

УДК 577.344.3:577.152.634

МОДИФИКАЦИЯ РЕДОКС-ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ С6 ПРОДУКТОМ ДЕСТРУКЦИИ СФИНГОЛИПИДОВ 2-ГЕКСАДЕЦЕНАЛЕМ

© 2019 г. Н.В. Амаэбери*, Г.Н. Семенкова*, А.Г. Лисовская* **, З.Б. Квачева***, О.И. Шадыро*

*Белорусский государственный университет, 220030, Минск, просп. Независимости, 4, Беларусь

**Университет Нотр-Дам, 46556 Нотр-Дам, Индиана, США

***Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, Беларусь
E-mail: galina_semenkova@yahoo.com

Поступила в редакцию 22.01.2019 г.

После доработки 22.01.2019 г.

Принята к публикации 18.02.2019 г.

2-Гексадеценаль – ненасыщенный альдегид, который образуется при свободнорадикальной деструкции сфинголипидов в условиях оксидативного стресса и проявляет биологическую активность посредством ингибирования пролиферации и индуцирования апоптоза. Представлены результаты исследования модифицирующего влияния этого альдегида на редокс-процессы, протекающие в клетках глиомы крысы С6. Показано, что культивирование клеток с 2-гексадеценалем в концентрациях от 3,5 до 35 мкмоль/л приводит к значительному увеличению, а при более высоких концентрациях – снижению выхода индуцируемых менадионом супероксидных анион-радикалов. Выявлено, что дополнительная продукция $O_2^{\cdot-}$ при действии 2-гексадеценала на клетки полностью подавляется в присутствии ингибиторов стресс-активируемых МАП-киназ, участвующих в запуске апоптоза, таких как JNK, p38 и ERK1/2. Модифицирующие эффекты 2-гексадеценала начинают проявляться на ранних стадиях его взаимодействия с клетками, что проявляется в увеличении продукции супероксидных анион-радикалов митохондриями и уменьшении внутриклеточного уровня восстановленного глутатиона. Предполагается, что модификация редокс-состояния клеток С6 является начальным этапом процесса внутриклеточной сигнализации, в котором 2-гексадеценаль играет роль сигнальной молекулы.

Ключевые слова: 2-гексадеценаль, сфинголипиды, активные формы кислорода, клетки глиомы крысы С6, митохондрии, глутатион.

DOI: 10.1134/S0006302919030153

Сфинголипиды широко распространены в мозге и представляют класс липидов, содержащих фрагмент аминспирта, среди которых наиболее часто встречается сфингозин. Эти соединения участвуют в формировании мембранных структур, опосредуют в организме процессы межклеточных коммуникаций, осуществляют лиганд-рецепторные взаимодействия [1]. Выполняя роль сигнальных молекул, сфинголипиды регулируют ряд важных клеточных функций. Так, сфингозин и церамид индуцируют в клетках апоптоз, в то время как их фосфорилированные производные сфингозин-1-фосфат (С1Ф) и церамид-1-фосфат способствуют росту и выживаемости клеток [2]. Согласно концепции «сфинголипидного реостата», смещение равновесия между

церамидом и С1Ф в сторону образования одного из этих сфинголипидов является ключевым фактором, определяющим судьбу клетки [3]. Изменение содержания С1Ф в клетках приводит к модификации их функций и развитию таких патологических состояний, как диабет, атеросклероз, остеопороз, рак. В частности, при раке простаты, поджелудочной железы, желудка, молочной железы, глиоме С1Ф способствует росту опухоли и метастазированию [4]. Количество С1Ф контролируется в организме сфингозинкиназами 1 и 2 (2.7.1.91), фосфорилирующими сфингозин, и сфингозин-1-фосфат-лиазой (4.1.2.273), которая катализирует деструкцию С1Ф с образованием ненасыщенного алифатического альдегида – 2-гексадеценала (2-ГД). В то же время нами и другими авторами установлен ферментативный путь образования 2-ГД при действии γ -, УФ-излучения и НОС1 на ряд сфинголипидов, таких как сфингозин, сфингозин-1-фосфохолин, С1Ф

Сокращения: 2-ГД – 2-гексадеценаль, АФК – активные формы кислорода, ФБР – фосфатный буферный раствор, PI – иодид пропидиума, GSH – восстановленный глутатион.

и др. [5-8]. Показано, что действие на клетки глиомы НОС1, продуцируемой в галогенирующем цикле миелопероксидазы, индуцирует свободнорадикальную деструкцию сфинголипидов с образованием 2-ГД [8].

Биологическая роль 2-ГД практически не изучена. Saba и соавторы показали, что 2-ГД проявляет биологическую активность посредством реорганизации цитоскелета и индуцирования апоптоза по JNK-зависимому механизму в клетках HeLa, HEK293T, NIH3T3 [9]. Обладая высокой реакционной способностью, этот ненасыщенный альдегид взаимодействует с белками, углеводами, нуклеиновыми кислотами. Выявлено, что 2-ГД образует конъюгаты с глутатионом и аддукты с аминокислотами и белками. Такие продукты были обнаружены в лизатах клеток НерG2, которые предварительно инкубировали с 2-ГД. [10]. Этот альдегид вступает в реакции с дезоксигуанозином и ДНК, с образованием циклического аддукта, что может приводить к мутагенным последствиям [11].

Ранее нами установлено, что 2-ГД вызывает снижение пролиферативной и митотической активности клеток глиомы крысы С6, вызывая изменение динамики митоза, модифицируя цитоскелет и индуцируя апоптоз. Было также показано, что в процессы регуляции пролиферативной активности клеток глиомы при действии 2-ГД вовлечены стресс-активируемые МАП-киназы [12, 13]. Исходя из этого, мы предположили, что снижение пролиферативной активности при действии 2-ГД на клетки С6 сопряжено с изменением протекающих в них редокс-процессов, обусловленных образованием активных форм кислорода (АФК). Подтверждение этого предположения и явилось целью настоящей работы. В связи с этим, нами изучена модификация способности клеток глиомы крысы С6 генерировать АФК после обработки 2-ГД, установлено влияние на этот процесс ряда специфических ингибиторов стресс-активируемых МАП-киназ, а также определено изменение продукции $O_2^{\cdot -}$ митохондриями и уровня восстановленного глутатиона в цитоплазме на ранних стадиях действия этого ненасыщенного альдегида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Питательная среда DMEM, сыворотка плодов коров, SP600125, SB202190, PD98059, MitoSOX Red, монохлоробиман (МСВ), иодида пропиридиум, бычий сывороточный альбумин (БСА), тритон X-100, менадион, люцигенин, (Sigma, St. Louis, MO, USA), гентамицин, фосфатный буферный раствор (рН 7,4) (ФБР), Анализ X (Минск, Беларусь). Сбалансированный буферный солевой раствор (СБСР) Эрла собственного приготовления включал 116,2 ммоль/л NaCl,

5,4 ммоль/л KCl, 0,9 ммоль/л $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 0,8 ммоль/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,8 ммоль/л $CaCl_2$, 26,2 ммоль/л $NaHCO_3$, 5,6 ммоль/л глюкозы.

Приготовление дисперсий 2-гексадеценаля.

2-ГД синтезировали по методу, описанному в работе [14]. Полученный альдегид растворяли в смеси хлороформ/метанол (соотношение 2 : 1, по объему). Растворитель на ротаторном испарителе и выдерживали в токе азота для полного удаления растворителя. 2-ГД растворяли в ФБР, содержащем 0,18% БСА и 150 ммоль/л хлорида натрия при энергичном встряхивании, а затем обрабатывали на ультразвуковой бане Bandelin Sonorex (35 кГц, 60/120 Вт) в течение трех минут. Концентрация 2-ГД в рабочем растворе составляла 35 ммоль/л [9].

Культура клеток глиомы крысы линии С6. Перевиваемая линия клеток глиомы крысы С6 получена из коллекции культур клеток Института цитологии, г. Санкт-Петербург. Клетки (70 тыс/мл) культивировали в питательной среде DMEM, обогащенной L-глутамином, $NaHCO_3$ и NEPES, с добавлением 10 % сыворотки плодов коров и 100 мкг/мл гентамицина. В опытах использовали двухсуточную культуру, после образования 80–90 % монослоя.

Определение жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток определяли флуоресцентным методом с использованием иодида пропиридиума (PI) на спектрофлуориметре (СМ 2203 «Солар», Беларусь) [15]. К образцам клеточных культур добавляли ФБР, содержащий 0,18 % БСА и 150 ммоль/л хлорида натрия (контроль) или 2-ГД в диапазоне концентраций 0,1–350 мкмоль/л и культивировали клетки в течение 24 ч. После этого клеточный монослой дважды промывали ФБР, переводили клетки в суспензию и вносили раствор PI в концентрации 1 мкмоль/л. Образцы перемешивали в течение 5 мин и измеряли интенсивность флуоресценции F_{d1} ($\lambda_{возб} = 530$ нм, $\lambda_{рег} = 640$ нм). Затем клетки разрушали с помощью 10 % раствора тритон X-100 и регистрировали интенсивность флуоресценции F_{t1} . Жизнеспособность клеток рассчитывали по формуле (1):

$$\frac{(F_{t1} - F_{t2}) - (F_{d1} - F_{d2})}{(F_{t1} - F_{t2})} \cdot 100\% \quad (1)$$

где F_{d2} и F_{t2} – параметры интенсивности флуоресценции PI и тритон X-100 в ФБР соответственно.

Изучение генерации супероксидных анион-радикалов клетками. Образование супероксидных анион-радикалов клетками оценивали хемиллюминесцентным методом с применением в каче-

Жизнеспособность клеток С6 при действии 2-гексадеценала

Концентрация 2-ГД, мкмоль/л	Жизнеспособность клеток С6, %
0 (контроль)	100 ± 2,1
10	99,01 ± 1,9
35	99,74 ± 3,2
75	98,43 ± 2,4
100	96,76 ± 2,6
350	62,82 ± 1,5**

Примечание. Время культивирования с 2-ГД составляло 24 ч. Измерения проводили с использованием Р1 ($\lambda_{\text{возб}} = 530$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 640$ нм). Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение ($n = 3$), ** – $P < 0.01$ по сравнению с контролем.

стве эмиттера свечения люцигенина при температуре 37°C и рН 7,4 на установке для регистрации слабых световых потоков БХЛ-1 (БГУ, Беларусь) с использованием системы получения и обработки информации «Unichrom» (Новые аналитические системы, Беларусь) [16]. Измерение люцигенинопосредованной хемилюминесценции (ЛюцХЛ) проводили в сбалансированном буферном солевом растворе (СБСР) Эрла. В образцы клеточных культур вносили контрольный раствор либо 2-ГД в концентрациях от 0,1 до 350 мкмоль/л и культивировали в течение 24 ч. Для исследования влияния 2-ГД на процессы внутриклеточной сигнализации, к клеткам добавляли 20 мкмоль/л PD98059, 0,3 мкмоль/л SB202190 либо 0,1 мкмоль/л SP600125 и инкубировали образцы в течение 30 мин, после чего добавляли контрольный раствор либо 2-ГД в концентрации 35 мкмоль/л и культивировали в течение 24 ч. Клеточный монослой промывали СБРЭ, клетки переводили в суспензию, добавляли люцигенин ($2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и регистрировали кинетические зависимости интенсивности хемилюминесценции. Генерацию $O_2^{\cdot-}$ клетками С6 индуцировали добавлением $3 \cdot 10^{-5}$ моль/л менадиона. Затем определяли интегральную интенсивность хемилюминесценции ($\Sigma I_{\text{ХЛ}}$) за 10 мин, прошедших после введения менадиона в клеточную суспензию.

Исследование генерации $O_2^{\cdot-}$ в митохондриях клеток. Образование $O_2^{\cdot-}$ в митохондриях клеток С6 изучали флуоресцентным методом с использованием зонда MitoSOX Red ($\lambda_{\text{возб}} = 510$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 580$ нм). Клеточный монослой промывали

ФБР, переводили в суспензию и инкубировали с 1,25 мкмоль/л MitoSOX Red в течение 20 мин. Затем клетки дважды отмывали ФБР, добавляли контрольный раствор либо 2-ГД в диапазоне концентраций 0,1–350 мкмоль/л, инкубировали в течение 40 мин при 37°C и регистрировали флуоресценцию. Генерацию $O_2^{\cdot-}$ в образце, содержащем контрольный раствор, принимали равной 100%.

Определение уровня восстановленного глутатиона в клетках. Уровень восстановленного глутатиона (GSH) в клетках С6 определяли с помощью флуоресцентного зонда монохлоробимана (МСВ, $\lambda_{\text{возб}} = 390$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 480$ нм). К клеткам добавляли контрольный раствор либо 2-ГД в диапазоне концентраций 0,1–350 мкмоль/л и инкубировали в течение 30 или 60 мин, либо 4 ч при 37°C. Полученный монослой промывали ФБР, клетки переводили в суспензию и инкубировали с 10 мкмоль/л МСВ в течение 30 мин при 37°C, затем дважды промывали ФБР и регистрировали флуоресценцию. Результаты представлены как отношение уровня GSH в клетках в присутствии 2-ГД к уровню GSH в контрольном образце.

Статистическая обработка результатов. Для статистической обработки результатов использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Отличия между контрольной и экспериментальными группами анализировали с помощью теста Даннета. Результаты представлены как среднее значение трех и более независимых экспериментов ± стандартное отклонение. Результаты считали достоверными при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние 2-ГД на жизнеспособность клеток. Для того чтобы определить, при каких концентрациях 2-ГД может оказывать регулирующее влияние на функции клеток, а при каких воздействие этого альдегида связано с его цитотоксичностью, нами изучена жизнеспособность клеток С6 через 24 ч после добавления 2-ГД в среду культивирования. Результаты представлены в таблице. Методом флуоресценции с использованием Р1 выявлено, что культивирование клеток с 2-ГД в концентрациях 10, 35, 75 и 100 мкмоль/л не влияет на их жизнеспособность. Из этого следует, что при таких концентрациях 2-ГД не вызывает разрушения клеток. При добавлении 350 мкмоль/л исследуемого альдегида в среду культивирования наблюдается снижение жизнеспособности клеток на $(37,18 \pm 1,6)$ %, что свидетельствует о гибели части клеток в этих условиях по механизму некроза.

Модификация процессов образования супероксидных анион-радикалов в клетках глиомы. Для

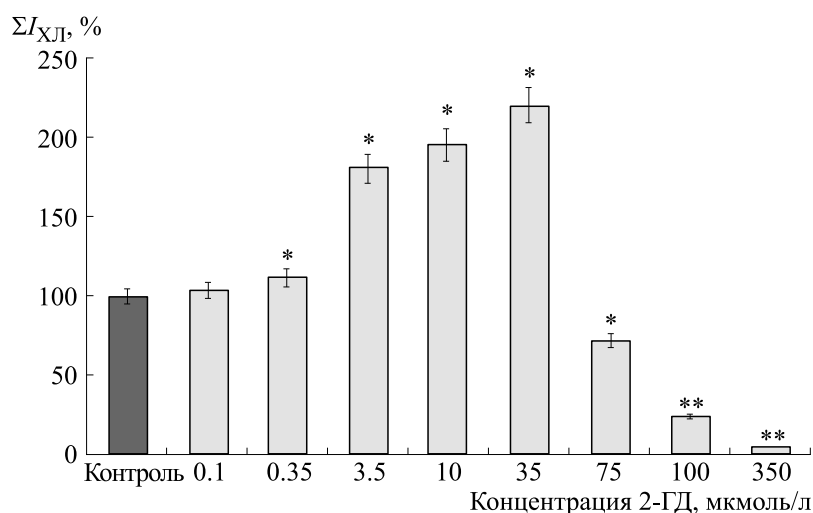


Рис. 1. Индуцированная менадионом генерация супероксидных анион-радикалов клетками С6, обработанными (светлые столбики) и необработанными (контроль, темный столбик) 2-гексадециалем. Время культивирования клеток с 2-ГД – 24 ч. По оси ординат – суммарная интенсивность ЛюцХЛ, измеренная в течение 10 мин после добавления менадиона. Концентрация люцигенина $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, менадиона – $3 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$); * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ по сравнению с контролем.

изучения влияния 2-ГД на продукцию супероксидных анион-радикалов в клетках С6 нами исследована индуцированная менадионом люцигенин-опосредованная хемилюминесценция клеток, обработанных этим альдегидом до начала культивирования (рис. 1). Менадион (2-метил-1,4-нафтохинон) проникает через плазматические мембраны и подвергается либо одноэлектронному, либо двухэлектронному восстановлению внутриклеточными оксидоредуктазами до семихинона или гидрохинона соответственно [17]. В процессе аутоокисления семихинон продуцирует супероксидные анион-радикалы. Известно, что интенсивность хемилюминесценции клеток С6, зарегистрированной с помощью люцигенина, коррелирует с образованием в них $O_2^{\cdot-}$ [19]. Из рис. 1 видно, что культивирование клеток глиомы с 2-ГД в концентрациях 0,1 и 0,35 мкмоль/л в течение 24 ч практически не влияет на генерацию супероксидных анион-радикалов. Добавление исследуемого альдегида в диапазоне концентраций 3,5–35 мкмоль/л приводит к увеличению выхода $O_2^{\cdot-}$ на $(80,7 \pm 4,2) - (120 \pm 4,6)\%$. А при культивировании клеток с 2-ГД в концентрациях от 75 до 350 мкмоль/л в течение 24 ч наблюдается снижение генерации супероксидных анион-радикалов по сравнению с контролем на $(27,8 \pm 3,8) - (95,8 \pm 2,7)\%$.

Супероксидные анион-радикалы в клетках трансформируются в пероксид водорода, который в свою очередь активирует ряд белков, участвующих в процессах внутриклеточной сигнализации и отвечающих за пролиферацию и апоптоз [20]. На рис. 2 показано влияние 2-ГД на генера-

цию супероксидных анион-радикалов клетками глиомы в присутствии специфических ингибиторов стресс-активируемых МАП-киназ. Как сле-

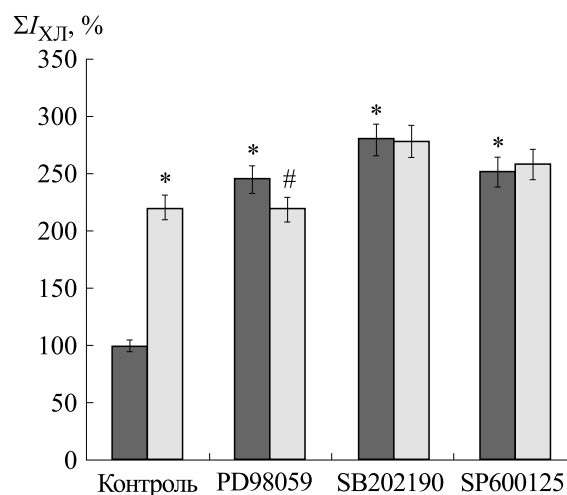


Рис. 2. Влияние 2-гексадециала на генерацию супероксидных анион-радикалов клетками глиомы в присутствии ингибиторов стресс-чувствительных МАПК (PD98059 – ингибитор ERK1/2–МАПК, SB202190 – p38–МАПК, SP600125 – JNK–МАПК). Контроль – клетки, не обработанные ингибиторами; серые столбики – клетки, не обработанные 2-ГД, светлые столбики – клетки, обработанные 2-ГД. Время культивирования клеток с 2-ГД – 24 ч. По оси ординат – суммарная интенсивность ЛюцХЛ, измеренная в течение 10 мин после добавления менадиона. Концентрация люцигенина $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, менадиона – $3 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$); * – $P < 0,05$, # – $P < 0,05$ по сравнению с соответствующим ингибитором, не содержащим 2-ГД.

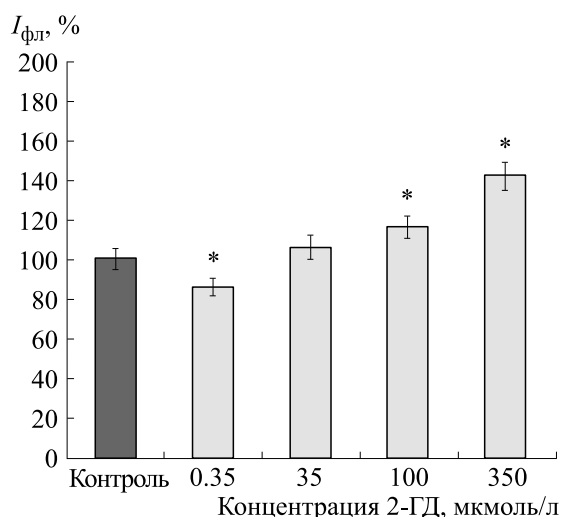


Рис. 3. Влияние 2-гексадеценаля на генерацию супероксидных анион-радикалов митохондриями клеток глиомы. Время инкубирования с 2-ГД – 40 мин. Измерения проводили с использованием флуоресцентного зонда MitoSOX Red ($\lambda_{возб} = 510$ нм, $\lambda_{рег} = 580$ нм). К – клетки, необработанные 2-ГД, светлые столбики – клетки, обработанные 2-ГД. По оси ординат – интенсивность флуоресценции. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$); * – $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

дует из представленных данных, предварительное инкубирование клеток С6 с ингибиторами МАП-киназ ERK1/2 (PD98059), p38 (SB202190) и JNK (SP600125) в отсутствие 2-ГД приводит к росту продукции $O_2^{\cdot-}$ в клетках глиомы на $(124 \pm 0,5) \%$, $(178,8 \pm 4,1) \%$ и $(150,9 \pm 3,5) \%$ соответственно. Добавление 35 мкмоль/л 2-ГД к образцам клеток, содержащим ингибиторы, практически не влияет на уровень ЛюцХЛ по сравнению с образцами, в которых ингибиторы присутствовали, а 2-ГД отсутствовал. Следовательно, 2-ГД в присутствии ингибиторов стресс-активируемых МАПК не способен индуцировать дополнительное образование $O_2^{\cdot-}$ в клетках С6.

Важным источником супероксидных анион-радикалов в клетках являются митохондрии [21]. В связи с этим нами изучено влияние 2-ГД на генерацию супероксидных анион-радикалов митохондриями клеток глиомы, которую регистрировали с использованием специфического флуоресцентного зонда MitoSOX Red через 40 мин после добавления этого альдегида. Из рис. 3 видно, что воздействие 2-ГД в диапазоне концентраций 100–350 мкмоль/л приводит к увеличению продукции $O_2^{\cdot-}$ митохондриями клеток С6 на $(6 \pm 2,1) - (42 \pm 3,6) \%$ по сравнению с контролем. При снижении концентрации исследуемого альдегида до 0,35 мкмоль/л наблюдается незначи-

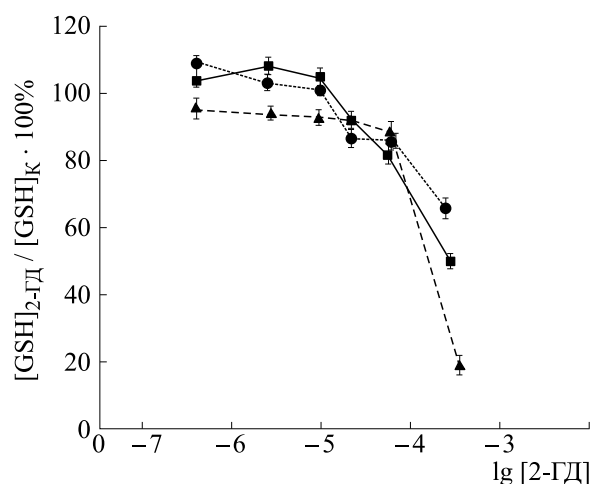


Рис. 4. Влияние 2-гексадеценаля на уровень восстановленного глутатиона в клетках глиомы. Восстановленный глутатион измеряли с использованием флуоресцентного зонда МСВ ($\lambda_{возб} = 390$ нм, $\lambda_{рег} = 480$ нм) через 30 мин (●), 60 мин (■) и 4 ч (▲) после обработки клеток 2-ГД. $[GSH]_{2-ГД}$ – уровень восстановленного глутатиона в клетках, обработанных 2-ГД. $[GSH]_К$ – уровень восстановленного глутатиона в клетках, необработанных 2-ГД. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 5$), $P < 0,05$.

тельное уменьшение продукции $O_2^{\cdot-}$ митохондриями клеток глиомы на $(14 \pm 2,3) \%$.

Изменение уровня восстановленного глутатиона в клетках С6 после обработки 2-гексадеценалем. Одним из ключевых элементов антиоксидантной системы клеток, обеспечивающих их защиту от продуктов оксидативного стресса, является глутатион. Нами исследовано изменение уровня восстановленного глутатиона (GSH) в клетках С6 после инкубирования с 2-ГД в течение 30, 60 мин и 4 ч (рис. 4). Видно, что инкубирование клеток с 2-ГД в концентрациях от 0,35 до 3,5 мкмоль/л 30 и 60 мин практически не влияет на уровень GSH. Увеличение концентрации исследуемого альдегида (35 и 100 мкмоль/л) приводит к снижению уровня GSH на $(20 \pm 2,3) \%$ и $(36 \pm 3,6) \%$ соответственно. Более значительные изменения содержания восстановленного глутатиона (уменьшение на $(40 \pm 2,9) \%$ и $(54,5 \pm 2,2) \%$) наблюдалось через 30 и 60 мин после внесения в среду культивирования 350 мкмоль/л 2-ГД. Инкубирование клеток глиомы с 2-ГД (от 0,35 до 100 мкмоль/л) в течение 4 ч приводило к снижению уровня GSH на $(10 \pm 1,8) - (22 \pm 2,4) \%$, а в концентрации 350 мкмоль/л – на $(80 \pm 1,4) \%$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Редокс-процессы, обусловленные образованием АФК, считаются ключевыми в изменении

программ клеточной дифференцировки, пролиферации и апоптоза [22]. Известно, что АФК, с одной стороны, стимулируют пролиферацию опухолевых клеток, а с другой — индуцируют апоптоз, посредством активации связанных с ростом либо гибелью клеток сигнальных путей [23, 24]. Пероксид водорода регулирует активность участвующих в сигнализации белков через обратимое окисление их мишеней, включая тирозинфосфатазы, тирозинкиназы и факторы транскрипции [25–26]. В диапазоне физиологических концентраций H_2O_2 модифицирует морфологические и функциональные свойства клеток перевиваемой глиомы крысы С6, усиливая пролиферативную активность и увеличивая продукцию супероксидных анион-радикалов [27]. Для НОС1 в микромолярных концентрациях обнаружено стимулирующее действие на клетки, что выражается в усилении секреторной дегрануляции в нейтрофилах [28], а также в снижении пролиферативной и митотической активности клеток С6 посредством индуцирования апоптоза [29].

При онкологических и нейродегенеративных заболеваниях, инсульте, черепно-мозговых травмах происходит инфильтрация нейтрофилами пораженного участка головного мозга и формируется очаг воспаления, в котором происходит образование активных метаболитов кислорода и хлора [30, 31]. Гиперпродукция хлорноватистой кислоты может вызывать фрагментацию сфинголипидов с образованием 2-ГД, как это было показано нами ранее для клеток глиомы С6 [8]. Этот альдегид вызывает снижение пролиферативной и митотической активности клеток С6, индуцируя апоптоз [12]. Примечательно, что при действии 2-ГД на эти клетки в процессы регуляции пролиферативной активности вовлечены ERK1/2, JNK- и p38-МАП-киназы, которые по данным авторов работы [13] активируются пероксидом водорода. Следовательно, стресс-активируемые МАПК либо вовлечены в процессы генерации $O_2^{\cdot-}$ клетками глиомы под действием 2-ГД, либо эти белки эффективно утилизируют H_2O_2 , образуемый при дисмутации супероксидных анион-радикалов.

Результаты, представленные в этой работе, демонстрируют модифицирующее влияние 2-ГД на редокс-активность клеток С6. При низких концентрациях 2-ГД увеличивает индуцированную менадионом продукцию супероксидных анион-радикалов. При этом максимальный выход $O_2^{\cdot-}$, в 2,3 раза превышающий контрольные значения, наблюдается при такой же концентрации 2-ГД (35 мкмоль/л) (рис. 1), при которой наблюдалось заметное ингибирование пролиферативной и митотической активности клеток С6 за счет усиления апоптоза [12]. Однако дальнейшее повыше-

ние концентрации 2-ГД вызывало значительное снижение по сравнению с контролем выхода супероксидных анион-радикалов. Следует отметить, что такой эффект не связан с цитотоксичностью альдегида при его концентрации до 100 мкмоль/л (табл. 1).

Мы предположили, что 2-ГД может влиять на функции клеток С6, изменяя вклад компонентов сигнальных путей в генерацию АФК. Это предположение подтверждается результатами, представленными на рис. 2. Видно, что эффект усиления индуцированной менадионом продукции супероксидных анион-радикалов клетками С6, обработанными 2-ГД, подавляется в присутствии специфических ингибиторов компонентов сигнальных путей, таких как ERK1/2-, p38- и JNK-МАПК (рис.2). Эти результаты коррелируют с полученными ранее данными о механизмах влияния 2-ГД на пролиферацию клеток С6 [12]. Как уже отмечалось, генерация супероксидных анион-радикалов при действии менадиона является результатом одноэлектронного восстановления этого хинона до семихинона при участии флавино-содержащих ферментов (NADH-убихинон-оксидоредуктаза (1.6.5.3) электронтранспортной цепи митохондрий, P-450-редуктаза (1.6.2.4), NADH-цитохром- b_5 -редуктаза (1.6.2.2)), который затем спонтанно взаимодействует с молекулярным кислородом с образованием $O_2^{\cdot-}$ [32]. В литературе нет сведений об участии ингибируемых нами МАПК в генерации АФК, обусловленной действием менадиона на клетки. В то же время эти киназы являются стресс-чувствительными [13]. Так, показано, что активация пероксидом водорода сигнальных путей с участием PI3K/AKT и МАПК/ERK играет ключевую роль в регуляции процессов онкогенеза, ангиогенеза и метастазирования [33]. H_2O_2 активирует JNK-МАПК [34, 35], которая инактивирует антиапоптотические белки Bcl-2 и Bcl-XL [32]. Воздействие АФК на клетки вызывает активацию p38-МАПК, также участвующей в индукции апоптоза [33]. Суммируя полученные нами результаты и литературные данные можно полагать, что индуцированное менадионом дополнительное образование супероксидных анион-радикалов в клетках С6 через 24 ч после их обработки 2-ГД необходимо для дальнейшей активации МАПК, участвующих в регуляции пролиферации и запуске апоптоза.

Важным источником АФК в клетках являются митохондрии. Образование АФК в митохондриях происходит в результате утечки электронов с комплексов I и III электронтранспортной цепи [4]. Первичной формой митохондриальных АФК являются супероксидные анион-радикалы, которые преобразуются в пероксид водорода. H_2O_2

митохондрий регулирует процессы дезактивации генов-супрессоров опухолей [36], экспрессии онкогенов, мутации мДНК [37]. Однако, несмотря на митогенное действие АФК митохондрий, в больших концентрациях эти активные интермедиаты проявляют токсическое действие на опухолевые клетки, индуцируя апоптоз или некроз [38, 39]. Нами показано, что уже на ранних стадиях воздействия 2-ГД (через 40 мин после добавления альдегида к клеткам) наблюдается дозозависимое увеличение продукции супероксидных анион-радикалов митохондриями (рис. 3). Это дает основание полагать, что повышение выхода митохондриальных АФК после обработки клеток глиомы 2-ГД может быть сопряжено с индуцированием апоптоза.

Нарушение редокс-состояния клеток связано с изменением уровня внутриклеточного восстановленного глутатиона. GSH является антиоксидантом и принимает участие в регуляции клеточного цикла [40], процессов внутриклеточной сигнализации, активации транскрипционных факторов [41]. Уменьшение уровня внутриклеточного GSH связано с ростом продукции АФК и является сигналом к индукции апоптоза путем активации рецептора смерти либо запуска митохондриального апоптотического пути [41]. Поэтому поддержание постоянного уровня GSH необходимо для обеспечения нормальной жизнедеятельности клетки. В настоящей работе показано, что уменьшение внутриклеточного GSH наблюдается уже через 30 мин после добавления в среду культивирования 2-ГД и не изменяется в течение 4 ч для нетоксичных концентраций этого альдегида (до 100 мкмоль/л включительно) (рис. 4), при которых наблюдается повышение продукции АФК. Эти данные также свидетельствуют о ранних изменениях редокс-состояния клеток после воздействия 2-ГД.

Таким образом, 2-ГД в нетоксичных концентрациях вызывает модификацию редокс-процессов в клетках глиомы, что подтверждается увеличением продукции супероксидных анион-радикалов в цитоплазме клеток, обработанных менадином, и митохондриях, а также уменьшением уровня внутриклеточного восстановленного глутатиона. Поскольку модифицирующие эффекты 2-ГД начинают проявляться на ранних стадиях его взаимодействия с клетками, а увеличение менадион-индуцированного образования $O_2^{\cdot-}$ полностью подавляется ингибиторами МАП-киназ (JNK-, p38- и ERK1/2), участвующих в запуске апоптоза, можно полагать, что модификация редокс-состояния клеток С6 является начальным этапом процесса внутриклеточной сигнализации, в котором 2-ГД играет роль сигнальной молекулы.

Полученные данные позволяют рассматривать 2-ГД, который образуется в результате свободно-радикальной деструкции сфинголипидов, индуцируемой при гиперпродукции НОС1, в качестве нового биомаркера развития оксидативного стресса в организме.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования Республики Беларусь (№ гранта 20170712).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. Bartke and Y. A. Hannun, *J. Lipid Res.* **50**, 591 (2009).
2. R. P. Rao, N. Vaidyanathan, M., et al., *J. of Lipids.* **2013**, Article ID 178910, 12 (2013).
3. J. Newton, S. Lima, M. Maceyka, et al., *Exp. Cell Res.* **333** (2), 195 (2015).
4. N. C. Hait and A. Maiti, *Mediators Inflamm.* **2017**, Article ID 4806541, 17 (2017).
5. A. G. Lisovskaya, O. I. Shadyro and I. P. Edimecheva, *Lipids* **46**, 271 (2011).
6. A. G. Lisovskaya, I. P. Edimecheva and O. I. Shadyro, *Photochem. Photobiol.* **88**, 899 (2012).
7. V. V. Brahmabhatt, F.-F. Hsu, J. L.-F. Kao, et al., *Chem. Phys. Lipids* **145**, 72 (2007).
8. O. Shadyro, A. Lisovskaya, G. Semenkova, et al., *Lipid Insights* **8**, 1 (2015).
9. A. Kumar, H. S. Byun, R. Bittman, et al., *Cell Signal.* **23**, 1144 (2011).
10. F. Schumacher, C. Neuber, H. Finke, et al., *J. Lipid Res.* **58**, 1648 (2017).
11. P. Upadhyaya, A. Kumar, H. Byun, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **424** (1), 18 (2012).
12. N. Amaegberi, G. Semenkova, A. Lisovskaya, et al., *FEBS J.* **284** (Suppl. 1), 243 (2017).
13. Y. Son, Y.-K. Cheong, N.-H. Kim, et al., *J. Signal Transduc.* **2011**, Article ID 792639, 6 (2011).
14. Z. Liu, Y. Gong, H.-S. Byun, et al., *New J. Chem.* **34** (3), 470 (2010).
15. F. Kato, M. Tanaka and K. Nakamura, *Toxicol. in vitro* **13**, 923 (1999).
16. T.A. Kulahava, G.N. Semenkova, Z.B. Kvacheva, et al., *Med Sci Monit.* **16** (6), 11 (2010).
17. G. M. Cohen and M. d'Ar. Doherty, *Br. J. Cancer* **55** (8), 46 (1987).
18. S. B. Hollensworth, C. C. Shen, J. E. Sim, et al., *Free Rad. Biol. Med.* **28** (8), 1161 (2000).
19. Г. Н. Семенкова, Т. А. Кулагова, З. Б. Квачева, и др., *Нейроиммунология.* **3** (1), 23 (2005).
20. B. C. Dickinson and C. J. Chang, *Nat. Chem. Biol.* **7**, 504 (2011).
21. D. F. Stowe and A. K. S. Camara, *Antioxid. Redox Signal.* **11** (6), 1373 (2009).
22. Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, и др. *Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания* (АРТА, Новосибирск., 2008).

23. G. U. Bae, D. W. Seo, H. K. Kwon, et al., J. Biol. Chem. **274**, 32596 (1999).
24. J. Abe, M. Okuda, Q. Huang, et al., J. Biol. Chem. **275**, 1739 (2000).
25. S. G. Rhee, Y. S. Bae, S.-R. Lee, et al., Sci. STKE **53**, 1 (2000).
26. P. Storz, Front. Biosci. **10**, 1881 (2005).
27. T. A. Kulahava, G. N. Semenkov, Z. B. Kvacheva, et al., Cell tissue biol. **1** (1), 8 (2007).
28. T. Kuznetsova, T. Kulahava, I. Zholnerevich, et al., Mol. Immunol. **87**, 317 (2017).
29. A. Lisovskaya, N. Amaegberi and G. Semenkov, Free Radic. Biol. Med. **108**, S23 (2017).
30. R. S. B. Clark, J.K. Schiding, S.L. Kaczorowski, et al., J. Neurotrauma. **11**, 499 (1994).
31. C. L. Mayer, B.R. Huber and E. Peskind, Headache. **53** (9), 1523 (2013).
32. Н. Г. Крылова, Т. А. Кулагова, Г. Н. Семенкова, и др., Укр. біохім. журн. **81** (6),77 (2009).
33. W. Mu and L.-Z. Liu, React. Oxyg. Species. **4** (10), 251 (2017).
34. E. Cadenas, Mol. Aspects Med. **25**, 17 (2004).
35. P. Storz, Trends Cell Biol. **17** (1), 13 (2007).
36. B. Vurusaner, G. Poli and H. Basaga, Free Radic. Biol. Med. **52**, 7 (2012).
37. S. Dasgupta, E. Soudry, N. Mukhopadhyay, et al., J. Cell Physiol. **227**, 2451 (2012).
38. L. B. Sullivan and N. S. Chandel, Cancer Metab. **2**, 17 (2014).
39. M. P. S. Idelchik, U. Begley, T. J. Begley, et al., Semin. Cancer Biol. **47**, 57(2017).
40. A. Meister, J. Nutrit. Sci. Vitaminol. 1992 Spec No, 1 (1992).
41. M. L. Circu and T. Y. Aw, BBA **1823**, 1767 (2012).

Modification of Redox Processes in C6 Glioma Cells by 2-Hexadecenal, Formed during Destruction of Sphingolipids

N.V. Amaegberi*, G.N. Semenkov*, A.G. Lisovskaya* **, Z.B. Kvacheva*, and O.I. Shadyro***

*Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030 Belarus

**University of Notre Dame, Notre Dame, 46556 Indiana, USA

***Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, Akademicheskaya ul. 27, Minsk, 220072 Belarus

2-hexadecenal is an unsaturated aldehyde, which is formed during the free radical destruction of sphingolipids under oxidative stress and exhibits biological activity by inhibiting proliferation and inducing apoptosis. This paper presents the results from the investigation of the modifying effects of this aldehyde on redox processes which occur in rat C6 glioma cells. It has been shown that cultivation of cells with 2-hexadecenal (in concentrations from 3.5 to 35 $\mu\text{mol/l}$) leads to a significant increase, and at the higher concentrations, a decrease in the yield of superoxide anion radicals induced by menadione. It has been ascertained that the additional production of $\text{O}_2^{\cdot-}$ under the action of 2-hexadecenal on cells is completely suppressed in the presence of inhibitors of stress-activated MAP-kinases involved in apoptosis induction, such as JNK, p38- and ERK1/2 MAP kinase. The modifying effects of 2-hexadecenal were observed during the early stages of interaction of this aldehyde with the cells leading to an increase in the production of superoxide anion radicals by mitochondria and a decrease in the intracellular level of reduced glutathione. It has been suggested that the modification of the redox state of C6 cells is the initial stage of the intracellular signaling process where 2-hexadecenal acts as a signaling molecule.

Keywords: 2-hexadecenal, sphingolipids, reactive oxygen species, rat C6 glioma cells, mitochondria, glutathione