

ДЕЙСТВИЕ КОРТЕКСИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ C-1300 В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭТАНОЛА

Епимахова Е.В.¹, Старостина М.В.², Панкова Т.М.², Иванова С.А.^{1,3}, Бохан Н.А.¹

¹Научно-исследовательский институт психического здоровья Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, e-mail: ElenaZhernova@sibmail.com;

²Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск;

³Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск

Хроническое употребление алкоголя приводит к изменениям в различных органах, тканях и клетках. Особенно чувствительны к воздействию этилового спирта нейроны. Кортексин (препарат полипептидной природы) обладает протекторными свойствами, воздействует на все этапы патологической цепи молекулярных событий, приводящих к гибели нервных клеток. Целью настоящей работы явилось изучение влияния кортексина на уровень белков апоптоза (антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического белка каспазы-3) в клетках нейробластомы мыши C-1300, культивированных с индуктором окислительного стресса (гидропероксидом третичного бутила) и под влиянием этанола. Показано, что инкубация с гидроперекисью третичного бутила или этанолом вызывала апоптоз клеток нейробластомы. Кортексин оказывал выраженный нейропротекторный эффект, защищая культуру нейробластомы от воздействия активных форм кислорода и этанола, что проявлялось в снижении концентрации каспазы-3 и достоверном увеличении уровня Bcl-2. Представленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что возможным механизмом реализации эффекта кортексина на показатели апоптоза является восстановление нарушенного баланса про- и антиапоптотических белков, и позволяют дать патогенетическое обоснование для применения нейропептидов в комплексных программах терапии алкогольной зависимости.

Ключевые слова: нейрометаболический протектор, кортексин, апоптоз, каспаза-3, Bcl-2, нейробластома, этанол, гидроперекись третичного бутила

NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF CORTEXIN ON OXIDATIVE STRESS- AND ETHANOL-INDUCED APOPTOSIS OF C-1300 NEUROBLASTOMA CELL LINE

Epimakhova E.V.¹, Starostina M.V.², Pankova T.M.², Ivanova S.A.^{1,3}, Bokhan N.A.¹

¹Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, e-mail: ElenaZhernova@sibmail.com;

²Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk;

³National Research Polytechnic University, Tomsk

Chronic alcohol consumption leads to changes in various organs, tissues and cells. Neurons are especially sensitive to the effects of alcohol. Cortexin (a drug of polypeptide nature) exerts the protective effect, affects all stages of the pathological chain of molecular events leading to the death of nerve cell. Objective of this work is to study the effect of cortexin at the level of apoptotic proteins (antiapoptotic proteins Bcl-2 and proapoptotic proteins caspase-3) on C-1300 neuroblastoma cells cultured with an oxidative stress inducer (tertiary butyl hydroperoxide) and under the influence of ethanol. It is shown that incubation with tert-butyl hydroperoxide or ethanol resulted in apoptosis of neuroblastoma cells. Cortexin exerts a pronounced neuroprotective effect, protecting neuroblastoma cells against the effects of reactive oxygen species and ethanol that exhibits manifested in the decrease in caspase-3 levels and the increase in Bcl-2 levels. The presented experimental data suggest that a possible mechanism for the realization of cortexin effect on the processes of apoptosis is rebalancing pro- and antiapoptotic proteins and allow for a pathogenetic rationale for the use of neuropeptides in complex programs of alcohol dependence therapy.

Keywords: neurometabolic protector, cortexin, apoptosis, caspase-3, Bcl-2, neuroblastoma, ethanol, tert-butyl hydroperoxide

Хроническое употребление алкоголя приводит к различным нарушениям в работе

центральной нервной системы, включая функциональные, структурные, клеточные и молекулярные повреждения [1]. Действие этанола сопровождается уменьшением объема серо-белого вещества, микроструктурным разрушением различных участков белого вещества, вызывает снижение объема гиппокампа и увеличение размеров желудочков мозга оказывает влияние на определенные нейромедиаторные системы [2]. Структурные нарушения, вызванные злоупотреблением алкоголя, приводят к изменениям функции мозга: гиперактивности, умственной отсталости, депрессии и когнитивной дисфункции [3,4]. Большое количество исследований посвящено раскрытию механизмов нейротоксического действия этанола. Особое внимание в патогенезе алкоголь-индуцированного повреждения нейронов уделяется роли окислительного стресса и запрограммированной клеточной гибели [5].

В связи с этим поиск лекарственных средств, обладающих доказанным регулирующим, антиоксидантным и протекторным действием и направленных на защиту нейрона при алкогольной зависимости - актуальное направление современной психофармакологии. Перспективным в этом отношении представляется нейропротектор кортекин (препарат полипептидной природы, получаемый путём экстракции из коры головного мозга крупного рогатого скота; производитель «Герофарм», Россия). В его составе до 90% олиго- и коротких пептидов и около 10% различных аминокислот, а также набор разнообразных микроэлементов (марганец, медь, цинк, селен, и др.), принимающих участие в активности более 1000 внутриклеточных ферментов и белков, регулирующих процессы клеточной динамики. Кортексин воздействует на разные этапы патологической цепи молекулярных событий, приводящих к нейрональной гибели [6]: регулирует процесс перекисного окисления липидов и метаболизм нейромедиаторов и в коре головного мозга, увеличивает эффективность энергетического метаболизма нейронов, препятствует образованию избыточного количества свободных радикалов, устраняет дисбаланс тормозных и возбуждающих аминокислот, обладает умеренным GABA-ергическим действием. Препарат успешно применяется в терапии различных психических и неврологических расстройств. Имеются исследования, доказывающие, что включение кортексина в стандартные схемы терапии алкогольной зависимости приводит к улучшению концентрации внимания, кратковременной памяти, способности к обучению, снижению уровня невротизации и тревоги, улучшению самочувствия пациентов, улучшению настроения, повышению самооценки, снижению уровня окислительного стресса [7].

В качестве экспериментальной модели нами использована клеточная линия нейробластомы мыши C-1300. Клетки нейробластомы обладают рядом важнейших свойств, типичных для нервных клеток: у них имеются ионные каналы и рецепторы, они

электрически и химически возбудимы, обладают ферментативным аппаратом, для синтеза медиаторов, образуют отростки. Относительная простота в использовании и высокая скорость роста культуры клеток нейробластомы позволяет широко применять ее в научных исследованиях для изучения дифференцирующих и нейропротекторных свойств различных биологически активных соединений [8,9].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния кортексина на показатели апоптоза клеток нейробластомы C-1300 в условиях индуцированного окислительного стресса и под влиянием этанола.

Материалы и методы исследования

Реактивы: В работе использовали среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), DMEM в модификации Искова (IMEM), пенициллин (Sigma-Aldrich, США), стрептомицин (Sigma-Aldrich, США), инактивированную эмбриональную телячью сыворотку (БиолоТ, Санкт-Петербург), препарат полипептидной природы «Кортексин» (ООО «Герофарм», Россия), гидроперекись трет-бутила (ГПТБ) (Fluka, Германия), наборы для иммуноферментного анализа Caspase-3 ELISA и Bcl-2 ELISA (Bender MedSystems GmbH, Австрия).

Культивирование нейробластомы: клетки нейробластомы мыши C-1300 культивировали в среде DMEM/IMEM (3:1), содержащей 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 5% эмбриональной телячьей сыворотки, при 36° С, 90% влажности в атмосфере с 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония). Смену среды проводили каждые 2-3 дня.

Для выявления эффекта кортексина клетки нейробластомы рассаживали в культуральные флаконы (75 см², 4x10⁵ клеток на флакон) и спустя сутки инкубировали с препаратом в концентрации 0,1 мкг/мл в течение 16 часов, затем на 4 часа вносили индуктор окислительного стресса - гидроперекись третичного бутила (ГПТБ) в конечной концентрации 140 мкМ или этанол в конечной концентрации 0,5 %.

Для оценки действия ГПТБ и этанола на клетки нейробластомы проводили инкубацию культур с указанными веществами по той же схеме, внося на 16 часов культуральную среду в тех же объемах, что и раствор кортексина, а потом на 4 часа – ГПТБ или этанол в вышеуказанных концентрациях.

В качестве контроля использовали культуру, в которую оба раза вносили эквивалентные объемы культуральной среды. Указанные концентрации исследуемых веществ были подобраны, исходя из результатов ранее проведенных предварительных экспериментов и литературных данных [10].

По окончании инкубации клетки отмывали в физиологическом растворе, осаждали центрифугированием, суспендировали в 1 миллилитре лизирующего буфера и замораживали на -80°C .

Изучение протекторных свойств: концентрацию проапоптотического белка каспаза-3 и антиапоптотического белка Bcl-2 определяли в клеточном лизате методом иммуноферментного анализа с использованием наборов Caspase-3 ELISA и Bcl-2 ELISA фирмы «Bender MedSystems GmbH» (Австрия). Постановку реакции проводили в соответствии с прилагаемой инструкцией фирмы-производителя. Результаты анализа оценивали на автоматическом микропланшетном спектрофотометре «EpochBioTekInstruments» (США) при длине волны 450 нм.

Статистическую обработку результатов производили с помощью программ Statistica, версия 8.0 для Windows. Проверку на нормальность распределения значений переменных проводили по критерию Колмогорова-Смирнова. Данные (в нг Bcl-2 или мкг каспазы 3 на мл лизата клеток) представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей ($Me (Q_L-Q_U)$). Для сравнения количественных переменных использовались критерии Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В качестве индукторов клеточной гибели нами использовались этанол и гидроперекись третичного бутила (ГПТБ) с целью моделирования ситуации окислительного стресса. Данный подход позволяет эффективно имитировать выраженный окислительный стресс и оценить протекторное и антиоксидантное действие, направленное на нейтрализацию активных радикалов, что приобретает важное значение при алкогольной зависимости, сопровождающейся развитием в организме окислительных процессов, повышением эндогенной генерации активных форм кислорода и, как следствие, к срыву защитных механизмов и активации окислительного стресса. Окислительный стресс, при аддиктивной патологии, отражается на функционировании разнообразных органов и систем, имеет огромное значение в развитии клинического течения заболевания и в формировании соматических осложнений, а также играет существенную роль в активации процессов апоптоза [7].

Измерение концентраций внутриклеточных регуляторных белков с целью изучения протекторного влияния лекарственного биорегулятора кортексина представляется целесообразным, поскольку именно относительный уровень протеаз определяет дальнейшую судьбу клетки. Белки семейства Bcl, в частности Bcl-2 (Apoptosis regulator Bcl-2) – важнейшие регуляторы клеточной гибели, в результате избыточного присутствия данных

белков в клетке формируются факторы, ингибирующие апоптоз. Другим ключевым моментом в промежуточных и терминальных стадиях запрограммированной клеточной гибели является активность ферментов семейства каспаз. Каспаза-3 играет важнейшую роль в исполнении внутриклеточной апоптотической программы клеток головного мозга.

По результатам проведенного эксперимента, концентрация внутриклеточного регуляторного белка Bcl-2 в интактных клетках нейробластомы составила 20,20 (17,77-23,50) нг/мл. Добавление в культуральную среду как гидроперекиси третичного бутила, так и этанола приводило к статистически значимому снижению уровня исследуемого антиапоптотического белка по сравнению с контрольными культурами нейробластомы (табл. 1).

Таблица 1

Концентрация антиапоптотического белка Bcl-2 (нг/мл)
в клетках нейробластомы при воздействии кортексина, Me (Q_L-Q_U)

Условия инкубации	Инкубация без кортексина	Инкубация с кортексином
Интактные клетки	20,20 (17,77—23,50)	17,56 (14,40—21,64)
Интактные клетки + ГПТБ	14,58 (13,10—16,20)*	18,24 (15,49—22,17)#
Интактные клетки + этанол	15,55 (11,73—17,61)*	19,56 (18,44—21,05)#

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с интактными клетками (контроль); # – $p < 0,05$ по сравнению с инкубацией в тех же условиях без протектора.

Полученные данные о нарушениях процессов запрограммированной клеточной гибели, в частности об изменениях уровня внутриклеточных регуляторных белков в условиях окислительного стресса и под воздействием этанола согласуются с литературными данными [11]. Tejedo J. С. с соавторами [12] показали токсическое воздействие оксида азота на клетки RINm5F, в результате которого происходит индукция апоптотических событий, таких как выделение цитохрома С из митохондрий, регуляция внутриклеточного белка Bcl-2, активация каспазы 3, фрагментация ДНК. Karasi A.A. с соавторами показали, что инкубация с этанолом в течение 16 часов в концентрации 50 мМ и выше приводит к увеличению апоптоза клеток Jurkat, так добавление этанола в концентрации 100 мМ вызывало двукратное увеличение экспрессии Вах и снижение экспрессии белка Bcl-2 в Jurkat-клетках, а также приводило к перемещению цитохрома С в цитозоль. Хроническое употребление алкоголя

оказывает влияние на активацию проапоптотического белка caspase-3 и снижение экспрессии Bcl-2 в Т-лимфоцитах пациентов. [13].

Кортексин оказывал нейропротекторное действие в условиях ГПТБ- и этанол-индуцированного нарушения уровня антиапоптотического белка: наблюдали статистически значимое увеличение концентрации исследуемого белка в клеточных культурах нейробластомы, по сравнению с инкубацией в тех же условиях без добавления протектора (табл.1).

Концентрация каспазы-3 в интактных культурах нейробластомы составила 2,61 (2,43—3,47) мкг/мл. Инкубация клеток с добавлением 0,5% этанола не вызывала значимых изменений изучаемого параметра. В то время как культивирование с добавлением ГПТБ приводило к индукции апоптоза клеток нейробластомы, что выражалось в статистически достоверном увеличении уровня проапоптотического белка по сравнению с контрольными культурами (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют о более токсическом воздействии активных форм кислорода, нежели самого этанола на регуляторные белки апоптоза.

Таблица 2

Концентрация проапоптотического белка каспазы-3(мкг/мл)
в клетках нейробластомы при воздействии кортексина, Me (QL-QU)

Условия инкубации	Инкубация без кортексина	Инкубация с кортексином
Интактные клетки	2,61 (2,43—3,47)	1,1 (0,75—1,92)*
Интактные клетки + ГПТБ	3,95 (3,53—4,02) *	2,21 (1,85—2,65)
Интактные клетки + этанол	2,40 (1,82—3,92)	2,24 (1,56—3,02)

Примечание. *- $p < 0,05$ по сравнению с интактными клетками (контроль).

Показаны защитные свойства исследуемого лекарственного препарата на уровень проапоптотического белка в условиях экспериментального окислительного стресса: инкубация в присутствии ГПТБ и кортексина приводит к нормализации концентрации каспазы-3. Изменений в содержании исследуемого белка при культивировании с кортексином в условиях этанол-индуцированного воздействия отмечено не было (табл. 2).

Полученные экспериментальные данные доказывают нейропротекторные свойства кортексина, что согласуется с уже известными литературными данными. Ранее было

продемонстрировано влияние препарата на выживаемость культивируемых нейронов в условиях перекисной интоксикации [14]. Показано, что препарат оказывает влияние на показатели апоптоза после воздействия токсических концентраций глутамата в молодых и старых нейронах и способен восстанавливать содержание АТФ [6]. Позитивный эффект кортексина при инкубации нейронов в отсутствие ростовых факторов подтверждает нейротрофический механизм действия препарата. На модели острой гипоксии у крыс было установлено тормозящее апоптоз влияние кортексина и нивелирование программируемой гибели нейронов, провоцируемой ишемией [15]. Показано участие кортексина в экспрессии нейротрофических факторов, энергетическом обеспечении нервной клетки, функционировании рецепторов глутамата и регулировании содержания кальция в клетке, а также наличие разнообразных эффектов, затрагивающих каскадную регуляцию клеточной динамики и гибели, что определяет нейротрофическое и нейропротекторное действие препарата [6].

Заключение

В результате проведенного исследования было показано, что в условиях экспериментального окислительного стресса в клеточных культурах нейробластомы наблюдается достоверное увеличение концентрации проапоптотического белка каспазы-3 и статистически значимое уменьшение содержания антиапоптотического белка Bcl-2. Инкубация клеток с этанолом приводила к достоверному снижению уровня Bcl-2 по сравнению с интактными клетками, изменений в концентрации каспазы-3 не было обнаружено.

Кортексин, в условиях эксперимента, оказывает выраженный нейропротекторный эффект сдерживая токсическое действие гидроперекиси и этанола, что проявляется в снижении концентрации каспазы-3 и достоверном увеличении уровня Bcl-2. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в клетках нейробластомы C-1300 возможным механизмом реализации защитного эффекта исследованного лекарственного препарата является восстановление нарушенного баланса про- и антиапоптотических белков, и позволяют патогенетически обосновать применение нейропептидов в комплексных программах терапии аддиктивных расстройств.

Авторы выражают признательность старшему научному сотруднику лаборатории молекулярной генетики и биохимии НИИ психического здоровья Л.П. Смирновой за методическую помощь в проведении эксперимента.

Исследование частично выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №17-75-20045) «Действие органических солей лития на клетки и плазму крови больных с расстройствами аффективного спектра и синдромом зависимости».

Список литературы

1. Солонский А.В., Прокопьева В.Д., Ярыгина Е.Г. Нейроморфологические и молекулярные эффекты этанола // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. 2018. № 2 (99). С. 28-32.
2. Jin Z., Bhandage A.K, Bazov I, Kononenko O, Bakalkin G, Korpi ER, Birnir B. Selective increases of AMPA, NMDA, and kainate receptor subunit mRNAs in the hippocampus and orbitofrontal cortex but not in prefrontal cortex of human alcoholics. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014. vol. 8. P.11.
3. Бохан Н.А., Иванова С.А., Мандель А.И., Жернова Е.В. Когнитивные функции и процессы апоптоза у больных алкоголизмом: эффекты нейрометаболической коррекции // Наркология. 2012. Т. 11. № 7 (127). С. 51-55.
4. Cushman J. D., Moore M.D., Jacobs N.S., Olsen R.W., Fanselow M.S. Behavioral pharmacogenetic analysis on the role of the $\alpha 4$ GABA_A receptor subunit in the ethanol-mediated impairment of hippocampus-dependent contextual learning / J. D. Cushman [et al.]. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2011. vol. 35. no. 11. P. 1948–1959.
5. Соколик Е.П., Беленичев И.Ф., Абрамов А.В. Фармакологическая регуляция молекулярно-морфологических характеристик нейроапоптоза при хроническом алкоголизме // Молекулярная медицина. 2012. № 1. С. 54-57.
6. Гранстрем О.К., Сорокина Е.Г., Салыкина М.А., Сторожевых Т.П., Сурин А.М., Штучная Г.В., Реутов В.П., Крушинский А.Л., Кузенков В.С, Пинелис В.Г., Дьяконов М.М. Кортексин на молекулярном уровне // Нейроиммунология. 2010. Т. VIII, № 1-2. С. 34-40.
7. Бохан Н.А., Прокопьева В.Д., Иванова С.А., Ветлугина Т.П., Епимахова Е.В., Плотников Е.В., Ярыгина Е.Г., Бойко А.С. Окислительный стресс и его коррекция у больных алкогольной зависимостью: итоги исследований в НИИ психического здоровья Томского НИМЦ // Вопросы наркологии. 2018. № 3 (163). С. 27-59.
8. Панкова Т.М., Сапожников А.М., Старостина М.В. Протекторные эффекты миелопептидов в культуре нейробластомы C-1300 // Биоорганическая химия. 2015. Т. 41. № 3. С. 375-379.
9. Kovalevich J., Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol*. 2013. vol. 1078.P.9-21.
10. Смирнова Л.П. Роль антиоксидантных ферментов в регуляции пролиферации опухолевых клеток: автореф. дис. ... канд. мед. наук [Место защиты: Научно-исследовательский институт онкологии СО РАМН]. Томск, 2003. 23 с.

11. Ivanova S.A., Vyalova N.M., Zhernova E.V., Bokhan N.A. Spontaneous and in vitro induced apoptosis of lymphocytes and neutrophils in patients with alcohol dependence. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2010. vol. 149. № 2. P. 246-249.
12. Tejedo J.C., Bernabé J.C., Ramírez R., Sobrino F., Bedoya F.J. NO induces a cGMP-independent release of cytochrome c from mitochondria which precedes caspase 3 activation in insulin producing RINm5F cells. *FEBS Letters*. 1999. Vol. 459. P.238-243.
13. Kapasi A.A., Patel G., Goenka A., Nahar N., Modi N., Bhaskaran M., Reddy K., Franki N., Patel J., Singhal P.C. Ethanol promotes T cell apoptosis through the mitochondrial pathway. *Immunology*. 2003. vol.108. no 3. P. 313–320.
14. Пинелис В.Г., Сторожевых Т.П., Сорокина Е.Г., Сенилова Я.Е., Персиянцева Н.А., Гранстрем О.К. Влияние кортексина на выживаемость культивируемых нейронов мозга, подвергнутых токсическому действию глутамата или лишенных ростовых факторов // Пептидная нейропротекция: сборник научных. Статей / Под ред. М.М. Дьяконова, А.А. Каменского. СПб.: Наука, 2009. С.107-126.
15. Менджерицкий А.М., Карантыш Г.В., Рыжак Г.А., Демьяненко С.В. Регуляция содержания цитокинов в сыворотке крови и активность каспазы-3 в мозге старых крыс кортексинопинеалоном в модели острой гипоксии // *Успехи геронтологии*. 2014. 27(1). С.94-97.