

DOI: 10.30906/0869-2092-2023-86-11-8-13

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ КОНЪЮГАТОВ ЭДАРАВОНА НА КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

М. А. Лапшина*, Е. С. Дубровская, И. М. Веселов, А. В. Мальцев,
А. Ю. Аксиненко, С. О. Бачурин¹

Изучена нейропротекторная эффективность новых конъюгатов эдаравона на клеточных моделях нейродегенерации *in vitro* и *ex vivo*. Работу проводили на клетках нейробластомы человека SHSY5Y и нейронах, полученных из гиппокампа мышей линий CD1 и 3xFAD. Установлено, что соединение ТГ-2307х вызывает концентрационно зависимую деполяризацию митохондрий в клетках SHSY5Y. В исследовании впервые показан нейропротекторный эффект ТГ-2308х на клетках SHSY5Y в присутствии глутамата в высокой концентрации (30 мМ). Исследуемые соединения увеличивают выживаемость нейронов гиппокампа линии CD1 после действия эдаравона ($p < 0,05$) в концентрации 10 мкМ при низких концентрациях глутамата (200 мкМ). Получено достоверно значимое увеличение жизнеспособности нейронов ($p < 0,05$) после применения ТГ-2308х в концентрации 5 мкМ (линия CD1, глутамат 200 мкМ). Для нейронов линии 3xFAD (глутамат 400 мкМ) достоверно значимое увеличение жизнеспособности нейронов ($p < 0,05$) показано после воздействия как ТГ-2308х, так и ТГ-2307х в концентрации 5 мкМ. Установлено, что соединение ТГ-2308х в концентрации 5 мкМ достоверно повышает жизнеспособность нейронов на 30 % ($p < 0,05$) в условиях окислительного стресса, вызванного воздействием перекиси водорода (10 мкМ) на клетки, что лучше, чем соответствующие показатели для эдаравона, который в концентрации 10 мкМ повышает выживаемость нейронов на 20 % ($p < 0,05$).

Ключевые слова: эдаравон; мемантин; амантадин; нейробластома; первичная культура; глутамат; перекись водорода; митохондриальный потенциал.

ВВЕДЕНИЕ

В основе нейродегенеративных заболеваний (НДЗ) лежит механизм образования патологических белковых агрегатов в нейронах различных типов, вызывающий их гибель. НДЗ широко классифицируются по их клиническим проявлениям, при этом наиболее распространенными являются экстрапирамидные и пирамидные двигательные расстройства, а также когнитивные или поведенческие нарушения [5]. Важным фактором развития таких заболеваний, как боковой амиотрофический склероз (БАС) и болезнь Альцгеймера (БА), наряду с процессами патологической агрегации определенных белков, является нарушение функций нейромедиаторных систем, в частности, развитие эксайтотоксических процессов, опосредуемых нейромедиатором глутаматом [4, 9], а также процессы окислительного стресса [3].

Одним из активно разрабатываемых подходов к созданию эффективных лекарственных средств (ЛС), применяемых при сложных мультифакторных заболеваниях, к которым относятся БА и БАС, является поиск мультитаргетных фармакологических веществ (ФВ), действующих одновременно на несколько ми-

шеней, участвующих в патогенезе НДЗ. Ранее нами были разработаны подходы к синтезу соединений, сочетающих в одной молекуле ключевые структурные фрагменты различных активных ФВ [2]. В частности, был синтезирован ряд новых конъюгатов на основе эдаравона и мемантина [1].

Эдаравон (метилфенилпиразолон) является антиоксидантом, снижающим уровень свободных радикалов в клетках. Ранее было показано, что он способен замедлять прогрессирование проявлений и дегенерацию двигательных нейронов у мышей с мутантной моделью БАС [6]. В настоящее время это ЛС применяется для симптоматического лечения пациентов с БАС. Мемантин (1-амино-3,5-диметиламиноадамantan) — низкоаффинный блокатор NMDA-рецепторов — является одним из наиболее активно применяемых при БА ЛС, а также рассматривается в качестве возможного ЛС при БАС [7].

В настоящей работе проведено изучение влияния нескольких оригинальных конъюгатов эдаравона и мемантина на состояние клеток человека и животных в условиях стресса, вызванного глутаматом (эксайтотоксичность) и перекисью водорода.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на клетках нейробластомы человека SH-SY5Y (ATCC, CRL2266). Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 (Gibco, США) с

¹ Институт физиологически активных веществ ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН, Россия, 142432, Московская обл., г. Черноголовка, Северный проезд, 1.

* e-mail: lapshina.masha@yandex.ru

добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллина (50 Ед/мл) и стрептомицина (50 мг/мл) при 37 °С и 5 % CO₂.

Клетки SH-SY5Y рассеивали в 96-луночные планшеты в концентрации 1,5 · 10⁶/мл. Через 24 ч к клеткам добавляли исследуемые ФВ. Для индукции токсического стресса через 24 ч инкубации с соединениями в среду вносили глутамат (35 мМ) или перекись водорода (120 мкМ). Для каждой концентрации ФВ эксперименты были выполнены в 3 повторениях и проведено не менее 3 независимых экспериментов. Все соединения растворяли в ДМСО. Конечная концентрация ДМСО не превышала 0,3 %. В контрольные лунки добавляли 0,3 % растворителя. Еще через 24 ч определяли выживаемость клеток по тесту с МТТ — (4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ, ПанЭко, Россия) в концентрации 0,5 мг/мл. Окрашивание клеток проводили при 37 °С и 5 % CO₂ в течение 2 ч. Далее инкубационную среду отбирали и кристаллы образованного формазана растворяли в 100 % ДМСО (диметилсульфоксид А3672,0100, AppliChem, Германия). Интенсивность окраски определяли при длине волны 536 нм с помощью планшетного ридера Cytation 3 (BioTek, США). За 100 % принимали интенсивность окраски контрольных клеток, обработанных только растворителем.

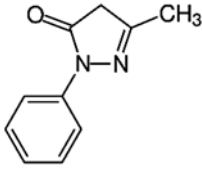
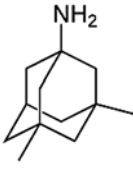
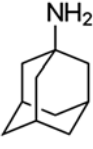
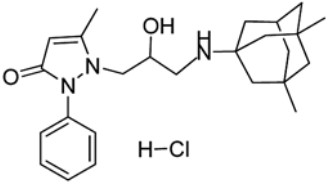
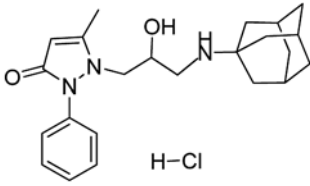
Нейрональные клетки первичной культуры извлекали из гиппокампа 3-дневных мышей линии CD1 (дикий тип) и линии 3xFAD (модель болезни Альцгеймера). Ткань выделяли в охлажденном сбалансированном солевом растворе без Ca²⁺ и Mg²⁺ HBSS (H6648, Sigma, США) с 10 мМ буфера HEPES, pH 7,3 (Gibco, США). Инкубировали 20 мин в буфере HBSS с 0,1 % трипсина при 37 °С, далее центрифугировали и промывали дважды в буфере HBSS. Затем растирали в нейробазальной среде А (NBA, Gibco, 10888-022, США), содержащей 10 % фетальной сыворотки телят, пенициллин (5000 ед/мл) и стрептомицин (5 мг/мл). После центрифугирования осадок ресуспендировали в нейробазальной среде. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты, предварительно покрытые поли-L-лизином (Sigma, P4832, США), при плотности 45 × 10³ кл/лунку. Через 24 ч заменяли питательную среду на свежую без сыворотки с добавками для поддержания жизнедеятельности нейронов B-27 или N2. Культуру поддерживали в термостате при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

Нейроны использовали для экспериментов на 7 день (глутаматный стресс) и на 11 день (стресс в присутствии перекиси водорода) культивирования. Для этого тестируемые ФВ, растворенные в нейробазальной среде без добавок, добавляли к первичной культуре клеток. Через 24 ч инкубации отбирали питательную среду с соединениями, и клетки гиппокампа обрабатывали глутаматом в концентрации 200 или 400 мкМ в буфере HBSS в течение 60 мин при 37 °С. Затем отбирали инкубационную среду с глутаматом и

добавляли растворенные в среде тестируемые ФВ. Контроль содержал то же количество ДМСО, что и обработанные клетки. Защитный ответ клеток оценивали через 24 ч после добавления глутамата по жизнеспособности нейронов с помощью стандартного МТТ-теста (описание выше). В экспериментах с перекисью водорода к клеткам добавляли сначала тестируемые соединения на 24 ч, затем вводили перекись в концентрации 10 мкМ. Через 24 ч определяли выживаемость нейронов по тесту с МТТ.

Влияние исследуемых ФВ на митохондриальный потенциал оценивали также на клетках нейробластомы человека SH-SY5Y, посаженных на 96-луночный планшет (1 × 10⁴ клеток/лунку). После удаления среды культивирования, клетки дважды отмывали буфером (PBS с добавлением 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ L-глутамина, 10 мМ глюкозы и 0,2 % БСА) и добавля-

Параметры цитотоксичности тестируемых ФВ в отношении клеток нейробластомы человека SHSY5Y и нейронов гиппокампа мышей линии CD1

Соединения	SH-SY5Y	CD1
	IC ₅₀ , мкМ, 24 ч	
 <p>Эдаравон</p>	>100	>100
 <p>Мемантин</p>	>100	>100
 <p>Адамантан</p>	>100	>100
 <p>H-Cl TG-2307x</p>	11 ± 2,5	17 ± 2,1
 <p>H-Cl TG-2308x</p>	48,5 ± 6,7	46 ± 0,6

^a данные представлены как M ± SD.

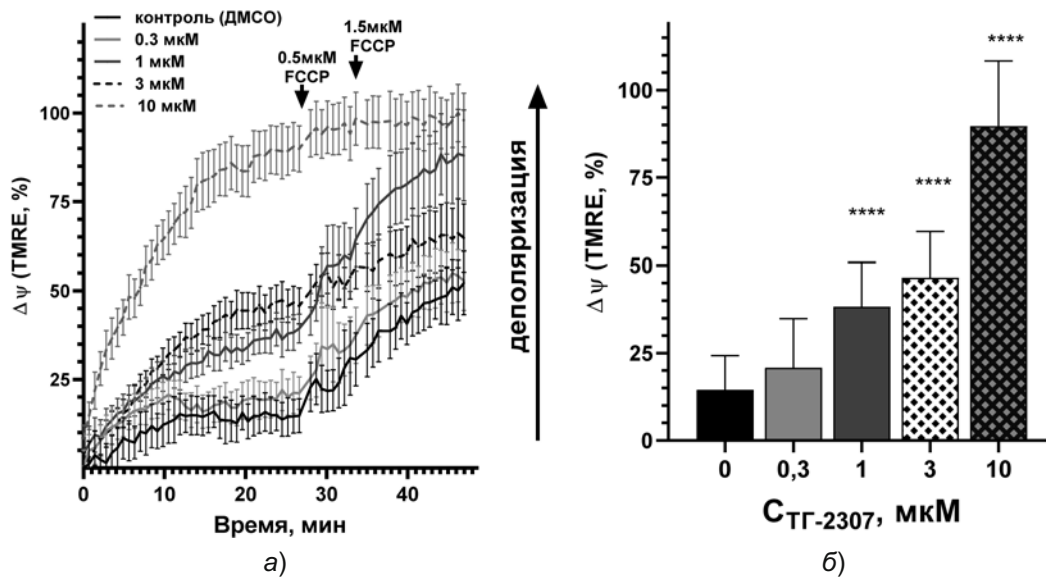


Рис. 1. Влияние нового конъюгата эдаровона и мемантина ТГ-2307х на митохондриальный потенциал в клетках нейробластомы человека SHSY5Y: *a* — влияние ТГ-2307х на динамику изменения митохондриального потенциала ($\Delta\psi$); *б* — концентрационно-зависимая деполяризация митохондрий через 25 мин после начала эксперимента. **** $p < 0,0001$; однофакторный дисперсионный анализ ANOVA (множественные сравнения по критерию Даннета).

ли по 200 μ кл буфера в лунку. Затем добавляли 15 μ кМ олигомицина. Непосредственно для измерения потенциала в лунку вносили потенциалзависимый катионный краситель TMRE (этиловый эфир тетраметил родамина/tetramethylrhodamine ethyl ester) в концентрации 200 нМ и инкубировали 20 мин при 37 °С. После инкубации клетки дважды отмывали и добавляли 200 μ кл буфера. Затем в плашку были добавлены ФВ, либо растворитель (контрольная группа), после чего проводили измерение флуоресценции на планшетном ридере EnVision (Perkin Elmer) на длинах волн возбуждения и эмиссии 549/575 нм. Для достижения полного разобщения добавляли FCCP (карбонилцианид-*n*-трифторметоксифенилгидразон/carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone) в концентрации 0,5 и 1,5 μ кМ. Полученные результаты нормализовали по начальной точке контрольной группы и максимальному значению флуоресценции после второго добавления FCCP.

Статистический анализ и нормализацию данных, построение графиков и диаграмм, а также расчет значений IC_{50} были выполнены с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы для оценки биологической активности в отношении разных клеточных систем как модельных, так и новых соединений — потенциальных ЛС были оценены параметры цитотоксичности в отношении клеток нейробластомы человека SH-SY5Y и нейронов гиппокампа мышей линии CD1.

Значения IC_{50} для исследуемых соединений приведены в таблице.

В ходе исследования было установлено, что модельные ФВ: мемантин, адамантан и эдаровон не обладают выраженной токсичностью в отношении клеток SH-SY5Y. Для соединений нового ряда — конъюгатов эдаровона — была рассчитана величина IC_{50} . Стоит отметить, что для соединения ТГ-2307х она составила $11 \pm 2,5$ μ кМ, для ТГ-2308х — $48,5 \pm 6,7$ μ кМ. Сходные результаты по токсичности тестируемых ФВ были получены и на нейронах линии CD1. Величина IC_{50} для новых ФВ была близка к значениям, полученным на клетках нейробластомы, и составила для ТГ-2307х $17 \pm 2,1$ μ кМ, для ТГ-2308х — $46 \pm 0,6$ μ кМ.

Изучено влияние вновь синтезированных ФВ на мембранный потенциал в клетках нейробластомы человека SHSY5Y (рис. 1). Установлено, что в отличие от соединения ТГ-2308х, которое не влияет на митохондриальный потенциал при аппликации на изолированные митохондрии печени крыс, соединение ТГ-2307х вызывает концентрационно-зависимую деполяризацию изолированных митохондрий печени крыс. Подобный эффект концентрационно-зависимой деполяризации митохондрий соединением ТГ-2307х был нами также показан и при измерении митохондриального потенциала в нейрональных клетках нейробластомы SH-SY5Y с помощью потенциал-зависимого красителя TMRE (рис. 1). Нужно отметить, что достоверные отличия от контроля выявлены для этого ФВ уже в концентрации при 1 μ кМ, а в концентрации 3 μ кМ ТГ-2307х не позволяет проявиться разобщающему эффекту FCCP. Эти данные позволяют предположить, что ТГ-2307х проникает в клетку и его токси-

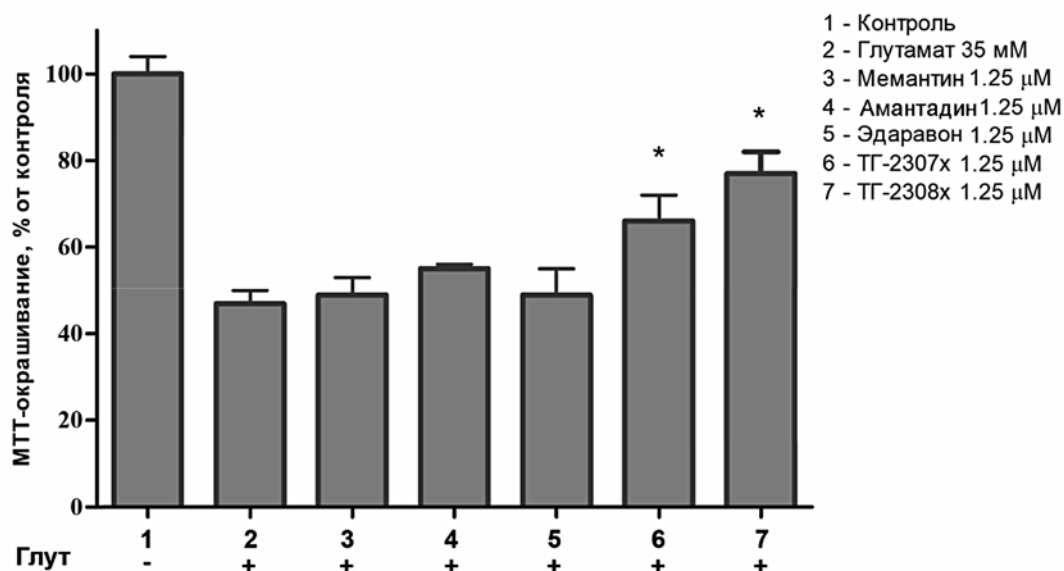


Рис. 2. Влияние модельных ФВ и новых конъюгатов эдаравона на глутаматную токсичность (глутамат 35 мМ) в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y. * $p < 0,05$ — относительно проб глутаматного контроля, тест Манна–Уитни.

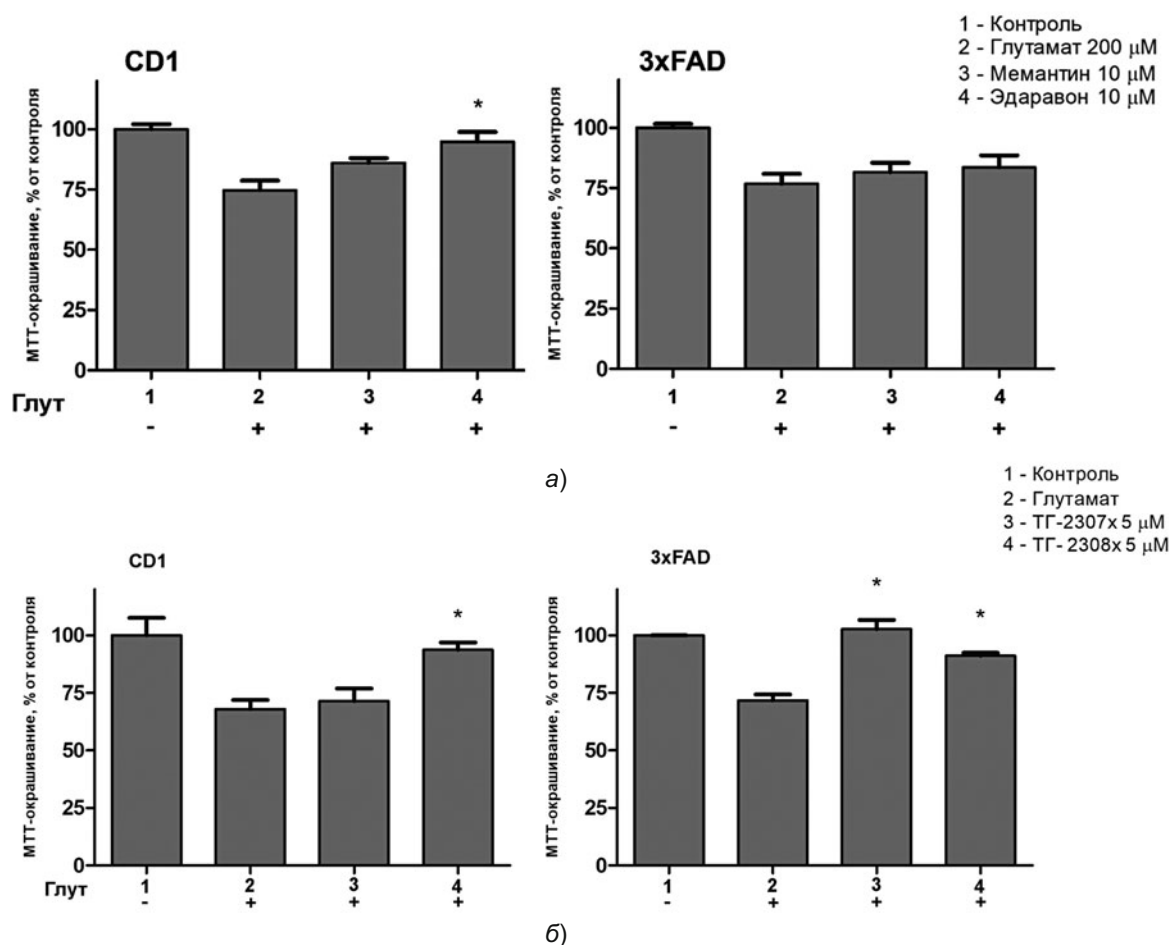


Рис. 3. Влияние модельных соединений и новых конъюгатов эдаравона на глутаматную токсичность в первичной культуре клеток гиппокампа мыши: а — глутаматная цитотоксичность (глутамат 200 мкМ) мемантина и эдаравона в гиппокампаальных нейронах линии животных CD1 и линии 3xFAD; б — глутаматная цитотоксичность новых конъюгатов эдаравона в гиппокампаальных нейронах линии животных CD1 (глутамат 200 мкМ) и линии 3xFAD (глутамат 400 мкМ). * $p < 0,05$ — относительно проб глутаматного контроля, тест Манна–Уитни.

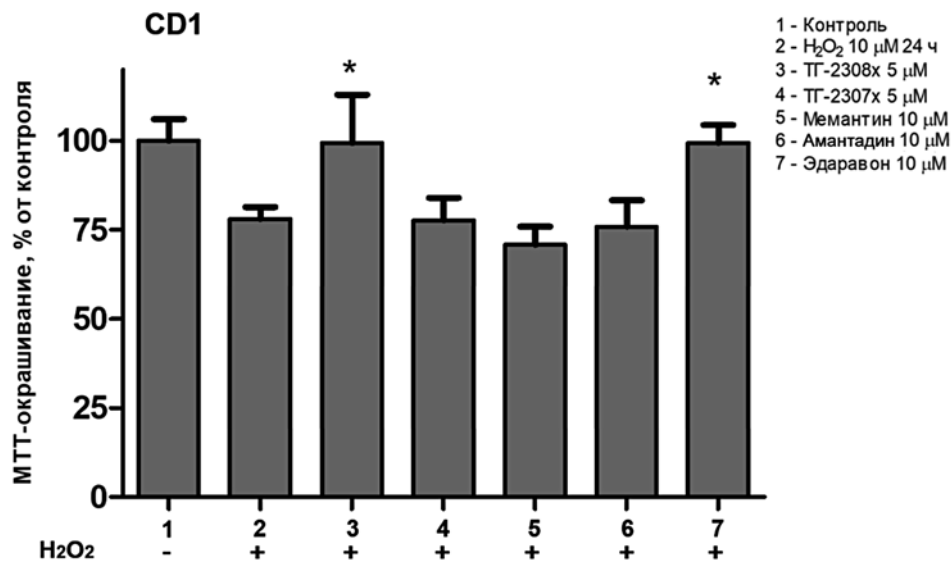


Рис. 4. Влияние модельных ФВ и новых конъюгатов эдаравона на токсичность, вызванную перекисью водорода в первичной культуре нервных клеток гиппокампа мыши линии CD1. * – $p < 0,05$ относительно проб контроля перекиси водорода, тест Манна–Уитни

ческий эффект в концентрации 10 мкМ выше и хотя бы отчасти может быть связан с влиянием на митохондрии.

Проведено также исследование токсичности глутамата и протективной способности тестируемых ФВ на клетках SH-SY5Y (рис. 2). Было установлено, что глутамат (35 мМ) вызывает гибель 50 % клеток. Модельные ФВ в условиях глутаматного стресса в нетоксичных концентрациях практически не увеличивали жизнеспособность нейронов. Однако способностью защищать клетки при действии глутамата обладали новые конъюгаты эдаравона. Показано достоверное увеличение жизнеспособности нейронов при применении новых ФВ: ТГ-2307x и ТГ-2308x ($p < 0,05$) в концентрации 1,25 мкМ.

Учитывая выраженную антиоксидантную активность вновь синтезированных производных эдаравона, можно предполагать, что именно она обуславливает защиту от нейротоксического действия глутамата, высокие концентрации которого в клетках приводят к образованию большого количества свободных активных радикалов кислорода [8]. Для новых ФВ этот эффект установлен впервые, а для соединения ТГ-2308x характерна наибольшая активность, причем ТГ-2308x повышает выживаемость клеток на 30 %.

Было проведено исследование протекторных свойств изучаемых ФВ на модели нейротоксического действия глутамата в первичной культуре нейронов гиппокампа двух линий животных (рис. 3). Оценивали жизнеспособность клеток с предобработкой ФВ (24 ч) при кратковременном глутаматном стрессе в течение 60 мин в низких концентрациях — 200 мкМ для CD1-нейронов и 400 мкМ — для 3xFAD-нейронов. Показано, что для нейронов линии CD1 достоверно значимо увеличение жизнеспособности нейронов на

30 % ($p < 0,05$) после воздействия эдаравона в концентрации 10 мкМ (рис. 3, а). При оценке новых ФВ, конъюгатов эдаравона, достоверно значимое увеличение жизнеспособности показано на нейронах CD1 для соединения ТГ-2308x в концентрации 5 мкМ, что составляет увеличение на 38 % роста нейронов на фоне введения глутамата. Для нейронов линии 3xFAD увеличение жизнеспособности клеток наблюдалось при применении соединений ТГ-2307x и ТГ-2308x в концентрации 5 мкМ ($p < 0,05$) на 44 и 28 % соответственно.

С целью оценки антиоксидантного потенциала изучаемых ФВ было исследовано защитное влияние соединений в условиях развития окислительного стресса при действии перекиси водорода на первичную культуру нейронов гиппокампа мышей дикого типа CD1 (рис. 4) [10]. Первичные нейроны гиппокампа мышей обрабатывали исследуемыми ФВ в нетоксичных концентрациях в течение 24 ч, затем вводили перекись водорода (10 мкМ) и культивировали еще 24 ч. Было показано, что в данной концентрации перекись водорода снижает жизнеспособность нейронов на 20 %. Соединение ТГ-2308x в концентрации 5 мкМ достоверно повышает жизнеспособность нейронов на 30 %. Сходным образом проявляет свое действие эдаравон в концентрации 10 мкМ, повышая достоверно выживаемость нейронов на 20 %.

ВЫВОДЫ

1. У нового соединения ТГ-2308x на клетках нейробластомы человека SH-SY5Y выявлен защитный эффект в отношении токсического влияния глутамата (30 мМ).

2. Показано увеличение жизнеспособности нейронов гиппокампа мышей линии CD1 после применения

эдаравона ($p < 0,05$) в концентрации 10 мкМ на 30 % на фоне введения глутамата (200 мкМ).

3. У новых соединений обнаружена способность достоверно увеличивать жизнеспособность нейронов: ТГ-2308х в концентрации 5 мкМ (линия CD1, глутамат 200 мкМ). Для нейронов линии 3xFAD (глутамат 400 мкМ) достоверно значимое увеличение жизнеспособности нейронов показано как для ТГ-2308х, так и для ТГ-2307х в концентрации 5 мкМ.

4. Соединение ТГ-2308х (5 мкМ) достоверно повышает жизнеспособность нейронов на 30 % ($p < 0,05$) в условиях окислительного стресса, вызванного перекисью водорода (10 мкМ), а соответствующие показатели для эдаравона (10 мкМ) составляют 20 % ($p < 0,05$).

Грантовая поддержка

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (грант 19-13-00378-П).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Ю. Аксиненко, Т. В. Горева, Т. А. Епишина, С. О. Бачурин, *Изв. Акад. наук. Серия хим.*, **71**, 1794 – 1800 (2022); doi: 10.1007 / s11172-022-3591-2

2. С. О. Бачурин, А. Ю. Аксиненко, Г. Ф. Махаева, Е. Ф. Шевцова, *Изв. Акад. наук. Серия хим.*, **72**, 130 – 147 (2023); doi: 10.1007 / s11172-022-3591-2
3. W. A. Banks, *Curr. Pharm. Des.*, **26**(1), 1 – 5 (2020); doi: 10.2174 / 138161282601200225102049
4. H. Blasco, S. Mavel, P. Corcia, P. H. Gordon, *Curr. Med. Chem.*, **21**(31), 3551 – 3575 (2014); doi: 10.2174 / 0929867321666140916120118
5. H. Chi, H. Y. Chang, T. K. Sang, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**(10), 3082 (2018); doi: 10.3390 / ijms19103082
6. H. Cho, S. Shukla, *Pharmaceuticals (Basel)*, **14**(1), 29 (2020); doi: 10.3390 / ph14010029
7. J. Jiang, Y. Wang, M. Deng, *Front. Pharmacol.*, **28**(13), 1054006 (2022); doi: 10.3389 / fphar.2022.1054006
8. V. Palanivel, V. Gupta, S. S. Mirshahvaladi, et al., *Cells*, **11**(22), 3665 (2022); doi: 10.3390 / cells11223665
9. R. Wang, P. H. Reddy, *J. Alzheimers Dis.*, **57**(4), 1041 – 1048 (2017); doi: 10.3233 / JAD-160763
10. T. Z. Xu, X. Y. Shen, L. L. Sun, et al., *Int. J. Mol. Med.*, **43**(2), 717 – 726 (2019); doi: 10.3892 / ijmm

Поступила 30.10.23

NEUROPROTECTIVE PROPERTIES OF NEW EDARAVONE CONJUGATES IN CELLULAR MODELS OF NEURODEGENERATION

M. A. Lapshina^{*}, E. S. Dubrovskaya, I. M. Veselov, A. V. Maltsev, A. Yu. Aksinenko, and S. O. Bachurin

Institute of Physiologically Active Substances, Chernogolovka, Moscow region, 142432 Russia

* e-mail: lapshina.masha@yandex.ru

The neuroprotective efficacy of new edaravone conjugates was studied in cell models of neurodegeneration *in vitro* and *ex vivo*. The study was carried out on human neuroblastoma cells SHSY5Y and neurons obtained from the hippocampi of CD1 and 3xFAD mice. It was revealed that compound TG-2307x causes a concentration-dependent depolarization of mitochondria in SHSY5Y cells. The study demonstrated for the first time the neuroprotective effect of the new compound TG-2308x on SHSY5Y cells when exposed to a high concentration of glutamate (30 mM). The studied compounds increase the survival of CD1 hippocampal neurons after the action of edaravone ($p < 0.05$) at a concentration of 10 μ M at low doses of glutamate (200 μ M). An honestly significant increase in the neuron viability ($p < 0.05$) was obtained after the exposure to TG-2308x at a concentration of 5 μ M (CD1 line, glutamate 200 μ M). For neurons of 3xFAD line (glutamate 400 μ M), an honestly significant increase in the neuron viability ($p < 0.05$) was observed after the exposure both to TG-2308x and TG-2307x at a concentration of 5 μ M. It was found that TG-2308x compound at a concentration of 5 μ M significantly increases the viability of neurons by 30% ($p < 0.05$) under conditions of oxidative stress caused by the action of 10 μ M hydrogen peroxide on cells, which is better than the corresponding indicators for edaravone, which increases the neuron survival by 20% ($p < 0.05$) at a concentration of 10 μ M

Keywords: edaravone; memantine; amantadine; neuroblastoma; primary culture; glutamate; hydrogen peroxide; mitochondrial potential.