

Vplyv omega-3 mastných kyselín na stresom indukovanú senescenciu

Mgr. Mária Janubová, Ing. Katarína Koňariková, PhD,
doc. Ing. Ingrid Žitňanová, PhD

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK Bratislava



Interreg

Slovakia-Austria

European Regional Development Fund



EUROPEAN UNION

Senescencia

▶ **Bunková senescencia** - ireverzibilné zastavenie bunkového cyklu sprevádzané zmenami v bunkovej morfológii a fyziológii

- **Replikatívna senescencia - RS**

Zastavenie bunkového cyklu v dôsledku skrátenia telomér na tzv. kritickú dĺžku

- **Stresom indukovaná (predčasná) senescencia - SISP**

Zastavenie bunkového cyklu v dôsledku pôsobenia rôznych foriem stresu

(poškodenie DNA, oxidačný stres, dysfunkcia mitochondrii, nadexpresia protoonkogénov ai.)

Vplyv senescentných buniek na organizmus

- ▶ **Akumulácia senescentných buniek v organizme**
 - zhoršovanie funkcie tkanív a orgánov
- ▶ **SASP (sekrécia látok asociovaná so senescenciou)**
 - parakrinná indukcia senescencie
 - degradácia kolagénu, elastínu a iných komponentov medzibunkovej hmoty
 - zmena v zložení tkanivového prostredia - narušenie funkcie kmeňových buniek a imunitného systému
 - chronický zápal
 - rozvoj ochorení spojených so starnutím
 - rozvoj nádorových ochorení

Vplyv omega-3 mastných kyselín na stresom indukovanú senescenciu

➤ Model stresom indukovanej senescencie

- MRC-5 ľudské pľúcne fbroblasty

Indukcia senescencie - 80 μM etopozid/1 hod alebo 100 μM peroxid vodíka/0,5hod

Detekcia senescencie - po 4 dňoch od ovplyvnenia

Detekcia senescencie - Experimenty

Detekcia aktivity SA- β -galaktozidázy - zvýšená aktivita SA- β -galaktozidázy po indukcii senescencie peroxidom vodíka alebo etopozidom

MTT test viability/proliferácie - znížená viabilita/proliferácia buniek po indukcii senescencie peroxidom vodíka alebo etopozidom

Detekcia expresie proteínu p21 (Western blot) - zvýšená expresia proteínu p21 po indukcii senescencie peroxidom vodíka alebo etopozidom

Detekcia reaktívnych foriem kyslíka - zvýšené množstvo reaktívnych foriem kyslíka po indukcii senescencie peroxidom vodíka alebo etopozidom

► Omega-3 mastné kyseliny

Biologicky významné látky

- zvyšujú fluiditu membrán
- ovplyvňujú vlastnosti membrán ako je elasticita, permeabilita, fúzia membrán a aktivita proteínov v membránach vrátane transmembránových enzýmov a receptorov v membránach

Vplyv na stresom indukovanú senescenciu

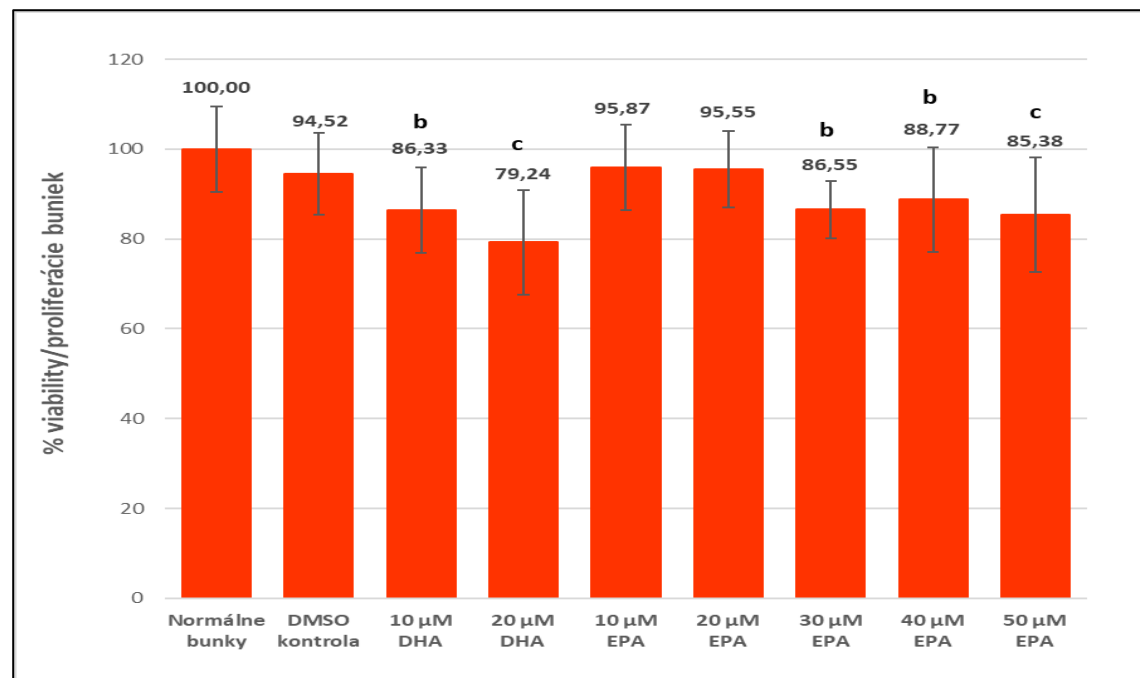
- Eikozapentaénová kyselina - EPA 20:5 (5, 8, 11, 14, 17)
- Dokozahexaénová kyselina - DHA 22:6 (4, 7, 10, 13, 16, 19)

Postreatment - EPA alebo DHA bola pridaná k bunkám na 24 hodín ihneď po skončení inkubácie buniek s peroxidom vodíka alebo etopozidom

DHA a EPA boli rozpustené v DMSO

MTT test viability/proliferácie buniek

Zdravé bunky

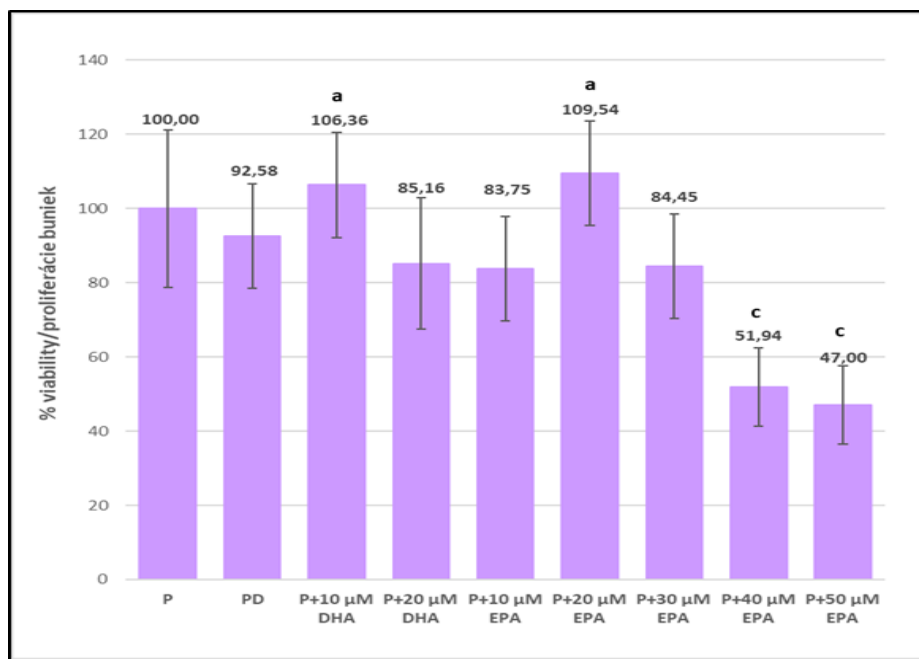


Obr. 1 Viabilita/proliferácia zdravých buniek po ovplyvnení s DHA alebo EPA na 24 hodín. DMSO kontrola - bunky ovplyvnené 1000x riedeným DMSO/24 hod; Výsledky sú priemer \pm SD 3 nezávislých experimentov, každý experiment bol robený v 4-6 jamkách; jednosmerná ANOVA s Bonferroniho korekciou; NB vs. DMSO; DMSO vs. omega-mastné kyseliny; b - $p < 0.01$; c - $p < 0.001$

DHA alebo EPA výrazne neznižujú viabilitu/proliferáciu zdravých buniek v porovnaní s DMSO kontrolou

MTT test viability/proliferácie buniek

► Postreatment



Obr. 2: Vplyv omega-3 mastných kyselín na viabilitu/proliferáciu buniek v podmienkach indukujúcich senescenciu P – bunky ovplyvnené 100 µM peroxidom vodíka/0,5 hod; PD– bunky ovplyvnené 2000x riedeným DMSO/24h; Výsledky sú priemer ± SD 3 nezávislých experimentov, každý experiment bol robený v 4-6 jamkách; jednosmerná ANOVA s Bonferroniho korekciou; P vs. PD; PD vs. PDHA; PD vs. PEPA; a - p <0.05; c - p <0.001

10 µM DHA vedie k nárastu viability/proliferácie buniek oproti PD kontrole

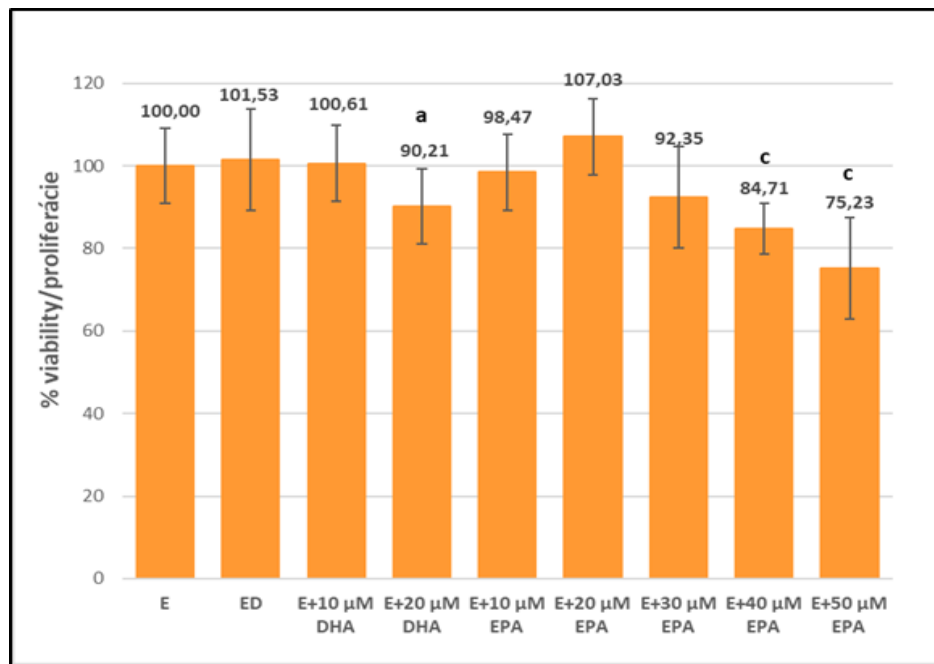
20 µM EPA vedie k nárastu viability/proliferácie buniek oproti PD kontrole

20 µM DHA mierne redukovala viabilitu/proliferáciu buniek oproti PD kontrole

40 a 50 µM EPA výrazne redukovala viabilitu/proliferáciu buniek v porovnaní s PD kontrolou

MTT test viability/proliferácie buniek

► Postreatment



Obr. 3: Vplyv omega-3 mastných kyselín na viabilitu/proliferáciu buniek v podmienkach indukujúcich senescenciu E - bunky ovplyvnené 80 μM etopozidom/1 hod; ED – bunky ovplyvnené 2000x riedeným DMSO/24h; Výsledky sú priemer \pm SD 3 nezávislých experimentov, každý experiment bol robený v 4-6 jamkách; jednosmerná ANOVA s Bonferroniho korekciou; E vs. ED; ED vs EDHA; ED vs. EEPA; a - $p < 0.05$; c - $p < 0.001$

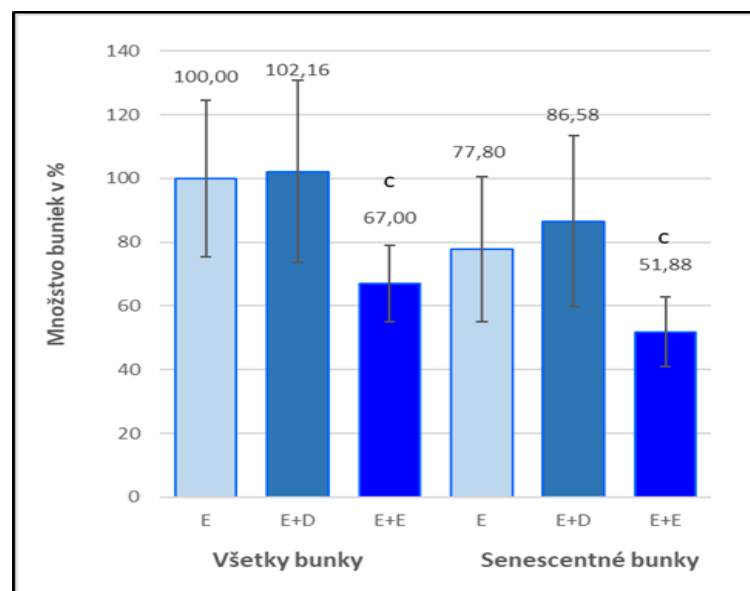
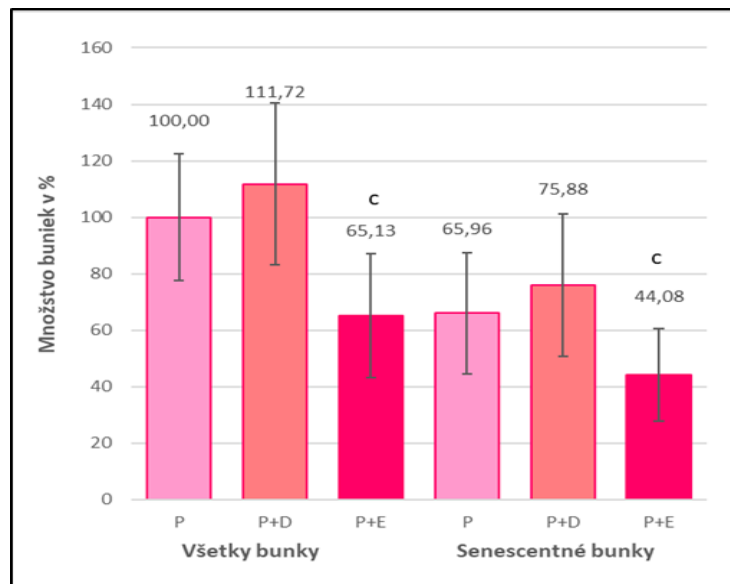
20 μM DHA mierne redukovala viabilitu/proliferáciu buniek oproti ED kontrole

30, 40 a 50 μM EPA vedie k postupnému poklesu viability/proliferácie buniek oproti ED kontrole

20 μM EPA vedie k miernemu zvýšeniu viability/proliferácie buniek oproti ED kontrole

Detekcia aktivity SA-β- galaktozidázy

► Posttreatment 50 μM EPA



50 μM EPA vedie k poklesu celkového množstva buniek a zároveň k poklesu celkového množstva senescentných buniek v podmienkach indukujúcich senescenciu v porovnaní s PD/ED kontrolou

Obr. 4: Vplyv 50 μM EPA na aktivitu SA-β-galaktozidázy v podmienkach indukujúcich senescenciu P – bunky ovplyvnené 100 μM peroxidom vodíka/0,5 hod; E - bunky ovplyvnené 80 μM etopozidom/1 hod; PD/ED – bunky ovplyvnené 2000x riedeným DMSO/24h; PE/EE – bunky ovplyvnené 50 μM EPA/24h; Výsledky sú priemer ± SD 3 nezávislých experimentov, jednosmerná ANOVA s *Bonferroniho* korekciou; P vs. PD; PD vs. PEPA; Psen vs PD sen; PD sen vs. PEPAsen; E vs. ED; ED vs. EEPA; Esen vs. EDsen; EDsen vs. EEPAsen; c - p <0.001; c' - p <0.001;

Senescentné bunky - bunky so zvýšenou aktivitou SA-β-galaktozidázy

Detekcia aktivity SA-β- galaktozidázy

► Posttreatment 50 μM EPA

Ovplyvnenie buniek	Senescentné bunky % ± SD
100 μM Peroxid vodíka/0.5 h	64,68 ± 8,43
100 μM Peroxid vodíka/0.5 h + DMSO 2000x/24h	67,1 ± 6,14
100 μM Peroxid vodíka/0.5 h + 50 μM EPA/24h	67,54 ± 5,95

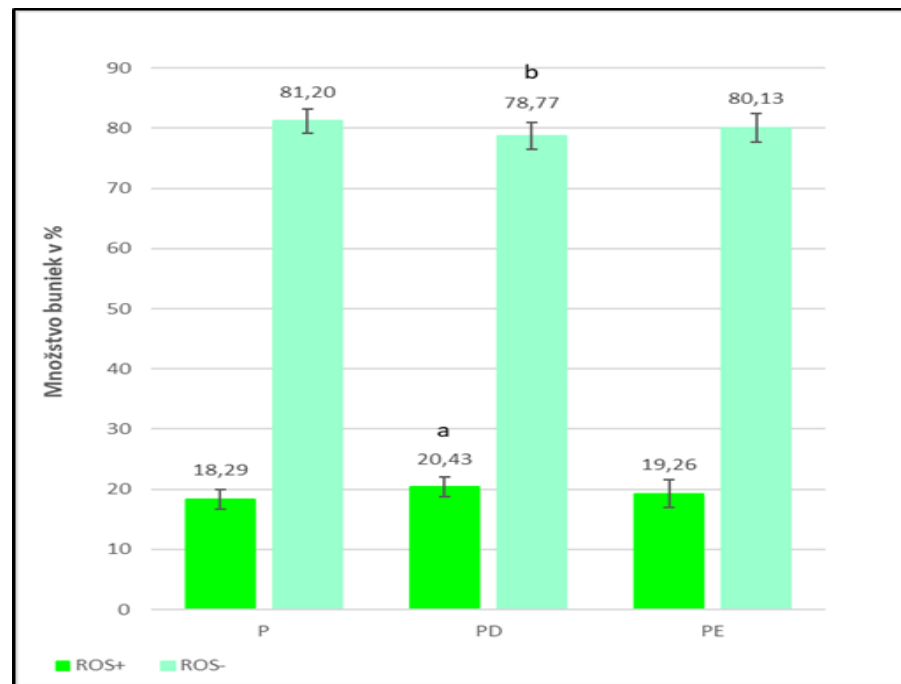
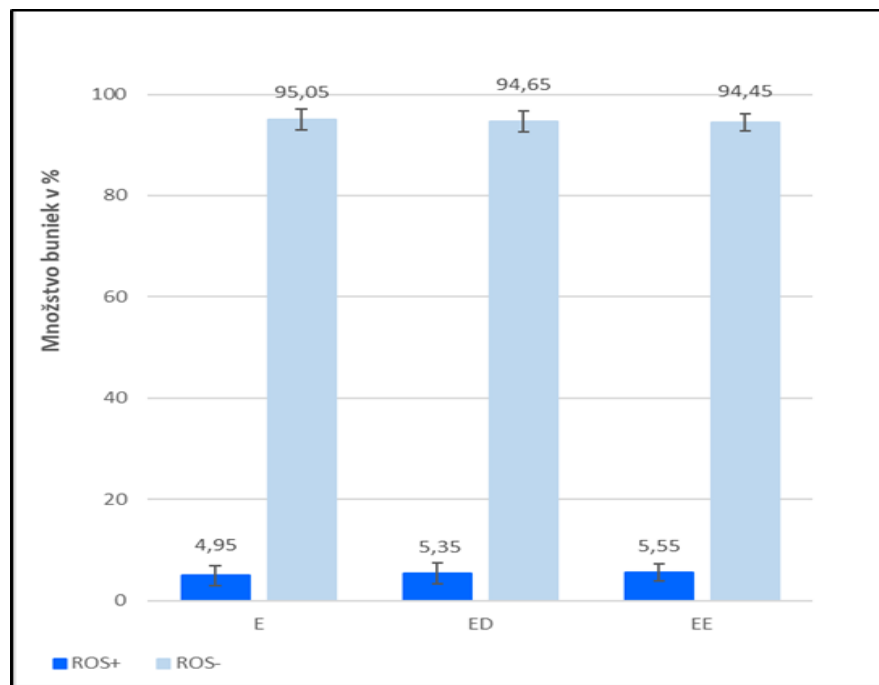
Ovplyvnenie buniek	Senescentné bunky % ± SD
80 μM Etopozid/1 h	77,12 ± 7,44
80 μM Etopozid/1 h + DMSO 2000x/24h	84,21 ± 4,05
80 μM Etopozid/1 h + 50 μM EPA/24h	77,19 ± 4,9

50 μM EPA výrazne nemení % senescentných buniek v podmienkach peroxidom indukovanej senescencie v porovnaní s DMSO kontrolou a mierne znižuje % senescentných buniek v podmienkach etopozidom indukovanej senescencie v porovnaní s DMSO kontrolou

Výsledky sú priemer ± SD troch nezávislých experimentov. Jednosmerná ANOVA s *Bonferroniho* korekciou P vs PDMSO; PDMSO vs PEPA; E vs EDMSO; EDMSO vs EEPA; n – nesignifikantné; ** - p < 0.01

Detekcia reaktívnych foriem kyslíka

► Posttreatment 50 μM

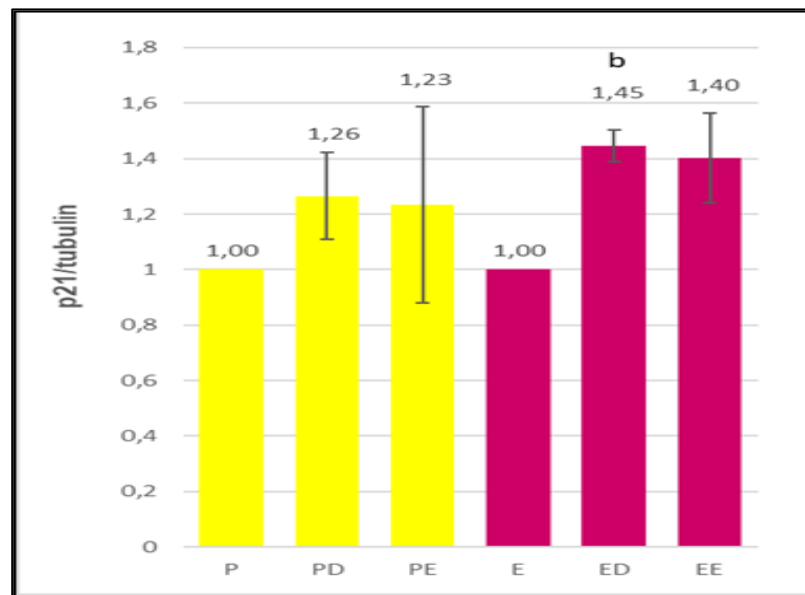


Obr. 5: Vplyv 50 μM EPA na množstvo reaktívnych foriem kyslíka v podmienkach indukujúcich senescenciu P – bunky ovplyvnené 100 μM peroxidom vodíka/0,5 hod; E - bunky ovplyvnené 80 μM etopozidom/1 hod; PD/ED – bunky ovplyvnené 2000x riedeným DMSO/24h; PE/EE – bunky ovplyvnené 50 μM EPA/24h; Výsledky sú priemer \pm SD 3 nezávislých experimentov, každý experiment bol robený v 3-4 jamkách; jednosmerná ANOVA s Bonferroniho korekciou; P vs. PD; PD vs. PE; E vs. ED; ED vs. EE; a - $p < 0,05$; b - $p < 0,01$

50 μM EPA nevedie k výraznej zmene v množstvo reaktívnych foriem kyslíka v bunkách v podmienkach indukujúcich senescenciu v porovnaní s PD/ED kontrolou

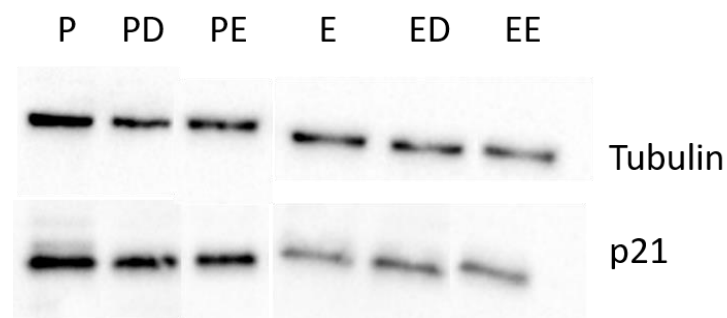
Detekcia expresie proteínu p21

► Posttreatment 50 μM



A.

50 μM EPA výrazne nemení expresiu proteínu p21 v podmienkach indukujúcich senescenciu v porovnaní s PD/ED kontrolou



B.

Obr. 6: Expresia proteínu p21 po posttratmente s 50 μM EPA v podmienkach indukujúcich senescenciu **A.** relatívna expresia proteínu p21; Výsledky sú priemer \pm SD 5 nezávislých experimentov; P vs. PD; PD vs. PE; E vs. ED; ED vs. EE; a - $p < 0.05$; c - $p < 0.001$; **B.** detekcia expresie proteínu p21 pomocou western blot analýzy; P – bunky ovplyvnené 100 μM peroxidom vodíka/0,5 hod; E - bunky ovplyvnené 80 μM etopozidom/1 hod; PD/ED – bunky ovplyvnené 2000x riedeným DMSO/24h; PE/EE – bunky ovplyvnené 50 μM EPA/24h

Záver

▶ Posttreatment - 50 μ M EPA

▶ Model peroxidom indukovanej senescencie

- klesá celkové množstvo buniek (na $47 \pm 10,6\%$ oproti $92,6 \pm 14,1\%$ pre DMSO-peroxid kontrolu)
- nemení sa výrazne % senescentných buniek (SA-B-galaktozidázová aktivita, množstvo reaktívnych foriem kyslíka, expresia p21)

▶ Model etopozidom indukovanej senescencie

- klesá celkové množstvo buniek (na $75,2 \pm 12,2\%$ oproti $101,5 \pm 12,2\%$ pre DMSO-etopozid kontrolu)
- nemení sa výrazne % senescentných buniek (SA-B-galaktozidázová aktivita mierne klesá, ale nemení sa množstvo reaktívnych foriem kyslíka a expresia p21)

Posttreatment s 50 μ M EPA pravdepodobne nepôsobí na samotný proces senescencie, ale znižuje viabilitu/proliferáciu buniek, ktoré rastú v stresových podmienkach.