранах эндотелиальных клетках сосудов, активирует PI3K-Akt, Ras-MAPK и PLCγ1-IP3 внутриклеточные сигнальные

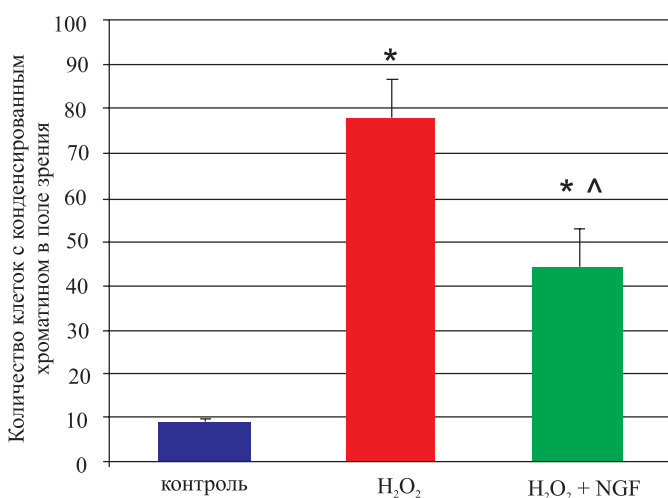


Рис. 2. Антиапоптотическое действие NGF (10^{-9} М) на модели оксидативного стресса в культуре клеток сосу­дистого эндотелия человека (HUVEC).

Данные окрашивания Hoeschst 33258. Статистическая значимость: от контроля * – $p \leq 0,05$; от перекиси водорода ^ – $p \leq 0,05$

пути, стимулирующие пролиферацию, миграцию и инвазию эндотелиальных клеток, т. е. инициирует ангиогенез [6–8 и др.]. Помимо этого, NGF может стимулировать ангиогенез посредством активации фактора роста эндотелия сосудов – VEGF-A [11]. Активированный NGF фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A) взаимодействует с FLK-1 рецепторами, в результате чего происходит экспрессия урокиназы и/или её рецепторов [12]. Экспрессия урокиназы является начальным этапом программы, связанной с миграцией клеток, и необходима для перемещения клеток из одного тканевого компартмента в другой [13]. Ключевым моментом процесса клеточной инвазии является взаимодействие урокиназы со специфичным для неё урокиназным рецептором – uPAR. uPAR рецепторы фиксируются к клеточной мембране липидным «якорем» – инозитол-фосфолипидом, — и способны латерально перемещаться в фосфолипидном слое клеточной мембраны и, в случае активации, концентрируются в её определённых участках, в частности в случае миграции клетки на её «лидирующем» полюсе. Такие свойства активированных uPAR рецепторов позволяют осуществлять строго направленную локальную деградацию внеклеточного матрикса, что необходимо для миграции и инвазии клеток [13, 14].

Если ангиогенные эффекты NGF достаточно хорошо известны, то его ангиопротекторное действие практически не изучено. В библиотеке Pub.Med. представлена только одна, опубликованная в 2017 г. статья, свидетельствующая о способности NGF защищать эндотелиальные клетки сосудов от повреждающего действия индометацина [15]. Авторы статьи полагают, что ангиопротекторное действие NGF может быть связано с его способностью препятствовать деполяризации митохондриальной мембраны и/или стимулировать экспрессию IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста 1) в эндотелиальных клетках. Близкая ситуация наблюдается в отношении изучения влияния NGF на апоптоз эндотелиальных клеток. В литературе имеются единичные противоречивые сообщения о наличии у NGF или антиапоптотической [16], или проапоптотической активности [17].

Заключение

Результаты настоящего исследования подтверждают данные о наличии у NGF ангиогенной активности и свидетельствуют о том, что в условиях повреждения эндотелиальных клеток сосудов оксидативным стрессом он проявляет выраженную ангиопротекторную и антиапоптотическую активность.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Крыжановский Сергей Александрович**Автор, ответственный за переписку**

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., зав. лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kryzhanovskii Sergey**Corresponding author**

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN code: 6596-4865

DM, Head of Laboratory of pharmacological screening FSBI “ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY”, Moscow

Пекельдина Евгения Сергеевна

SPIN-код: 3225-9216

н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Pekeldina Evgeniya

SPIN code: 3225-9216

Researcher Scientist of Laboratory of pharmacological screening FSBI “ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY”, Moscow

Николаев Сергей Владимирович

ORCID ID: 0000-0003-4584-746X

SPIN-код: 1144-0269

н. с. лаборатории нейропротекции ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Nicolaev Sergey

ORCID ID: 0000-0003-4584-746X

SPIN code: 1144-0269

Researcher Scientist of Laboratory of neuroprotection pharmacology FSBI “ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY”, Moscow

Антипова Татьяна Алексеевна

ORCID ID: 0000-0002-9309-4872

SPIN-код: 7723-6008

к. б. н., зав. лабораторией нейропротекции ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Antipova Tatyana

ORCID ID: 0000-0002-9309-4872

SPIN code: 7723-6008

Candidate of Biological Sciences, Head of Laboratory of neuroprotection pharmacology FSBI “ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY”, Moscow

Литература / References

- Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Jan;2(1):24–32. DOI: 10.1038/35049004
- Bradshaw RA, Pundavela J, Biarc J, et al. NGF and proNGF: Regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling. *Adv Biol Regul*. 2015 May;58:16–27. DOI: 10.1016/j.jbior.2014.11.003
- Schenck K, Schreurs O, Hayashi K, Helgeland K. The role of nerve growth factor (NGF) and its precursor forms in oral wound healing. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 11;18(2). pii: E386. DOI: 10.3390/ijms18020386
- Saygili E, Kluttig R, Rana OR, et al. Age-related regional differences in cardiac nerve growth factor expression. *Age (Dordr)*. 2012 Jun;34(3):659–667. DOI: 10.1007/s11357-011-9262-0
- Retamales-Ortega R, Oróstica L, Vera C, et al. Role of nerve growth factor (NGF) and miRNAs in epithelial ovarian cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 26;18(3). pii: E507. DOI: 10.3390/ijms18030507
- Nico B, Mangieri D, Benagiano V, et al. Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvasc Res*. 2008 Mar;75(2):135–141. DOI: 10.1016/j.mvr.2007.07.004
- Ahluwalia A, Jones MK, Brzozowski T, Tarnawski AS. Nerve growth factor is critical requirement for in vitro angiogenesis in gastric endothelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016 Nov 1;311(5):G981–G987. DOI: 10.1152/ajpgi.00334.2016
- Lazarovici P, Lahiani A, Gincberg G, et al. Nerve growth factor-induced angiogenesis: 1. Endothelial cell tube formation assay. *Methods Mol Biol*. 2018;1727:239–250. DOI: 10.1007/978-1-4939-7571-6_18
- Mu P, Liu Q, Zheng R. Biphasic regulation of H₂O₂ on angiogenesis implicated NADPH oxidase. *Cell Biol Int*. 2010 Oct;34(10):1013–1020. DOI: 10.1042/CBI20090092
- Diao YP, Cui FK, Yan S, et al. Nerve growth factor promotes angiogenesis and skeletal muscle fiber remodeling in a murine model of hindlimb ischemia. *Chin Med J (Engl)*. 2016 Feb 5;129(3):313–319. DOI: 10.4103/0366-6999.174496
- Wang J, Fu X, Yu L, et al. Preconditioning with VEGF enhances angiogenic and neuroprotective effects of bone marrow mononuclear cell transplantation in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Mol Neurobiol*. 2016 Nov;53(9):6057–6068. DOI: 10.1007/s12035-015-9512-8
- Herkenne S, Paques C, Nivelles O, et al. The interaction of uPAR with VEGFR2 promotes VEGF-induced angiogenesis. *Sci Signal*. 2015 Nov 17;8(403):ra117. DOI: 10.1126/scisignal.aaa2403
- Breuss JM, Uhrin P. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system. *Cell Adh Migr*. 2012 Nov-Dec;6(6):535–615. DOI: 10.4161/cam.22243
- Montuori N, Ragno P. Role of uPA/uPAR in the modulation of angiogenesis. *Chem Immunol Allergy*. 2014;99:105–122. DOI: 10.1159/000353310
- Ahluwalia A, Jones MK, Hoa N, Tarnawski AS. NGF protects endothelial cells from indomethacin-induced injury through activation of mitochondria and upregulation of IGF-1. *Cell Signal*. 2017 Dec;40:22–29. DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.08.006
- Urban D, Lorenz J, Meyborg H, et al. Proprotein convertase furin enhances survival and migration of vascular smooth muscle cells via processing of pro-nerve growth factor. *J Biochem*. 2013 Feb;153(2):197–207. DOI: 10.1093/jb/mvs137
- Han Y, Qi Y, Kang J, et al. Nerve growth factor promotes formation of lumen-like structures in vitro through inducing apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Feb 15;366(3):685–691. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.11.160