

Doi: 10.31116/tsitol.2018.05.07

## УМЕНЬШЕНИЕ НАКОПЛЕНИЯ КОЛЛАГЕНА I НА ПОВЕРХНОСТИ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ТИОЛСОДЕРЖАЩИХ АНТИОКСИДАНТОВ

© И. В. Воронкина, К. М. Кирпичникова, Л. В. Смагина, Н. М. Юдинцева,  
О. Г. Люблинская, И. А. Гамалей\*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;  
\* электронный адрес: igamaley@incras.ru*

В работе сравнивали действие антиоксидантов N-ацетилцистеина (НАС), пары  $\alpha$ -липовой (ЛА) и дигидролиповой (DHЛА) кислот на фибробласты кожи человека в условиях *in vitro*. Выясняли, как в условиях культивирования изменяются генерация клетками активных форм кислорода (АФК), активность матриксных металлопротеиназ (коллагеназы ММП-1 и желатиназы ММП-2 и ММП-9), а также накопление на поверхности клеток коллагена I. Показали, что НАС уменьшает содержание АФК (детектируемое по флуоресцентному зонду  $H_2DCFDA$ ) в клетках и активность всех ММП в среде культивирования. В отличие от НАС ЛА и DHЛА не влияют на уровень АФК, увеличивают активность коллагеназы ММП-1, но малоэффективны в отношении желатиназы. При этом НАС и DHЛА уменьшают (приблизительно на 20 %) количество коллагена I на поверхности клеток. Это свидетельствует о том, что в нормальных физиологических условиях антиоксиданты способны вмешиваться в состав (и свойства) внеклеточного матрикса.

Ключевые слова: фибробласты кожи человека, металлопротеиназы, активные формы кислорода, коллаген, N-ацетилцистеин,  $\alpha$ -липовая и дигидролиповая кислоты.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, ВКМ — внеклеточный матрикс, ММП — металлопротеиназы, DHЛА — дигидролиповая кислота, ЛА —  $\alpha$ -липовая кислота, НАС — N-ацетилцистеин.

Активные формы кислорода (АФК) являются известными модуляторами активности многих редокс-чувствительных сигнальных молекул. В условиях постоянного сдвига редокс-баланса клетки в сторону как окисляющих, так и восстанавливающих эквивалентов ее функции меняются, что ведет к развитию нежелательных последствий и для самой клетки, и для организма в целом. В этой связи внимание исследователей привлекает, в частности, редокс-чувствительность внеклеточного матрикса (ВКМ), который служит не только связующей основой для клеточного сообщества, но и основой для возникновения многочисленных сигнальных каскадов в клетку. Ведущими клетками, продуцирующими компоненты ВКМ, являются фибробласты. Главные компоненты ВКМ — коллагеновые белки, основная масса которых (типы I, III, VII и др.) в тканях относится к фибриллообразующим. Синтез и деградация ВКМ (и соответственно его структура и свойства) зависят прежде всего от активности фибробластов и секреции ими во внеклеточную среду матриксных металлопротеиназ (ММП), участвующих в ремоделировании тканей, миграции, адгезии и других клеточных процессах (Sodek, Overall, 1992; Arthur, 1994; Touyz, Briones, 2011; Sakimoto, Sawa, 2012).

*In vivo* основным физиологическим активатором про-ММП является плазмин. Он образуется в результате многостадийного процесса из плазминогена (Monea et al.,

2002; Vayalil et al., 2005). Однако *in vitro* активность ММП может меняться в присутствии разных агентов, в том числе тиоловых соединений и разных окислителей, благодаря чувствительности к ним связи между остатком цистеина в пропептидном домене и цинка в активном центре белка (Van Wart, Birkedal-Hansen, 1990; Björklund, Koivunen, 2005; Pei et al., 2006).

Развитие таких тяжелых патологий, как атеросклероз, фиброз тканей (легких, печени и сердца) и системный склероз, объясняют, в частности, вмешательством в сигнальные пути АФК (при окислительном стрессе) и в конечном итоге разрастанием ВКМ за счет изменения функций фибробластов (в частности, активности ММП) и усиления ими синтеза коллагена. Исследования, выполненные на животных моделях и человеке, а также на клетках в культуре, подтверждают это заключение (см. обзоры: Touyz, Briones, 2011; Gonzalez-Gonzalez et al., 2017).

Окислительная и восстановительная модификация белков клетки в физиологических условиях, ведущая к кардинальному изменению активности белков, обязана главным образом тиоловым (SH) группам цистеина в белковой молекуле. В клетке восстановление окисленных SH-групп (разрыв межбелковых или внутрибелковых S—S-связей) осуществляется восстановленным глутатионом, белками тиоредоксинового семейства, специализи-

рованными ферментами и другими соединениями. Для искусственного вмешательства и изменения окислительной ситуации в клетке *in vitro* или в организме *in vivo* используют антиоксиданты. Наиболее привлекательными пока остаются естественные для клетки соединения, несущие SH-группы. К ним относятся известные антиоксиданты N-ацетилцистеин (НАС) и пара  $\alpha$ -липовая (ЛА) и дигидролиповая (DHЛА) кислоты. Природный антиоксидант ЛА, будучи дисульфидным соединением, в клетке восстанавливает SH-группы с помощью NAD(P)H-зависимых редуктаз, образуя сульфгидрильную форму DHЛА, и действует как прямой антиоксидант внутри клетки (Packer, Cadenas, 2011). Однако ЛА является антиоксидантом и в восстановленной, и в окисленной формах (Packer et al., 1995; Whiteman et al., 1996).

Согласно данным из литературы, в экспериментах, как правило, действие антиоксидантов на ВКМ или активность ММП испытывают на фоне уже существующих изменений. *In vitro* они вызваны окислительным стрессом или другим влиянием, а *in vivo* — заболеванием, при котором в очаге с патологией уже повышен уровень АФК. Задачей таких работ является поиск положительной корреляции между снижением содержания АФК и уменьшением признаков патологии (понижением накопления коллагена в ВКМ, изменением активности ряда ключевых сигнальных молекул, включая ММП) (см., например: Oliver et al., 2007; Dooley et al., 2010; Tsou et al., 2014; Chen et al., 2015; Zhao et al., 2015). Однако при введении антиоксидантов в организм в качестве фармакологических агентов необходимо учитывать, что они действуют не только в очаге патологии, но и на нормальные ткани.

В настоящей работе мы сравнивали действие НАС, ЛА и DHЛА на нормальные фибробласты кожи человека в физиологических условиях. Выясняли, как при этом изменяются генерация клетками АФК, активность ММП (коллагеназы ММП-1 и желатиназы ММП-2 и ММП-9), а также накопление на поверхности клеток коллагена.

## Материал и методика

Клетки и антиоксиданты. Для выделения фибробластов человека использовали материал после косметологических операций кожи лица условно здоровых доноров. Клетки получали методом миграции при культивировании в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки коров (FBS; HyClone, США) и смесь пенициллина и стрептомицина (100 ед./мл и 100 мкг/мл соответственно; Gibco, США). Фибробласты переседали в соотношении 1 : 2 по мере формирования ими монослоя. Маточные растворы антиоксидантов НАС, ЛА и DHЛА (Sigma, США) готовили непосредственно перед экспериментом, при этом величину pH доводили до 7.0. НАС использовали в концентрациях 10 и 20 мМ, ЛА и DHЛА — 2 мМ. Параметры измеряли через 24 ч после введения в среду антиоксиданта. Жизнеспособность клеток, оцениваемая по окрашиванию трипановым синим, после всех экспериментов составляла 90—95 %.

Внутриклеточный уровень АФК оценивали методом проточной цитометрии, измеряя среднюю интенсивность флуоресценции зонда, чувствительного к окислению, преимущественно пероксидом водорода ( $H_2O_2$ ) — 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеиндиацетата ( $H_2DCFDA$ ; Invitrogen, D-399, США). Подробности мето-

да описаны ранее (Люблинская и др., 2013). Маточный раствор (10 мМ) красителя готовили на DMSO. Непосредственно перед экспериментом готовили рабочий раствор красителя (5 мкМ  $H_2DCFDA$ ) в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). Клетки, контрольные или предобработанные антиоксидантом, инкубировали в присутствии красителя в PBS 30 мин в атмосфере 5 %  $CO_2$  при 37 °C в темноте. Затем клетки отмывали от красителя, переводили в суспензионное состояние с помощью раствора трипсина—ЭДТА и анализировали на проточном цитометре EPICS XL (Beckman Coulter, США). Флуоресценцию возбуждали аргоновым лазером (длина волны 488 нм). Измерения повторяли дважды, эксперименты — 3—5 раз. Статистическую обработку проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Значимыми считали различия при  $P < 0.05$ .

Протеолитическую активность ММП определяли методом зимографии (Oliver et al., 1999) в среде контрольных фибробластов и через 3 и 24 ч после культивирования их в присутствии антиоксиданта. Субстратом для определения активности коллагеназы ММП-1 служил казеин, а для определения активности желатиназы ММП-2 и ММП-9 — желатин. Пробы кондиционированной среды смешивали без нагревания с буфером по Лэммли (Lammli, 1970), не содержащим дитиотреитола, после чего проводили электрофорез. Гель (10 % акриламида) содержал 0.5 мг/мл казеина или 1 мг/мл желатина. Пробы наносили в количестве, соответствующем 10 мкг белка на дорожку. Количество белка в пробе определяли по Брэдфорд (Bradford, 1976). После проведения электрофореза гель промывали 2.5%-ным раствором Тритона X-100 2 раза по 30 мин, после чего инкубировали в течение 12 ч в буферном растворе, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7.6), 0.15 М NaCl, 10 мМ  $CaCl_2$  и 0.05 % Brij 35. После инкубирования гель окрашивали Кумасси синим R-250. Зоны, содержащие ММП, проявлялись в виде неокрашенных полос. Идентификацию зон, соответствующих ММП-1, ММП-2 и ММП-9, осуществляли по соответствующим молекулярным массам. Мы анализировали суммарную активность для каждой ММП. Для количественного анализа гели сканировали, полученные изображения обрабатывали с помощью программы QuantiScan 2.1.

Оценка количества коллагена на поверхности клетки. *In vitro* достаточно чувствительным, простым и быстрым методом определения синтезируемого клеткой коллагена является окрашивание клеток кислотным красителем сириусом красным, специфическим для коллагена (Tullberg-Reinert, 1999; Chen et al., 2013). Клетки в равных количествах рассеивали в лунки 24-луночных планшетов. Через 1 сут культивирования в среду вводили антиоксиданты, используя лунки попарно: 2 лунки оставались контрольными, а в 2 лунки вводили антиоксидант и продолжали культивирование в течение еще 24 ч. После этого среду от клеток использовали для определения активности ММП, клетки одной из двух парных лунок (и контрольных, и экспериментальных) окрашивали на коллаген, а клетки другой использовали для определения общего количества клеточного белка в микроварианте метода Брэдфорд (Bradford, 1976). Поверхностный коллаген окрашивали следующим образом. После снятия среды клеточный слой трижды промывали холодным раствором фосфатно-солевого буфера и фиксировали, внося в лунку по 1 мл жидкости Буэна (насыщенный раствор пикриновой кислоты, нейтральный 40%-ный формалин и ле-

дьяная уксусная кислота в соотношении 15 : 5 : 1). Фиксацию проводили в течение 1 ч при комнатной температуре, потом удаляли раствор Буэна и промывали лунки проточной водой 15—20 мин до исчезновения желтой окраски раствора. Плату высушивали и в ее лунки добавляли по 1 мл раствора сириуса красного (Sirius Red F3B; Sigma, Германия) (0.5 г красителя в 500 мл насыщенного водного раствора пикриновой кислоты). Клетки окрашивали в течение 1 ч при комнатной температуре при медленном качании на шейкере. Затем раствор красителя удаляли и окрашенные клеточные слои интенсивно промывали 0.01 N раствором HCl для удаления несвязавшегося красителя. Далее окрашенный слой в лунках растворяли в 200 мкл 0.1 N NaOH в течение 30 мин на шейкере при комнатной температуре. Окрашенные растворы переносили в лунки 96-луночной платы и измеряли оптическую плотность при длине волны 500 нм на иммунохимическом анализаторе Fluorofot «Charity» (Россия), используя в качестве контроля 0.1 N NaOH (Tullberg-Reinert, Jundt, 1999). Для корректного сравнения результатов интенсивность окраски рассчитывали на единицу общего клеточного белка. Результаты выражали как среднее значение и его ошибка, полученные в эксперименте. Всего было проведено 5 экспериментов на клетках от разных доноров.

## Результаты

Содержание АФК. Проточная цитометрия показала, что во всех экспериментах NAC (20 мМ) значительно уменьшал (на 10—20 % в зависимости от эксперимента) содержание АФК в фибробластах. Уменьшение регистрируется уже через 3 ч. Результат эксперимента, представленный на рис. 1, показывает уменьшение на 12 % (от  $1.0 \pm 0.04$  до  $0.87 \pm 0.02$  усл. ед.). В большинстве экспериментов LA (2 мМ) и DHLA (2 мМ) значимого влияния на содержание АФК в фибробластах не оказывают. Хотя надо заметить, что в некоторых экспериментах эти два агента оказывали прооксидантное действие и увеличивали уровень АФК в клетках. От количества сыворотки в среде культивирования клеток (10 или 1 % в течение 24 ч) и от времени действия антиоксиданта (30 мин—24 ч) этот параметр не зависит (не показано).

Активность ММП. Данные литературы относительно влияния LA и DHLA на разные параметры клетки (см. ниже) очень противоречивы, поэтому мы стандартизировали по возможности все условия культивирования. Предварительно проверили влияние длительности культивирования на активность ММП. Принципиальных различий между активностями ММП по мере культивирования клеток (пассажи 1—10) не оказалось. Ответ на NAC был всегда однозначным и от возраста клеток не зависел, а вот разброс данных в ответ на действие LA или DHLA увеличивался по мере пассирования клеток (не демонстрируется). Поэтому в настоящей работе мы приводим результаты серии экспериментов, полученных на клетках 6—7-го пассажей.

Присутствие 10—20 мМ NAC в среде дермальных фибробластов вызывало подавление активности всех ММП во всех экспериментах, причем очень быстро. Ингибирование регистрируется уже через 3 ч и сохраняется на протяжении всего эксперимента (24 ч) (рис. 2, а). Разница между действием NAC в концентрациях 10 и 20 мМ очень незначительна (не показано). В присутствии LA

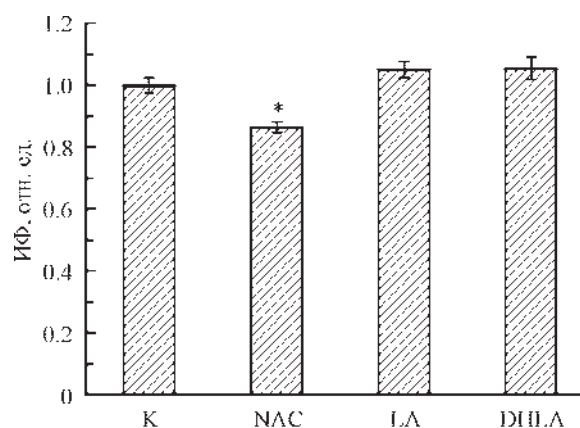


Рис. 1. Относительные изменения интенсивности флуоресценции (ИФ) АФК-чувствительного зонда в фибробластах кожи человека через 3 ч культивирования в контроле (К) и в присутствии антиоксидантов NAC, LA или DHLA.

Показаны средние величины измерений и их ошибки. Значение 1.0 соответствует уровню ИФ в контрольных клетках; звездочкой показана достоверность отличия от контрольного значения ( $P < 0.05$ ). По данным проточной цитометрии. Здесь и на рис. 2 и 3 концентрация NAC — 20, LA и DHLA — 2 мМ.

или DHLA активность всех ММП изменяется не столь драматично, как в присутствии NAC. Как показывает зимограмма на рис. 2, оба агента в отличие от NAC увеличивают активность коллагеназы I и мало изменяют активность обеих желатиназ. Однако необходимо сказать, что в результате многих экспериментов нам не удалось получить стабильный (повторяющийся) ответ на действие этих двух агентов. В разных экспериментах регистрируются и увеличение, и уменьшение, и отсутствие изменений активности ММП, причем наибольший разброс данных относится к желатиназам и не зависит от времени действия антиоксидантов.

Неповторяющийся ответ на действие LA и DHLA может быть результатом ряда неучитываемых факторов. Один из них — присутствие в среде сыворотки (10 %), уже содержащей ММП и, возможно, мешающей оценке изменений активности ММП, секретируемых клеткой. Поэтому мы проверили, как меняется активность ММП в среде культивирования фибробластов при 3-часовом действии антиоксидантов в условиях голодания (1 % сыворотки), в которые клетки переводили за 24 ч до начала эксперимента. Результаты зимографии одного из экспериментов представлены на рис. 2, б. Сравнение рис. 2 и 3 (нормальные условия и условия голодания) свидетельствует в целом об идентичности изменений активностей ММП в присутствии антиоксидантов. Разница касается лишь ММП-1, активность которой несколько уменьшилась в ответ на DHLA при содержании сыворотки 1 %. Сравнение всех полученных результатов показывает, что в присутствии малого содержания сыворотки результаты зимографии более четкие и стабильные. Однако из-за большой длительности экспериментов (в целом 3 сут) оказалось невозможным культивировать клетки в условиях голодания, так как они начинали погибать, особенно в присутствии антиоксидантов.

Окраска клеток на коллаген сириусом красным. В тех же экспериментах, в которых оценивали активность ММП (рис. 2, а) в среде культивирования, клетки окрашивали сириусом красным. Количество связавшегося с поверхностным коллагеном красителя, опре-

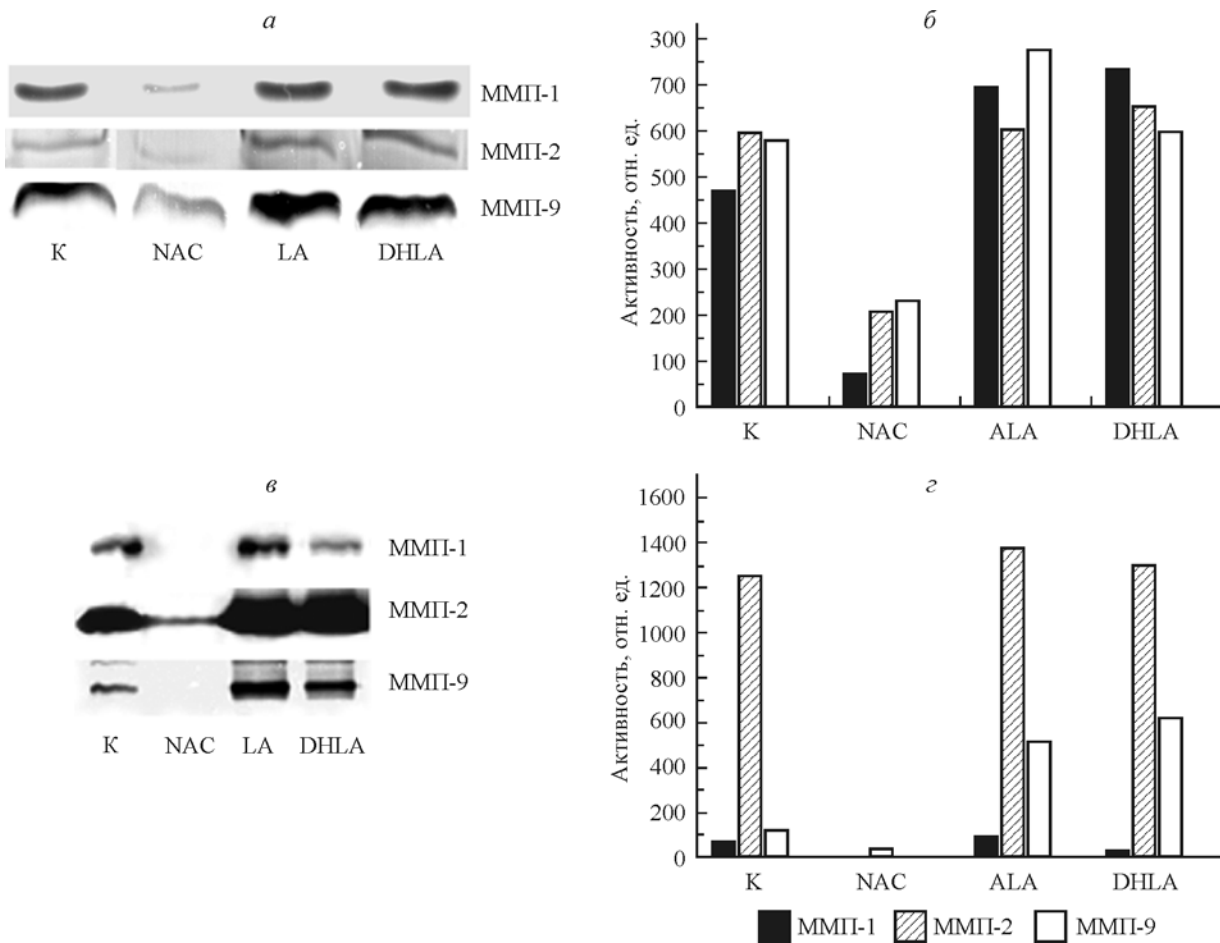


Рис. 2. Активность ММП в ростовой среде фибробластов кожи человека в контроле (К) и через 24 ч присутствия NAC, ALA или DHLA в нормальных условиях (а, б) или в условиях голодания (в, г).

а, в — зимография на казеине (ММП-1) и желатине (ММП-2 и ММП-9); б, г — денситограммы соответствующих полос; содержание сыворотки в среде 10 (а) или 1 (в) %.

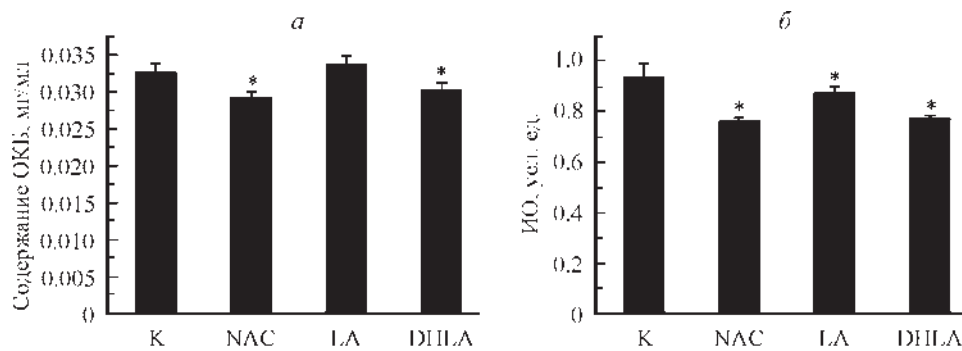


Рис. 3. Рост фибробластов кожи человека (а) и относительные изменения количества коллагена I на поверхности клеток (б) в контроле (К) и через 24 ч действия NAC, LA или DHLA.

а — изменения количества общего клеточного белка (ОКБ; средние величины и их ошибки из трех независимых экспериментов); б — интенсивность окраски (ИО) коллагена сирусом красным, рассчитанная на единицу клеточного белка (средние значения из трех измерений и их ошибки, полученные в том же эксперименте, что и данные на рис. 2, а). Звездочка показывает достоверность отличий от контроля ( $P < 0.05$ ).

деляемого фотометрически, зависит от количества клеток, т. е. от скорости их роста, на которую влияют антиоксиданты (Гамалей и др., 2003). Поэтому в каждом эксперименте оценивали изменение числа клеток по общему количеству клеточного белка и для корректного сравнения связывания сируса красного коллагеном I на

поверхности клеток интенсивность окраски оценивали на единицу клеточного белка. Результаты показаны на рис. 3. Уменьшение общего клеточного белка за 24 ч присутствия антиоксидантов (особенно NAC и DHLA) по сравнению с контрольными клетками свидетельствует о замедлении роста клеток (рис. 3, а). Параллельно умень-



шается и количество связавшегося красителя, рассчитанное на единицу клеточного белка (рис. 3, б). Уменьшение наиболее выражено (около 20 %) в случае действия NAC и DHLA (от  $0.9292 \pm 0.0034$  в контроле до  $0.7569 \pm 0.0266$  и  $0.07678 \pm 0.0138$  усл. ед. соответственно). Это говорит об уменьшении количества коллагена I на поверхности клеток. Отметим, что во всех поставленных экспериментах в присутствии антиоксидантов связывание сириуса красного уменьшается независимо от изменения активности ММП. Однако в среднем по результатам трех экспериментов достоверные изменения получены только в случае NAC и DHLA.

Таким образом, несмотря на то что LA и DHLA (в отличие от NAC) увеличивают активность ММП-1, изменяют не всегда однозначно активность желатиназ и не изменяют содержание АФК, на количество поверхностного коллагена они влияют так же, как и NAC, хотя LA действует наименее эффективно.

### Обсуждение

Кожа человека экспрессирует множество ММП, включая коллагеназы ММП-1, ММП-8 и ММП-13, каждая из которых способна атаковать нативный фибриллярный коллаген (Varani et al., 2002). Для деградации ВКМ наиболее значима ММП-1. Она лучше других коллагеназ фрагментирует фибриллярный коллаген, который далее может подвергаться деградации желатиназами (Varani et al., 2002; Wenk et al., 2004). Есть данные о корреляции между активностью ММП-1 и фрагментацией коллагена (Fisher et al., 2009). Ранее мы показали, что в присутствии NAC нарушается количественный баланс между ММП-1, ММП-9 и их ингибитором TIMP-1, что ведет к реструктуризации и перераспределению коллагена I на поверхности трансформированных фибробластов (Воронкина и др., 2014). В настоящей работе мы расширили спектр антиоксидантов и испытали их действие на нормальные фибробласты кожи человека в физиологических условиях.

Наши результаты показали, что в нормальных физиологических условиях прямой корреляции между изменением содержания АФК (измеряемого с помощью  $H_2O_2$ -зависимого зонда) в клетках в присутствии антиоксидантов и накоплением ими коллагена не оказалось. Это объясняется, с одной стороны, ограниченностью метода измерения АФК в клетках, а с другой — разными механизмами действия этих антиоксидантов и их разной способностью восстанавливать АФК. Особенности LA и DHLA и их прооксидантное действие на фибробласты, которые мы обсуждали ранее (Люблинская и др., 2013), выражаются в том, что ALA и DHLA более активны против радикалов, чем против стабильной молекулы  $H_2O_2$  (по данным химических экспериментов) (Packer et al., 1995; Whiteman et al., 1996; Packer, Cadenas, 2011). Это же относится и к NAC, который прямо не взаимодействует ни с супероксидным анионом, ни с  $H_2O_2$ , хотя является источником цистеина, увеличивает синтез глутатиона и, таким образом, уменьшает содержание АФК в клетке (см. обзор: Samuni et al., 2013). Поэтому понятно, что мишени действия этих антиоксидантов и их сигнальные пути в клетке разные и могут не включать в себя изменение содержания  $H_2O_2$ .

Неповторяющийся ответ желатиназ на действие LA и DHLA в настоящей работе, по-видимому, является свиде-

тельством наличия многих мишеней и внутри, и вне клетки, чувствительных к их действию и зависимых от состояния клеток в момент действия агента. Тем не менее, как оказалось, это не влияет на изменение количества коллагена I (всегда уменьшение). Это означает, что уменьшение коллагена на поверхности фибробластов происходит не только в результате обнаруженного нами увеличения активности ММП, ММП-1 прежде всего, но и в силу изменения активностей каких-то других сигнальных молекул, более существенных для конечного клеточного ответа. Этот вывод подтверждают и эксперименты с NAC, который не увеличивает, а подавляет активность всех ММП и, казалось бы, должен способствовать накоплению коллагена.

Данные из литературы, посвященной влиянию антиоксидантов на активность ММП в условиях окислительного стресса, свидетельствуют о том, что NAC *in vivo* и *in vitro* в широком диапазоне концентраций тоже ингибирует активность желатиназ ММП-2 и ММП-9 легочных мышечных фибробластов (Wang et al., 2006). Это может происходить через подавление активности транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и изменение экспрессии его генов (Galis et al., 1998; Radomska-Leoeniewska et al., 2010). Показано, что 10 мМ NAC понижает содержание АФК и ингибирует синтез коллагенов I и II легочными фибробластами через активацию киназы JNK (Zhao et al., 2015). При легочном фиброзе, вызванном силикозом у крыс, NAC уменьшал содержание АФК, повреждение митохондрий и содержание проапоптотических белков, а также уровень мРНК коллагена I и проколлагена III (Zhang et al., 2014). В эмбриональных фибробластах легких человека NAC снижал содержание коллагена I, увеличенное действием липополисахарида, и увеличивал содержание восстановленного глутатиона; молекулярные механизмы включали в себя ERK1/2-киназный путь и подавление активности транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B (Dooley et al., 2010; Li et al., 2011). NAC (5—40 мМ) на фоне действия TGF- $\beta$ 1 уменьшает пролиферацию легочных фибробластов человека, ингибируя индукцию циклина E и синтез проколлагена I (Hu, Zhong, 2009). Нитрозо-NAC действует еще активнее и подавляет экспрессию коллагена I, фактора некроза опухолей и активность ММП-2 при фиброзе у крыс с циррозом печени (Vercelino et al., 2010). Таким образом, уменьшение количества коллагена в ВКМ при действии NAC зависит гораздо больше от активности внутриклеточных сигнальных путей, чем от подавления активности ММП, а уменьшение содержания АФК при этом способствует большей выживаемости клеток в условиях патологии.

Значительно меньше данных о влиянии LA и DHLA на синтез клетками ВКМ, и они не так однозначны (как и в настоящей работе), как результаты экспериментов с NAC. Независимо от использованного агента действие LA авторы работ всегда рассматривают в паре с DHLA, поскольку в клетке LA восстанавливается до DHLA соответствующей синтазой. Показано, что DHLA уменьшает окислительный стресс в дермальных фибробластах человека при системном склерозе, тоже ингибирует экспрессию коллагена I и увеличивает активность ММП-1 (как и в нашей работе) и ММП-3, причем в большинстве случаев действует активнее, чем NAC (Tsou et al., 2014). *In vivo* LA предотвращает или уменьшает фиброз, ингибируя провоспалительные пути и накопление ВКМ (Ekinici et al., 2014), снижает экспрессию ММП-9 через ингибирование активности NF- $\kappa$ B (Kim et al., 2007). В ряде случаев

ПЦР-анализ подтверждает уменьшение активности MMP-2 и MMP-9 в клетках при действии LA, демонстрируя снижение экспрессии их мРНК (Shay et al., 2009; Lee et al., 2010). Некоторые авторы подчеркивают большую способность именно LA, а не DHLA уменьшать экспрессию MMP-9 (Maggiacchi et al., 2004). Но есть данные и о том, что LA (0.5 % в косметическом креме) значительно увеличивает синтез коллагена и его отложения в дерме у крыс (Han, Nimni, 2005). По данным других авторов, в экспериментах *in vitro* LA защищает фибробласты от окислительного повреждения, хотя не влияет на их функции (пролиферацию, синтез коллагена и экспрессию MMP) (Lateef et al., 2005).

Из данных литературы, упомянутых выше, следует, что влияние антиоксиданта на уменьшение секреции коллагена легочными фибробластами регистрируется в разных случаях через 2—24 ч действия и достигает 40 % и более, но на фоне предварительного воздействия на клетки, связанного с продукцией АФК, а в случае здоровых клеток эффект намного меньше и может составлять не более 10 % (Hung et al., 2009; Doole et al., 2010; Li et al., 2011; Chen et al., 2015). И в настоящей работе не столь ярко выраженное влияние LA и DHLA на уровень АФК в фибробластах и активность MMP, объясняется, возможно, отсутствием окислительного стресса и стимуляции клетки. Но, несмотря на это, количество коллагена на поверхности клеток значительно уменьшается, причем эффекты NAC и DHLA равнозначны (около 20 %), действие LA (менее 10 %) существенно слабее (рис. 3). Есть сравнительные данные о том, что в отсутствие предварительной стимуляции нормальных фибробластов действие LA (Tsuji-Naito et al., 2010) или DHLA (Tsou et al., 2014) может даже повышать экспрессию коллагена I.

Анализ приведенных данных показывает, что, несмотря на прямую зависимость реструктуризации ВКМ от активности MMP и редокс-зависимость самих MMP, изменения в ВКМ в присутствии антиоксидантов происходят не только в результате прямого изменения активности MMP, но и в результате изменений активности других мишеней во внутриклеточных сигнальных путях. Наиболее частым обсуждаемым механизмом в плейотропном действии NAC являются ингибирование транскрипционного фактора NF-κB и изменение экспрессии ряда генов. Анализ экспрессии генов в разных клетках при действии NAC в зависимости от времени показал, что изменение функций клетки происходит при длительном действии NAC (12—24 ч), когда изменения генной экспрессии становятся более выраженными и приводят главным образом к ингибированию пролиферации и стимуляции дифференцировки клеток (Gustafsson et al., 2005). В контексте настоящей работы важно ингибирование NAC пролиферации и других функций фибробластов. Вероятно, изменения клеточных функций при действии LA и DHLA происходят, главным образом, тоже в результате активации (ингибирования) экспрессии определенных генов. Расширенный анализ экспрессии генов показал, что LA уменьшает экспрессию генов факторов роста, хемокинов и цитокинов, транскрипционных факторов и протеаз (в том числе MMP), что ведет к реструктуризации ВКМ (Alleva et al., 2008).

Итак, в нормальных физиологических условиях (как и при патологии в условиях окислительного стресса и активации фибробластов) антиоксиданты независимо от их влияния на редокс-баланс клетки (детектируемый по флуоресцентному зонду H<sub>2</sub>DCFDA) меняют активность

MMP в межклеточной среде и уменьшают количество коллагена I на поверхности клетки, что ведет к реструктуризации ВКМ. Это происходит за счет изменения активностей MMP и, по-видимому, уменьшения синтеза клеткой коллагена.

Авторы выражают благодарность А. В. Агафоновой за техническую помощь.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы ФИМТ президиума РАН.

#### Список литературы

- Воронкина И. В., Вахромова Е. А., Кирпичникова К. М., Смагина Л. В., Гамалей И. А. 2014. Анализ изменения активности матриксных металлопротеаз трансформированных фибробластов при действии N-ацетилцистеина. Цитология. 56 (10) : 717—724. (Voronkina I. V., Vakhromova E. A., Kirpichnikova K. M., Smagina L. V., Gamaley I. A. 2015. Matrix metalloproteinase activity in transformed cells exposed to an antioxidant. Cell. Tissue Biol. (Tsitologiya). 9 : 16—23.)
- Гамалей И. А., Аксенов Н. Д., Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М. 2003. Влияние агентов, изменяющих внутриклеточный уровень активных форм кислорода, на характер распределения клеток линий 3T3 и 3T3SV40 по фазам клеточного цикла. Цитология. 45 (1) : 26—33. (Gamaley I. A., Aksenov N. D., Efremova T. N., Kirpichnikova K. M. 2003. Effect of agents affecting the intracellular level of reactive oxygen species on the cell cycle phase distribution in 3t3 and 3t3sv40 cell lines. Tsitologiya. 45 (1) : 26—33.)
- Люблинская О. Г., Кирпичникова К. М., Гамалей И. А. 2013. Сравнительное влияние антиоксидантов на уровень активных форм кислорода в нормальных и трансформированных фибробластах. Цитология. 55 (10) : 732—736. (Lyublinkskaya O. G., Kirpichnikova K. M., Gamaley I. A. Antioxidant action on the level of reactive oxygen species in normal and transformed fibroblasts. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 8 (1) : 33—37.)
- Alleva R., Tomasetti M., Sartini S., Emanuelli M., Nasole E., Di Donato F., Borghi B., Santarelli S., Neuzil J. 2008. α-Lipoic acid modulates extracellular matrix and angiogenesis gene expression in non-healing wounds treated with hyperbaric oxygen therapy. Mol. Med. 14 : 175—183.
- Arthur M. J. 1994. Degradation of matrix proteins in liver fibrosis. Pathol. Res. Pract. 190 : 825—833.
- Björklund M., Koivunen E. 2005. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. Biochim. biophys. acta. 1755 : 37—69.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.
- Chen C., Guan X., Quinn D. A., Ouyang B. 2015. N-acetylcysteine inhibits ventilation-induced collagen accumulation in the rat lung. Tohoku J. Exp. Med. 236 : 255—261.
- Chen C., Yang S., Zhang M., Zhang Z., Zhang B., Han D., Ma J., Wang X., Hong J., Guo Y., Okunieff P., Zhang L. 2013. *In vitro* Sirius Red collagen assay measures the pattern shift from soluble to deposited collagen. Adv. Exp. Med. Biol. 765 : 47—53.
- Dooley A., Shi-Wen X., Aden N., Tranah T., Desai N., Denton C. P., Abraham D. J., Bruckdorfer R. 2010. Modulation of collagen type I, fibronectin and dermal fibroblast function and activity, in systemic sclerosis by the antioxidant epigallocatechin-3-gallate. Rheumatol. (Oxford). 49 : 2024—2036.
- Ekinci M., Cagatay H. H., Ceylan E., Keles S., Koban Y., Gokce G., Huseyinoglu U., Ozcan E., Oba M.E. 2014. Reduction of conjunctival fibrosis after trabeculectomy using topical α-lipoic acid in rabbit eyes. J. Glaucoma. 23 : 372—379. Doi: 10.1097/IJG.0000000000000052.
- Fisher G. J., Quan T., Purohit T., Shao Y., Cho M. K., He T., Varani J., Kang S., Voorhees J. J. 2009. Collagen fragmentation

promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. *Amer. J. Pathol.* 174 : 101—114.

Galis Z. S., Asanuma K., Godin D., Meng X. 1998. N-acetyl-cysteine decreases the matrix-degrading capacity of macrophage-derived foam cells. New target for antioxidant therapy? *Circulation.* 97 : 2445—2453.

Gonzalez-Gonzalez F. J., Chandel N. S., Jain M., Budinger G. R. S. 2017. Reactive oxygen species as signaling molecules in the development of lung fibrosis. *Transl. Res.* 190 : 61—68.

Gustafsson A. C., Kupersmidt I., Edlundh-Rose E., Greco G., Serafino A., Krasnowska E. K., Lundeberg T., Bracci-Laudiero L., Romano M.-C., Parasassi T., Lundeberg J. 2005. Global gene expression analysis in time series following N-acetyl-L-cysteine induced epithelial differentiation of human normal and cancer cells *in vitro*. *BMC Cancer.* 5 : 75 (19 p.). Doi: 10.1186/1471-2407-5-75.

Han B., Nimni M. E. 2005. Transdermal delivery of amino acids and antioxidants enhance collagen synthesis: *in vivo* and *in vitro* studies. *Connect Tissue Res.* 46 : 251—257.

Hu J. M., Zhong N. S. 2009. A preliminary study on the mechanisms of N-acetylcysteine in the inhibition of proliferation and collagen synthesis of human pulmonary fibroblasts. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 32 : 897—901.

Hung K. Y., Liu S. Y., Kao S. H., Huang J. W., Chiang C. K., Tsai T. J. 2009. N-acetylcysteine-mediated antioxidation prevents hyperglycemia-induced apoptosis and collagen synthesis in rat mesangial cells. *Amer. J. Nephrol.* 29 : 192—202.

Kim H.-S., Kim H.-J., Park K. G., Kim Y.-N., Kwon T.-K., Park J.-Y., Lee K.-U., Kim J.-G., Lee I.-K. 2007.  $\alpha$ -Lipoic acid inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting NF- $\kappa$ B transcriptional activity. *Exp. Mol. Med.* 39 : 106—113.

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680—683.

Lateef H., Aslam M. N., Stevens M. J., Varani J. 2005. Pretreatment of diabetic rats with lipoic acid improves healing of subsequently-induced abrasion wounds. *Arch. Dermatol. Res.* 297 : 75—83.

Lee H. S., Na M. H., Kim W. K. 2010.  $\alpha$ -Lipoic acid reduces matrix metalloproteinase activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Nutr. Res.* 30 : 20340—20349.

Li X. F., Ouyang B., Wu J. F., Chen J., Guan X. D. 2011. N-acetylcysteine (NAC) inhibited pulmonary fibrosis in acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 23 : 599—601.

Marracci G. H., McKeon G. P., Marquardt W. E., Winter R. W., Riscoe M. K., Bourdette D. N. 2004. Alpha lipoic acid inhibits human T-cell migration: implications for multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 78 : 362—370.

Monea S., Lehti K., Keski-Oja J., Mignatti P. 2002. Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism. *J. Cell. Physiol.* 192 : 160—170.

Oliver G. W., Stettler-Stevenson W. G., Kleiner D. E. 1999. Zymography, casein zymography and reverse zymography: activity assays for proteases and their inhibitors. In: *Handbook of proteolytic enzymes.* San Diego: Acad. Press. 61—76.

Oliver S. J., Firestein G. S., Arsenault L., Cruz T. F., Cheng T. P., Banquerigo M. L., Boyle D. L., Brahn E. 2007. Vanadate, an inhibitor of stromelysin and collagenase expression, suppresses collagen-induced arthritis. *J. Rheumatol.* 34 : 1802—1809.

Packer L., Cadenas E. 2011. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 48 : 26—32.

Packer L., Witt E. H., Tritschler H. J. 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Rad. Biol. Med.* 19 : 227—250.

Pei P., Horan M. P., Hille R., Hemann C. F., Schwendeman S. P., Mallery S. R. 2006. Reduced nonprotein thiols inhibit activation and function of MMP-9 : implications for chemoprevention. *Free Rad. Biol. Med.* 41 : 1315—1324.

Radomska-Leoniewska D. M., Skopińska-Rózewska E., Janowska-Stejfer E., Sobiecka M., Sadowska A. M., Hevelke A., Malejczyk J. 2010. N-acetylcysteine inhibits IL-8 and MMP-9 release

and ICAM-1 expression by bronchoalveolar cells from interstitial lung disease patients. *Pharmacol. Rep.* 62 : 131—138.

Sakimoto T., Sawa M. 2012. Metalloproteinases in corneal diseases: degradation and processing. *Cornea. Suppl.* 1 : S50—S56.

Samuni Y., Goldstein S., Dean O. M., Berk M. 2013. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim. biophys. acta.* 1830 : 4117—4129.

Shay K. P., Moreau R. F., Smith E. J., Smith A. R., Hagen T. M. 2009. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim. biophys. acta.* 1790 : 1149—1160.

Sodek J., Overall C. M. 1992. Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodelling. *Matrix. Suppl.* 1 : 352—362.

Touyz R. M., Briones A. M. 2011. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens. Res.* 34 : 5—14.

Tsou P. S., Balogh B., Pinney A. J., Zakhem G., Lozier A., Amin M. A., Stinson W. A., Schiopu E., Khanna D., Fox D. A., Koch A. E. 2014. Lipoic acid plays a role in scleroderma: insights obtained from scleroderma dermal fibroblasts. *Arthritis Res. Ther.* 16 : article 411 (13 p.). <http://arthritis-research.com/content/16/4/411>.

Tsuji-Naito K., Ishikura S., Akagawa M., Saeki H. 2010.  $\alpha$ -Lipoic acid induces collagen biosynthesis involving prolyl hydroxylase expression via activation of TGF- $\beta$ -Smad signaling in human dermal fibroblasts. *Connect. Tissue Res.* 51 : 378—387.

Tullberg-Reinert H., Jundt G. 1999. *In situ* measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius Red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor b2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem. Cell. Biol.* 112 : 271—276.

Van Wart H. E., Birkedal-Hansen H. 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 87 : 5578—5582.

Varani J., Perone P., Fligel S. E., Fisher G. J., Voorhees J. J. 2002. Inhibition of type I procollagen production in photodamage: correlation between presence of high molecular weight collagen fragments and reduced procollagen synthesis. *J. Invest. Dermatol.* 119 : 122—129.

Vayalil P. K., Olman M., Mutphy-Ulrich J. E., Postlethwait E. M., Liu R.-M. 2005. Glutathione restores collagen degradation in TGF- $\beta$ -treated fibroblasts by blocking plasminogen activator inhibitor-1 expression and activating plasminogen. *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 289 : L937—L945.

Vercelino R., Crespo I., de Souza G. F., Cuevas M. J., de Oliveira M. G., Marroni N. P., González-Gallego J., Tuñón M. J. 2010. S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats. *J. Mol. Med. (Berl.).* 88 : 401—411. Doi: 10.1007/s00109-009-0577-6.

Wang H. T., Gao J. L., Tian Y. X., Kan Q. 2006. Inhibition of N-acetyl-L-cysteine on expressions of matrix metalloproteinases increased by exposure to silicon dioxide in lung fibroblasts in rats. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 24 : 514—517.

Wenk J., Schuller J., Hinrichs C., Syrovets T., Azoitei N., Podda M., Wlaschek M., Brenneisen P., Schneider L. A., Sabiwalsky A., Peters T., Sulyok S., Dissemmond J., Schauen M., Krieg T., Wirth T., Simmet T., Scharffetter-Kochanek K. 2004. Overexpression of phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase in human dermal fibroblasts abrogates UVA irradiation-induced expression of interstitial collagenase/matrix metalloproteinase-1 by suppression of phosphatidylcholine hydroperoxide-mediated NF $\kappa$ B activation and interleukin-6 release. *J. Biol. Chem.* 29 : 45634—45642.

Whiteman M., Tritschler H., Halliwell B. 1996. Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and  $\alpha_1$ -antitrypsinase inactivation by oxidized and reduced lipoic acid. *FEBS Lett.* 379 : 74—76.

Zhang L., He Y. L., Li Q. Z., Hao X. H., Zhang Z. F., Yuan J. X., Bai Y. P., Jin Y. L., Liu N., Chen G., Yun X., Yao S. Q. 2014. N-acetylcysteine alleviated silica-induced lung fibrosis in rats by down-regulation of ROS and mitochondrial apoptosis signa-



ling. Toxicol. Mech. Methods. 24 : 212—219. Doi: 10.3109/15376516.2013.879974.

Zhao L., Wei Z., Yang F., Sun Y. 2015. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induced cellular proliferation and collagen synthesis was

mediated by reactive oxygen species in pulmonary fibroblasts. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi. 33 : 15—19.

Поступила 15 II 2018

REDUCTION IN THE ACCUMULATION OF COLLAGEN I ON THE SURFACE  
OF HUMAN SKIN FIBROBLASTS IN THE PRESENCE OF THIOL-CONTAINING ANTIOXIDANTS

I. V. Voronkina, K. M. Kirpichnikova, L. V. Smagina, N. M. Yudintseva,  
O. G. Lyublinskaya, I. A. Gamaley\*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

\* e-mail: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru

The effects of antioxidants N-acetylcysteine (NAC), a pair of  $\alpha$ -lipoic (LA) and dihydrolipoic (DHLA) acids on human skin fibroblasts *in vitro* was compared. Specifically we tried to determine changes in the generation of active oxygen species (ROS), activity of matrix metalloproteinases (MMP-1 collagenase and MMP-2 and MMP-9 gelatinases), and accumulation of collagen I on the cell surface in cell culture. Here we show that NAC decreases both levels of ROS in cells (as detected by fluorescent probe H<sub>2</sub>DCFDA) and the activity of all MMPs in the culture medium. In contrast of NAC, LA and DHLA did not changed ROS levels, increased the activity of collagenase MMP-1, but had small effect on gelatinase activity. At the same time the amount of collagen I on cells surface was reduced by about 20 % in the presence of NAC and DHLA. In summary, our data indicate that under normal physiological conditions antioxidants are able to interfere with the composition/properties of the extracellular matrix.

Key words: human skin fibroblasts, metalloproteinases, active oxygen species, collagen I, N-acetylcysteine,  $\alpha$ -lipoic acid, dihydrolipoic acid.