

УДК 577.17

ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ХОЛЕСТЕРИНА В КЛЕТКАХ НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ЭНДОВАНИЛОИДОВ

© 2020 г. М. Г. Акимов^{1,*}, П. В. Дудина¹, А. М. Гамисония¹, Н. М. Грецкая¹, Г. Н. Зинченко¹,
С. С. Mandal², В. В. Безуглов¹

Представлено академиком РАН Н.Ф. Мясоедовым

Поступило 11.03.2020 г.

После доработки 19.03.2020 г.

Принято к публикации 19.03.2020 г.

Изучено влияние содержания холестерина в клетках MDA-MB-231 и MCF 10A на цитотоксичность эндованилоидов ацилдофаминов. Активность ацилофаминов зависит от уровня клеточного холестерина, и снижение содержания холестерина в клетках увеличивает цитотоксичность ацилдофаминов.

Ключевые слова: цитотоксичность ацилдофаминов, холестерин, эндованилоиды, арахидоноилдофамин, эндоканнабиноиды

DOI: 10.31857/S2686738920040034

Эндованилоиды — семейство биологически активных липидов — модуляторов нервной и иммунной системы; их типичные представители — N-ацилдофамины (NADA), содержащие остатки длинных насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Основными рецепторами эндованилоидов являются два классических каннабиноидных рецептора CB1 и CB2, ванилоидный рецептор TRPV1 и неклассический каннабиноидный рецептор GPR55. Функционирование большинства этих рецепторов, кроме CB2, зависит от целостности липидных рафтов. CB1 и GPR55 находятся в рафтах, и их активность уменьшается с разрушением последних [1]. Активность TRPV1 также зависит от липидных рафтов, но только для некоторых агонистов [3]. Мы предположили, что активность эндованилоидов должна отрицательно коррелировать с содержанием холестерина в клетках. Цель работы — проверить влияние содержания холестерина на цитотоксичность ацилдофаминов.

Известно, что ацилдофамины индуцируют апоптотическую гибель клеток, активируя рецепторы CB1, GPR55 или TRPV1 на плазматической мембране [5–7]. Поэтому индукция гибели кле-

ток была выбрана в качестве детектируемого параметра. В качестве модели были использованы линии клеток человеческого рака молочной железы: нетуморогенная MCF 10A и высокометастатическая MDA-MB-231 как линии с потенциально разным состоянием системы метаболизма холестерина [8]. В работе были изучены дофаминамиды арахидоновой (AA-DA), олеиновой (Ol-DA) и докозагексаеновой (DHA-DA) кислот.

Исследуемые ацилдофамины синтезировали по ранее разработанным нами методикам [2]. Продукты очищали колоночной хроматографией. Чистоту финального продукта оценивали с помощью микроколоночной обращенно-фазовой ВЭЖХ, структуру подтверждали с помощью ¹H-ЯМР и масс-спектрометрии ESI. Все соединения, использованные в экспериментах, имели чистоту не менее 97%.

Клетки MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) и MCF 10A (ATCC CRL-10317) культивировали в питательной среде DMEM с добавлением 4 mM L-глутамина, 10% эмбриональной коровьей сыворотки, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2.5 мкг/мл амфотерицина В при 37°C и 5% CO₂. Плотность клеток накануне экспериментов была 60000 на лунку 96-луночного планшета. Инкубацию с тестируемыми соединениями проводили в течение суток. Вещества растворяли в равном объеме свежей среды и добавляли к клеткам с удалением старой среды из лунок. Стоковые растворы веществ готовили в диметилсульфоксиде, финальная концентрация растворителя не

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

² School of Life Sciences, Central University of Rajasthan, NH 8, Bandarsindri, Kishangarh, Ajmer-305817, Rajasthan
*e-mail: akimovmike@gmail.com, akimovmike@yandex.ru

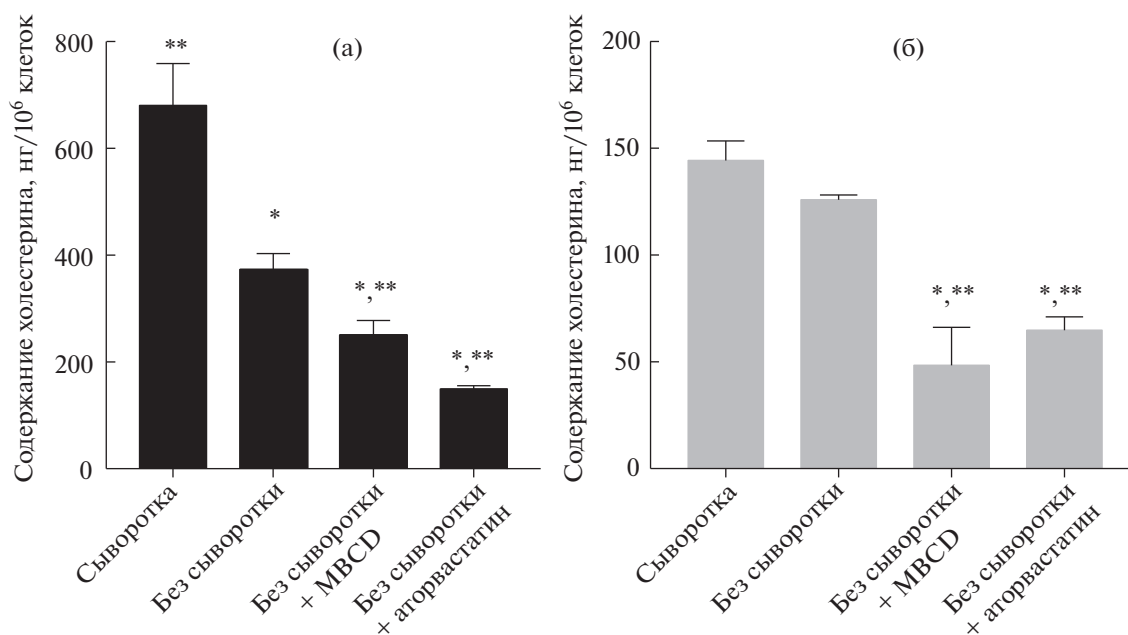


Рис. 1. Содержание холестерина в клетках MCF 10A (а) и MDA-MB-231 (б) в разных условиях. $M \pm SD$, $n = 3$ эксперимента. * – статистически достоверное отличие от среды с сывороткой, ** – статистически достоверное отличие от среды без сыворотки.

превышала 0.5%. Для оценки жизнеспособности клеток использовали ресазуриновый тест. Каждый эксперимент повторяли три раза.

Содержание холестерина измеряли с помощью набора Sigma-Aldrich Cholesterol Determination Kit.

Экспрессию генов каннабиноидных рецепторов проводили с помощью ОТ-кПЦР, последовательности праймеров: CB1 прямой CAAGCCTCTCTGGCACTTT, обратный CTGGTGTTGGGCCTATTT; CB2 прямой STACACSTATGGGCATGTTCTC, обратный CCTCACATCCAGCCTCATTC; TRPV1 прямой CTGGACCAACATGCTCTACTAC, обратный AGGTCTCTCAGGATCATCTTCT; GPR55 прямой ACTGATGTGCTTCCSTTTGAT, обратный CCTGAACACTGGGTGGTATAAG; Alu-SQ [9] прямой CACAGATCAGGTGTTCCCATAC, обратный CATCTCCAGAGCGTCATCTTT, с нормировкой на ген домашнего хозяйства Alu-SQ.

Для статистической оценки различий использовали дисперсионный анализ с пост-тестом Тьюки, различия считали достоверными при $p \leq 0.05$.

Для изменения содержания холестерина клетки помещали в следующие условия: а) среда с сывороткой; б) бессывороточная среда (ограничение поступления внешнего холестерина); в) бессывороточная среда с обработкой клеток в течение 30 мин 5 мМ метил-бета-циклодекстрина (МВСД, экстракция холестерина из мембраны); г) бессывороточная среда с добавлением 20 нМ

аторвастатина (подавление синтеза холестерина через ингибирование ключевого фермента – 3-гидрокси-3-метилглутарил-КОА редуктазы). Инкубация клеток в вышеприведенных условиях не приводила к потере жизнеспособности, что было оценено в отдельном эксперименте (данные не приведены). В культуре клеток MCF 10A удаление сыворотки привело к снижению содержания холестерина, которое еще больше снизилось в присутствии МВСД, а максимальное падение зафиксировано при ингибировании собственного биосинтеза холестерина аторвастатином. Напротив, в культуре MDA-MB-231 удаление сыворотки привело к незначительным изменениям содержания холестерина, а добавление к бессывороточной среде МВСД и аторвастатина понижало содержание холестерина практически в равной степени (рис. 1).

Использованные линии клеток таким образом представляют собой два разных варианта поддержания уровня холестерина: MCF 10A обладает одновременно активными системами и биосинтеза, и захвата холестерина из среды, а в MDA-MB-231 захват холестерина практически не задействован, а собственный его биосинтез, по видимому, протекает с низкой скоростью, и внутриклеточный пул холестерина в меньшей степени подвержен влиянию ингибитора.

Экспрессия рецепторов каннабиноидной системы, количественно оцененная по уровню их мРНК, в рассматриваемых линиях клеток весьма близка (рис. 2), и потому можно было ожидать,

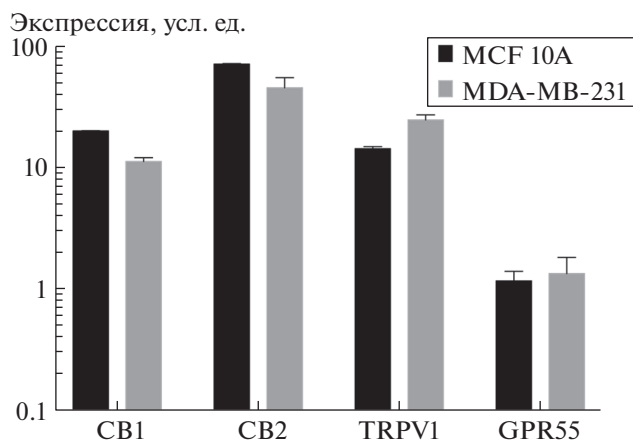


Рис. 2. Экспрессия рецепторов каннабиноидной системы в клетках MCF 10A и MDA-MB-231. Уровень мРНК, данные ОТ-кПЦР. Здесь и на рис. 3 $M \pm SEM$, $n = 3$ эксперимента.

что цитотоксичность ацилдофаминов будет прогрессивно снижаться в MCF 10A по мере разрушения рафтов, и ступенчато изменяться в MDA-MB-231.

Вопреки ожиданиям, снижение содержания холестерина без воздействия на ферментативную систему приводило к усилению цитотоксичности ацилдофаминов (рис. 3). При этом ингибирование биосинтеза холестерина практически не влияло на токсичность ацилдофаминов, а максимальный эффект был вызван экстракцией холестерина с помощью MBCD.

С одной стороны, обнаруженное усиление цитотоксичности противоречит литературным данным о потребности в холестерине для функции каннабиноидных и ванилоидных рецепторов.

Однако, липидные рафты могут также действовать как негативные регуляторы GPCR за счет либо физической секвестрации сигнальных компонентов, либо интернализации рецепторных молекул посредством эндоцитоза, связанного с кавеолами [4]. Таким образом, частичного разрушения рафтов может быть достаточно, чтобы убрать это действие.

Участие эндоцитоза в рассматриваемом явлении представляется менее вероятным, поскольку одновременно с его прекращением будет нарушаться и система передачи внутриклеточного сигнала от ацилдофаминов, компоненты которой также локализируются в рафтах. С другой стороны, рафты могут ограничивать доступность ацилдофаминов для рецепторов. В пользу этой гипотезы говорит и существенно более выраженное усиление цитотоксичности OI-DA – вещества с наиболее насыщенным остатком жирной кислоты – на фоне действия MBCD.

Парадоксальное на первый взгляд отсутствие влияния аторвастатина по сравнению с MBCD можно объяснить тем, что в условиях снижения синтеза холестерина клетка будет стараться поддерживать его содержание в жизненно важных частях, то есть в рафтах, жертвуя внутриклеточными ресурсами. MBCD, с другой стороны, в первую очередь экстрагирует холестерин именно из мембраны с сопутствующим разрушением рафтов.

Обнаруженное усиление действия ацилдофаминов согласуется с данными в работе Wojtalla с соавт., где на культуре клеток печени добавление MBCD снижало токсичность анандамида, но не AA-DA [10].

Таким образом, уровень холестерина в клетках является важным параметром, определяющим их

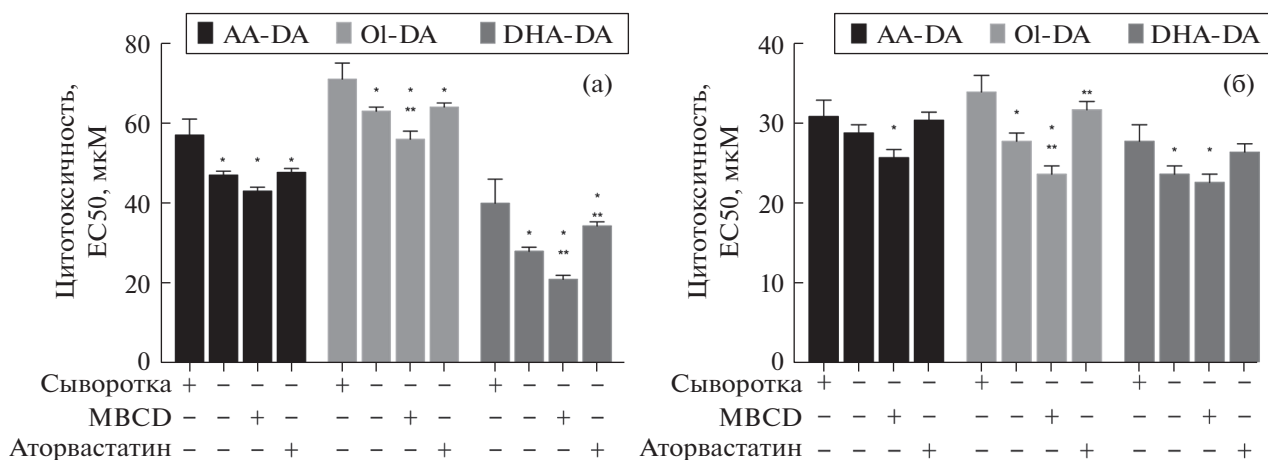


Рис. 3. Цитотоксичность (EC₅₀) NADA на фоне разного уровня холестерина, (а) MCF 10A, (б) MDA-MB-231. Инкубация 24 ч, ресазуриновый тест, * – статистически достоверное отличие от среды с сывороткой, ** – статистически достоверное отличие от среды без сыворотки.

чувствительность к цитотоксическому действию эндоваилоидов ацилдофаминов. Снижение содержания холестерина в клетках и, прежде всего в цитоплазматической мембране, приводит к повышению цитотоксичности ацилдофаминов, предположительно в результате разрушения рафтов. Данный результат важен для разработки новых терапевтических стратегий борьбы с онкологическими заболеваниями, основанных на использовании эндогенных противораковых соединений и малых молекул, синтезированных на шаблоне их структур.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ, проект 17-54-45059, и DST, проект INT/RUS/RFBR/P-256.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gasperi V., Dainese E., Oddi S., Sabatucci A., Maccarrone M.* GPR55 and its Interaction with Membrane Lipids: Comparison with Other Endocannabinoid-Binding Receptors // *Curr. Med. Chem.* 2012. V. 20. № 1. P. 64–78.
2. *Bezuglov V.V., Zinchenko G.N., Nikitina L.A., Buznikov G.A.* Arachidonoylcholine and O-arachidonoyldimethylaminoethanol as new cholinergic substances // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2001. V. 207. P. 200–203.
3. *Taberner F.J., Fernández-Ballester G., Fernández-Carvajal A., Ferrer-Montiel A.* TRP channels interaction with lipids and its implications in disease // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2015. V. 1848. № 9. P. 1818–1827.
4. *Dainese E., Oddi S., Bari M., Maccarrone M.* Modulation of the Endocannabinoid System by Lipid Rafts // *Curr. Med. Chem.* 2007. V. 14. № 25. P. 2702–2715.
5. *Akimov M.G., Ashba A.M., Gretskaya N.M., Bezuglov V.V.* N-acyl dopamines induce apoptosis in PC12 cell line via the GPR55 receptor activation // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2017. V. 474. № 1. P. 155–158.
6. *Davies J.W., Hainsworth A.H., Guerin C.J., Lambert D.G.* Pharmacology of capsaicin-, anandamide-, and N-arachidonoyl-dopamine-evoked cell death in a homogeneous transient receptor potential vanilloid subtype 1 receptor population // *Br. J. Anaesth.* 2010. V. 104. № 5. P. 596–602.
7. *Bisogno T., Melck D., Bobrov M.Y., Gretskaya N.M., Bezuglov V.V., De Petrocellis L., Di Marzo V.* N-acyl-dopamines: Novel synthetic CB1 cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo // *Biochem. J.* 2000. V. 351. Pt. 3. P. 817–824.
8. *Mandal C.C.* Targeting Intracellular Cholesterol is a Novel Therapeutic Strategy for Cancer Treatment // *J. Cancer Sci. Ther.* 2014. V. 6. № 12. P. 510–513.
9. *Marullo M., Zuccato C., Mariotti C., Lahiri N., Tabrizi S.J., Di Donato S., Cattaneo E.* Expressed Alu repeats as a novel, reliable tool for normalization of real-time quantitative RT-qPCR data // *Genome Biol.* 2010. V. 11. № 1. P. R9.
10. *Wojtalla A., Herweck F., Granzow M., Klein S., Trebicka J., Huss S., Lerner R., Lutz B., Schildberg F.A., Knolle P.A., Sauerbruch T., Singer M.V., Zimmer A., Siegmund S.V.* The endocannabinoid N-arachidonoyl dopamine (NADA) selectively induces oxidative stress-mediated cell death in hepatic stellate cells but not in hepatocytes // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2012. V. 302. № 8. P. G878–887.

THE INFLUENCE OF THE CHOLESTEROL LEVEL IN CELLS ON ENDOVANILLOIDS CYTOTOXICITY

M. G. Akimov^{a, #}, P. V. Dudina^a, A. M. Gamisonia^a, N. M. Gretskaya^a,
G. N. Zinchenko^a, C. C. Mandal^b, and V. V. Bezuglov^a

^a Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

^b School of Life Sciences, Central University of Rajasthan, NH 8, Bandarsindri, Kishangarh, Ajmer-305817, Rajasthan

[#]e-mail: akimovmike@gmail.com, akimovmike@yandex.ru

Presented by Academician of the RAS N.F. Myasoyedov

The influence of the cellular cholesterol content on the cytotoxicity of endovanilloids acyldopamines was studied in the cells MDA-MB-231 and MCF 10A. The activity of acyldopamines depended on the cellular cholesterol content, and a decrease of cholesterol content increased the cytotoxicity of acyldopamines.

Keywords: acyldopamine cytotoxicity, endovanilloids, cholesterol, arachidonoyl dopamine, endocannabinoids