

OXIDATÍV STRESSZ HATÁSA VÁZIZOMSEJTEKRE

Hajtó Dorottya, Molnár Péter
pmolnar@pminfonet.com

Nyugat-magyarországi Egyetem, Természettudományi Kar
Biológiai Intézet, Állattani tanszék

9700 Szombathely Károlyi Gáspár tér 4.

Kategória: 3

Absztrakt

Vázizombetegég valamilyen típusában a felnőtt lakosság 40-44%-a szenved. Az izomsorvadás egyes típusainál felmerült a lehetőség, hogy oxidatív stressz szerepet játszhat az izom leépülésének folyamatában. Ezért egy oxidatív stressz modell (hidrogén- peroxid kezelés) hatását vizsgáltuk C2C12 egér vázizom sejt vonal differenciációjára. Hidrogén- peroxid kezelés koncentráció függvényében (2-10 mM) elpusztította mind a differenciálatlan, mind a differenciált vázizomsejteket. 3 μ M Adenosine a differenciált sejteknél, ellentétben a differenciálatlanoknál korábban tapasztaltnál, nem fordította vissza a hidrogén- peroxid hatását. Cyfluthrin 3 μ M koncentrációban gátolta a differenciációt, de érdekes módon növelte a sejtek metabolizmusának sebességét. Adenosine itt is hatástalannak bizonyult.

A kísérleteink alapján a hidrogén- peroxid kezelés megbízható oxidatív stressz modellnek tekinthető. A differenciáció folyamata nem változtatta meg a vázizomsejtek érzékenységét az oxidatív stresszre, de az Adenosine kedvező hatása viszont eltűnt. Krónikus Cyfluthrin kezelésre a differenciálódó sejtek érzékenyebbek, mint az akut kezelésre. Az általunk használt nagy áteresztőképességű *in vitro* modell alkalmas az oxidatív stressz vázizom sejtekre és azok differenciációjára kifejtett hatások vizsgálatára.

Kulcsszavak: Toxikológia, farmakológia, oxidatív stressz, hidrogén- peroxid, Cyfluthrin, Alamar blue, izom disztrófia

Bevezetés

Vázizombetegség különböző formái a felnőtt emberek 40-44%-át érinti. Kialakulásának lehet genetikai oka, káros szenvedély következtében vagy pedig valamilyen betegség visszamaradt komplikációja miatt is bekövetkezhet (Bonaldo, 2013; Davies, 2006; Emery, 2002). Az izomdisztrófiának több típusa van. Leggyakrabban gyermekkorban kezdődik és főként fiúgyermeket érinti. A progresszív izomdisztrófia következtében fokozatosan csökken a működőképes izomtömeg. Az izom leépülésének oka valamennyi ilyen betegségnél egy izomfehérje károsodása vagy hiánya, ami idővel a teljes izomzat pusztulását is magával hozhatja, és sajnos egyelőre nincs elfogadott terápiája (Flanigan, 2012). Az izomsorvadás (izomatrófia) leggyakrabban az izom használatának hiánya miatt következik be, de okozhatja az öregedés, metabolikus zavar, éhezés valamint számos betegség is (Bonaldo, 2013; Jackman, 2004). Az izomsorvadás patomechanizmusa még nem teljesen ismert, számos trigger mole-

kulát és jelátviteli kaszkádot azonosítottak melyek szerepet játszhatnak a betegség kialakulásában (Jackman, 2004; Zhang, 2007).

Felmerült az a lehetőség, hogy oxidatív stressz központi szerepet játszhat az izomsorvadás folyamatában (Powers, 2007; Pellegrino, 2011). Az oxidatív stressz a reaktív oxigén vagy nitrogén eredetű szabadgyökök keletkezése és az antioxidáns védő rendszerek közötti egyensúly megbomlása, a sejtek oxido- redukciós állapotának megváltozása során lép fel. Oxidatív stressz során az egyes szövetek és szervek biomolekulái sérülhetnek. Az oxidatív stressz jelentős szerepét számos betegségben leírták, mint például az öregedés, neurodegeneráció, szívinfarktus vagy daganatképződés (Halliwell, 2006; Finkel, 2000; Klaunig, 2010; Neuzil, 2005). Izomatrófia során leírták a szabadgyökök koncentrációjának növekedését (oxidatív stressz), melyek aktiválják azokat a proteázokat, amelyek szerepet játszanak az izomfehérjék lebontásában.

Laboratóriumunkban hidrogén- peroxid kezelést használunk sejtenyészeteken oxidatív stressz modellként (Chen, 2000). Hidrogén- peroxid kezelés egyszerűen és megbízhatóan modellezi az oxidatív stressz fő mechanizmusait és következményeit. Cyfluthrin egy gyakran használt szintetikus, apyretroidok családjába tartozó rovarirtó, melynél felmerült, hogy oxidatív stresszt okoz, és ez a magyarázata a toxicitásának (Sadowska-Woda, 2010), ezért ezt a vegyületet is vizsgáltuk. Az általunk használt C2C12 egér vázizom sejt vonal mind fiziológiájában mind farmakológiájában és toxikológiájában sok kísérletben bizonyítottan modellezi a vázizomsejtek tulajdonságait (Manabe, 2012). Soltow és munkatársai még azt is megmutatták, hogy differenciált C2C12 izomrostok, a natív vázizomrostokhoz hasonlóan, atrófián mennek keresztül, ha terhelésüket csökkentjük (Soltow, 2013). Cytotoxicitás mérésére az Alamar blue módszert állítottuk be, mely a sejtek metabolikus aktivitását méri, és általában arányos a túlélő sejtek számával (Geusens, 2007; Miret, 2006). Ezzel a kísérletsorozattal az volt a célunk, hogy megvizsgáljuk az oxidatív stressz hatását differenciált C2C12 vázizomsejteken.

Módszerek

C2C12 tenyésztés

A C2C12 (ATCC) sejt vonalat folyékony nitrogén gőz fázisában tartottuk. Kísérlet kezdetén 1 csövet (1 millió sejt) felolvasztottunk, lecentrifugáltunk (300g, 5 perc) majd 25 cm²-es sejtenyésztő flaskában (6 ml DMEM+10% FBS /Sigma/ tenyésztő médiumban) tenyésztettük amíg a tenyészet konfluens nem lett. Ezután a sejtekhez 3ml tripszint adtunk. Miután a sejtek feljöttek a felszínről a flaskához 5 ml tenyésztő médiumot adtunk majd 300g-n 5percig centrifugáltuk. Utána a sejteket szétosztottuk 24-lyukú plate-ekbe majd 37 °C-on 5% CO₂ mellett 3 napig tenyésztettük, míg a tenyészet konfluens nem lett.

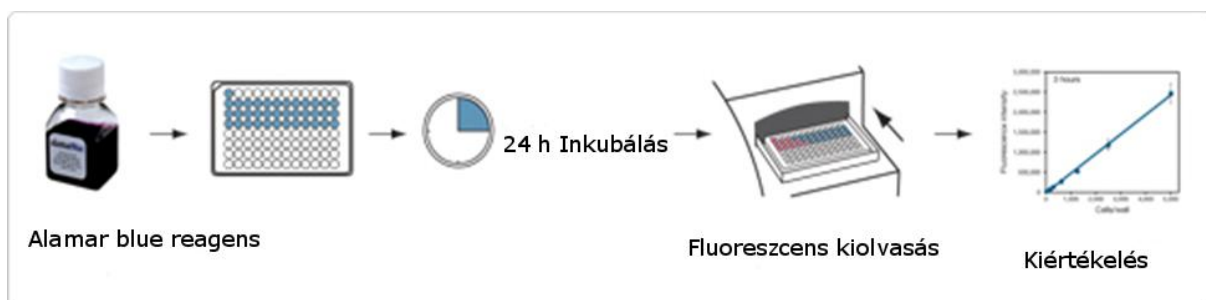
A differenciálatlan sejteket ekkor használtuk fel a kísérletekhez, vagy a sejteket szérum mentes DMEM médiumban 5 napig differenciáltattuk és úgy használtuk fel a kísérletekhez.

Kezelés

A vegyületeket törzsoldatból 100 x hígításban adtuk. Minden kísérletben 4 párhuzamosan dolgoztunk. Egy plate-n belül volt a kontroll és a kezelt csoportok. Vizsgált anyagok: Hidrogén- peroxid (Sigma) 2, 3, 4, 6, 10 mM; Adenosine (Sigma) 3 μ M; Cyfluthrin (Bulldock 25 hatóanyaga) 3, 1, 0.3, 0.1 μ M.

Kiértékelés

A kezelt és kontroll tenyészeteket lefényképeztük egy Olympus invertált fázis kontraszt mikroszkóppal 40x-es objektíven keresztül. A képeket kvalitatívan értékeltük. Ezután a tenyészetekhez 0.01 mg/ml végső koncentrációban Alamarblue (Sigma) festéket adtunk. A sejtekbe belépve, a mitokondriumban a resazurin átalakult resorufinná melynek mennyiségét egy fluoreszcens plateraderrel (530 nm excitáció, 580 nm emisszió) kvantifikáltuk (1. ábra). Az adatokat Microsoft Excell program segítségével értékeltük ki és ábrázoltuk. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg.

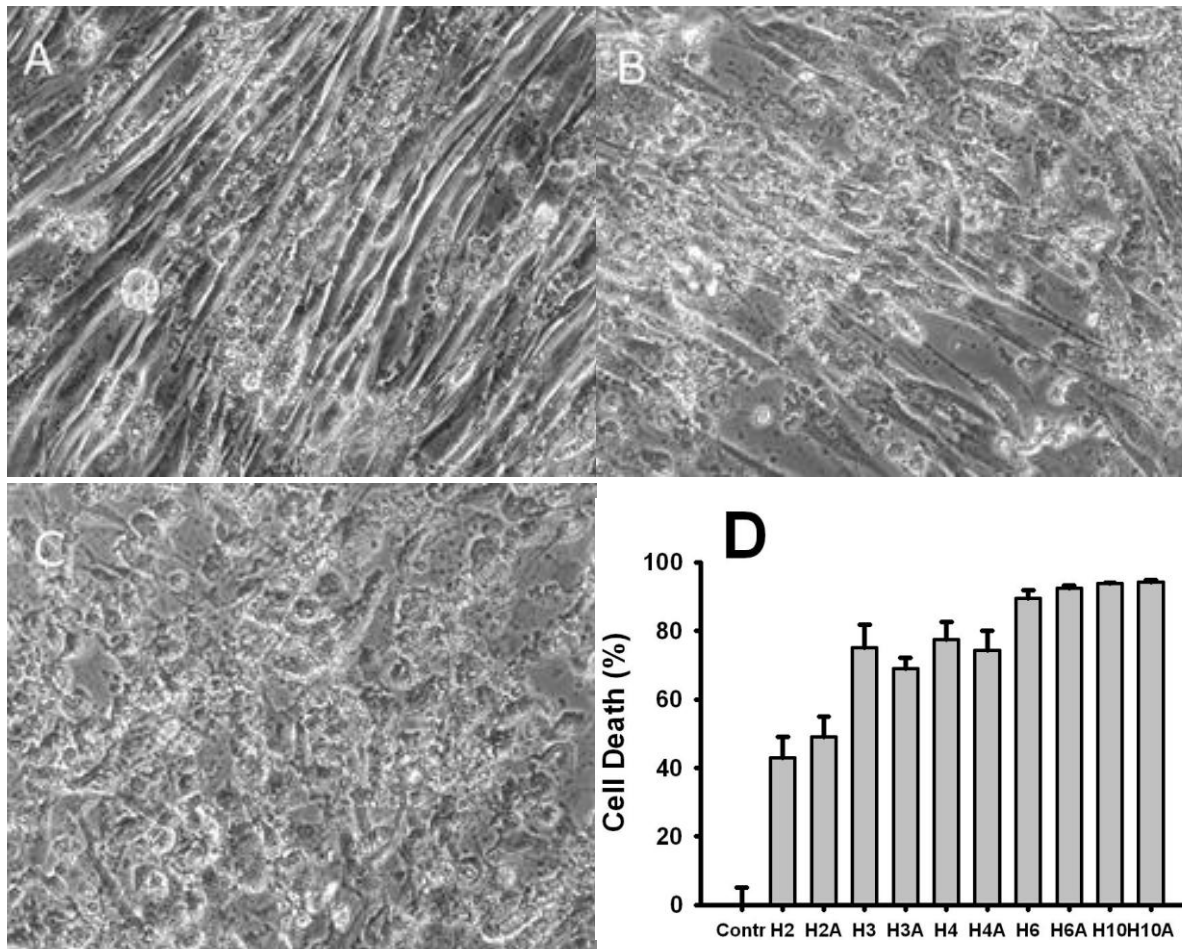


1. ábra. Az Alamar blue toxicitásitesztvázlata.<http://www.lifetechnologies.com/hu/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alarblue-rapid-and-accurate-cell-health-indicator.html> -alapján.)

Eredmények

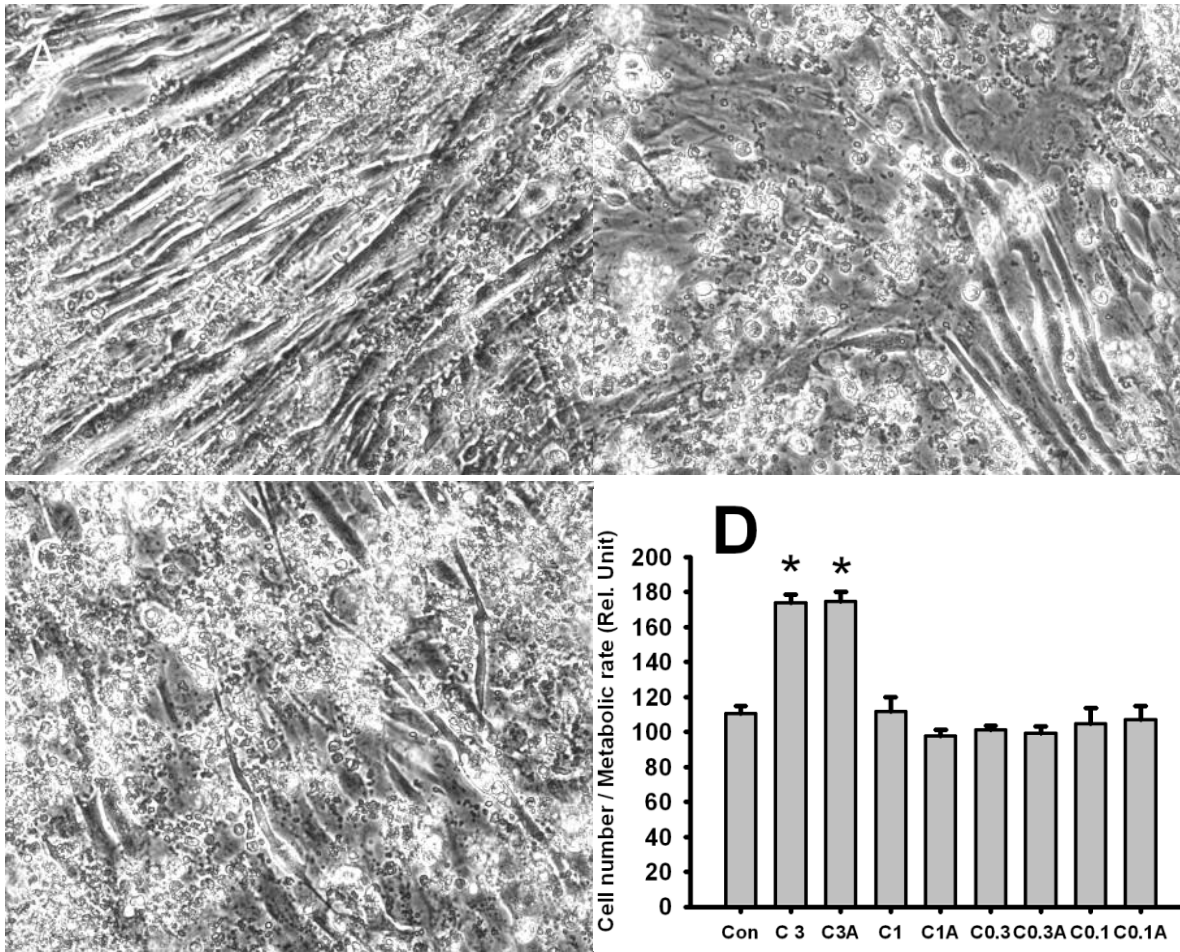
Korábbi kísérleteink leginkább arra irányultak, hogy hogyan hatnak toxinok differenciálatlan C2C12 tenyészeteken (Lakatos, 2014). Akkor megállapítottuk, hogy a C2C12 egér vázizom sejt vonal könnyen tenyészthető, megbízható sejtforrás a toxikológiai kísérletekhez. Ebben a kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy hogyan hatnak a toxinok a differenciáltatott vázizom sejtekre, vagy magára a differenciálódás folyamatára. C2C12 sejtek megbízhatóan, reprodukálhatóan és egyszerűen differenciálthatók vázizom rostokká (2A és 3A ábra.). A differenciáció folyamata kb. 5 napig tart, kezdetben a sejtek hosszúkas alakúvá válnak, párhuzamosan rendeződnek, majd fúzionálnak. A differenciáció kvantitatív értékelése fényképek alapján lehetséges, de időigényes feladat volt, ezért inkább kvalitatív kiértékelést használtunk, amely után, Alamar blue tesztel mértük a sejtek metabolikus aktivitását. Korábbi kísérleteinkben és az irodalom alapján is ez jól korrelált a sejtszámmal. Az Alamar blue teszt olcsó, érzékeny és nagy áteresztőképességű módszer, mely csak kismértékben befolyásolja a sejtek fiziológiai aktivitását. 24-órás hidrogén- peroxid kezelés koncentrációfüggően elpusztította a differenciált C2C12 izomrostokat (2. Ábra). A koncentráció/sejtpusztulás görbe nagyon meredeknek bizonyult, 1 mM H₂O₂ csak minimális (adat korábbi kísérletből származik), míg 6

mM szinte teljes pusztulást okozott. Korábbi kísérletekben, melyeket differenciálatlan C2C12 sejteken végeztünk, 3 μ M Adenosine bizonyult a leghatékonyabbnak a hidrogén- peroxid toxicitásának a visszafordításában, bár ez a koncentráció sem okozott teljes védelmet. Differenciált C2C12 izomrostokon Adenosine teljesen hatástalannak bizonyult.



2. ábra. Hidrogén- peroxid kezelés hatása differenciált C2C12 sejtekre. A: kezeletlen kontroll. B: 24 órás 4mM hidrogén- peroxid kezelés jelentős sejtpusztulást váltott ki C: 3 μ M Adenosine nem fordította vissza a H₂O₂ kezelés hatását. D: Hidrogén- peroxid kezelés differenciált C2C12 sejtekre kifejtett hatásának mérése Alamar blue módszerrel. 2 mM H₂O₂ (H2) több mint 40% sejtpusztulást okozott. A hatás koncentrációfüggő volt és minden vizsgált koncentrációban szignifikáns. 3 μ M Adenosine nem változtatta meg szignifikánsan a hidrogén- peroxid kezelés hatását.

Cyfluthrin korábbi akut kísérletekben koncentrációfüggően elpusztította a differenciálatlan C2C12 sejteket. Akkor is megfigyeltünk egy érdekes hatást, alacsonyabb koncentrációkban mintha növelte volna a sejtszámot az Alamar blue teszt szerint, de a fényképeken nem volt megfigyelhető ez a hatás. A mostani kísérletekben 5 napig adtuk a Cyfluthrint a differenciáltság kezdetétől. 3 μ M Cyflutrin, mely akut adásnál éppen a toxicitási küszöb alatt volt, láthatóan gátolta az izomrostok kialakulását (3). Meglepő módon az Alamar blue teszt a sejtek számának, vagyis metabolikus aktivitásának drasztikus (több mint 50%-os) növekedését jelezte. Adenosine kezelés nem befolyásolta a Cyflutrin hatását.



3. ábra. Cyfluthrin kezelés hatása differenciált C2C12 sejtekre. A: kezeletlen kontroll. B: 24 órási 3 μ M Cyfluthrin kezelés jelentősen gátolta a differenciációt C: 3 μ M Adenosine nem fordította vissza a Cyfluthrin kezelés hatását. D: Cyfluthrin kezelés differenciált C2C12 sejtekre kifejtett hatásának mérése Alamar blue módszerrel. 3 μ M Cyfluthrin (C) több mint 50%-al megnövelte a sejtek metabolizmusának sebességét. A többi koncentrációban a kezelés nem volt hatékony. 3 μ M Adenosine (A) nem változtatta meg szignifikánsan a Cyfluthrin kezelés hatását.

Megvitatás

A differenciált C2C12 izomrostok érzékenysége az oxidatív stresszre hasonlóan bizonyult, mint a differenciálatlan C2C12 sejteké. A hidrogén-peroxid kezelés 1 mM koncentráció felett, mely előfordulhat fiziológiás körülmények között is, toxikus a vázizomrostokra. Adenosine kezelés hatástalannak bizonyult, aminek a legvalószínűbb magyarázata, hogy a differenciáció folyamata során megváltozott az Adenosine receptorok expressziója. Ennek az eldöntése további vizsgálatokat igényel. A mi adataink is azt a véleményt erősítik, hogy oxidatív stressz jelentős szerepet játszhat az izomsorvadásban.

Cyfluthrin komplex módon hat a vázizomsejtekre, a toxikus koncentráció határán jelentősen megnöveli a sejtek metabolikus sebességét. Hogy ez összefügg-e a Cyfluthrin oxidatív stresszt indukáló hatásával vagy teljesen más mechanizmuson keresztül valósul meg, további vizsgálatokat igényel.

A hidrogén-peroxid oxidatív stressz modell egy vázizom sejt vonallal kombinálva sikeresen használható vázizomsejtek oxidatív stressz toleranciájának a vizsgálatára és olyan vegyületek tesztelésére, melyek visszafordíthatják ezt a folyamatot.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Molnár Péternek folyamatos, önzetlen, segítő támogatását mely nélkül e munka nem jöhetett volna létre. Köszönetemet szeretném kifejezni a Nyugat-magyarországi Egyetem Természettudományi Karának a munka támogatásáért.

Irodalomjegyzék

- Bonaldo, P., & Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models&Mechanisms*, 6, 25–39.
- Chen, Q. M., Tu, V. C., Wu, Y., & Bahl, J. J. (2000). Hydrogen Peroxide Dose Dependent Induction of Cell Death or Hypertrophy in Cardiomyocytes, 373 (1), 242–248.
- Davies, K. E. & Nowak, K. J. (2006). Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7, 762–773.
- Emery, A. E. H. (2002). The muscular dystrophies. *The Lancet*, 359, 687–695.
- Finkel, T. & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239–247.
- Flanigan, K. M. (2012). The muscular dystrophies. *Seminars in Neurology*, 32, 255–63.
- Geusens, N. Hanssens, M., Luyten, C., & Pijnenborg, R. (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability ,migration and invasion of choriocarcinoma cells, 22(5), 1304–1309.
- Halliwel, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97, 1634–1658.
- Jackman, R. W. & Kandarian, S. C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American Journal of Physiology. CellPhysiology*, 287, C834–C843.
- Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., & Hocevar, B. A. (2010). Oxidative stress and oxidative-damage in carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, 38, 96–109.
- Lakatos, Renáta és Péter Molnár (2014) *Cell Cultures in Pharmacological and Toxicological Research. NYME SEK Tudományos Közlemények 2014, Természettudományi Kötet. Inpress.*
- Manabe, Y., Miyatake, S., Takagi, M., Nakamura, M., Okeda, A., Nakano, T., ... Fujii, N. L. (2012). Characterization of an Acute Muscle Contraction Model Using Cultured C2C12 Myotubes. *PLoS ONE*, 7.
- Miret, S., Groene, E. De, & Klaffke, W. (2006). Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2. *Journal of Biomolecular Screening*, 11, 184–193.
- Neuzil, J., Rayner, B., Lowe, H., & Witting, P. (2005). Oxidative stress in myocardial ischaemia reper fusion injury: a renewed focus on a long-standing area of heart research. *Redox Report*, 10, 187–197.
- Pellegrino, M. A., Desaphy, J.-F., Brocca, L., Pierno, S., Camerino, D. C., & Bottinelli, R. (2011). Redox homeostasis, oxidative stress and disuse muscle atrophy. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 9), 2147–60.
- Powers, S., Kavazis, A., & McClung, J. (2007). Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology*, 2389–2397.
- Sadowska-Woda, I., Wójcik, N., Karowicz-Bilińska, A., & Bieszczad-Bedrejcuk, E. (2010). Effect of selected antioxidants in beta-cyfluthrin-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*. 24, 879–884.

- Soltow, Q. A., Zeanah, E. H., Lira, V. A., & Criswell, D. S. (2013). Cessation of cyclic stretch induces atrophy of C2C12 myotubes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434, 316–321.
- Zhang, P., Chen, X., & Fan, M. (2007). Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Medical Hypotheses*, 69, 310–321.