

## МОДИФИКАЦИЯ ФУНКЦИЙ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ 2-ГЕКСАДЕЦЕНАЛЕМ

А. В. Богданова<sup>1</sup>, Г. Н. Семенкова<sup>1</sup>, А. Г. Полешко<sup>2</sup>, З. Б. Квачева<sup>2</sup>,  
О. И. Шадыро<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН РБ, Минск, Беларусь

*bognasty23@mail.ru*

науч. рук. – Семенкова Г.Н., канд. биол. наук, доц.

2-Гексадеценаль (2-ГД) – ненасыщенный жирный альдегид, который может образовываться в организме ферментативным и неферментативным путём (в условиях оксидативного стресса). Накопление 2-ГД в организме под действием факторов окружающей среды, в частности под действием УФ-излучения, может изменять функциональную активность фибробластов кожи. Установлено, что 2-ГД при экзогенном воздействии на дермальные фибробласты вызывает дозозависимое изменение редокс-активности клеток. Это выражается в уменьшении уровня восстановленного глутатиона, увеличении продукции пероксида водорода и уменьшении митохондриального мембранного потенциала. Изменение редокс-состояния фибробластов под действием 2-гексадеценала реализуется в индуцировании апоптоза.

**Ключевые слова:** 2-гексадеценаль; дермальные фибробласты; восстановленный глутатион; митохондриальный мембранный потенциал; апоптоз.

### ВВЕДЕНИЕ

В норме в организме человека 2-ГД является продуктом необратимого ферментативного расщепления сфингозин-1-фосфата –сфинголипида, регулирующего пролиферацию и апоптоз клеток [1]. Ранее было установлено, что 2-ГД может образовываться из ряда сфинголипидов неферментативно в условиях оксидативного стресса, обусловленного действием  $\gamma$ -, УФ-излучения и НОС1 в результате свободнорадикальной деструкции, ключевой стадией которой является фрагментация N-центрированных радикалов [2].

Важными компонентами кожи являются фибробласты, преимущественно локализованные в дермальном слое. 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 УФ-излучения, в этих клетках будет влиять на их функционирование. В настоящей работе исследовано влияние 2-ГД на функции дермальных фибробластов, а именно: на генерацию клетками пероксида водорода, изменение уровня

восстановленного глутатиона и митохондриального мембранного потенциала, а также на инициирование апоптотических процессов.

**Материалы и методы.** Уровень восстановленного глутатиона (GSH) в фибробластах определяли с помощью флуоресцентного зонда монохлоробимана (МСВ,  $\lambda_{ex} = 390$  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  $H_2O_2$  оценивали с использованием флуоресцентного зонда  $H_2DCFDA$  (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. Апоптоз клеток оценивали с помощью набора Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, согласно методике [4]. Интенсивность флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре CM2203 «Solar» (Беларусь). Апоптоз исследовали на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Восстановленный глутатион (GSH) является чувствительным маркером оксидативного стресса. Уменьшение содержания GSH в клетках связано с ростом продукции активных форм кислорода и является сигналом к индукции 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 восстановленного глутатиона (GSH) в фибробластах.

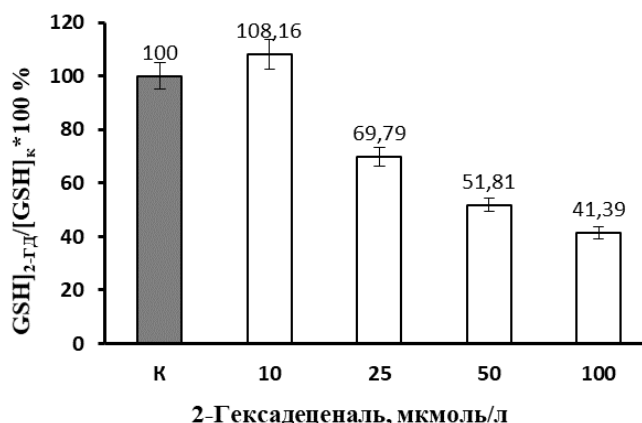


Рис.1 – Влияние 2-гексадеценала на уровень восстановленного глутатиона в фибробластах

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.

Усиление генерации  $H_2O_2$  также может быть обусловлено изменением редокс-активности фибробластов, что связано с нарушением функционирования митохондрий. 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 снижению величины мембранного потенциала митохондрий.

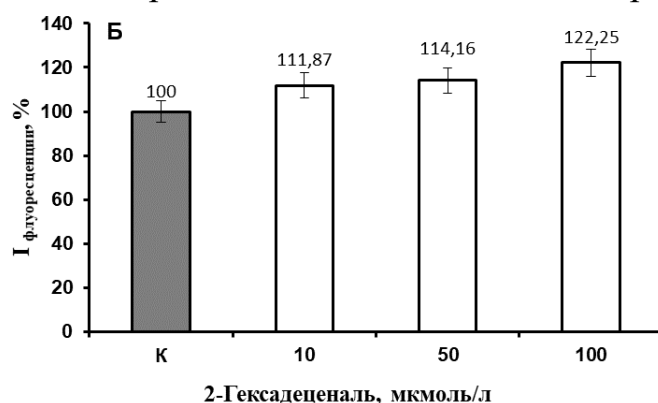


Рис. 2 – Влияние 2-гексадеценала на продукцию  $H_2O_2$  фибробластами

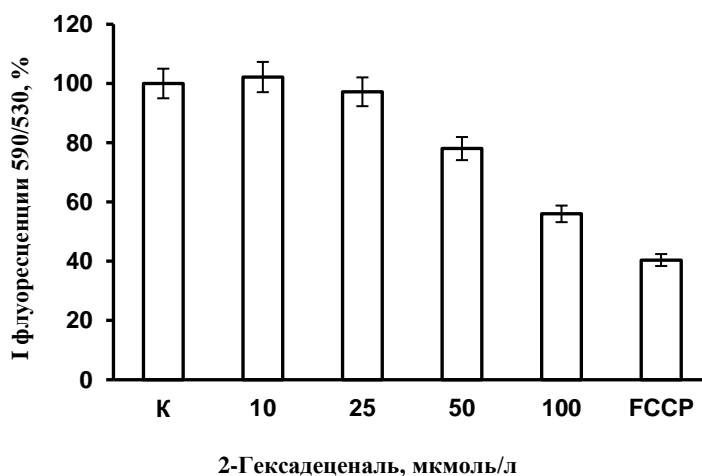


Рис. 3 – Влияние 2-гексадеценала на митохондриальный мембранный потенциал фибробластов

Одной из причин снижения митохондриального мембранного потенциала может быть индуцирование апоптоза. Из рис. 4 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.

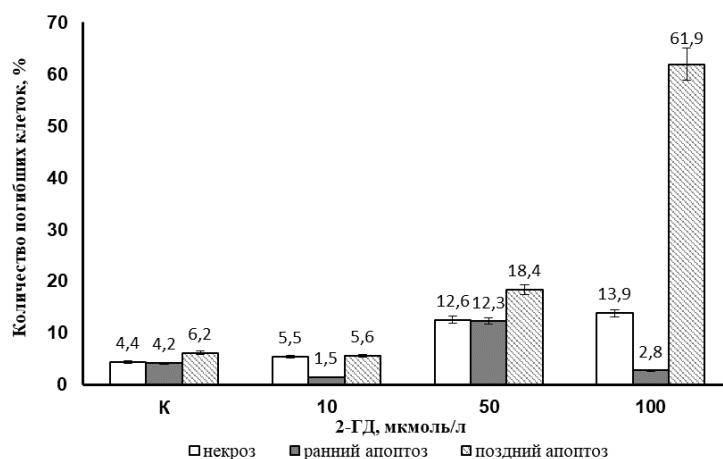


Рис.4 – Апоптоз фибробластов при действии 2-гексадеценаля

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, из полученных данных следует, что при действии 2-гексадеценаля на фибробласты 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-гексадеценаля реализуется в индуцировании апоптоза.

## Библиографические ссылки

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