

ЭНЕРГОКОРРИГИРУЮЩЕЕ И АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЦИТОФЛАВИНА В ПОСТИШЕМИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

© И. И. Тюряева, М. Л. Куранова, И. В. Гончар, Ю. М. Розанов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: tii@mail.cytspb.rssi.ru

Исследовали влияние препарата Цитофлавин (ЦФ), обладающего антигипоксическим и антиоксидантным свойствами, на дермальные фибробласты человека в модели ишемии—реоксигенации *in vitro*. Препарат обладает цитопротекторным действием, снижая клеточную гибель после ишемии в период реоксигенации клеток в 2—2.7 раза. Выявлено, что восстановление синтеза АТФ в постшемическом периоде в фибробластах значительно ускорено (в 2.1 раза) при добавлении ЦФ в культуральную среду. ЦФ эффективно снижает уровень активных форм кислорода (АФК) в фибробластах после их культивирования в присутствии H_2O_2 , что позволяет сохранить их выживаемость на уровне контрольных клеток. Введение ЦФ в среду культивирования фибробластов за 1 сут до воздействия H_2O_2 позволяет поддерживать нормальный уровень АФК после 30-минутного воздействия H_2O_2 и снижает гибель клеток почти на треть по сравнению с контрольными клетками, культивированными в течение 1 сут до воздействия без ЦФ. Введение в культуральную среду ЦФ в постшемическом периоде не влияет на синтез белка Hsp70, но приводит к снижению повышенного после ишемии в период реоксигенации синтеза белка GRP78 до контрольного уровня, что свидетельствует о разрешении клеточного ответа на несвернутые белки (UPR, Unfolded Protein Response) и нормализации функционирования эндоплазматического ретикулаума.

Ключевые слова: дермальные фибробласты, Цитофлавин, ишемия—реоксигенация, активные формы кислорода, Hsp70, GRP78.

В патогенезе ряда острых и хронических заболеваний гипоксия или ишемия занимает центральное место. Недостаток кислорода ингибирует митохондриальную дыхательную цепь. В результате окислительное фосфорилирование, являющееся главным источником АТФ, замещается значительно менее продуктивным анаэробным гликолизом, приводящим к недостатку высокоэнергетических фосфатов для нормального клеточного функционирования и к ацидозу. Вследствие энергодифицита активность ферментативных антиоксидантов (каталазы, глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы) и уровень неферментативных антиоксидантов (витаминов Е и С, бета-каротина, убихинона и др.) снижаются (Nordberg, Arner, 2001). Восстановление кровообращения (реоксигенация), происходящее спонтанно или индуцированное терапевтически, вызывает вторую волну нарушений в клетках, обусловленную ростом свободных радикалов (окислительный стресс), что вызывает активацию перекисного окисления липидов, нарушение целостности клеточных мембран, повреждение ДНК и ведет к необратимым изменениям и к гибели клеток, часто даже в большей степени, чем ишемия (Li, Jackson, 2002). Подобный каскад нарушений описан при ишемии—реоксигенации для кардиомиоцитов (Doenst et al., 2008; Murphy, Steenbergen, 2008), нейронов (Choe, 1996; Самойлов, 1999), глиальных клеток (Ouyang et al., 2007), клеток почечных канальцев (Paller, Neumann, 1991) и ряда других клеточных типов (Li, Jackson, 2002).

Защитным ответом клетки на стрессорные воздействия, в том числе на снижение концентрации высокоэнергетических фосфатов, ацидоз и изменения редокс-баланса, является синтез белков теплового шока (HSP); общим стимулом активирования экспрессии HSP при ишемии—реоксигенации является повышение концентрации несвернутых белков внутри клетки (Lipton, 1999; Chang et al., 2001; Latchman, 2001; Chi, Karliner, 2004). HSP выполняют роль клеточных шаперонов и отвечают за сворачивание вновь синтезируемых незрелых полипептидов, исправление неправильно свернутых белков, препятствуют агрегации белков и направляют «неисправимые» белки на деградацию в протеосомы. Кроме того, HSP участвуют в регуляции апоптоза на всех его этапах, обладают прямым антиапоптотическим действием, препятствуя действию ключевых проапоптотических белков. Среди HSP наиболее исследована защитная роль белков семейства Hsp70: цитоплазматического белка Hsp70 и локализованного в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) белка GRP78. Цитопротекторные свойства этих двух шаперонов были показаны на различных моделях ишемических нарушений *in vitro* и *in vivo* (Marber et al., 1995; Bush et al., 1999; Meissner et al., 2000; Zhang et al., 2004; Martindale et al., 2006; Thuerauf et al., 2006; Goel et al., 2010). Активация и эффективность стресс-ответа связаны с энергетическим статусом клетки (Chang et al., 2001).

Из сказанного выше следует, что при ишемии и реоксигенации целесообразным подходом для уменьшения

метаболических нарушений, приводящих к увеличению клеточной гибели, является применение фармакологических препаратов, позволяющих стимулировать энергообразование, активировать метаболические процессы и снижать уровень свободных радикалов в клетках. Одним из таких препаратов является Цитофлавин (ЦФ), комбинированное антигипоксантиное и антиоксидантное действие которого обусловлено комплексом входящих в его состав компонентов — янтарной кислоты, никотинамида, рибоксина и рибофлавина.

Задачей нашей работы явилось исследование энергокорректирующей и антиоксидантной эффективности препарата ЦФ в модели ишемии—реоксигенации дермальных фибробластов человека *in vitro* и его влияния на уровень синтеза шаперонов Hsp70 и GRP78.

Материал и методика

Культивирование клеток. Фибробласты человека, выделенные из кожи предплечья, культивировали в полной ростовой питательной среде MEM (Биолот, Россия), содержащей 12 % сыворотки эмбрионов коров (Gibco, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США) и 0.3 мг/мл L-глутамина (Биолот, Россия). Питательную среду меняли 1 раз в 6—7 дней. Использовали клетки 4—9-го пассажей.

Ишемия *in vitro*. Фибробласты выращивали в стеклянных флаконах Карреля (стекло в отличие от пластика не связывает кислород) и при достижении 70—80 % конfluence клетки подвергали кислородному и глюкозному голоданию (Chen et al., 2007; Guo et al., 2007; Osorio-Fuentealba et al., 2009). Для этого полную ростовую среду заменяли не содержащей глюкозы средой DMEM (Gibco, США), предварительно барботированную азотом для замещения растворенного кислорода, и замещали атмосферный воздух азотом. После 1-часовой экспозиции при 37 °С фибробласты подвергали реоксигенации в нормоксических условиях в полной среде указанное время в присутствии 1.6 мкл/мл ЦФ (НТТФ Полисан, Россия) или без него. Долю мертвых клеток во всех вариантах опыта оценивали через 1 сут реоксигенации с помощью 0.4%-ного трипанового синего по стандартной методике, добавляя его к объему клеточной суспензии в соотношении 1 : 1.

Внутриклеточное содержание АТФ определяли люминесцентным методом с использованием люциферазы и ее субстрата D-люциферина (ATF Determination Kit, Molecular Probes, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Клетки лизировали литическим буфером, 10 мкл каждого образца добавляли к 90 мкл люциферазного реагента. Люминесценцию измеряли в течение интеграционного периода 10 с с помощью люциметра TD-20/20 (Turner Designs, США). Фоновое значение люминесценции (без АТФ и клеточного лизата) вычитали. Полученные данные нормировали по концентрации белка в образцах, определяемой методом Лоури. Уровень АТФ выражали в процентах от значения в контроле (интактных клетках в нормоксических условиях), принятого за 100 %. Объединяли данные трех независимых экспериментов.

Для определения внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) использовали редокс-чувствительный флуоресцентный зонд диацетат 5-(и-6)-карбокситетра-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеина (карбокситетра-

H₂DCFDA, Molecular Probes, США). Карбокситетра-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин пассивно диффундирует в клетки, где внутриклеточные эстеразы отщепляют ацетатные группы. Окисление модифицированной метки превращает ее во флуоресцентный продукт. Клетки, выращенные в стеклянных флаконах (для последующей ишемии—реоксигенации) или в пластиковых чашках 35 мм (для воздействия на клетки экзогенным H₂O₂), отмывали от среды культивирования теплым фосфатно-солевым буфером (PBS). Затем клетки нагружали меткой в конечной концентрации 5 мкМ в буферном растворе Хенкс-HEPES, pH 7.4, и инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем клетки дважды отмывали от избытка метки PBS и либо подвергали ишемии в указанных выше условиях, либо воздействовали 500 мкМ H₂O₂ в среде культивирования в течение 30 мин, после чего клетки отмывали и переводили в раствор Хенкс-HEPES с добавлением ЦФ или без него. Флуоресценцию клеток выявляли с помощью микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), снабженного камерой Leica DFC 420c (Leica, Германия), при длинах волн возбуждения и регистрации соответственно 480 и 520 нм. Интенсивность флуоресценции оценивали с помощью программы ImageJ 1.35r (National Institutes of Health, США). Данные (все воспроизводимые) были получены в 5 экспериментах (3 эксперимента с ишемией клеток и 2 — с воздействием H₂O₂).

Оценку выживаемости и пролиферации фибробластов проводили с помощью реагента CellTiter 96 Aqueous One Cell Proliferation Assay (MTS-тест, Promega, США). Действующий компонент реагента — тетразолий (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium — MTS), преобразуется клетками в цветной продукт — формазан, растворимый в культуральной среде. Оптическая плотность среды в ячейках платы пропорциональна количеству живых клеток. Фибробласты, подвергнутые ишемии—реоксигенации и интактные, снимали через 24 ч со дна культурального флакона смесью растворов трипсина и Версена, отмывали и наносили в лунки 96-луночного плоскодонного планшета в количестве 10⁴ клеток в 100 мкл культуральной среды на 1 лунку. Далее клетки инкубировали в CO₂-термостате при 37 °С в нормоксических условиях в присутствии или в отсутствие ЦФ. Спустя 1 сут в лунки добавляли по 20 мкл реагента и через 2 ч измеряли оптическую плотность среды при 492 нм с помощью Titertek Multiskan (Финляндия). В экспериментах с воздействием на фибробласты H₂O₂ все манипуляции проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах. Эксперименты выполняли по 2—3 раза в 4—8 повторностях.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла определяли методом проточной цитометрии. Фибробласты после 1-суточной реоксигенации отмывали от среды и ресуспендировали в PBS. Далее клетки обрабатывали 0.1%-ным Тритоном X-100 и окрашивали смесью двух красителей — оливомицина и бромистого этидия — в присутствии 15 мМ MgCl₂ в течение 24 ч при 5—7 °С. Конечная концентрация красителей составляла 40 мкг/мл для оливомицина и 20 мкг/мл для бромистого этидия. Перед измерением флуоресценции клетки инкубировали в 0.05%-ном растворе РНКазы 30 мин при 37 °С. ДНК-гистограммы регистрировали с помощью лабораторного макета проточного цитометра на основе микроскопа ЛЮМАМ-И (LUMAM-I). В качестве источника света использовали газоразрядную ртутную лампу ДРШ-250-2. Возбуждение флуоресценции осуществля-

ли в области 380—450 нм, регистрацию — при 520 нм и более.

Электрофорез и иммуноблотинг. Фибробласты интактные, после ишемии и на разных сроках реоксигенации в присутствии и в отсутствие ЦФ отмывали ледяным PBS, лизировали 50 мкл буфером RIPA (20 mM Трис-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % SDS, 0.5 % дезоксихолата Na, 1 % Тритона X-100, 1 % NP-40, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF и коктейль протеазных ингибиторов (Protease inhibitor cocktail, Sigma, США)) на льду в течение 5 мин. К лизату добавляли 1/4 часть буфера Лэммли (300 mM Трис, pH 6.8, 10 % SDS, 25 % 2-меркаптоэтанола и 50 % глицерина) и инкубировали на водяной бане при 100 °С в течение 5 мин. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд, используя овалбумин для построения калибровочной кривой.

Электрофоретическое разделение белков проводили в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS при силе тока 30 mA в течение 2.5—3 ч. Разделенные в полиакриламидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США) при напряжении 100 В и силе тока не более 300 mA в течение 1.5—2 ч в буфере для переноса (48 mM Трис, 39 mM глицин, 0.037 % SDS и 15 % метанола). Для визуализации белковых полос использовали Ponceau S (Sigma, США). Иммуноблотинг проводили в соответствии с методикой ECL (Western blotting protocols, Amersham, США), соблюдая указания производителя антител. Сразу после переноса мембрану промывали несколько раз буфером TTBS (20 mM Трис-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl и 0.1 % Tween-20). Затем места неспецифического связывания блокировали 5%-ным раствором сухого обезжиренного молока в TTBS (Valio, Финляндия) в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмывки добавляли первые антитела в 1—3%-ном растворе BSA в TTBS на ночь при 4 °С: кроличьи антитела к Hsp70 ((K-20)-R, Santa Cruz Biotech., Inc., США) или к GRP78 (Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 1000. После антител мембрану отмывали и инкубировали со вторыми козыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma, США), 1 ч в 5%-ном растворе молока на TTBS в разведении 1 : 10 000, после чего мембрану отмывали. Белки, связавшиеся с антителами, выявляли с помощью метода усиленной хемилюминесценции. Для этого нитроцеллюлозную мембрану промывали 1 раз водой (10—15 с), после чего инкубировали в растворе ECL в течение 1 мин и закладывали мембрану между двумя слоями пленки. Хемилюминесцентное излучение регистрировали экспонированием на рентгеновскую пленку CEA RP NEW (CEA AB, Швеция).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microcal Origin 6.0 (США), различия оценивали по *t*-критерию Стьюдента при *P* < 0.05. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения.

Результаты

После 1-часовой инкубации фибробластов в условиях ишемии содержание АТФ в них снижается до 15.7 % от исходного уровня в интактных клетках (рис. 1). Спустя 1 ч после перевода клеток в нормоксические условия инкубации в полную среду с глюкозой уровень АТФ в клетках продолжает снижаться (до 12 %). Это может объяс-

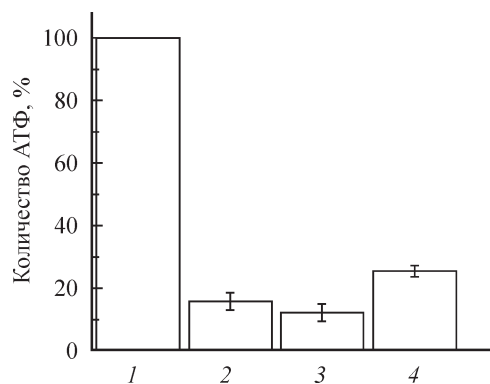


Рис. 1. Влияние Цитофлавина (ЦФ) на уровень АТФ в клетках, подвергнутых ишемии и реоксигенации.

1 — интактные клетки, 2 — через 1 ч ишемии, 3 — 1 ч реоксигенации, 4 — 1 ч реоксигенации в присутствии ЦФ.

няться тем, что активируемый при реоксигенации синтез АТФ немедленно расходуется энергозависимыми системами, и скорость утилизации АТФ может в начальные периоды реоксигенации превышать скорость ее синтеза. В то же время добавление ЦФ в среду культивирования при реоксигенации клеток повышает содержание клеточного АТФ в среднем в 2.1 раза (до 25.5 %).

Для исследования клеточной выживаемости через 1 сут после начала реоксигенации клетки снимали со дна флаконов и подсчитывали долю погибших клеток с использованием трипанового синего. Ишемия в течение 1 ч и последующая реоксигенация в течение 24 ч приводили к гибели около 6 % клеток, в то время как реоксигенация в присутствии ЦФ сокращала утрату клеток до 2.2 % (доля мертвых клеток в контроле — около 1 %). Клеточную выживаемость и пролиферацию через 48 ч после ишемии оценивали с помощью MTS-теста (см. таблицу). Через 24 ч после начала реоксигенации клетки в равных концентрациях разносили в лунки 96-луночного планшета и культивировали 1 сут либо в отсутствие сыворотки (для ингибирования пролиферации и анализа выживаемости клеток), либо в ее присутствии. Обнаружено, что фибробласты после ишемии в период реоксигенации проявляют повышенную пролиферативную активность (почти на 10 % выше, чем у контрольных клеток), в то время как добавление ЦФ в период реоксигенации оставляет этот показатель на уровне контрольных клеток. Клеточная гибель (тест в среде без сыворотки) регистрируется только среди клеток, культивируемых после ишемии без применения препарата.

Для подтверждения различий в пролиферативной активности фибробластов после ишемии, культивируемых

Выживаемость и пролиферативная активность фибробластов в течение 2-х сут реоксигенации

Среда культивирования	Клетки		
	интактные (контроль)	после ишемии и реоксигенации (Иш/Р)	после ишемии и реоксигенации в присутствии ЦФ
Без сыворотки	779.0 ± 31.4	699.3 ± 39.3 ^а	781.0 ± 28.2 ^в
С сывороткой	911.3 ± 24.5	999.3 ± 46.1 ^б	922.5 ± 29.5 ^г

Примечание. Различия с контролем достоверны при ^а*P* < 0.1 и ^б*P* < 0.05, различия с Иш/Р достоверны при ^в*P* < 0.05 и ^г*P* < 0.1.

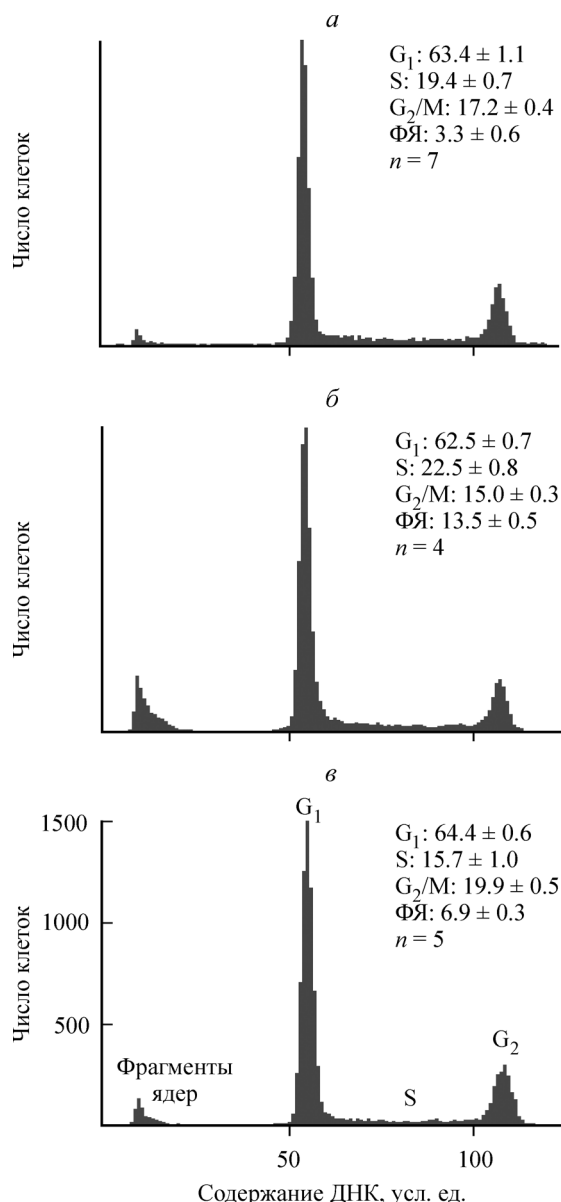


Рис. 2. Распределение клеток по фазам клеточного цикла. Проточная цитофлуорометрия.

а — интактные фибробласты, *б* — фибробласты после ишемии и 24-часовой реоксигенации, *в* — фибробласты после ишемии и 24-часовой реоксигенации в присутствии ЦФ. ФЯ — фрагменты ядер. Представлены среднее и доверительный интервал.

с ЦФ и без него, анализировали распределение клеток по фазам клеточного цикла и методом проточной ДНК-цитометрии (рис. 2). Уже спустя 1 сут после ишемии можно отметить индукцию пролиферации фибробластов, стремящуюся восполнить утрату клеток: различие в пролиферативной активности между клетками, культивируемыми в присутствии ЦФ и без него, составляет почти 7 % (доля клеток в S-фазе 15.7 и 22.5 % соответственно). В то же время реоксигенация в присутствии ЦФ приводит к накоплению тетраплоидных клеток (различие в количестве клеток в G_2 -фазе составляет около 5 %). Повышение тетраплоидизации среди раневых фибробластов связывают с более успешным заживлением повреждения (Egms et al., 1998; Obberinger et al., 1999). По количеству выявляемых фрагментов ядер также можно судить о величине

клеточной гибели, которая при культивировании клеток в постишемическом периоде в присутствии ЦФ почти в 2 раза ниже, чем без препарата (6.9 и 13.5 % соответственно).

Измерение уровня АФК в культивируемых фибробластах кожи показало, что реоксигенация клеток после ишемии в течение 1 ч не приводит к его возрастанию по сравнению с интактными клетками. Наоборот, наблюдается сначала снижение содержания АФК, а затем его постепенное восстановление к контрольному уровню (рис. 3, *а*). Снижение уровня АФК не было связано с инактивацией флуоресцентного зонда, что подтверждалось повышением уровня флуоресценции в клетках при добавлении H_2O_2 .

Для того чтобы проверить антиоксидантную эффективность ЦФ, мы индуцировали окислительный стресс в клетках добавлением в среду культивирования $500 \mu M H_2O_2$ на 30 мин (рис. 3, *б*, *в*). Последующее введение в среду ЦФ уже через 30 мин эффективно снижало уровень АФК. Следствием этого снижения являлась высокая выживаемость фибробластов (на уровне интактных клеток), оцененная с помощью MTS-теста через 24 ч инкубации клеток с ЦФ после воздействия H_2O_2 (рис. 3, *з*). Культивирование дермальных фибробластов в течение 1 сут с ЦФ перед добавлением к клеткам H_2O_2 (30 мин) значительно ингибировало образование в них АФК, уровень которых не отличался от уровня в контрольных клетках в исследуемый период времени. При этом выживаемость фибробластов, предварительно культивируемых в присутствии ЦФ, через 24 ч оказалась на треть выше, чем у клеток, культивированных до стресса без ЦФ.

При выяснении изменений в уровне синтеза клеточных шаперонов Hsp70 и GRP78 было обнаружено, что через 15 ч реоксигенации происходит увеличение продукции GRP78 по сравнению с контролем в обоих вариантах культивирования клеток — с ЦФ и без него (рис. 4). Однако уже через 24 ч в клетках, культивируемых с ЦФ, количество GRP78 снижено и приближается к уровню в контрольных клетках. Это свидетельствует о достижении функционального благополучия ЭПР. В то же время каких-либо значимых изменений в уровне синтеза Hsp70 на протяжении 24 ч реоксигенации в клетках, культивируемых с ЦФ или без него, отмечено не было.

Полученные результаты демонстрируют, что ЦФ оказывает эффективное влияние на восстановление продукции АТФ, снижение уровня внутриклеточных АФК и тем самым — на жизнеспособность дермальных фибробластов, подвергнутых ишемии—реоксигенации или воздействию H_2O_2 .

Обсуждение

Клетки соединительной ткани фибробласты — клетки с особыми свойствами. С одной стороны, фибробласты всех типов тканей имеют универсальные характеристики: это подвижные клетки веретенообразной формы мезенхимного происхождения, синтезирующие компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ), цитокины и ростовые факторы. С другой стороны, фибробласты разной тканевой локализации отличны друг от друга и внутри каждой ткани гетерогенны по своему составу, фенотипу, набору экспрессируемых генов, поверхностным маркерам, пролиферативной активности, уровню секретируемых продуктов и ответу на различные стрессорные воз-

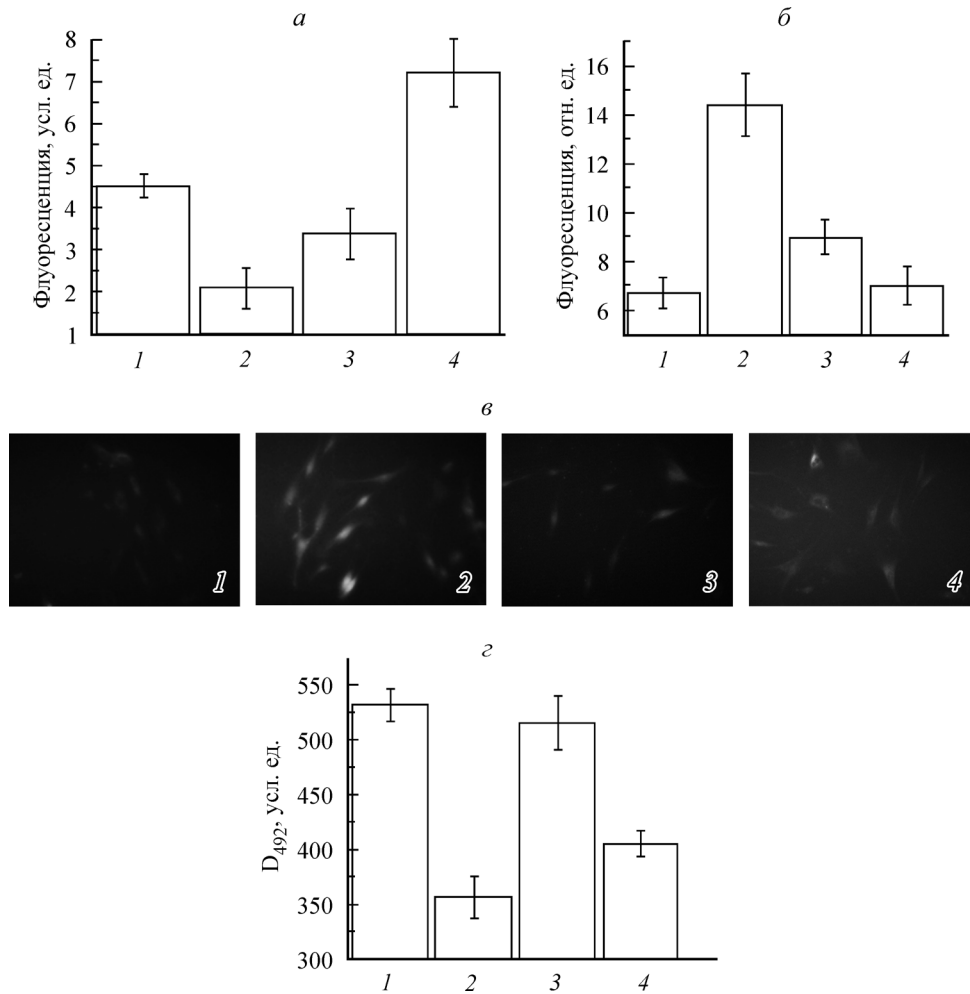


Рис. 3. Уровень АФК в фибробластах человека, культивируемых в разных условиях.

а — уровень АФК в клетках после гипоксии и последующей реоксигенации: 1 — интактные клетки, 2 и 3 — 30 и 60 мин реоксигенации соответственно, 4 — через 60 мин реоксигенации добавлена H₂O₂, увеличение флуоресценции свидетельствует о сохранении активности зонда. *б* — влияние ЦФ на уровень АФК при окислительном стрессе, вызванном H₂O₂: 1 — интактные клетки, 2 — 30 мин в присутствии H₂O₂, 3 — после H₂O₂ добавлен ЦФ (30 мин), 4 — 24 ч предынкубации с ЦФ, затем среду сменили на среду с H₂O₂ на 30 мин. *в* — флуоресцентная микроскопия (об. 20×): 1 — интактные клетки, 2 — 30 мин в присутствии H₂O₂, 3 — после H₂O₂ добавлен ЦФ (30 мин), 4 — 24 ч предынкубации с ЦФ, затем среду сменили на среду с H₂O₂ на 30 мин. *з* — выживаемость фибробластов через 24 ч после H₂O₂ (MTS-анализ): 1 — интактные клетки, 2 — 30 мин в среде с H₂O₂, 3 — после H₂O₂ 24 ч в среде с ЦФ, 4 — 24 ч предынкубации с ЦФ, затем воздействие H₂O₂. По вертикали — оптическая плотность (D) формазана (см. раздел «Материал и методика»).

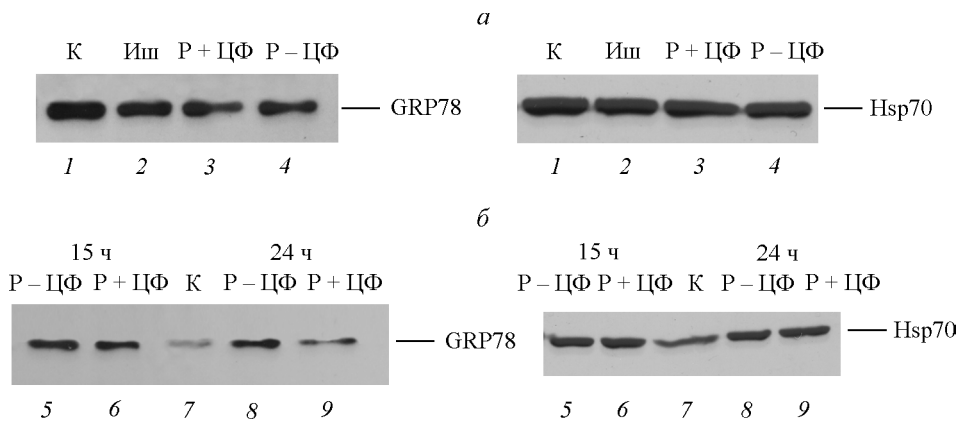


Рис. 4. Влияние ЦФ на синтез белков GRP78 и Hsp70 фибробластами человека в разные сроки.

а — 6 ч, *б* — 15—24 ч реоксигенации (Р) после ишемии (Иш). *а*: 1 — интактные клетки, 2 — 1 ч Иш, 3 — спустя 6 ч Р в присутствии ЦФ, 4 — спустя 6 ч Р без ЦФ; *б*: 5 — 15 ч без ЦФ, 6 — 15 ч в присутствии ЦФ, 7 — интактные клетки, 8 — 24 ч без ЦФ, 9 — 24 ч в присутствии ЦФ.

действия (Das et al., 2002; Sorrell, Caplan, 2004; Souders et al., 2009). Такая пластичность фибробластов определяется их особой ролью в установлении и поддержании органных функций, которые осуществляются посредством тонко регулируемых синтеза и деградации ВКМ, ауто- и паракринного сигналинга, пролиферации, миграции и дифференцировки в миофибробласты. Фибробласты играют ведущую роль в репарации повреждений в тканях, синтезируя ВКМ и формируя рубец. Дизрегуляция процессов синтеза компонентов ВКМ и его деградации матриксными металлопротеиназами, пролиферации фибробластов на начальных этапах и их апоптоза на финальных стадиях тканевой репарации может привести к задержке (недостаточности) заживления или избыточности заживления, в том числе к фиброзу. Поэтому уменьшение очагов некроза и окружающих их зон апоптоза, уменьшение уровня воспалительного ответа и ускорение восстановления нормального метаболизма клеток в ишемическом и в постишемическом периодах является важным условием для обеспечения нормального функционирования органа или ткани в целом.

Различия в заживлении нормальной и ишемизированной кожи описываются математической моделью (Хие et al., 2009), находящейся в согласии с экспериментальными результатами (Roy et al., 2009). Согласно этой модели, повреждение, к примеру, радиусом в 4 мм в норме закрывается в течение приблизительно 13 сут, в то время как в ишемизированной области такое повреждение заживает гораздо медленнее: через 20 сут уровень заживления составит лишь 25 %.

Положительный эффект ЦФ на репаративную функцию фибробластов был получен в экспериментах *in vivo* на крысах в модели ишемического повреждения сердца (Бульон и др., 2002). Применение ЦФ купировало прогрессию некротических очагов в миокарде, участки некроза замещались соединительной тканью, которая к исходу инфаркта миокарда созревала в крупноочаговый склероз с последующим рубцеванием.

Препарат метаболического ряда ЦФ разработан отечественными фармакологами и уже более 10 лет успешно применяется в практике неотложной терапии и в лечении хронических заболеваний (Афанасьев, Лукьянова, 2010). Это комплексный препарат, состоящий из двух метаболитов (янтарной кислоты и рибоксина) и двух коферментов (рибофлавин-мононуклеотида и никотинамида). Фармакологические эффекты каждого составляющего по отдельности широко известны. Рибоксин является предшественником АТФ, обеспечивает внутриклеточный транспорт энергии, повышает активность ряда ферментов цикла Кребса, активирует анаэробный гликолиз в условиях гипоксии в отсутствие АТФ. Янтарная кислота — важнейший субстрат цикла Кребса, при ее окислении вырабатывается максимальное количество энергии, она повышает кругооборот цикла, снижает концентрацию лактата, пирувата и цитрата, которые накапливаются уже на ранних стадиях гипоксии. Никотинамид — предшественник коферментов дегидрогеназ (НАД⁺ и НАДФ⁺), являющихся переносчиками водорода и обеспечивающих окислительно-восстановительные процессы, — улучшает микроциркуляцию и активирует антиоксидантную систему убихиноновых редуктаз. Рибофлавин-мононуклеотид в качестве коэнзима входит в состав флавиновых ферментов, которые принимают участие в расщеплении янтарной и других кислот и поддерживают в восстановленном состоянии глутатион (кофактор глутатионпероксидазы),

защищающий клетку от АФК и в целом определяющий внутриклеточный редокс-статус. Сочетание этих компонентов в ЦФ оказывает синергичное действие на клеточный метаболизм и придает ему свойства эффективного антигипоксанта.

Согласно нашим данным, добавление ЦФ в среду культивирования фибробластов уже в ранние сроки (1 ч) реоксигенации после ишемии позволяет увеличивать содержание АТФ в клетках в 2.1 раза, что говорит о быстром эффекте препарата на энергообразование.

Для оценки антиоксидантного действия ЦФ мы подвергли дермальные фибробласты ишемии и последующей реоксигенации. Для ряда клеток описано повышение при реоксигенации уровня АФК, приводящее к увеличению объемов клеточной гибели (Li, Jackson, 2002). Результаты нашего исследования показали, что уровень АФК в фибробластах после 30 и 60 мин реоксигенации был ниже контрольного. Это находится в соответствии с результатами другой работы (Panchenko et al., 2000), где авторами было показано, что в период гипоксии дермальные фибробласты снижают выработку АФК, которая медленно восстанавливается в период реоксигенации до уровня в интактных клетках. Тем не менее в ткани *in vivo* фибробласты подвергаются воздействию повышенного количества АФК, выделяемых эндотелиальными клетками в период реоксигенации (Terada, 1996), а также фагоцитирующими клетками (при респираторном взрыве) в области раны и (или) некроза (вызываемого в том числе хронической и острой ишемией). Предполагают, что именно вклад эндотелиальных клеток в усиленную продукцию АФК может предопределять основную гибель ишемизированных тканей (Zweiger et al., 1988). Кроме того, окислительный стресс вызывает качественные и количественные изменения ВКМ, синтезируемого, в частности, кардиальными фибробластами, что может играть существенную роль в патогенезе ремоделирования миокарда (Siwik et al., 2001; Sen et al., 2006; Roy et al., 2010; Jun et al., 2011).

Для инициирования окислительного стресса в дермальных фибробластах мы использовали H₂O₂. Применение ЦФ после 30-минутного воздействия H₂O₂ на 2/3 снижало повышенный уровень АФК в клетках. Этот антиоксидантный эффект препарата отразился на высокой выживаемости дермальных фибробластов (на уровне интактных клеток). Предобработка клеток ЦФ препятствовала увеличению выработки АФК в ранние сроки после воздействия H₂O₂, что приводило к увеличению выживаемости фибробластов через 24 ч после воздействия, т. е. повышала резистентность этих клеток к окислительному стрессу.

Одним из важнейших механизмов защиты клеток после ишемии и реоксигенации является индукция синтеза защитных белков Hsp70 и GRP78. Поскольку ЦФ обладает способностью значительно усиливать белоксинтетическую функцию клеток при гипоксии (Бульон и др., 2006), мы исследовали, не вносит ли вклад в цитопротекторные свойства ЦФ повышенный синтез этих шаперонов. Через 15 и 24 ч реоксигенации мы наблюдали усиление синтеза Hsp70, однако применение ЦФ не привело к повышению этого синтеза. Известно, что одной из функций Hsp70 является его модулирование активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, которые регулируют клеточный редокс-статус в ответ на ишемический стресс (Guo et al., 2007). Возможно, что регистрируемый нами при реоксигенации уровень АФК в дермальных фибробластах,

не превышающий нормального, является фактором, позволяющим не инициировать заметных изменений в экспрессии Hsp70.

В то же время 24 ч культивирования клеток в период реоксигенации с ЦФ снизило повышенный через 15 ч синтез GRP78. Поскольку усиление экспрессии шаперона GRP78 является маркером эндоплазматического стресса и развития UPR, прогрессирование которого приводит к клеточной гибели, выявляемое нами снижение синтеза GRP78 свидетельствует о благополучном разрешении ответа на несвернутые белки в ЭПР, что подтверждается и увеличением выживаемости фибробластов при использовании в период реоксигенации ЦФ.

Полученные нами результаты демонстрируют, что ЦФ оказывает на дермальные фибробласты выраженный цитопротекторный, энергокорректирующий и антиоксидантный эффекты. Исходя из этого можно предполагать целесообразность применения ЦФ в клинике в комплексной терапии при заболеваниях, связанных с повреждениями кожного покрова травматического и трофического генеза.

Список литературы

- Афанасьев В. В., Лукьянова И. Ю. 2010. Особенности применения цитофлавина в современной клинической практике. СПб.: Тактик-Студио. 80 с.
- Булъон В. В., Хныченко Л. К., Сапронов Н. С., Коваленко А. Л., Алексеева Л. Е. 2002. Использование Цитофлавина для коррекции последствий ишемического повреждения миокарда. Эксперим. клинич. фармакол. 65 (1) : 27—29.
- Булъон В. В., Хныченко Л. К., Сапронов Н. С., Коваленко А. Л., Алексеева Л. Е., Романцев М. Г., Чеснокова Н. П., Бизенкова М. Н. 2006. Оценка метаболических сдвигов при гипоксии на молекулярно-клеточном уровне и возможности их медикаментозной коррекции. Успехи современного естествознания. 12 : 29—31.
- Самойлов М. О. 1999. Мозг и адаптация. Молекулярно-клеточные механизмы. Турусел. 271 с.
- Bush K. T., George S. K., Zhang P. L., Nigam S. K. 1999. Pre-treatment with inducers of ER molecular chaperones protects epithelial cells subjected to ATP depletion. Amer. J. Physiol. Renal Physiol. 277 : F211—F218.
- Chang J., Knowlton A. A., Xu F., Wasser J. S. 2001. Activation of the heat shock response: relationship to energy metabolites. A ³¹P NMR study in rat hearts. Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 280 : H426—H433.
- Chen J.-X., Zeng H., Tuo Q.-H., Yu H., Meyrick B., Aschner J. L. 2007. NADPH oxidase modulates myocardial Akt, ERK1/2 activation, and angiogenesis after hypoxia-reoxygenation. Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 292 : H1664—H1674.
- Chi N. C., Karliner J. S. 2004. Molecular determinants of responses to myocardial ischemia/reperfusion injury: focus on hypoxia-inducible and heat shock factors. Cardiovasc. Res. 61 : 437—447.
- Choe D. W. 1996. Ischemia-induced neuronal apoptosis. Curr. Opin. Neurobiol. 6 : 667—672.
- Das M., Dempsey E. C., Reeves J. T., Stenmark K. R. 2002. Selective expansion of fibroblast subpopulations from pulmonary artery adventitia in response to hypoxia. Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 282 : L976—L986.
- Doenst T., Bugger H., Schwarzer M., Faerber G., Borger M. A., Mohr F. W. 2008. Three good reasons for heart surgeons to understand cardiac metabolism. Eur. J. Cardiothorac. Surg. 33 : 862—871.
- Ermis A., Oberringer M., Wirbel R., Koschnick M., Mutschler W., Hanselmann R. G. 1998. Tetraploidization is a physiological enhancer of wound healing. Eur. Surg. Res. 30 : 385—392.
- Goel G., Guo M., Ding J., Dornbos D., 3rd, Ali A., Shenaq M., Guthikonda M., Ding Y. 2010. Combined effect of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and heat shock protein (HSP)-70 in reducing apoptotic injury in hypoxia: a cell culture study. Neurosci. Lett. 483 : 162—166.
- Guo S., Wharton W., Moseley P., Shi H. 2007. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. Cell Stress Chaperones. 12 : 245—254.
- Jun J. H., Cho J. E., Shim Y. H., Shim J. K., Kwak Y. L. 2011. Effects of propofol on the expression of matrix metalloproteinases in rat cardiac fibroblasts after hypoxia and reoxygenation. Br. J. Anaesth. 106 : 650—658.
- Latchman D. S. 2001. Heat shock proteins and cardiac protection. Cardiovasc. Res. 51 : 637—646.
- Li C., Jackson R. M. 2002. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 282 : C227—C241.
- Lipton P. 1999. Ischemic cell death in brain neurons. Physiol. Rev. 79 : 1431—1568.
- Marber M. S., Mestrlil R., Chi S. H., Sayen M. R., Yellon D. M., Dillmann W. H. 1995. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. J. Clin. Invest. 95 : 1446—1456.
- Martindale J. J., Fernandez R., Thuerauf D., Whittaker R., Gude N., Sussman M. A., Glembotski Ch. C. 2006. Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6. Circ. Res. 98 : 1186—1193.
- Meissner A., Luss I., Rolf N., Boknik P., Kirchhefer U., Kehm V., Knapp J., Linck B., Luss H., Muller F. U., Weber T., Schmitz W., Van Aken H., Neumann J. 2000. The early response genes *c-jun* and *hsp-70* are induced in regional cardiac stunning in conscious mammals. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 119 : 820—825.
- Murphy E., Steenbergen C. 2008. Ion transport and energetics during cell death and protection. Physiology. 23 : 115—123.
- Nordberg J., Arner E. S. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic. Biol. Med. 31 : 1287—1312.
- Oberringer M., Lothschutz D., Jennewein M., Koschnick M., Mutschler W., Hanselmann R. G. 1999. Centrosome multiplication accompanies a transient clustering of polyploid cells during tissue repair. Mol. Cell Biol. Res. Commun. 2 : 190—196.
- Osorio-Fuentealba C., Valdes J. A., Riquelme D., Hidalgo J., Hidalgo C., Carrasco M. A. 2009. Hypoxia stimulates via separate pathways ERK phosphorylation and NF-κB activation in skeletal muscle cells in primary culture. J. Appl. Physiol. 106 : 1301—1310.
- Ouyang Y.-B., Voloboueva L. A., Xu L.-J., Giffard R. G. 2007. Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. J. Neurosci. 27 : 4253—4260.
- Paller M. S., Neumann T. V. 1991. Reactive oxygen species and rat renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation. Kidney Int. 40 : 1041—1049.
- Panchenko M. V., Farber H. W., Korn J. H. 2000. Induction of heme oxygenase-1 by hypoxia and free radicals in human dermal fibroblasts. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 278 : C92—C101.
- Roy S., Biswas S., Khanna S., Gordillo G., Bergdall V., Green J., Marsh C. B., Gould L. Z., Sen Ch. K. 2009. Characterization of a preclinical model of chronic ischemic wound. Physiol. Genomics. 37 : 211—224.
- Roy S., Khanna S., Azad A., Schnitt R., He G., Weigert C., Ichijo H., Sen Ch. K. 2010. Fra-2 mediates oxygen-sensitive induction of transforming growth factor β in cardiac fibroblasts. Cardiovasc. Res. 87 : 647—655.
- Sen Ch. K., Khanna S., Roy S. 2006. Perceived hyperoxia: oxygen-induced remodeling of the reoxygenated heart. Cardiovasc. Res. 71 : 280—288.
- Siwik D. A., Pagano P. G., Colucci W. S. 2001. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase ac-

tivity in cardiac fibroblasts. *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* 280 : C53—C60.

Sorrell J. M., Caplan A. I. 2004. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J. Cell Sci.* 117 : 667—675.

Souders C. A., Bowers S. L. K., Baudino T. A. 2009. Cardiac fibroblast: the renaissance cells. *Circ. Res.* 105 : 1164—1176.

Terada L. S. 1996. Hypoxia-reoxygenation increases O₂-eflux which injures endothelial cells by an extracellular mechanism. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 270 : H945—H950.

Thuerauf D. J., Marcinko M., Gude N., Rubio M., Susman M. A., Glembotski Ch. C. 2006. Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ. Res.* 99 : 275—282.

Xue Ch., Friedman A., Sen Ch. K. 2009. From the Cover: A mathematical model of ischemic cutaneous wounds. *PNAS.* 106 : 16 782—16 787.

Zhang P. L., Lun M., Teng J., Huang J., Blasick T. M., Yin L., Herrera G. A., Cheung J. Y. 2004. Preinduced molecular chaperones in the endoplasmic reticulum protect cardiomyocytes from lethal injury. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 34 : 449—457.

Zweier J. L., Kuppusamy P., Lutty G. A. 1998. Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *PNAS.* 85 : 4046—4050.

Поступила 13 II 2012

ENERGY CORRECTIVE AND ANTIOXIDATIVE ACTIONS OF CYTOFLAVIN AFTER ISCHEMIA OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS *IN VITRO*

I. I. Tjurjaeva, M. L. Kuranova, I. V. Gonchar, Yu. M. Rozanov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: tii@mail.cytspb.rssi.ru

The influence of metabolic drug Cytoflavin (CF) with antihypoxic and antioxidative properties on human dermal fibroblasts in a model of ischemia—reoxygenation *in vitro* was studied. It was revealed that the restoration of ATP synthesis in fibroblasts in the postischemic period was considerably accelerated (in 2.1 times) by the addition of CF to the culture medium. The drug had a cell protective effect of reducing cell mortality during the reoxygenation after ischemia by 2—2.7 times. CF effectively reduced the level of reactive oxygen species (ROS) in fibroblasts after H₂O₂ treatment which allowed maintaining their survival at the level of control cells. Pretreatment of the cells with CF for one day ensured the maintenance of normal levels of ROS during the investigated time period in the fibroblasts subjected to H₂O₂ treatment, and reduced H₂O₂-induced cell death by almost a third compared to control cells. The introduction of CF in culture medium after ischemia showed no influence on Hsp70 synthesis, but led to decrease in GRP78 synthesis, raised after ischemia, to the control level, indicating a resolve of the endoplasmic reticulum (ER) stress and functional normalization of ER.

Key words: dermal fibroblasts, Cytoflavin, ischemia—reoxygenation, reactive oxygen species. ROS, Hsp70, GRP78.