



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 48–52

VITAMÍN D V ÚLOHE REPARÁCIE DNA SENESCENTNÝCH BUNIEK POŠKODENÝCH PEROXIDOM VODÍKA

Koňariková, K.¹, Janubová, M.¹, Muchová, J.¹, Ďuračková, Z.¹, Žitňanová, I.¹

¹Ústav Lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, LF UK, Bratislava

katarina.konarikova@fmed.uniba.sk

SÚHRN

V rámci našich experimentov sme sa zamerali na sledovanie protektívnych účinkov vitamínu D na senescentné (starnúce) bunky MRC-5 v pasáži 21 (p21) a nesenescentné (mladé) bunky v pasáži 8 (p8) pred a po poškodení peroxidom vodíka.

MTT testom sme zistili, že vitamín D zvýšil prežívanie buniek p8 nad 100 % v koncentrácii 20 $\mu\text{mol/L}$ a 25 $\mu\text{mol/L}$. V prípade buniek p21 vitamín D zvýšil prežívanie buniek nad 100 % v koncentrácii 10 $\mu\text{mol/L}$ a 25 $\mu\text{mol/L}$. Tieto zvýšenia však neboli signifikantné.

Následne sme sledovali vplyv vitamínu D na poškodenie DNA buniek indukované peroxidom vodíka a zistili sme, že vitamín D vykazuje nielen protektívny, ale aj reparačný účinok. Tento účinok bol signifikantný v koncentráciách 1, 10, 20, 25 a 50 $\mu\text{mol/L}$.

Kľúčové slová: starnutie; vitamín D; ľudské fibroblasty; protektívny účinok; DNA

ABSTRACT

In our experiments we focused on monitoring the protective effects of vitamin D on senescent MRC-5 cells

at passage 21 (p21) and non-senescent cells at passage 8 (p8) before and after hydrogen peroxide damage.

By MTT test we found that vitamin D increased the survival of p8 cells above 100 % at a concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$ and 25 $\mu\text{mol/L}$. In the case of p21 cells, vitamin D increased cell survival above 100 % at a concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$ and 25 $\mu\text{mol/L}$. However, these increases were not significant.

Subsequently, we monitored the effect of vitamin D on hydrogen peroxide-induced DNA damage in cells and found that vitamin D has not only a protective but also a repair effect. This effect was significant at concentrations of 1, 10, 20, 25 and 50 $\mu\text{mol/L}$.

Key words: aging; vitamin D; human fibroblasts; protective effect; DNA

ÚVOD

V súčasnosti sa mnoho štúdií venuje účinkom vitamínu D na ľudské zdravé, ale aj nádorové bunky v podmienkach in vitro (C a l d e r, K e w, 2002). Oxidačný stres a nedostatok vitamínu D vedú k mnohým zápalovým reakciám, ktoré majú na bunky a následne na celý ľudský organizmus, fatálne následky (P f e f f e r a kol., 2008).

Úloha vitamínu D v prevencii a liečbe chorôb spojených so starnutím nie je ešte dobre preštudovaná, a preto s objavom receptorov vitamínu D v nervovom, kardiovaskulárnom a endokrinnom systéme sa jeho úloha i vplyv na tieto systémy stala dôležitou oblasťou výskumu. Starší ľudia sú vystavení riziku nižšej hladiny vitamínu D v dôsledku jeho zníženej syntézy v koži, ako aj nižšieho príjmu stravou. V súčasnosti prebiehajú viaceré klinické štúdie, ktoré zisťujú prínos doplnku vitamínu D pri prevencii a liečbe rôznych ochorení (M e e h a n, P e n c k o f e r, 2014).

Nedostatok vitamínu D je zdravotný problém, ktorý významne ovplyvňuje zdravie starších. Hoci nové štúdie preukázali sľubné výsledky týkajúce sa úlohy vitamínu D v súvislosti s rôznymi ochoreniami kostí a kardiovaskulárneho systému, rakoviny a imunitného systému, tieto zistenia sú nekonzistentné a v súčasnosti nie je možné vyvodiť nijaké jednoznačné závery (N e w b e r r y a kol., 2014).

Adekvátna hladina vitamínu D môže byť tiež prospešná pri udržiavaní integrity DNA. Túto úlohu vitamínu D možno rozdeliť na primárnu funkciu, ktorá zabraňuje poškodeniu DNA, a na sekundárnu funkciu, ktorá reguluje rýchlosť rastu buniek. Suplementácia vitamínu D redukuje 8-hydroxy-2'-deoxyguanozín, marker oxidačného poškodenia (F r a g a a kol., 1990) znižuje poškodenie oxidačným stresom a chromozomálnych aberácií, preventívne pôsobí na skrátene telomér a inhibuje aktivitu telomeráz. Sekundárna funkcia vitamínu D pri prevencii poškodenia DNA zahŕňa reguláciu aktivity poly-ADP-ribóza polymerázy v odpovedi na poškodenie DNA, ktorá sa podieľa na detekcii lézií DNA. Vitamín D je tiež schopný regulovať bunkový cyklus, čím bráni replikácii poškodenej DNA a reguluje apoptózu (N a i r - S h a l l i k e r a kol., 2012).

Cieľom našej štúdie bolo vyšetriť protektívne účinky vitamínu D na senescentné bunky MRC-5 v pasáži 21 (p21) a nesenescientné bunky v pasáži 8 (p8) pred a po poškodení peroxidom vodíka.

METÓDA

Bunkové línie

Ľudské pľúcne fibroblasty MRC-5 boli kultivované pri 37°C, 5% CO₂ v médiu MEM (Minimum Essential Media), ktoré obsahovalo L-glutamín, neesenciálne aminokyseliny, 10% fetálne sérum a 5% ATB (antibiotiká), staticky

v Petriho miske. Bunky boli získané z American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA.

MTT test

Kontrolné a vitamínom D ovplyvnené bunky sme nasadili do 96 jamkovej sterilnej platničky a kultivovali pri 37 °C, 5 % CO₂ po dobu 24 h. Po skončení kultivácie sme zliali kultivačné médium prevrátením platničky a do každej jamky napipetovali 0,1 mL média obsahujúceho MTT (5 mg MTT soli rozpustíme v 1 mL PBS (Phosphate Buffered Saline) a uchováme pri 4 °C v tme, prefiltrujeme cez filter a riedime v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) v pomere 1 : 10). Prikryté platničky sme kultivovali v termostate 3,5 hod. pri 37 °C. Po tejto dobe sme médium opäť zliali a pridali extrakčný roztok (100 % DMSO (Dimethylsulfoxid)) v objeme 0,1 mL na jamku. Po 10 min. inkubácii pri laboratórnej teplote sme merali absorbanciu pri 490 nm.

Comet assay

Kométovej test slúži na určenie genotoxického účinku testovanej látky, t.j. určenie priamych, resp. oxidačných zlomov na molekule DNA vplyvom danej látky (C o l l i n s a kol., 1996). Po zdrsnení povrchu podložných sklíčok 1% roztokom NMP (Normal Melting Point) agarózy sme naniesli prvú vrstvu gélu, 100 µL 1 % NMP agarózy. Potom sme si pripravili bunkovú suspenziu o koncentrácii 1,5–2 x 10⁵ buniek/mL riedením v PBS. 1 mL takto pripravenej suspenzie sme preniesli do ependorfky a scentrifigovali 5 min. pri 134 g. Sediment sme rozsuspendovali v príslušnom objeme 0,75 % LMP (Low Melting Point) agarózy a 85 µL s počtom buniek 2–2,5 x 10⁴ buniek na sklíčko sme naniesli na prvú vrstvu gélu. Potom sme bunky lyzovali 60 min. v kvetách s lyzujúcim roztokom (2,5 mol/L NaCl, 100 mmol/L Na₂EDTA, 10 mmol/L TRIS) s prídavkom Tritonu X-100 (0,05 %). Po prebehnutí lýzy sme sklíčka vybrali a nechali odkvapkať a potom dvakrát premyli Fpg tlmivým roztokom (40 mmol/L HEPES ((4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)); 0,1 mol/L KCl; 0,5 mmol/L Na₂EDTA; 0,2 mg/mL BSA (Bovine Serum Albumin solution) pH 7,4). Následne prebehla inkubácia 30 min. s enzýmom (Fpg (Formamidopyrimidine DNA Glycosylase), 50 µL), potom odvíjanie DNA. Sklíčka sme uložili do elektroforetickej nádoby, zaliali elektroforetickým roztokom (5 mol/L NaOH, 0,2 mol/L Na₂EDTA, H₂O, pH > 13) a nechali odvíjať 40 min. Po skončení odvíjania DNA

sme uskutočnili elektroforézu, ktorá prebiehala 30 min. pri 300 mA a 25 V. Po ukončení elektroforézy sme sklíčka vybrali z elektroforetickej nádoby, vložili ich do kyviet a zaliali neutralizačným roztokom (0,4 mol/L TRIS, H₂O). Po 10 min. sme neutralizačný roztok vymenili, postup opakovali dvakrát. Po skončení neutralizácie sme sklíčka z kyviet opatrne vybrali a nechali odkvapkať. Nasledovalo farbenie DNA fluorescenčným farbivom DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) a fluorescenčná mikroskopická analýza pri zväčšení 800x.

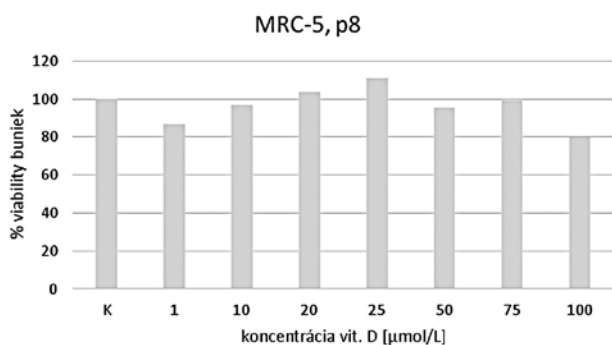
Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Namerané údaje sme vyjadrili ako priemer ±SD (štandardná odchýlka). Na porovnanie štatistických rozdielov získaných hodnôt v experimentálnych vzorkách sme použili nepárový študentov t-test, kde $p^* < 0,05$.

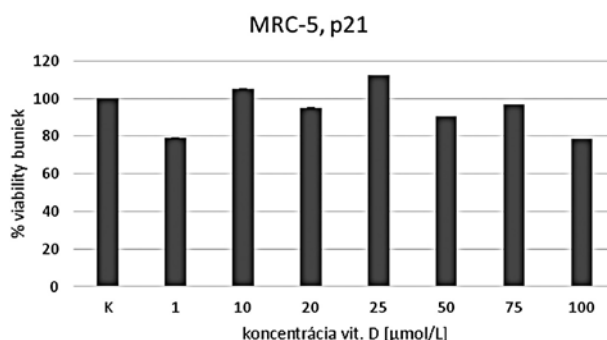
VÝSLEDKY

Sledovali sme účinok vitamínu D na rast fibroblastov MRC-5 v pasáži 21 (senescentné bunky p21) a v pasáži 8 (nesenescentné bunky p8) po ich ovplyvnení rôznymi koncentraciami vitamínu D (1; 10; 20; 25; 50; 75; 100 μmol/L) pred a po poškodení 30 % peroxidom vodíka.

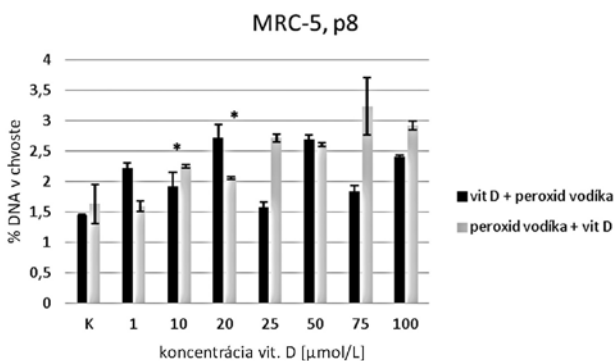
V prvom kroku sme vyhodnocovali percento viability buniek pomocou MTT testu. Bunky boli kultivované 24 h pri 37 °C a 5 % CO₂. Následne sme ich ovplyvnili vybranými koncentraciami vitamínu D a nechali 24 h kultivovať. Po tomto čase sme vymenili médium a bunky nechali rásť do 72 h inkubácie. Po zmeraní absorbancie sme vyhodnotili percento viability buniek, pričom nás zaujímal nárast nad hodnotu kontroly (bez ovplyvnenia vitamínom D), ktorú sme považovali za 100 %. Kontrolným bunkám sme po 48 h kultivácie vymenili médium tak ako v prípade kultivácie s vitamínom D, aby sme zachovali rovnaké podmienky.



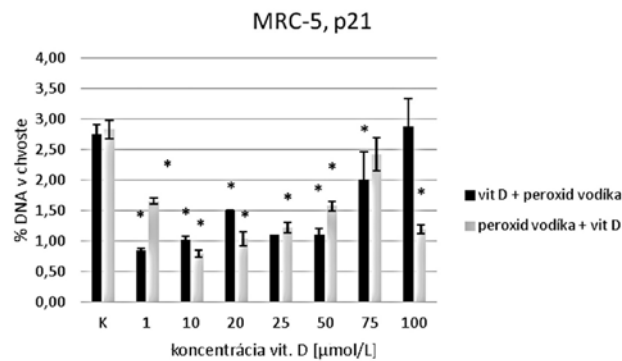
Obr. 1. Percento viability buniek MRC-5 v pasáži 8 po ovplyvnení vitamínom D počas 24 h kultivácie



Obr. 2. Percento viability buniek MRC-5 v pasáži 21 po ovplyvnení vitamínom D počas 24 h kultivácie



Obr. 3. Poškodenie DNA buniek MRC-5 v pasáži 8 ovplyvnených rôznymi koncentraciami vitamínu D pred a po poškodení peroxidom vodíka; * $p < 0,05$



Obr. 4. Poškodenie DNA buniek MRC-5 v pasáži 21 ovplyvnených rôznymi koncentraciami vitamínu D pred a po poškodení peroxidom vodíka; * $p < 0,05$

Zistili sme, že vitamín D zvýšil prežívanie nesenescentných buniek p8 nad 100 % v koncentrácii 20 $\mu\text{mol/L}$ 1,03-krát a v koncentrácii 25 $\mu\text{mol/L}$ 1,11-krát (Obr. 1). V prípade buniek p21 (Obr. 2) vitamín D zvýšil prežívanie buniek nad 100 % v koncentrácii 10 $\mu\text{mol/L}$ 1,04-krát a v koncentrácii 25 $\mu\text{mol/L}$ 1,12-krát. Tieto zvýšenia však neboli významné.

V druhom kroku nás zaujímal podiel poškodenia DNA buniek MRC-5 ovplyvnených vitamínom D pred a po poškodení peroxidom vodíka. Bunky boli kultivované 24 h pri 37 °C a 5 % CO_2 . Následne sme ich ovplyvnili vybranými koncentráciami vitamínu D a nechali 24 h kultivovať. Po 24 h inkubácie s vitamínom D sme bunky poškodili 30 % peroxidom vodíka 30 min. Metódou comet assay sme detegovali percento DNA v chvoste kométy.

V prípade buniek MRC-5 v pasáži 8 vitamín D pridaný pred poškodením peroxidom vykazuje najvýraznejší protektívny účinok v koncentrácii 25 $\mu\text{mol/L}$ (1,58 % DNA v chvoste kométy) v porovnaní s vitamínom D pridaným po poškodení peroxidom vodíka (2,72 % DNA v chvoste kométy). Podobný efekt sme pozorovali aj pri koncentráciách 10, 75 a 100 $\mu\text{mol/L}$ (Obr. 3).

Rovnako sme postupovali aj pri bunkách MRC-5 v pasáži 21, teda senescentnými bunkami (Obr. 4). Vitamín D vykazoval na bunky významný protektívny aj regeneračný účinok. Najvýraznejší efekt sme pozorovali pri koncentrácii 1, 10, 20, 25 a 50 $\mu\text{mol/L}$ pred a po poškodení buniek peroxidom vodíka. Zaujímavý účinok vitamínu D sme pozorovali pri najvyššej použitej koncentrácii 100 $\mu\text{mol/L}$, kde v prípade ovplyvnenia vitamínom D a následnom poškodení buniek peroxidom vodíka, ale v opačnom prípade, a teda po poškodení buniek peroxidom a následnom pridaní vitamínu D sme zaznamenali významný pokles poškodenia DNA.

DISKUSIA

V našej práci sme sledovali účinok vitamínu D na ľudské zdravé fibroblasty MRC-5 s cieľom zistiť jeho proliferatívne, protektívne resp. reparačné účinky. Na porovnanie sme využili bunky v pasáži 8 (nesenescentné) a v pasáži 21 (senescentné). Výsledky MTT testu (Obr. 1 a 2) naznačujú, že použité koncentrácie vitamínu D významne neovplyvňovali viabilitu buniek ani v pasáži 8, ani senescentných buniek v pasáži 21. Mnohí autori sledovali

účinky vitamínu D v súvislosti s ovplyvnením proliferácie, s dôrazom na signálne dráhy. Songyang a kolektív sledovali schopnosť inhibovať proliferáciu, inváziu a metastázovanie buniek karcinómu pľúc A549 a NCI-H1975 a schopnosť indukovať apoptózu. Autori potvrdili účinok vitamínu D signálnou cestou PI3K/AKT/mTOR (Songyang a kol., 2021). Dráha PI3K/AKT/mTOR je intracelulárna signálna dráha zapojená do mnohých biologických procesov, ako je bunková proliferácia a apoptóza, angiogenéza a metabolizmus glukózy aj v zdravých bunkách (Xie a kol., 2019). Cesta je iniciovaná väzbou extracelulárnych rastových faktorov na transmembránové receptorové tyrozínkinázy (RTK), ako je EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Chin, Toker, 2010), na ktorej sa aktivuje fosfatidylinozitol 3-kináza (PI3K) a následne aktivuje serín/treonínovú proteínkinázu B (PKB/AKT). To vedie k serínovej a/alebo treonínovej fosforylácii radu následných substrátov, ktorými sú často kináza/fosfatázy alebo iné signálne molekuly sprostredkujúce rôzne bunkové biológie (Nair-Shaliker a kol., 2012). Práve dysregulácia tejto cesty je spojená s vývojom mnohých ľudských chorôb a k zvýšenej aktivácii môže dôjsť prostredníctvom niekoľkých mechanizmov, vrátane inaktívácie negatívnej regulačnej fosfatázy a tenzínového homológu (PTEN) a aktivačných mutácií a génovej amplifikácie génu kódujúceho PIK3CA (Parsringel, 2008). Na základe týchto poznatkov a súvislostí signálnych dráh, ktoré je vitamín D schopný ovplyvniť v nádorových bunkách, sme ďalej sledovali schopnosť vitamínu D ochrániť, resp. reparať DNA pred alebo po poškodení buniek p8 a p21 peroxidom vodíka metódou comet assay v zdravých bunkách MRC-5. Látky, ktoré regulujú reparačné dráhy sa zameriavajú na reguláciu cez AKT signálny proteín, keďže AKT je kľúčová efektorová serínová/treonínová kináza v receptorovej tyrozínkinázovej/fosfatázovej a tenzínovej homológnej/fosfo-inozitol 3-kinázovej dráhe a riadi nespočetné množstvo bunkových funkcií (Liu a kol., 2014).

AKT priamo reaguje na poškodenie DNA a jeho opravy. Kométovou metódou sme pozorovali významný pokles poškodenia DNA pri koncentrácii 1, 10, 20, 25 a 50 $\mu\text{mol/L}$ pred a po poškodení buniek peroxidom vodíka. Z literatúry je známy opravný mechanizmus DNA cez PARP, poly (ADP-ribózy) polymerázy, ktoré majú schopnosť katalyzovať prenos ADP-ribózy na cieľové proteíny. PARP hrá dôležitú úlohu v rôznych bunkových procesoch vrátane modulácie štruktúry chromatinu, transkripcie, replikácie, rekombi-

nácie a opravy DNA (Morales a kol., 2014), preto sa naše ďalšie experimenty zamerajú na sledovanie hladiny PARP metódou western blot v bunkách p21 ovplyvnených koncentráciami so významným účinkom, pred a po poškodení peroxidom vodíka.

ZÁVER

Záverom môžeme konštatovať, že vitamín D neovplyvnil prežívanie buniek v pasáži 8 a 21 v nami použitých koncentráciách. Avšak vykazuje na senescentné bunky (p21) nielen protektívne, ale aj reparačné účinky, ktoré dokážu tieto bunky ochrániť pred poškodením peroxidom vodíka. Získané údaje sú dobrým základom pre ďalší výskum v oblasti molekulárnej biológie.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola finančne podporená grantom EU z programu CBC, Interreg V-A-NutriAging V-0014 a grantom VEGA 1/0314/19.

LITERATÚRA

1. Calder, P. C. and Kew, S. (2002): The immune system: a target for functional foods? *British Journal of Nutrition*. doi: 10.1079/bjn2002682.
2. Chin, Y. R. and Toker, A. (2010): The Actin-Bundling Protein Palladin Is an Akt1-Specific Substrate that Regulates Breast Cancer Cell Migration. *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2010.02.031.
3. Collins, A. R. et al. (1996): Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives*. doi: 10.1289/ehp.96104s3465.
4. Fraga, C. G. et al. (1990): Oxidative damage to DNA during aging: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.87.12.4533.
5. Liu, Q. et al. (2014): Role of AKT signaling in DNA repair and clinical response to cancer therapy. *Neuro-Oncology*. doi: 10.1093/neuonc/nou058.
6. Meehan, M. and Penckofer, S. (2014): The Role of Vitamin D in the Aging Adult. *Journal of Aging and Gerontology*. doi: 10.12974/2309-6128.2014.02.02.1.
7. Morales, J. C. et al. (2014): Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2013006875.
8. Nair-Shalliker, V., Armstrong, B. K., Fenech, M. (2012): Does vitamin D protect against DNA damage? *Mutation Research—Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2012.02.005.
9. Newberry, S. J. et al. (2014): Vitamin D and Calcium: A Systematic Review of Health Outcomes (Update). *Evidence report/technology assessment*. doi: 10.23970/AHRQEPERTA217.
10. Paes, J. E. and Ringel, M. D. (2008): Dysregulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway in Thyroid Neoplasia. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. doi: 10.1016/j.ecl.2008.01.001.
11. Pfeffer, P. E. et al. (2018): Effects of Vitamin D on inflammatory and oxidative stress responses of human bronchial epithelial cells exposed to particulate matter. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0200040.
12. Songyang, Y. et al. (2021): Effect of vitamin D on malignant behavior of non-small cell lung cancer cells. *Gene*. doi: 10.1016/j.gene.2020.145309.
13. Xie, Y. et al. (2019): PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review). *Molecular Medicine Reports*. doi: 10.3892/mmr.2018.9713.