

2-ГЕКСАДЕЦЕНАЛЬ МОДИФИЦИРУЕТ ФУНКЦИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

А.В. Богданова¹, Н.В. Амазгбери¹, Г.Н. Семенкова¹, А.Г. Полешко²,
З.Б. Квачева², О.И. Шадыро¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²Институт биофизики и клеточной инженерии НАН РБ, Минск, Беларусь
bognasty23@mail.ru

Введение. 2-Гексадеценаль (2-ГД) – ненасыщенный жирный альдегид. В организме человека это соединение образуется при необратимом ферментативном расщеплении сфингозин-1-фосфата – сфинголипида, регулирующего процессы пролиферации и апоптоза клеток [1]. Ранее нами установлено, что 2-ГД может образовываться из ряда сфинголипидов неферментативным путем в условиях оксидативного стресса, обусловленного действием γ -, УФ-излучения и H₂O₂ в результате свободнорадикальной фрагментации [2].

Известно, что клетки кожи богаты различными сфинголипидами, такими как церамиды, сфингозин и сфингозин-1-фосфат [3]. Мы предположили, что накопление 2-ГД в результате свободнорадикальной фрагментации сфинголипидов под действием факторов окружающей среды в дермальных фибробластах, которые являются основными компонентами кожи, будет влиять на их функционирование.

В настоящей работе изучено влияние 2-ГД на функции дермальных фибробластов *in vitro*, а именно: на генерацию клетками пероксида водорода, изменение уровня восстановленного глутатиона и митохондриального мембранного потенциала, а также на инициирование апоптотических процессов.

Материалы и методы. Фибробласты выделяли методом миграции из эксплантов кожи здоровых доноров в условиях лаборатории и выращивали *in vitro* в питательной среде ДМЕМ с добавлением 10% сыворотки в условиях 100 % влажности и 5 % содержания CO₂ при температуре 37⁰С. В экспериментах использовали культуры 2-3 пассажей в логарифмической фазе роста.

Уровень восстановленного глутатиона (GSH) в клетках определяли с помощью флуоресцентного зонда монохлоробимана (MCB, $\lambda_{ex} = 390$ нм, $\lambda_{em} = 480$ нм). Результаты представлены как отношение уровня GSH в клетках в присутствии 2-ГД к уровню GSH в контрольном образце. Способность клеток генерировать H₂O₂ оценивали с использованием флуоресцентного зонда H₂DCFDA (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеина диацетат). Величину митохондриального мембранного потенциала определяли с использованием флуоресцентного зонда JC-1 ($\lambda_{ex}=490$ нм, $\lambda_{em}=530, 590$ нм). В качестве положительного контроля к суспензии клеток добавляли разобщитель дыхательной цепи

– карбонилцианид 4-(трифлуорометокси)фенилгидразона (FCCP). Отношение интенсивностей флуоресценции при 590 и 530 нм (I_{590}/I_{530}) пропорционально величине митохондриального мембранного потенциала. Интенсивность флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре CM2203 «Solar» (Беларусь). Апоптоз клеток оценивали с помощью набора Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, согласно методике [4]. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США).

Результаты и обсуждение. Поддержание в клетке постоянного соотношения GSH к окисленному (GSSG) – GSH/GSSG является необходимым для обеспечения ее нормальной жизнедеятельности. GSH является чувствительным маркером оксидативного стресса. Снижение уровня GSH может свидетельствовать об изменении редокс-состояния данных клеток, в частности усиление генерации активных форм кислорода, и является сигналом к индуцированию апоптоза путем активации рецепторов смерти либо запуска митохондриального апоптотического пути [5].

На рис. 1 показано влияние 2-ГД в диапазоне концентраций от 10 до 100 мкмоль/л на уровень GSH в фибробластах. Видно, что в концентрации 10 мкмоль/л этот альдегид не оказывает влияния на уровень GSH в клетках. Инкубирование фибробластов с 2-ГД в концентрациях 25, 50 и 100 мкмоль/л приводит к дозозависимому снижению регистрируемого параметра.

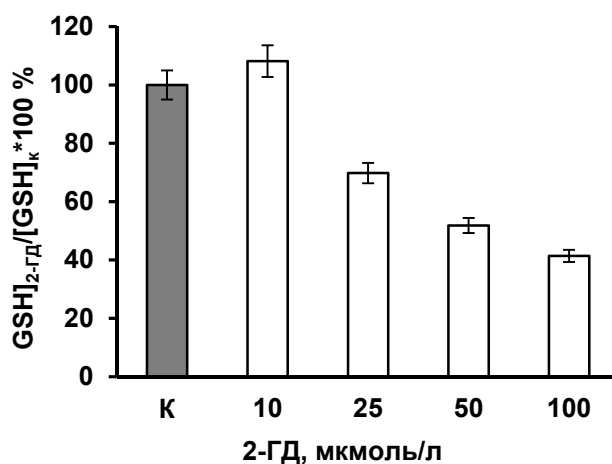


Рисунок 1. – Влияние 2-гексадеценаля на уровень восстановленного глутатиона в культуре фибробластов

Снижение уровня GSH под действием 2-ГД может быть связано с усилением образования активных форм кислорода в этих клетках в результате активации НАДФН-оксидазного комплекса и / или с нарушением функционирования митохондрий. И то, и другое приводит к увеличению продукции супероксидных анион-радикалов, которые легко трансформируются в пероксид водорода. На рисунке 2 представлено влияние 2-ГД на образование H_2O_2 фибробластами. Видно, что с ростом концентрации альдегида происходит увеличение генерации H_2O_2 . Добавление 2-ГД в концентрации 10, 50 и 100 мкмоль/л приводит к увеличению продукции H_2O_2 клетками на 11,87 %, 14,16 % и 22,25 % соответственно.

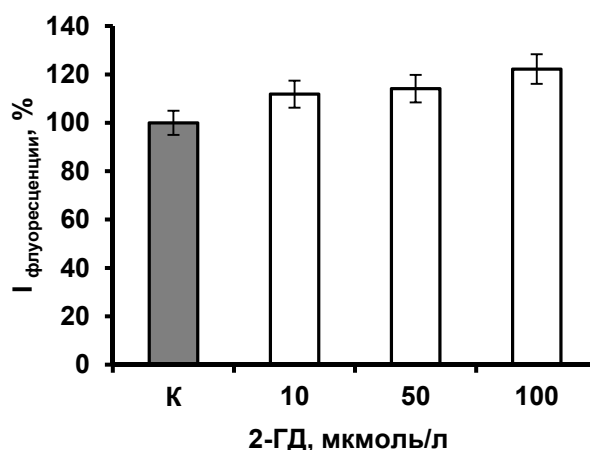


Рисунок 2. – Влияние 2-гексадеценаля на продукцию H_2O_2 фибробластами

Из рис. 3 видно, что 2-ГД в концентрациях 10 и 25 мкмоль/л не влияет на митохондриальный мембранный потенциал. Добавление этого альдегида в концентрациях 50 и 100 мкмоль/л приводит к значительному снижению величины мембранного потенциала митохондрий.

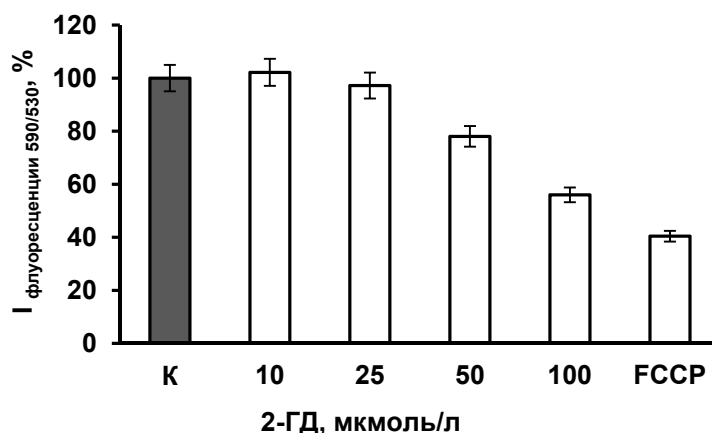


Рисунок 3. – Влияние 2-гексадецаня на митохондриальный мембранный потенциал фибробластов

Одной из причин снижения митохондриального мембранного потенциала может являться индуцирование апоптоза в дермальных фибробластах под действием 2-ГД. На рис. 4 в виде точечных диаграмм представлены результаты влияния 2-ГД на апоптоз фибробластов клеток, инкубированных в течение 4 ч с контрольным раствором (А), с 10 мкмоль/л (Б), 50 мкмоль/л (В) и 100 мкмоль/л (Г) 2-ГД, после окрашивания Annexin V-FITC и PI. На участках Q1, Q2, Q3 и Q4 представлено количество некротических клеток, клеток в стадии позднего апоптоза, живых клеток и клеток в стадии раннего апоптоза соответственно.

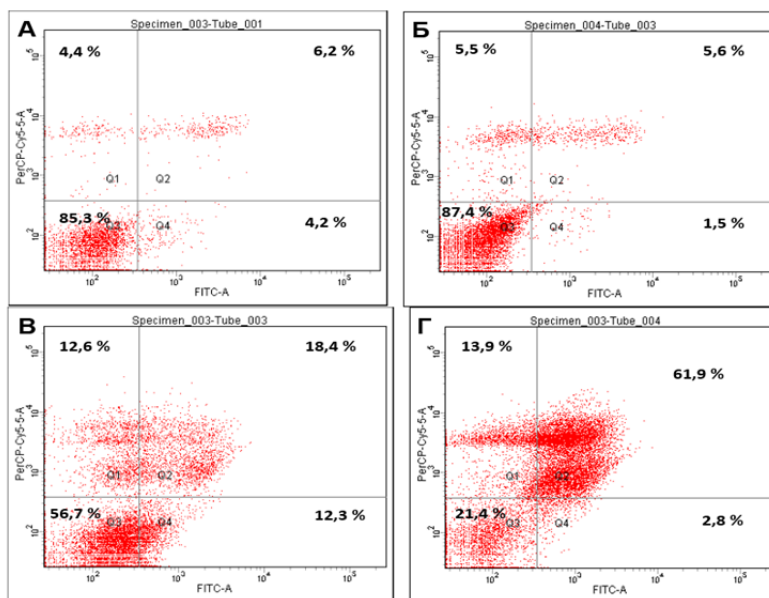


Рисунок 4. – Влияние 2-гексадецаня на апоптоз фибробластов

Из рис. 5 видно, что инкубирование клеток с 10 мкмоль/л 2-ГД в течение 4 ч не влияет на апоптотические процессы в этих клетках. В то же время, обработка клеток 50 и 100 мкмоль/л этого альдегида приводит к снижению количества живых клеток. При этом возрастает число клеток в стадиях раннего и позднего апоптоза.

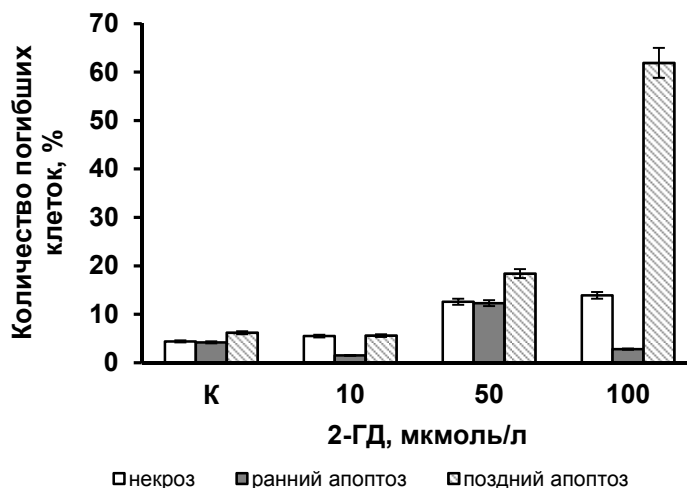


Рисунок 5. – Количество апоптотических фибробластов при действии 2-гексадеценаля

Заключение. Таким образом, из полученных данных следует, что при действии 2-ГД наблюдается дозозависимое изменение редокс-активности дермальных фибробластов. Это выражается в уменьшении уровня восстановленного глутатиона в цитоплазме клеток, увеличении продукции пероксида водорода и уменьшении митохондриального мембранного потенциала. Изменение редокс-состояния фибробластов под действием 2-ГД сопровождается индуцированием апоптоза.

Список использованных источников

1. Hannun, Y.A. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease / Y.A. Hannun, L.M. Obeid // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2018. – Vol. 19(3). – P. 175–191.
2. Shadyro, O. Free-radical destruction of sphingolipids resulting in 2-hexadecenal formation / O. Shadyro, A. Lisovskaya, G. Semenkova, I. Edimecheva, N. Amaegberi // *Lipid insights.* – 2015. – Vol. 8. – P. 1–9.
3. Driskel, R. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin / R. Driskel, F. Watt // *Trends in Cell Biology.* – 2015. – Vol. 25 (2). – P. 92-99.
4. Measurement of apoptosis in cell culture // *Methods in biotechnology, animal cell biotechnology: methods and protocols*, 2nd ed. / A. Ishaque, M. Al-Rubeai; ed. R. Pörtner. – Totowa, 2007. – P. 285–299.
5. Circu, M.L. Glutathione and modulation of cell apoptosis / M.L. Circu, T.Y. Aw // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1823. – P. 1767–1777.