

## К 40-летию Института физиологически активных веществ РАН

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

## ЗАЩИТА КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ SK-N-MC ПРИРОДНЫМИ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫМИ ЛАКТОНАМИ ОТ ПОВРЕЖДЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ГЛУТАМАТОМ И ПЕРОКСИДОМ

Е.С. Дубровская<sup>1\*</sup>, А.В. Семаков<sup>1</sup>, С.В. Афанасьева<sup>1</sup>, М.Е. Неганова<sup>1</sup>, В.И. Козловский<sup>2</sup>, С.Г. Клочков<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, 142432, Черноголовка Московской обл., Северный проезд, 1; \*эл. почта: dubrovskaya@iras.ac.ru<sup>2</sup>Филиал Института энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе Российской академии наук, 142432, г. Черноголовка, проспект акад. Семенова, 1, корп. 10

Исследовано действие природных сесквитерпеновых лактонов растений рода *Inula* на клетки нейробластомы SK-N-MC в условиях токсического стресса, индуцированного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и глутаматом. Показана способность лактонов повышать выживаемость клеток в этих условиях и выявлены соединения лидеры в этом ряду. Предложен механизм защитного действия лактонов на клетки при индукции токсического стресса.

**Ключевые слова:** сесквитерпеновые лактоны; нейробластома; пероксид; глутамат; ресазурин

**DOI:** 10.18097/BMCRM00051

## ВВЕДЕНИЕ

Различные по происхождению нейродегенеративные заболевания имеют общие механизмы поражения клеток. Установлено, что дисбаланс, ведущий к накоплению активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид-аниона, пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и гидроксил-радикала, ведёт к окислительному стрессу, который вовлекается в развитие болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона [1]. Показано, что накопление глутамата в клетке также индуцирует окислительный стресс, в частности, через поражение митохондрий в результате избыточного накопления Ca<sup>2+</sup> [2]. Исходя из этого, следует, что антиоксидантная терапия играет важную роль при лечении нейродегенеративных заболеваний [3].

Сесквитерпеновые лактоны – обширная группа вторичных метаболитов растений, обладающих широким спектром биологической активности: противовоспалительной, цитотоксической, кардиотонической, анальгезирующей, спазмолитической, гипогликемической, гипотензивной, антибактериальной, противогрибковой [4]. Они являются потенциальными лекарственными средствами для лечения нейродегенеративных заболеваний [5]. Многие лактоны обладают антиоксидантными свойствами и могут рассматриваться как экзогенные антиоксиданты [6]. Ранее было показано, что некоторые аминопроизводные сесквитерпеновых лактонов обладают антиоксидантными свойствами [7].

В данной работе исследовано защитное действие природных сесквитерпеновых лактонов, выделенных из растений семейства *Asteraceae*, на клетки нейробластомы человека SK-N-MC, подвергнутые окислительному стрессу, вызванному H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а также токсическому стрессу под действием высоких доз глутамата. Была исследована способность десяти природных лактонов восстанавливать жизнеспособность клеток нейробластомы при токсическом воздействии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и глутамата.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

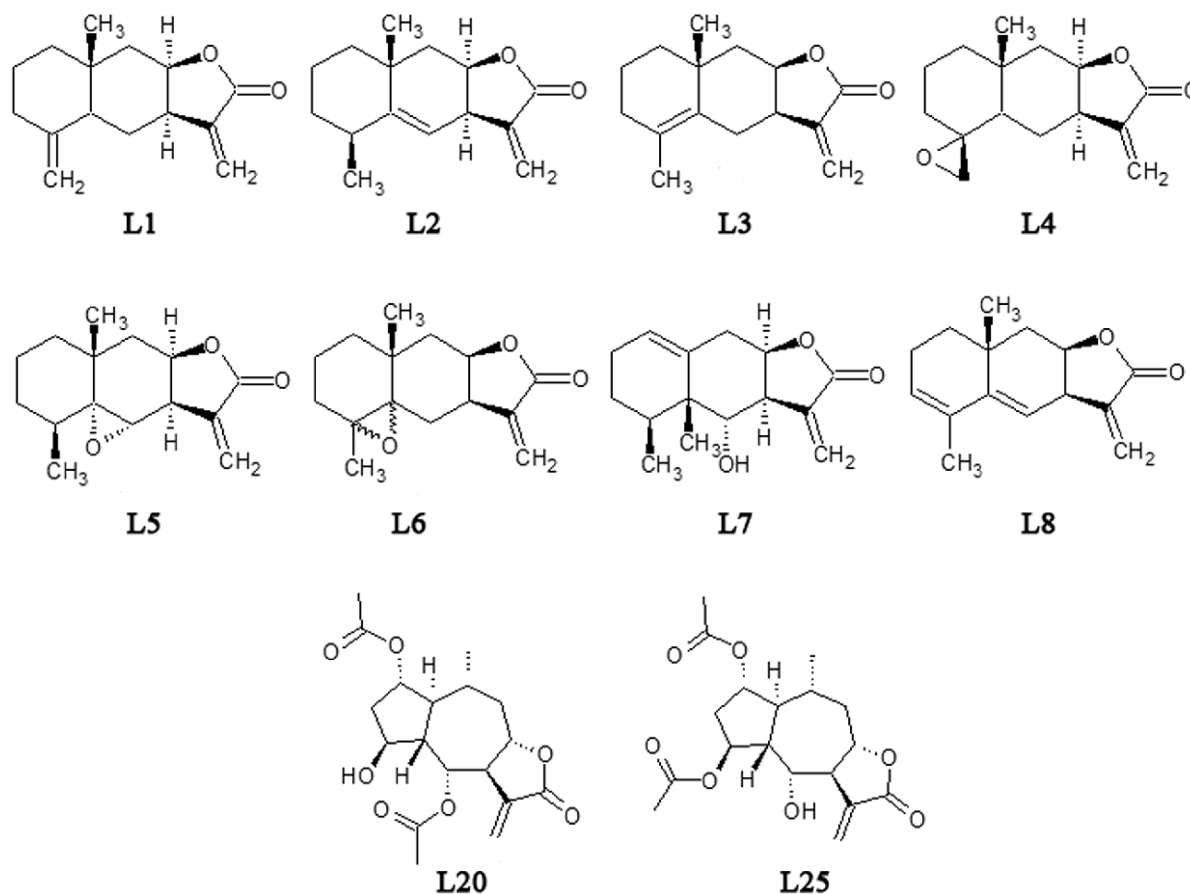
В качестве исследуемых соединений были выбраны природные сесквитерпеновые лактоны, вторичные метаболиты растений рода девясил (*Inula*), а также их модифицированные производные (рис. 1). Из наземной части девясила британского (*I. britannica*) были выделены лактоны с гваяновым скелетом – иннучинолид С (L20) и британин (L25) [8]. Эвдесманолиды – изоалантолактон (L01) и его изомер по положению двойной связи алантолактон (L02) выделены как основные компоненты корней девясила высокого (*I. helenium*). Лактоны L03–L08 синтезированы путём химических трансформаций алантолактонов L01, L02 под действием кислот [9], в то же время в минорных количествах они выделены из растений рода *Inula*.

## Культура клеток

Клетки нейробластомы человека SK-N-MC (ATCC® HTB-10™), культивировали в среде DMEM/F12 (“Gibco”, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Gibco”) и 1% смеси пеницилина/стрептомицина (НПП “ПанЭко”, Россия) при 37°C в атмосфере CO<sub>2</sub> (5%). Культура клеток получена из Института цитологии РАН.

Клетки рассеивали в 96-луночный планшет (CELLTREAT™) в количестве 5·10<sup>4</sup>/100 мкл. Через 24 ч к клеткам добавляли различные концентрации тестируемых соединений. Для индукции токсического стресса через сутки после обработки веществами в среду вводили глутамат в концентрации 25 мМ или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в концентрации 60 мкМ и культивировали клетки ещё 24 ч. Для каждой концентрации веществ эксперименты были выполнены в трёх повторностях, и проведено не менее трёх независимых экспериментов. Все вещества растворяли в ДМСО (“PANREAC QUIMICA S.L.U.”, Испания). Конечная концентрация ДМСО в лунке составляла 0.3% и была нетоксична для клеток. В контрольные лунки добавляли 0.3% ДМСО.





**Рисунок 1.** Структуры сесквитерпеновых лактонов.

#### Определение жизнеспособности клеток

Выживаемость клеток определяли по тесту Alamar Blue с редокс активным флуоресцентным индикатором резазурином (7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он-10-оксида натриевая соль, “Sigma-Aldrich”, США) (в конечной концентрации 50 мкМ), восстановление которого оксидоредуктазами до резорурфина считается показателем жизнеспособности клеток [10]. Планшеты инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Флуоресценцию восстановленного красителя определяли с помощью планшетного ридера Victor<sup>3</sup> (“PerkinElmer”, США, возбуждение при 530 нм, эмиссия при 590 нм).

За 100% выживаемости принимали значения флуоресценции резорурфина для интактных клеток в присутствии только растворителя. Выживаемость клеток при действии соединений выражали в процентах относительно контроля (контрольный образец содержал только растворитель).

Значение концентрации, вызывающее 50%-ное ингибирование роста популяции клеток ( $IC_{50}$ ), было определено на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения GraphPad Prizm 7.

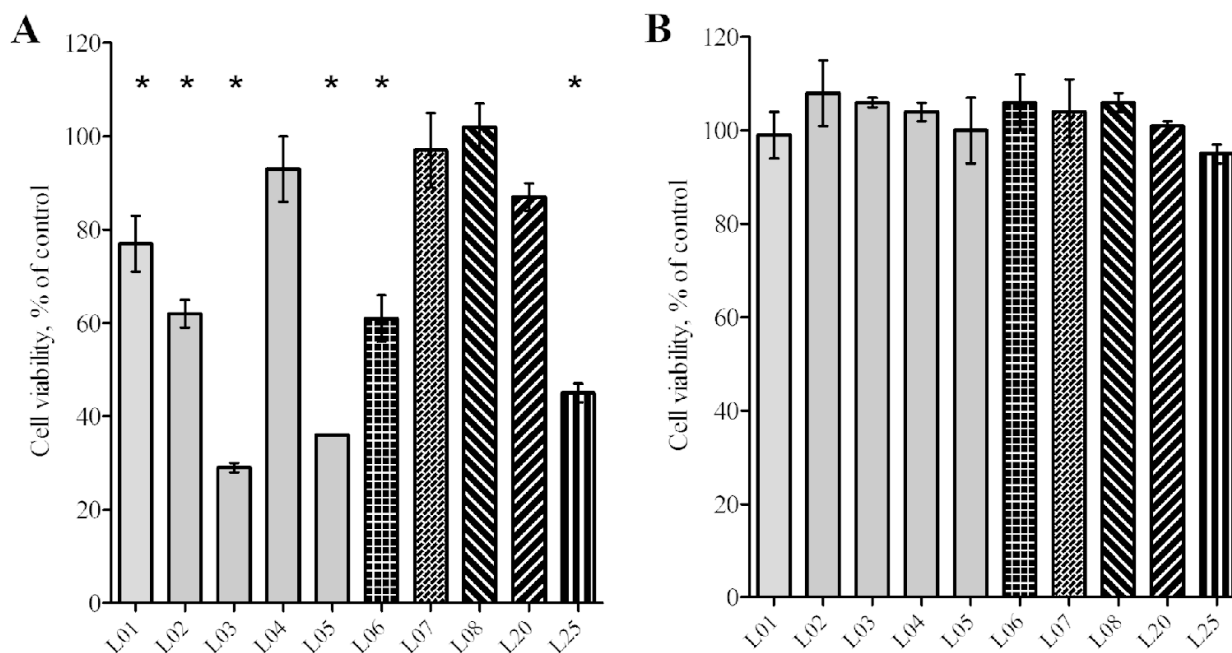
#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения концентрации токсических агентов, при действии которых 50% клеток будут

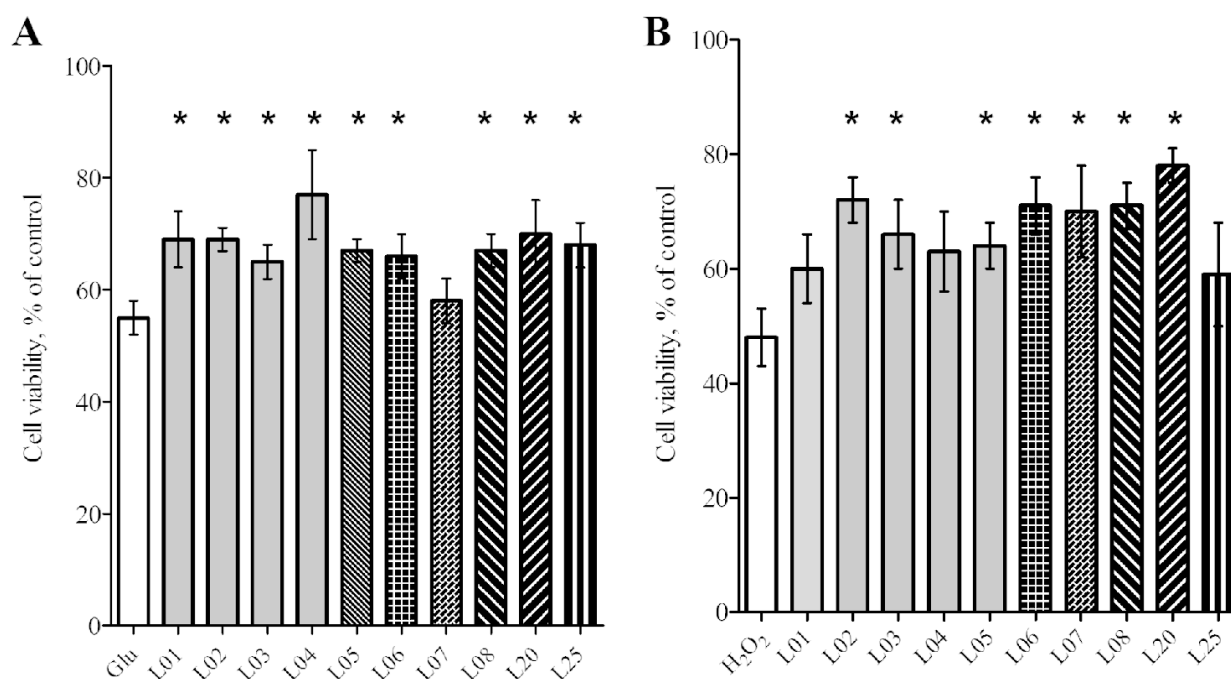
жизнеспособны, клетки SK-N-MC были обработаны  $H_2O_2$  в диапазоне концентраций (300 мкМ ÷ 6.25 мкМ) или глутаматом (160 мМ ÷ 2.5 мМ) с последующей инкубацией в течение 24 ч при 37°C в атмосфере  $CO_2$  (5%). Концентрация  $H_2O_2$ , которая приводит к 50% гибели клеток, составила 56.6 мкМ, а концентрация глутамата – 19.09 мМ. В соответствии с этим, для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация  $H_2O_2$  – 60 мкМ, глутамата – 25 мМ.

Для определения нетоксической концентрации исследуемых сесквитерпеновых лактонов клетки SK-N-MC были обработаны лактонами в диапазоне концентраций 10 мкМ ÷ 100 нМ при инкубации 48 ч при 37°C в атмосфере  $CO_2$  (5%). Жизнеспособность клеток определяли по тесту с резазурином. Концентрация лактонов 1 мкМ была выбрана для дальнейших исследований, так как при этой концентрации выживаемость клеток составляла практически 100% (рис. 2б). При обработке лактонами L03, L05 и L25 в концентрации 10 мкМ выживаемость клеток SK-N-MC значительно снижалась (рис. 2а)

Предобработка клеток лактонами в концентрации 1 мкМ в течение 24 ч с последующей обработкой в течение 24 ч либо  $H_2O_2$  (60 мкМ), либо глутаматом (25 мМ) повышала выживаемость клеток SK-N-MC (рис. 3а,б). На рисунке 3 видно, что все исследованные лактоны в концентрации 1 мкМ повышают выживаемость клеток SK-N-MC при токсическом действии как  $H_2O_2$  (рис. 3б), так и глутамата (рис. 3а).



**Рисунок 2.** Действие лактонов в концентрациях 10 мкМ (а) и 1 мкМ (б) на выживаемость клеток SK-N-MC. Данные выражены в % от контроля как среднее  $\pm$  SD (n=3). В контроле содержится только 0.3% ДМСО.



**Рисунок 3.** Защитное действие лактонов в концентрации 1 мкМ в отношении токсического действия 25 мМ глутамата (а) и 60 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (б) на клетки нейробластомы человека SK-N-MC. (а) Клетки инкубировали с лактонами в течение 24 ч и затем добавляли 25 мМ глутамата еще на 24 ч. (б) Клетки инкубировали с лактонами в течение 24 ч с последующим добавлением 60 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ещё на 24 ч. Данные выражены в % от контроля (контроль 0.3% ДМСО) как среднее  $\pm$  SD (n=3).

При токсическом действии 60 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (выживаемость клеток 48 $\pm$ 5%) наибольшее защитное действие показано для лактонов L20 (78 $\pm$ 3%) и L02 (72 $\pm$ 4) (рис. 3б). Наименьший эффект проявляют лактоны L01 (60 $\pm$ 6%) и L25 (59 $\pm$ 9%) (рис. 3б). При токсическом действии 25 мМ глутамата (выживаемость клеток 55 $\pm$ 3%) наибольшее защитное

действие в концентрации 1 мкМ показано для лактона L04 (77 $\pm$ 8%), немного меньше для лактонов L01 (69 $\pm$ 5%), L02 (69 $\pm$ 2%) и L20 (70 $\pm$ 6%) (рис. 3а). Наименьший эффект проявляет лактон L07 (58 $\pm$ 4%).

Как следует из приведенных выше данных, исследованные сесквитерпеновые лактоны обладают защитным действием в отношении окислительного

повреждения клеток нейробластомы SK-N-MC, вызванного токсическим действием глутамата и пероксида водорода. Хотя сами сесквитерпеновые лактоны не обладают антиоксидантными свойствами, а в ряде случаев проявляют прооксидантные свойства [7], они способны активировать ферменты антиоксидантной защиты, такие как глутатион пероксидаза, супероксид дисмутаза, NQO1 и гамма-глутамилцистеин лигаза [11]. Все исследованные нами лактоны содержат активированную экзометиленовую группу в лактонном цикле, что обеспечивает возможность их связывания с тиольными группами цистеиновых остатков. Сигнальный путь Nrf2–Keap1 играет одну из основных ролей в цитопротекции при АФК-опосредованных нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хаттингтона [12, 13]. Предполагается, что и механизм антиоксидантной защиты сесквитерпеновых лактонов реализуется через активацию сигнального пути Nrf2–Keap1 путём связывания электрофильной  $\alpha$ -метильной группы  $\gamma$ -лактона с богатой цистеиновыми остатками молекулой белка Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) [11, 14]. Активация сигнального пути Nrf2–Keap1 приводит к гиперэкспрессии антиоксидантных ферментов и, соответственно, к цитопротекции, что мы и наблюдали для исследованного ряда природных сесквитерпеновых лактонов. Причём, стерически и конформационно затруднённые лактоны (например, L07 для глутаматной токсичности или L25 для оксидантного стресса вызванного гидропероксидом) показывают несколько меньшую цитопротекторную активность. Полученные данные подтверждают обсуждаемую в литературе возможность использования природных сесквитерпеновых лактонов в качестве потенциальных нейропротекторных соединений.

## ВЫВОДЫ

Предварительная обработка клеток сесквитерпеновыми лактонами в концентрации 1 мкМ в течение 24 ч способна защищать клетки SK-N-MC от токсического стресса, вызванного воздействием 25 мМ глутамата и против оксидантного стресса под действием 60 мкМ  $H_2O_2$ .

## БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования ИФАВ РАН. Работа выполнена в рамках Госзадания 0090-2017-0018.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Coyle, J.T. & Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993, 262, 689-695. DOI: 10.1126/science.7901908

2. Cacabelos, R., Takeda, M. & Winblad, B. (1999) The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 1999, 14, 3–47. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1166(199901)14:1%3C3::AID-GPS897%3E3.0.CO;2-7
3. Lai, T.W., Zhang, S. & Wang, Y.T. (2014) Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*. 2014, 115, 157-188. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.006
4. Zhao, Y.M., Zhang, M.L., Shi, Q.W. & Kiyota, H. (2006) Chemical constituents of plants from the genus *Inula*. *Chemistry & Biodiversity*. 2006, 3(4), 371-384. DOI: 10.1002/cbdv.200690041
5. Seo, J.Y., Lim, S.S., Kim, J., Lee, K.W. & Kim, J.S. (2017) Alantolactone and isoalantolactone prevent amyloid  $\beta_{25-35}$ -induced toxicity in mouse cortical neurons and scopolamine-induced cognitive impairment in mice. *Phytotherapy Research*. 2017, 31(5), 801-811. DOI: 10.1002/ptr.5804
6. Tambewagh, U.U., Kandhare, A.D., Honmore, V.S., Kadam, P.P., Khedkar, V.M., Bodhankar, S.L. & Rojatkari, S.R. (2017) Anti-inflammatory and antioxidant potential of Guaianolide isolated from *Cyathocline purpurea*: Role of COX-2 inhibition. *International Immunopharmacology*. 2017, 52, 110-118. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.09.001
7. Neganova, M.E., Afanas'eva, S.V., Klochkov, S.G. & Shevtsova, E.F. (2012) Mechanisms of antioxidant effect of natural sesquiterpene lactone and alkaloid derivatives. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012, 152(6), 720-722. DOI: 10.1007/s10517-012-1615-x
8. Klochkov, S.G., Pukhov, S.A., Afanas'eva, S.V., Anikina, L.V. & Ermatova, A.B. (2015) Amination products of *Inula britannica* lactones and their antitumor activity. *Chemistry of Natural Compounds*. 2015, 51(3), 435-443. DOI: 10.1007/s10600-015-1310-z
9. Klochkov, S.G., Afanas'eva, S.V. & Pushin, A.N. (2006) Acidic isomerization of alantolactone derivatives. *Chemistry of Natural Compounds*. 2006, 42(4), 400-406. DOI: 10.1007/s10600-006-0166-7
10. Rampersad, S.N. (2012) Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, 2012, 12(9), 12347-12360. DOI: 10.3390/s120912347
11. Seo, J.Y., Lim, S.S., Kim, J.R., Lim, J.S., Ha, Y.R., Lee, I.A., Kim, E.J., Park, J.H. & Kim, J.S. (2008) Nrf2-mediated induction of detoxifying enzymes by alantolactone present in *Inula helenium*. *Phytotherapy Research*. 2008, 22(11), 1500-1505. DOI: 10.1002/ptr.2521
12. Chaturvedi, R.K. & Flint Beal, M. (2013) Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013, 63, 1–29. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.018
13. Zhang, M.J., An, C.R., Gao, Y.Q., Leak, R.K., Chen, J. & Zhang, F. (2013) Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Progress in Neurobiology*. 2013, 100, P. 30–47. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2012.09.003
14. Surh, Y.J. & Na, H.-K. (2008) NF- $\kappa$ B and Nrf2 as prime molecular targets for chemoprevention and cytoprotection with anti-inflammatory and antioxidant phytochemicals. *Genes & Nutrition*. 2008, 2(4), 313-317. DOI: 10.1007/s12263-007-0063-0

Поступила: 27. 06. 2018.  
Принята к публикации: 18. 07. 2018.

## PROTECTIVE EFFECTS OF THE NATURAL SESQUITERPENE LACTONES AGAINST DAMAGE INDUCED BY GLUTAMATE AND PEROXIDE IN SK-N-MC CELLS

*E.S. Dubrovskaya<sup>1\*</sup>, A.V. Semakov<sup>1</sup>, S.V. Afanasyeva<sup>1</sup>, M.E. Neganova<sup>1</sup>, V.I. Kozlovski<sup>2</sup>, S.G. Klochkov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Physiologically Active Compounds Russian Academy of Sciences,

1 Severny proezd, Chernogolovka, Moscow region, 142432 Russia; \*e-mail: dubrovskaya@ipac.ac.ru

<sup>2</sup>Branch of Talrose Institute of Energetic Problems of Chemical Physics Russian Academy of Sciences,  
1-10 Acad. Semenov av., Chernogolovka, Moscow region, 142432 Russia

An the present study we evaluated the effect of natural sesquiterpene lactones of plants of the genus *Inula* on the cells of neuroblastoma SK-N-MC under conditions of toxic stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glutamate. Lactones increased cell survival under these conditions and the leader compounds were identified in this series. A putative mechanism for the protective action of lactones on cells under condition toxic stress has been proposed.

**Key words:** sesquiterpene lactones; neuroblastoma; peroxide; glutamate; resazurin

### ACKNOWLEDGMENTS

The equipment of the Center for Collective Use of the Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences was used. The work was carried out within the framework of the State Proposal 0090-2017-0018.