

УДК 577.29+576.535.5+547.327

НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ АМИДНЫХ НЕЙРОЛИПИНОВ В МОДЕЛЯХ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ НА КУЛЬТУРЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ НЕЙРОНОПОДОБНЫХ КЛЕТОК SH-SY5Y

М. Г. Акимов^{1,*}, А. М. Ашба¹, Е. В. Фомина-Агеева¹, Н. М. Грецкая¹,
академик РАН Н. Ф. Мясоедов², В. В. Безуглов¹

Поступило 28.11.2018 г.

В условиях модели нейродегенерации с использованием линии нейроноподобных клеток SH-SY5Y человека амидные производные арахидоновой и докозагексаеновой кислот не защищали клетки от токсического действия нейротоксина 1-метил-4-фенил-пиридиния (МФП⁺) и CoCl₂, но защищали от влияния H₂O₂. Защитная активность нейролипинов начинала проявляться при концентрации 0,5 нМ, и используемые в работе нейролипины по этому признаку можно расположить следующим образом: докозагексаеноилдофамин > арахидоноилсерин >= арахидоноилглицин > арахидоноил гамма-аминомасляной кислоты >= этаноламид арахидоновой кислоты.

Ключевые слова: SH-SY5Y, нейролипины, эндоканабиноиды, нейропротекция, АФК, цитотоксичность.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524855625-628>

Нейролипины — амидные и эфирные производные жирных кислот, взаимодействующие с белками каннабиноидно-ванилоидной системы, — являются естественными регуляторами метаболизма и физиологических процессов головного мозга [1]. Наиболее типичными аминными частями природных нейролипинов являются аминокислоты глицин и серин, нейромедиаторы серотонин, дофамин и гамма-аминомасляная кислота, а также этаноламин. Для отдельных нейролипинов установлена их нейрозащитная активность при исследовании в условиях моделей патологии нервной системы. В частности, было обнаружено нейрозащитное действие анандамида (этанол амида арахидоновой кислоты) при ишемии, предположительно, посредством активации рецептора CB1 [2, 3] и этаноламидов олеиновой и арахидоновой кислот (OL-EA и AA-EA) посредством активации рецепторов PPAR α [4]. Арахидоноилсерин (AA-Ser) повышает выживаемость нейронов при травме головного мозга [5] посредством активации рецептора CB2. Арахидоноилдофамин и другие ацилдофамины — лиганды каннабиноидных рецепторов и ванилоидного рецептора — обладают выраженным нейрозащитным действием по неустановленному механизму [6, 7]. Нейрозащитное действие других амидных нейролипинов: арахидоноилгли-

цина (AA-Gly), арахидоноил гамма-аминомасляной кислоты (AA-GABA), арахидоноилсеротонина (AA-5HT) — практически не изучено.

Цель настоящей работы — сравнить нейрозащитную активность разных амидных нейролипинов в отношении клеток одной линии в нескольких моделях *in vitro*, имитирующих нейродегенеративные процессы в тканях головного мозга, что ранее не было описано. Для этой цели мы выбрали нейроноподобные клетки линии SH-SY5Y человека, которые широко применяют при тестировании потенциальных нейрозащитных веществ [8]. В исследовании использовали следующие нейролипины: анандамид (AA-EA), арахидоноилглицин (AA-Gly), арахидоноилсерин (AA-Ser), арахидоноил гамма-аминомасляной кислоты (AA-GABA), арахидоноилсеротонин (AA-5HT) и докозагексаеноилдофамин (DHA-DA), наиболее активный нейрозащитный агент среди ацилдофаминов [6, 7].

Защитное действие нейролипинов сравнивали в трёх моделях окислительного стресса: собственно токсичность H₂O₂, гипоксия, индуцированная CoCl₂, и действие нейротоксина 1-метил-4-фенилпиридиния (МФП⁺).

Нейролипины AA-EA, OL-EA, AA-GABA, AA-Gly, AA-Ser, AA-5HT и DHA-DA синтезировали по ранее разработанным нами методикам [9]. Продукты очищали колоночной хроматографией. Чистоту финального продукта оценивали с помощью микроколоночной обращённо-фазовой ВЭЖХ, структуру подтверждали с помощью ¹H ЯМР и масс-

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии наук, Москва

² Институт молекулярной генетики Российской Академии наук, Москва

*E-mail: akimovmike@gmail.com; akimovmike@yandex.ru

спектрометрии ESI. Все соединения, использованные в экспериментах, имели чистоту не менее 97%.

Клетки человеческой нейробластомы SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) культивировали в комбинированной питательной среде MEM + F12 (1 : 1) с добавлением 0,5% заменимых аминокислот, 0,5 мМ пирувата натрия, 2 мМ L-глутамин, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2,5 мкг/мл амфотерицина В при 37 °С и 5% CO₂. Клетки пересеивали с помощью раствора Версена и раствора трипсина с ЭДТА. Плотность клеток в экспериментах была 15000 на лунку 96-луночного планшета. Инкубацию с тестируемыми соединениями проводили в течение суток. Вещества растворяли в равном объеме свежей среды и добавляли в среду культивирования. Стоковые растворы веществ готовили в диметилсульфоксиде или H₂O, финальная концентрация растворителя не превышала 0,5%. Для оценки жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест. Каждый эксперимент повторяли три раза. Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Prizm 6.0. Для статистической оценки различий использовали дисперсионный анализ и критерий Фишера, различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Для каждой модели окислительного стресса мы предварительно определили значения EC₅₀ и EC₇₀ для каждого индуктора стресса. Эти концентрации далее использовали в опытах по изучению защитного действия нейролипидов (рис. 1), чтобы избежать условий избыточной токсичности, когда клетки погибают независимо от присутствия потенциаль-

ных защитных агентов. Значения EC₅₀ в условиях суточной инкубации с индуктором составили 1,00 ± 0,05; 5,0 ± 0,1 и 0,40 ± 0,01 мМ для H₂O₂, МФП⁺ и CoCl₂ соответственно.

Поскольку для некоторых нейролипидов известно, что они способны вызывать апоптоз опухолевых клеток [10, 11], на первом этапе работы мы определили собственную токсичность исследуемых соединений, что позволило оптимизировать диапазон тестируемых концентраций. В дальнейших опытах для соединений с EC₅₀ ≤ 100 мкМ использовали концентрации, не превышающие полученное значение EC₅₀.

В опытах по защите от действия CoCl₂ и МФП⁺ статистически значимого протективного влияния нейролипидов мы не зафиксировали (данные не представлены).

В условиях модели окислительного стресса на фоне обработки H₂O₂ можно расположить защитную активность нейролипидов в виде следующего ряда: DHA-DA > AA-Ser >= AA-Gly > AA-GABA >= AA-EA. Нейролипиды AA-5HT и OL-EA в данном тесте были неактивны (рис. 2). Защитное влияние активных соединений зафиксировали при использовании их в наномолярном диапазоне концентраций, что указывает на их рецепторно-опосредованное действие. С этим согласуется и отсутствие активности OL-EA. Известно, что его аффинность к рецепторам каннабиноидной системы существенно отличается от таковой для AA-EA [12].

Исходя из наблюдаемого распределения активности, можно предположить, что механизм действия нейролипидов в ходе защиты от цитотоксического

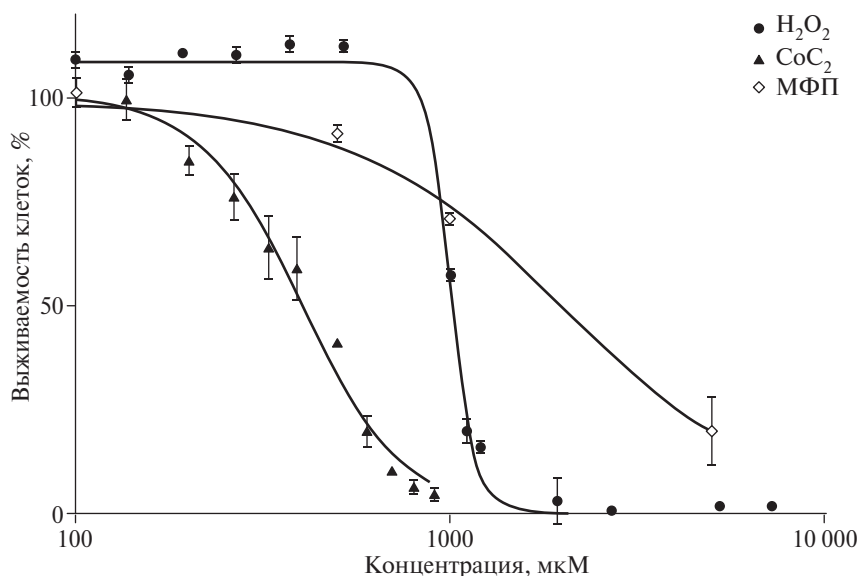


Рис. 1. Цитотоксическое действие H₂O₂, CoCl₂ и МФП⁺ на культуру клеток SH-SY5Y. Здесь и на рис. 2 $M \pm SD$, $n = 3$.

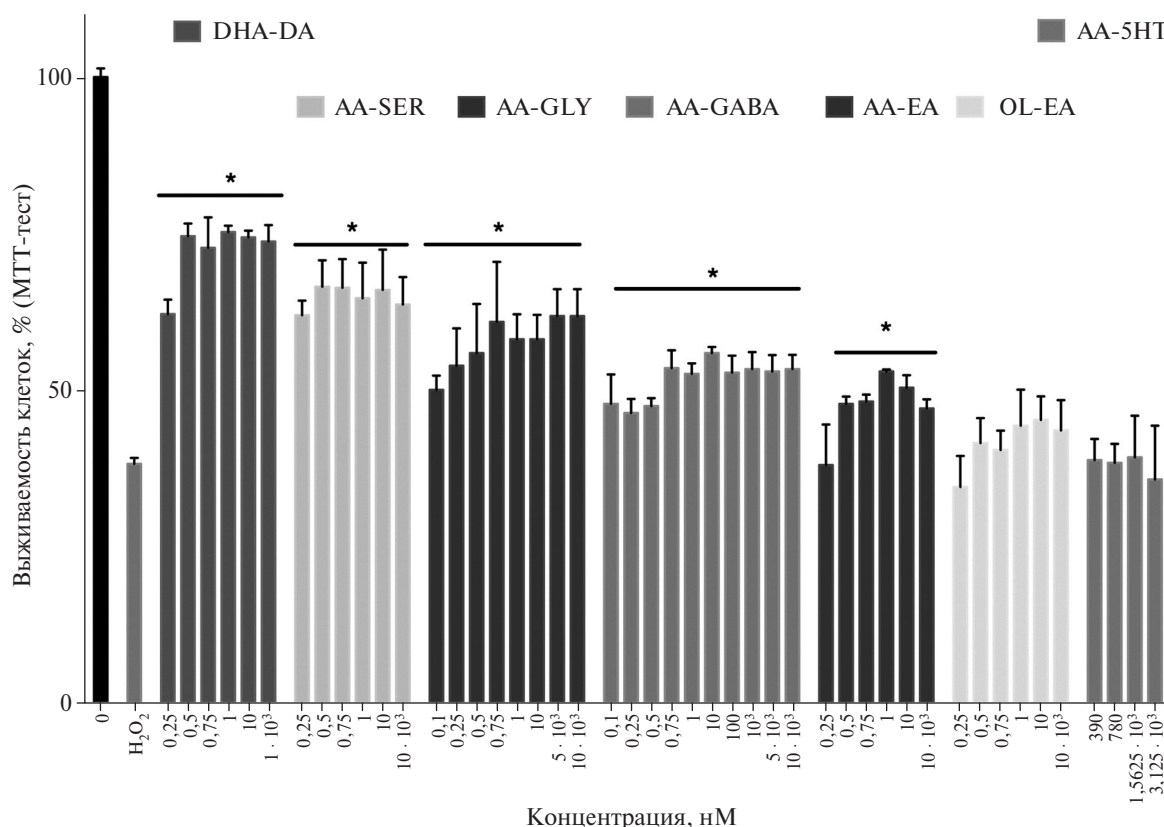


Рис. 2. Защита нейролипидами клеток SH-SY5Y от токсического действия H₂O₂ при одновременном добавлении. **p* < 0,05 при сравнении с контролем.

действия H₂O₂ различен. Так, DHA-DA согласно нашим ранее опубликованным данным [7] обладает собственной активностью в качестве “ловушки” активных форм кислорода и потому оказывает действие достаточно быстро. Соединение AA-Ser, вероятно, действует посредством активации уже имеющихся в клетке систем детоксикации активных форм кислорода. Не исключено, что механизмы нейрозащитного действия нейролипидов AA-EA и AA-GABA, которые были менее активны в этом тесте, а также AA-Gly, который занимал промежуточное положение в ряду активности, включают с некоторым опозданием запуск имеющихся систем защитных белков, и потому к моменту активации последних повреждения клеток могут быть уже необратимыми.

Полученные данные позволяют сформулировать гипотезу, в рамках которой ацилдофамины и ацилсерины, будучи веществами “немедленного реагирования”, образуются в начале процесса повреждения нервной ткани и обеспечивают выживание нейронов в первое время. Нейролипиды AA-EA, AA-Gly и AA-GABA могут выполнять более долговременную гомеостатическую функцию. С этой гипотезой согласуется описанный биосинтез AA-Ser, катализируемый

цитохромом *c* в присутствии перекиси водорода [13, 14], и вариант биосинтеза DHA-DA путём обращения активности гидролазы FAAH [15]. Не исключено, что оба этих пути могут реализовываться в условиях гиперпродукции перекиси водорода.

В наших экспериментах мы использовали достаточно высокие концентрации химических нейротоксических агентов — CoCl₂ (0,8 мМ) и МФП⁺ (5 мМ), мишенью которых является система окислительного фосфорилирования в митохондриях. Не исключено, что в таких экстремальных условиях испытываемые нейролипиды в диапазоне использованных концентраций (не выше 10 мкМ) были не способны противодействовать выраженному падению уровня АТФ в клетках.

Таким образом, из набора исследованных амидных нейролипидов можно выделить в качестве перспективных нейрозащитных агентов докозагексаеноилдофамин и арахидоноилсерин, причём последний в модели окислительного стресса, индуцированного перекисью водорода, проявлял максимальный защитный эффект уже в концентрации 0,5 нМ.

Источники финансирования. Работа осуществлена при поддержке РФФИ: грант 17–00–00105 и грант КОМФИ 17–00–00109 (К).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pertwee R.G.* Endocannabinoids and Their Pharmacological Actions // *Handb Exp. Pharmacol.* 2015. V. 231. P. 1–37.
2. *Muthian S., Rademacher D.J., Roelke C.T., Gross G.J., Hillard C.J.* Anandamide Content is Increased and CB1 Cannabinoid Receptor Blockade is Protective During Transient, Focal Cerebral Ischemia // *Neuroscience.* 2004. V. 129. P. 743–750.
3. *Sarne Y., Mechoulam R.* Cannabinoids: between Neuroprotection and Neurotoxicity // *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 2005. V. 4. P. 677–684.
4. *Sun Y., Alexander S.P., Garle M.J., Gibson C.L., Hewitt K., Murphy S.P., Kendall D.A., Bennett A.J.* Cannabinoid Activation of PPAR Alpha; A Novel Neuroprotective Mechanism // *Brit. J. Pharmacol.* 2007. V. 152. P. 734–743.
5. *Cohen-Yeshurun A., Trembovler V., Alexandrovich A., Ryberg E., Greasley P.J., Mechoulam R., Shohami E., Leker R.R.* N-Arachidonoyl-L-Serine is Neuroprotective after Traumatic Brain Injury by Reducing Apoptosis // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2011. V. 31. P. 1768–1777.
6. *Bobrov M.Y., Lizhin A.A., Andrianova E.L., Gretskaya N.M., Frumkina L.E., Khaspekov L.G., Bezuglov V.V.* Antioxidant and Neuroprotective Properties of N-Arachidonoyldopamine // *Neurosci. Lett.* 2008. V. 431. P. 6–11.
7. *Бобров М.Ю., Лыжин А.А., Андрианова Е.Л., Грецкая Н.М., Зинченко Г.Н., Фрумкина Л.Е., Хаспеков Л.Г., Безуглов В.В.* Антиоксидантные и нейропротекторные свойства N-Докозагексаеноилдофамина // *БЭБиМ.* 2006. Т. 142. № 10. С. 425–427.
8. *Kovalevich J., Langford D.* Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 1078. P. 9–21.
9. *Безуглов В.В., Блаженова А.В., Андрианова Е.Л., Акимов М.Г., Бобров М.Ю., Назимов И.В., Кисель М.А., Шарко О.Л., Новиков А.В., Краснов Н.В., Шевченко В.П., Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Мясоедов Н.Ф.* Арахидоноламиноокислоты и арахидоноилпептиды: синтез и свойства // *Биоорганическая химия.* 2006. Т. 32. № 3. С. 258–267.
10. *Akimov M. G., Gretskaya N.M., Zinchenko G.N., Bezuglov V.V.* Cytotoxicity of Endogenous Lipids N-Acyl Dopamines and their Possible Metabolic Derivatives for Human Cancer Cell Lines of Different Histological Origin // *Anticancer Res.* 2015. V. 35. P. 2657–2661.
11. *Oesch S., Gertsch J.* Cannabinoid Receptor Ligands as Potential Anticancer Agents — High Hopes for New Therapies? // *J. Pharm. Pharmacol.* 2009. V. 61. P. 839–853.
12. *Godlewski G., Offertaler L., Wagner J.A., Kunos G.* Receptors for Acylethanolamides-GPR55 and GPR119 // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009. V. 89. P. 105–111.
13. *McCue J.M., Driscoll W.J., Mueller G.P.* *In vitro* Synthesis of Arachidonoyl Amino Acids by Cytochrome *c* // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009. V. 90. P. 42–48.
14. *McCue J.M., Driscoll W.J., Mueller G.P.* Cytochrome *c* Catalyzes the *in vitro* Synthesis of Arachidonoyl Glycine // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 365. P. 322–327.
15. *Hu S.S., Bradshaw H.B., Benton V.M., Chen J.S., Huang S.M., Minassi A., Bisogno T., Masuda K., Tan B., Roskoski R., Jr., et al.* The Biosynthesis of N-Arachidonoyl Dopamine (NADA), a Putative Endocannabinoid and Endovanilloid, via Conjugation of Arachidonic Acid with Dopamine // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009. V. 81. P. 291–301.

NEUROPROTECTIVE ACTION OF AMIDIC NEUROLIPINS IN MODELS OF NEUROTOXICITY ON THE CULTURE OF HUMAN NEURAL—LIKE CELLS SH-SY5Y

M. G. Akimov¹, A. M. Ashba¹, E. V. Fomina-Ageeva¹,
N. M. Gretskaya¹, Academician of the RAS N. F. Myasoedov², V. V. Bezuglov¹

¹Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation

²Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Received November 28, 2018

It was established that in neurodegeneration models in the human neuron-like cell line SH-SY5Y, amide derivatives of arachidonic and docosahexaenoic acids were inactive in experiments with MPP⁺ and CoCl₂ but protected from H₂O₂. The protective activity of neurolipins decreased in the series DHA-DA > AA-SER >= AA-GLY > AA-GABA >= AA-EA and was manifested starting from a concentration of 0.5 nM.

Keywords: SH-SY5Y, neurolipins, endocannabinoids, neuroprotection, ROS, cytotoxicity.