

УДК 615.21:615.272.4.014.425

А.К. Цой¹, Т.М. Шалахметова^{1*}, Ш.Н. Аскарлова², Б.А. Умбаев¹

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

²Назарбаев Университет, Казахстан, г. Астана

*E-mail: Tamara.Shalakhmetova@kaznu.kz

Влияние z-лигустилида на генерацию супероксид аниона и фосфорилирование cPLA2 в астроцитах при воздействии β-амилоида

Аннотация. В настоящей работе было изучено влияние Z-лигустилида (бутилиден-4,5-дигидрофталид) на генерацию супероксид аниона и фосфорилирование cPLA2 в астроцитах крыс при воздействии β-Амилоида. Установлено, что Z-лигустилид ингибирует генерацию супероксид аниона, синтез которого индуцирует β-Амилоид. Показано, что Z-лигустилид снижает уровень фосфорилирования cPLA2, но при этом не оказывает токсического действия на астроциты

Ключевые слова: β-амилоид, Z-лигустилид, астроциты крыс, активные формы кислорода, супероксиддисмутаза.

Одной из ранних причин развития болезни Альцгеймера (БА) является образование β-амилоида (Аβ) в нервных клетках головного мозга. Аβ - гетерогенный пептид, содержащий от 36 до 43 аминокислот, который образуется в нейронах путем последовательного протеолиза белка предшественника амилоида с помощью ферментов β- и γ-секретазы [1]. Наиболее токсичной формой β-амилоида является Аβ42 [2].

Известно, что Аβ, проникая в астроциты и другие клетки гематоэнцефалического барьера, запускает каскад внутриклеточных реакций и индуцирует синтез активных форм кислорода (АФК), в том числе супероксид аниона [3,4]. Молекулы АФК приводят к нарушению работы цитоскелета, активации стрессовых киназ, синтезу транскрипционных факторов, контролирующих апоптоз клетки. Кроме того, одним из цитотоксических свойств Аβ является активация киназ MAPK/ERK и цитозольной фосфолипазы А2 (cPLA2) [5]. Известно, что cPLA2 участвует в различных жизненно важных процессах клеток млекопитающих, в том числе астроцитов, таких, как митоз, дифференцировка, воспалительный и цитотоксический ответ клеток [6, 7]. Данный фермент активируется MAP киназой (МАРК), посредством фосфорилирования серина 505, после чего он транслоцируется в плазматическую мембрану, где начинает выполнять свои функции.

Процессы фосфорилирования cPLA2 в клетках строго регламентированы, и избыточная активность данного фермента вовлекается в патогенез многих нейродегенеративных заболеваний, в том числе и БА [8]. Таким образом, Аβ запускает различные, независимые цитотоксические механизмы в астроцитах: генерацию АФК и активацию cPLA2.

В связи с вышесказанным, для предотвращения токсического действия Аβ на астроциты необходим поиск эффективных лекарственных средств, способных оказывать комплексное терапевтическое воздействие. Кроме того, данные препараты должны быть способными проникать через ГЭБ в паренхиму мозга. В этом случае они будут перспективными для использования в терапии БА.

Из литературы известно, что вещество Z-лигустилид (бутилиден-4,5-дигидрофталид), содержащееся в эфирных маслах вегетативных органов многих видов растений семейства зонтичных (Umbelliferae), может активировать супероксиддисмутазу – фермент антиоксидантной защиты против АФК в клетках млекопитающих [9]. Помимо антиоксидантных свойств Z-лигустилида, показана его способность проникать через ГЭБ, что делает его весьма привлекательным для исследования на церебропротекторные свойства при воздействии Аβ.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования явилось изучение влияния *Z*-лигустилида на генерацию супероксид аниона и фосфорилирование cPLA2 при воздействии A β 42 на астроциты крыс.

Культивирование астроцитов и их инкубирование с *Z*-лигустилидом и A β 42. В настоящем исследовании использовалась культура первичных астроцитов крыс (Invitrogen, США). Клетки культивировали на покровных стеклах и культуральных чашках в стандартной среде DMEM с добавлением 15% бычьей сыворотки и 1% пенициллин-стрептомицина в CO₂-инкубаторе (содержание CO₂ - 5%, температура - 37°C). В культуральную среду астроцитов добавляли 5 мкг/мл *Z*-лигустилида (Avechem, США) [9]. Клетки, которые подвергались воздействию β -амилоида, инкубировали в такой же среде с добавлением A β 42 в концентрации 5 мкМ [10]. Для этого 5 мМ раствора β -амилоида (American Peptide Company, США) и растворителя DMSO разводили до концентрации 100 мкМ в ледяной культуральной среде Ham, а затем обрабатывали ультразвуком в течение минуты для получения мономеров A β 42. Далее для получения из мономеров β -амилоида олигомеры, которые, как известно, являются наиболее токсичными для клеток, их инкубировали при температуре 37°C в течение 2-х часов [10].

Культура клеток была разбита на следующие группы: I – контроль (интактные клетки); II – клетки, которые инкубировали с β -амилоидом (5 мкМ) в течение 2-х часов; III – клетки инкубировали с *Z*-лигустилидом в течение 18 часов, затем подвергали воздействию β -амилоидом (5 мкМ); IV – клетки инкубировали только с *Z*-лигустилидом в течение 18 часов. После чего, для дальнейших анализов, культуру астроцитов в контроле и опыте промывали фосфатным буфером при pH 7,4.

Определение содержания супероксид аниона в астроцитах. Для количественной оценки супероксид аниона в астроцитах использовали флуоресцентный метод с дигидроэтидиумом (DHE). Данный метод основан на способности DHE реагировать с супероксид анионом с образованием флуоресцирующего продукта (2-гидроксиэтидиум). DHE свободно проникает через мембрану клеток и после реакции с кислородным радикалом 2-гидроксиэтидиум (2-HE) интеркалирует с ДНК клетки, что позволяет проводить флуоресцентный анализ генерации

супероксид аниона в исследуемых объектах *in vivo* [11].

Астроциты инкубировали в культуральной среде с DHE (Sigma, Германия) в концентрации 5 мМ [11] и с A β 42 в течение 2-х часов. После чего клетки промывали фосфатным буфером (pH 7,4), а затем фиксировали в течение 30 минут 4% раствором формалина. Затем снова промывали фосфатным буфером (pH 7,4) и проводили количественный флуоресцентный анализ с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon TE-2000 U снабженного ПЗС-фотокамерой и программой Meta View. Для получения флуоресцентных изображений 2-HE использовали фильтр с экстинкцией 540 нм и эмиссией 620 нм. Время экспозиции для каждого снимка составляло 400 миллисекунд. Количественную оценку производили путем определения интенсивности свечения 2-HE в условных единицах. Измерение производили в 500 клетках в каждой группе исследований.

Определение cPLA2 и уровня его фосфорилирования. Для измерения уровня экспрессии и фосфорилирования cPLA2 использовали метод иммуноблоттинга. Для этого получали лизат астроцитов исследуемых групп, добавляя в культуральные чашки по 300 мкл буфера Laemmli [12]. Полученный экстракт обрабатывали ультразвуком, добавляли 7,5 мкл 2-меркаптоэтанола и кипятили при 95°C в течение 5 минут. Затем белки в одинаковом количестве каждого образца (40 мкл) разделяли электрофорезом в 12% SDS-PAGE геле при электрическом напряжении 80 В в течение 30 минут, затем в течение 1,5 часов при 110 В. Разделенные электрофорезом белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану в трис-глициновом буфере (pH 8,3) с 0,1% додецилсульфат натрия и 20% метанола в течение 12 часов при силе тока 90 мА в холодной комнате [13]. После чего, мембраны содержащие белок, для предотвращения неспецифического связывания антител, инкубировали в TBS-Т буфере содержащем 5% обезжиренного молока в течение 3-х часов при комнатной температуре. Затем, мембраны промывали в TBS-Т буфере и инкубировали с первичными антителами специфичными к cPLA2 (1:2000, Cell Signaling Technology, США) при 4°C в течение 12 часов. После этого, мембраны промывали в TBS-Т буфере 3 раза по 10 минут и инкубировали с вторичными антителами конъюгированными с

пероксидазой хрена (1:10000, Santa Cruz, США) при комнатной температуре в течение 1 часа. В качестве стандартного протеина использовали β -актин, визуализацию которого проводили используя антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:50000, Molecular Probes, США), специфичные к данному белку в тех же условиях, что и для cPLA2. Визуализацию пероксидазной реакции проводили с помощью хемилюминесценции с использованием субстрата, содержащего люминол (Thermo Sci-SuperSignal West Pico и West Femto). Для этого мембраны инкубировали с субстратом в течение 5 минут, затем мембраны покрывали прозрачной пленкой (3Com) и совмещали с фотопластинкой, время экспозиции составляло от 2 до 5 минут. Для удаления антител мембраны инкубировали в стриппинг-буфере (Thermo Sci, США) в течение 45 минут. После чего, мембраны инкубировали с первичными антителами, специфичными к фосфорилированному cPLA2 (1:2000, Cell Signaling Technology, США), а затем с вторичными антителами (1:10000, Santa Cruz США) в тех же условиях, что и для общего cPLA2.

Для количественной оценки экспрессии и уровня фосфорилирования cPLA2, полученные негативы с фотопластинок, сканировали и измеряли оптическую плотность засвеченных полосок (band), используя программу Quantity One (BioRAD, Hercules, США). Расчет содержания общего cPLA2 проводили по формуле $A/B=C$, где A – оптическая плотность cPLA2, B – оптическая плотность β -актина и C-количество cPLA2 в условных единицах. Содержание

фосфорилированного cPLA2 проводили по формуле $C/D=E$: – где C - количество cPLA2 в условных единицах, D -оптическая плотность фосфорилированного cPLA2 и E – содержание фосфорилированного cPLA2 в условных единицах [14-16].

Результаты количественной оценки содержания супероксид аниона в астроцитах исследуемых групп представлены на рисунке 1 (А, Б).

Видно, что интенсивность свечения 2-НЕ в интактных клетках минимальна (рисунок 1,А-1), а при воздействии $A\beta$ 42 она значительно возрастает (рисунок 1,А-2). Напротив, в клетках которые инкубировали Z-лигустилидом и $A\beta$ 42 интенсивность свечения 2-НЕ была на уровне контроля (рисунок 1, А-3). В астроцитах которые инкубировали только с Z-лигустилидом интенсивность флуоресценции также не отличалась от таковой в клетках контрольной группы (рисунок 1, А-4). Количественный флуоресцентный анализ интенсивности свечения 2-НЕ подтвердил данное визуальное наблюдение (рисунок 1,Б). Было установлено, что при воздействии $A\beta$ 42 содержание супероксид аниона в астроцитах возрастает на 40% по сравнению с контролем (рисунок 1,Б-II). Однако, содержание супероксид аниона в астроцитах, инкубированных с Z-лигустилидом и $A\beta$ 42, снижалось до контрольного уровня (рисунок 1,Б-III). Практически на этом же уровне было содержание супероксид аниона в астроцитах, инкубированных только с Z-лигустилидом (рисунок 1,Б- IV).

Результаты измерения уровня экспрессии

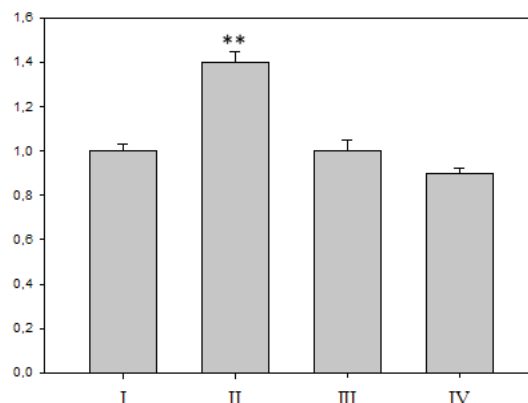
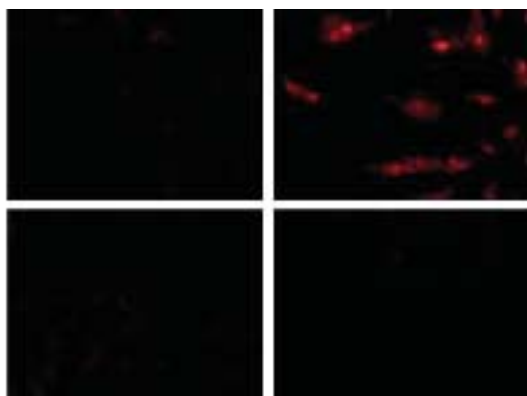


Рисунок 1 - Флуоресценция 2-НЕ в астроцитах крыс (А) и его количественный анализ (усл.ед) (Б): I – контроль (интактные клетки); II – клетки инкубировали с $A\beta$ 42; III группа – клетки инкубировали с Z-лигустилидом и с $A\beta$ 42; IV группа - клетки инкубировали с Z-лигустилидом. ** - $P \leq 0,01$ по сравнению с контролем

и фосфорилирования сPLA2 в астроцитах представлены на рисунке 2 (А,Б).

Видно, что экспрессия сPLA2 в клетках во всех исследуемых группах не изменялась (рисунок 2,А-I-IV). Однако содержание фосфорилированного фермента при воздействии на астроциты Аβ42 увеличивалось на 28%

(рисунок 2,Б-II). Напротив, в клетках, которые инкубировали с Z-лигустилидом, а затем подвергали воздействию Аβ42, содержание фосфорилированного белка снижалось до контрольных значений (рисунок 2,Б-III). Сам по себе Z-лигустилид влияния на фосфорилирование не оказывал (рисунок 2,Б-IV).

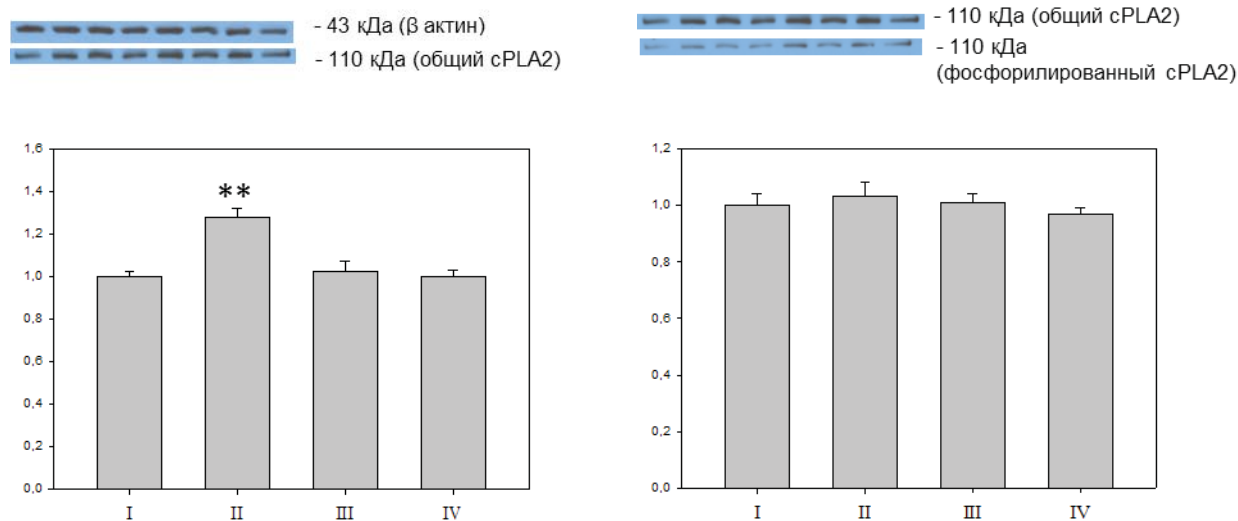


Рисунок 2 - Экспрессия сPLA2 (А) и уровень его фосфорилирования (усл.ед) (Б) в астроцитах крыс:

I – контроль (без воздействия); II – клетки инкубировали с Аβ42;

III группа – клетки инкубировали с Z-лигустилидом и с Аβ42; IV группа - клетки инкубировали с Z-лигустилидом.

** - $P \leq 0,01$ по сравнению с контролем

Таким образом, результаты данного исследования показали, что Аβ42, повышая содержание супероксид аниона на 40% в клетках, инкубированных с данным веществом, индуцирует окислительный стресс, что подтверждает данные других авторов [3, 4]. Вместе с тем нами было установлено, что Z-лигустилид проявляет антиокислительные свойства, снижая содержание супероксид аниона до контрольного уровня. Известно, что Z-лигустилид может активировать работу антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы [9] и/или ингибировать транскрипционный фактор NF-κB, регулирующий экспрессию каталитического центра НАДФН оксидазы (gp91phox)- основного источника АФК в астроцитах [3]. Исходя из этого, можно предположить, что, наряду с активацией процессов утилизации супероксидного радикала, Z-лигустилид способен регулировать активность НАДФН оксидазы и, тем самым, блокировать синтез АФК. Следует отметить, что сам по себе Z-

лигустилид не обладает токсичными свойствами, о чем свидетельствуют полученные данные об одинаковом уровне содержания супероксид аниона в контроле и опыте (рисунок 1,Б- IV).

В данном исследовании также было установлено, что Аβ42 не только вызывает генерацию АФК, но и приводит к активации сPLA2 в астроцитах, что может, вероятно, приводить к нейродегенеративным процессам, а Z-лигустилид не влияет на уровень экспрессии фермента сPLA2, но ингибирует процессы его фосфорилирования, индуцированные Аβ42, что, вероятно, будет способствовать защите клеток от нейротоксического действия β-амилоида.

Исходя из всего вышесказанного, можно заключить, что Z-лигустилид способен блокировать цитотоксическое действие Аβ42 на астроциты и может быть перспективным в клинике лечения пациентов с диагнозом болезнь Альцгеймера.

Литература

- 1 Vassar R. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease // J. Mol. Neurosci. – 2004. - № 23. - P.105-114.
- 2 Bernstein S.L., Wyttenbach T., Baumketner A., Shea J.-E., Bitan G., Teplow D.B., Bowers M.T. Amyloid β -protein: monomer structure and early aggregation states of A β 42 and its pro19 alloform // J. Amer. Chem. Soc. - 2005. -127. – P. 2075-2084.
- 3 Abramov A.Y., Duchon M.R. The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides // Biol Sci. – 2005. -V. 360. – P. 2309-2314.
- 4 Park L., Zhou P., Pitstick R., Capone C., Anrather J., Norris E.H., Younkin L., Younkin S., Carlson G., McEwen B.S., Iadecola C. Nox2-derived radicals contribute to neurovascular and behavioral dysfunction in mice overexpressing the amyloid precursor protein // Proc. Nat. Ac. Sci. - 2008. - V. 105. - P. 1347-1352.
- 5 Dineley K.T., Westerman M., Bui D., Bel K., Ashe K.H., Sweatt J.D. beta-Amyloid Activates the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade via Hippocampal alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptors: In Vitro and In Vivo Mechanisms Related to Alzheimer's Disease // J. Neurosci. - 2001. - V. 21. - P. 4125-4133.
- 6 Stephenson D., Rash K., Smalstig B., Roberts E., Johnstone E., Sharp J., Panetta J., Little S., Kramer R., Clemens J. Cytosolic phospholipase A2 is induced in reactive glia following different forms of neurodegeneration // Glia. - 1999. - V. 27. - P. 110-128.
- 7 Sun G.Y., Horrocks L.A., Farooqui A.A. The roles of NADPH oxidase and phospholipases A2 in oxidative and inflammatory responses in neurodegenerative diseases // J. Neurochem. - 2007. - V. 103. - P. 1-16.
- 8 Sun G.Y., Xu J., Jensen M.D., Simonyi A. Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases // J. Lipid Res. - 2004. - V. 45. - P. 205-213.
- 9 Yan Yu, Jun-Rong Du, Chen-Yuan Wang and Zhong-Ming Qian. Protection against hydrogen peroxide-induced injury by Z-ligustilide in PC12 cells // Experimental brain research. - 2008. - V. 184. - P. 307-312.
- 10 Fa M., Orozco I.J., Francis Y.I., Saeed F., Gong Y., Arancio O. Preparation of oligomeric beta-amyloid 1-42 and induction of synaptic plasticity impairment on hippocampal slices // J. Vis. Exp. - 2010. - V. 41. - P.1884.
- 11 Zanetti M., d'Uscio L.V., Peterson T.E., Katusic Z.S., O'Brien T. Analysis of Superoxide Anion Production in Tissue // Hypertension. - 2005. - P. 65-72.
- 12 Bolt A. and Mahoney B. High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide, gel electrophoresis // Analytical Biochemistry. – 1997. – V. 247. – P. 185-192.
- 13 Schagger H. Tricine–SDS-PAGE // Nature Protocols. -2006. - V. 1. - P. 16-22.
- 14 Li W., Murai Y., Okada E., Matsui K., Hayashi S., Horie M., Takano Y. Modified and simplified western blotting protocol: use of intermittent microwave irradiation (IMWI) and 5% skim milk to improve binding specificity // Pathol. Int. - 2002. - V. 52(3). - P. 234-238.
- 15 Dennis-Sykes C.A., Miller W.J., McAleer W.J. A quantitative Western Blot method for protein measurement // J. Biol. Stand. - 1985. - V. 13(4). – P. 309-314.
- 16 Van Kooten T.G., Klein C.L., Kirkpatrick C.J. Western blotting as a method for studying cell-biomaterial interactions: the role of protein collection // J. Biomed. Mater. Res. - 2001. - V. 54(3). - P. 385-389.

А.К. Цой, Т.М. Шалахметова, Ш.Н. Аскарлова, Б.А. Умбаев
**Астроциттерінде супероксид анионның генерациясына Z-лигустилидтың әсері және
 β -Амилоидтың әсерінен cPLA2-нің фосфорлануы**

Осы жұмыста Z-лигустилиданың (бутилиден-4,5-дигидрофталид) әсері суперкапсид анионның генерациясына және β -Амилоидтың әсерімен cPLA2-нің егеуқұйрығының астроциттеріне фосфорлануы зерттелген. Z-лигустилид суперкапсид анионының генерациясын тежейтіндігі анықталды, бұл синтез индуцирует етеді β -Амилоид. Z-лигустилид cPLA2-тің фосфорилденуін төмендетеді, бірақ уландырғыш қасиетін астроциттерге тигізбейтіндігі көрсетілді.

Түйін сөздер: β -амилоид, Z-лигустилид, егеуқұйрықтың астроциттері, оттектің белсенді түрлері, супероксиддисмутаза.

A.K. Tsoy, T.M. Shalahmetova, Sh.Y. Askarova, B.A. Umbayev
**The influence of Z-ligustilid on the generation of superoxide anion and the phosphorylation
of cPLA2 in astrocytes at β -amyloid**

В настоящей работе было изучено влияние Z-лигустилида (бутилиден-4,5-дигидрофталид) на генерацию супероксид аниона и фосфорилирование cPLA2 в астроцитах крыс при воздействии β -Амилоида. Установлено, что Z-лигустилид ингибирует генерацию супероксид аниона, синтез которого индуцирует β -Амилоид. Показано, что Z-лигустилид снижает уровень фосфорилирования cPLA2, но при этом не оказывает токсического действия на астроциты.

Keywords: β -amyloid, Z-ligustilid, rats astrocytes, reactive oxygen species, superoxide dismutase.