

ДОЗАЗАВИСИМОЕ ВЛИЯНИЕ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО ЭКСТРАКТА КЛЕТОК КУРИНОГО ЭМБРИОНА НА ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ МОНОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

© 2019 г. Е. Г. Костоломова^{1,2*}, Ю. Г. Суховой¹, И. Г. Унгер¹

*E-mail: lenakost@mail.ru

¹ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

²ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет»

Минздрава РФ, Тюмень, Россия

Поступила: 25.05.2019. Принята: 30.06.2019

Одним из перспективных направлений является применение новых технологий, в частности разработка препаратов, обладающих способностью к нейтрализации и элиминации патогенных микроорганизмов, хорошо проникающих в рану и обладающих репаративными свойствами. Результаты исследований показали, что эмбриональные ткани кур имеют существенные перспективы для дальнейшего использования в качестве субстрата при получении различных форм эффективных биопрепаратов. Более глубокое изучение механизмов репаративной регенерации ран кожи, в частности роли апоптоза, может способствовать поиску новых подходов к терапии, связанной с воздействием на иммунные механизмы регуляции гибели клеток и оценке эффективности применяемых лекарственных препаратов.

Ключевые слова: клетки куриного эмбриона, апоптоз, моноциты, проточная цитометрия

DOI: 10.31857/S102872210007254-4

Адрес: Тюмень, ООО «Тюменский филиал ИКИ», Костоломова Елена Геннадьевна. Тел.: +79044930674.

E-mail: lenakost@mail.ru

Авторы:

Костоломова Е. Г., к.б.н., ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Тюмень, Россия; в.н.с. ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

Суховой Ю. Г., д.м.н., профессор, директор ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

Унгер И. Г., к.м.н., в.н.с. ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день является бесспорным мнение, что любое ранозаживление — это комплекс мероприятий, направленных на все звенья патологического процесса [1]. Результаты исследований показали, что эмбриональные ткани кур имеют существенные перспективы для дальнейшего использования в качестве субстрата при получении различных форм эффективных биопрепаратов. При этом используются

методики как выделения клеточных субстанций, в частности стволовых клеток, так и получения различными способами биологически активных веществ. [2, 3].

Процессы заживления подчиняются тем же принципам, что и любая соединительная ткань в организме, которые регулируется через клеточно-клеточные и клеточно-матриксные сигналы и процессы пролиферации и апоптоза [4, 5, 6]. Если процесс апоптоза не возникает, то воспалительные процессы продолжают, поскольку из некротизированных клеток продолжают поступать провоспалительные факторы, такие как, например, лизосомальные протеолитические ферменты и метаболиты арахидоновой кислоты. Замедление же процессов апоптоза приводит к замене грануляционной ткани окончательной рубцовой тканью.

Цель — изучить влияние вещества, выделенного из экстракта клеток куриного эмбриона, на жизнеспособность и процессы апоптоза клеток в культуре, в зависимости от разных концентраций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемое вещество получали по авторскому методу [7]. В качестве объекта исследования были выбраны клетки суспензионные культуры ТНР-1 (клетки моноцитарной лейкемии человека). Культивирование клеток линии ТНР-1 осуществляли с использованием среды RPMI-1640 («Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением 10% инактивированной ЭТС («Биолот», Санкт-Петербург), 50 мкг/мл гентамицина («Биолот», Санкт-Петербург) и 2 μ M L-глутамин («Биолот», Санкт-Петербург). Пересев производили каждые 2–3 дня. Для ведения клеток использовали пластиковые флаконы объемом 50 мл («Sarstedt», Германия). Клетки инкубировали при 37 °C в атмосфере 5% CO₂. При постановке экспериментов в лунки 96-луночного плоскодонного планшета («Sarstedt», Германия) вносили 200 мкл клеточной суспензии (2 × 10⁶ клеток в мл) в соответствующей полной культуральной среде. В качестве индуктора апоптоза использовали камптотетин, цитотоксический хинолиновый алкалоид, ингибирующий топоизомеразу I, ядерный фермент, участвующий в процессе репликации ДНК. Камптотетин ковалентно связывается с топоизомеразой I и ДНК, образуя тройной комплекс. Это предотвращает лигирование ДНК и является причиной повреждения ДНК, ведущее к апоптозу клетки. Токсичность камптотетина обуславливается результатом преобразования однонитевых разрывов ДНК в двунитевые во время S-фазы, когда вилка репликации сталкивается с расщеплением комплексов, образованных между камптотетином и ДНК. В ходе собственных экспериментов были использованы финальные концентрации 1 и 0,2 μ M. Вещество интереса вносили в финальных концентрациях 10, 100 и 300 мкг/мл. Также инкубацию клеток осуществляли в присутствии обоих стимуляторов. Время инкубации в присутствии стимуляторов составляло 24 часа 37 °C в атмосфере 5% CO₂.

Оценку жизнеспособности клеток проводили при помощи проточной цитофлуориметрии. Для оценки относительного содержания клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза, применяли два флуоресцентных красителя PI и YO-PRO-1 по описанное ранее методике [8]. При окраске клеток к 100 мкл клеточной суспензии (2–3 × 10⁶ клеток/мл) добавляли раствор YO-PRO-1 («Invitrogen», США) в финальной концентрации 250 нМ и раствор йодистого пропидия («Sigma-Aldrich», США) в финальной

концентрации 1 мкг/мл. Окраску проводили при комнатной температуре в течение 15 минут в защищенном от света месте. По завершении инкубации к образцам добавляли по 200 мкл ЗФР и анализировали на проточном цитофлуориметре Navios™ («Beckman Coulter», США). Для каждого из образцов анализировали не менее 20000 одиночных клеток. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США).

МАТРИЧНЫЙ АНАЛИЗ

Концентрации камптотетина и вещества, использованные в экспериментах, обозначим через множества: $X = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$, $X \in \mathbb{R}$ и $Y = \{y_1, y_2, \dots, y_n\}$, $Y \in \mathbb{R}$, соответственно. Каждой паре значений $(x_i; y_i)$ соответствуют процентные значения величины гибели клеток на ранней стадии от апоптоза (z_i) и на поздней стадии от апоптоза и некроза (z'_i). Таким образом, мы получаем две матрицы, в которой вектор-строки $(x_i; y_i; z_i)$ и $(x_i; y_i; z'_i)$ определяют точки, лежащие на двух поверхностях в трехмерном пространстве. Полученные данные в виде двумерного массива обрабатывались с помощью языка программирования Python (Python Software Foundation, <http://www.python.org>) и модулей SciPy и Numpy. На первом этапе проводилось формирование узлов двумерной сетки с помощью функции `numpy.meshgrid` [9], а затем данные интерполировались с помощью функции `scipy.interpolate.griddata` [10]. Графическое построение поверхностей выполнялось с помощью модуля `Matplotlib`. Также статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США). Результаты выражали в виде % позитивных клеток. Сравнение относительного содержания клеток на различных стадиях апоптоза между экспериментами проводили при помощи t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольных образцах клеток линии ТНР-1 относительно содержание живых клеток составляло 96,53 ± 0,46%. Внесение вещества в финальной концентрации 300 мкг/мл сопровождалось достоверным снижением ($p < 0,001$) относительного содержания жизнеспособных клеток до 91,72 ± 0,44%. Более того, отмечено достоверное увеличение относительного содержания клеток, находящихся на ранних стадиях апоп-

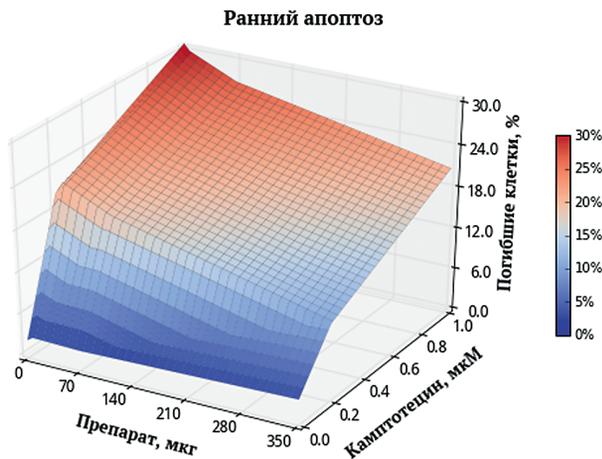


Рисунок 1. Поверхность, характеризующая зависимость ранней апоптотической гибели клеток от концентраций веществ. Градиентная заливка поверхности позволяет оценивать отдельное и комбинированное действие препарата и камптотецина. Синим цветом обозначены области с низким процентом гибели клеток, а красным – области с высоким процентом гибели.

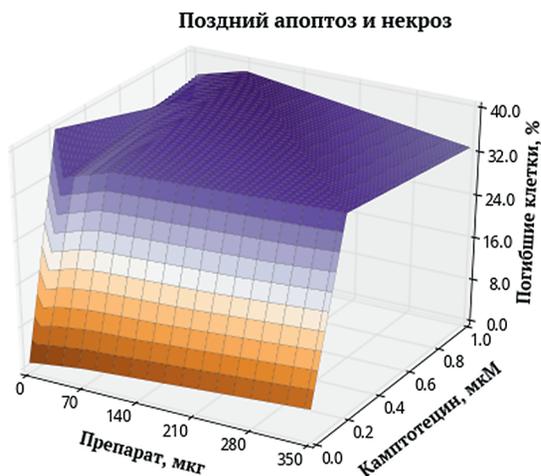


Рисунок 2. Поверхность, характеризующая зависимость поздней гибели клеток в результате апоптоза и некроза от концентраций веществ. Коричневым цветом обозначены области с низким процентом гибели клеток, а фиолетовым – области с высоким процентом гибели.

тоза ($3,16 \pm 0,19\%$ против $1,99 \pm 0,39\%$ в контроле, $p=0,024$), а также погибших клеток (поздний апоптоз/некроз), когда результаты контрольных образцов были превышены более чем в 4 раза ($5,12 \pm 0,28\%$ и $1,47 \pm 0,21\%$, соответственно, при $p < 0,001$). Что касается серии экспериментов, в рамках которых вещество применяется в фи-

нальной концентрации 100 мкг/мл, то было отмечено достоверное двукратное увеличение ($p=0,009$) клеток, находящихся на терминальных стадиях апоптоза и в некрозе ($2,69 \pm 0,29\%$). Препарат в финальной концентрации 10 мкг/мл не оказывал достоверное влияние ни на один из исследованных показателей (**Рисунки 1 и 2.**)

Внесение в среду для культивирования камптотецина, индуктора апоптоза, в финальной концентрации 1 мкМ сопровождалось снижением ($p < 0,001$) относительного содержания жизнеспособных клеток до $31,58 \pm 1,68\%$, а также увеличением относительного содержания клеток на ранних и поздних стадиях апоптоза (до $30,12 \pm 1,94\%$ и $38,30\%$, соответственно). Вместе с тем, в присутствии препарата в финальной концентрации 300 мкг/мл уровень жизнеспособных клеток увеличивался ($p=0,001$) и достигал значений в $45,11 \pm 2,17\%$. Более того, относительное содержание ТНР-1, находящихся на ранних стадия апоптоза снижалось до $21,49 \pm 2,15\%$ ($p=0,018$), а клеток, находящихся на стадии позднего апоптоза и некроза – до $33,40 \pm 2,49\%$ ($p=0,165$). Внесение препарата в концентрациях 100 и 10 мкг/мл не оказывало достоверного влияния на распределение клеток по фазам апоптоза (**Рисунки 1 и 2.**)

В рамках отдельного эксперимента концентрация камптотецина в клетки была понижена до 0,2 мкМ, что привело к увеличению относительного содержания живых клеток до $47,76 \pm 3,17\%$, тогда как на ранних и поздних стадиях апоптоза находилось уже $20,75 \pm 2,40\%$ и $31,49 \pm 1,31\%$ клеток, соответственно. Инкубация ТНР-1 в присутствии камптотецина и препарата в финальной концентрации 300 мкг/мл достоверно не влияла на жизнеспособность клеток ($51,11 \pm 1,49\%$, $p=0,367$), однако сопровождалась почти двукратным снижением относительного содержания клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза (до $12,86 \pm 2,00$ при $p=0,036$). По остальным концентрациям препарата достоверных изменений жизнеспособности клеток линии ТНР-1 отмечено не было.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований были получены данные о дозозависимом влиянии исследуемого вещества на жизнеспособность и процессы апоптоза клеток в культуре. Таким образом исследуемое вещество возможно обладает не только антибактериальными и противовоспалительными, но и регуляторными свой-

ствами, способствующими эффективному выживанию клеток в периферических тканях при воспалительных реакциях. Поскольку обладает выраженной способностью блокировать индуцированный апоптоз моноцитов, что, возможно, способствует продлению жизни моноцитов в условиях воспаления и более успешному противостоянию микробным факторам, ускоряющим апоптоз клеток, а значит более эффективно элиминировать чужеродную генетическую информацию и поврежденные ткани организма.

Более глубокое изучение механизмов репаративной регенерации ран кожи, в частности роли апоптоза, может способствовать поиску новых подходов к терапии, связанной с воздействием на иммунные механизмы регуляции гибели клеток и оценке эффективности применяемых лекарственных препаратов для профилактики образования рубцов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Gericke J., Ittensohn J., Mihály J., Alvarez S., Alvarez R., Töröcsik D., de Lera A. R., Rühl R. Regulation of Retinoid Mediated Signaling Involved in Skin Homeostasis by RAR and RXR Agonists / Antagonists in Mouse Skin // PLoS One. 2013 Apr 24; 8(4): e62643.
2. Костоломова Е. Г., Суховой Ю. Г., Унгер И. Г., Акунеева Т. В. Взаимодействие иммуноцитов кожи в процессе репаративной регенерации в ране. Российский иммунологический журнал. 2017. Т. 11(20). № 2. С. 148–150. [Kostolomova E. G., Sukhovey Y. G., Unger I. G., Akuneeva T. V. The interaction of immune cells of the skin in the process of reparative regeneration in the wound. Russian journal of immunology 2017, 11 (20), № 2. С. 148–150.]
3. Суховой Ю. Г., Костоломова Е. Г., Цирятьева С. Б., Аргунова Г. А., Унгер И. Г., Гольцов С. В. Регенераторно-репаративные и антибактериальные свойства препарата «Cellgel» в эксперименте. Российский Иммунологический Журнал, 2015, том 9(18), № 2(1). с 44–46. [Sukhovey Y. G., Kostolomova E. G., Tsiryayeva S. B., Argunova G. A., Unger I. G., Goltsov S. V. Regenerative-reparative and antibacterial properties of the drug “Cellgel” in the experiment. Russian journal of immunology 2015, том nine (18), № 2 (1). с 44–46.]
4. Костоломова Е. Г., Стрелин С. А., Суховой Ю. Г., Унгер И. Г., Акунеева Т. В. Роль процессов пролиферации и апоптоза в образовании рубцовой ткани. Медицинская иммунология. 2017. Т. 19. № S. С. 327. [Kostolomova E. G., Strelin S. A., Sukhovey Y. G., Unger I. G., Akuneeva T. V. The role of the processes of proliferation and apoptosis in the formation of scar tissue. Medical immunology. 2017. Т. 19. № S. С. 327.]
5. Fuchs Y, Brown S, Gorenc T, Rodriguez J, Fuchs E, Steller H. Sept4/ARTS Regulates Stem Cell Apoptosis and Skin Regeneration. Science. 2013 Jun 20.
6. Костоломова Е. Г., Суховой Ю. Г., Гольцов С. В., Унгер И. Г., Акунеева Т. В. Некоторые иммунофизиологические механизмы регенерации ран в условиях применения ранозаживляющего средства “CELLGEL”. Российский Иммунологический Журнал, 2016, том 10(19), № 3. с 289–291. [Kostolomova E. G., Sukhovey Y. G., Unger I. G., Goltsov S. V., Akuneeva T. V. Certain immunophysiological mechanisms of wound repair in condition of wound healing medical means “cellgel” application. Russian journal of immunology 2016, 10 (19), № 3. С. 289–291.]
7. Суховой Ю. Г., Унгер И. Г., Костоломова Е. Г., Гольцов С. В. патент на изобретение RUS2481115 13.10.2011 средство для заживления ран “целльгель”, способ его получения и способ лечения ран различной этиологии полученным средством.
8. Надеев А. Д., Кудрявцев И. В., Серебрякова М. К., Авдонин П. В., Зинченко В. П., Гончаров Н. В. Индукция апоптоза и некроза клеток эндотелия пупочной вены человека пероксидом водорода. Цитология. 2015, 57, 12, 909–916. [A. D. Nadeev, I. V. Kudryavtsev, M. K. Serebriakova, P. V. Avdonin, V. P. Zinchenko, N. V. Goncharov. Dual Proapoptotic and Pronecrotic Effect of Hydrogen Peroxide on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Cell and Tissue Biology. 2016, 10(2), 145–151].
9. Tallarida R. J. Drug synergism and dose-effect data analysis / R. J. Tallarida. – CRC Press, 2000. – 264 p.
10. Khuri A. I., Mukhopadhyay S. Response surface methodology / A. I. Khuri, S. Mukhopadhyay. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics. – 2010. – Т. 2. – № . 2. – С. 128–149.

**DEPENDABLE EFFECT OF LYOPHYLIZED EXTRACT OF CHICKEN
EMBRYO CELLS ON INDUCED APOPTOSIS OF MONOCYTES UNDER
IN VITRO CONDITIONS**

© 2019 E.G. Kostolomova^{1,2*}, U. G. Suhovej¹, I. G. Unger¹

*E-mail: lenakost@mail.ru

¹«Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;

²FSBEI of Higher Education «Tyumen State Medical University» of the Ministry of Healthcare
of Russian Federation, Tyumen, Russia

Received: 25.05.2019. **Accepted:** 30.06.2019

One of the promising areas is the use of new technologies, in particular the development of drugs that have the ability to neutralize and eliminate pathogenic microorganisms that penetrate well into the wound and have reparative properties. The research results showed that the embryonic tissues of chickens have significant prospects for further use as a substrate in the preparation of various forms of effective biologics. A more in-depth study of the mechanisms of reparative regeneration of skin wounds, in particular the role of apoptosis, can facilitate the search for new approaches to therapy associated with effects on immune mechanisms regulating cell death and assessing the effectiveness of the drugs used.

Key words: chicken embryo cells, apoptosis, monocytes, flow cytometry

Authors:

Kostolomova E. G., ✉ PhD (Biology), the assistant to faculty of pathological physiology FSBEI of Higher Education «Tyumen State Medical University» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Tyumen, Russia; leading research associate «Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia.

625027, Tyumen, st. Kotovsky, 5. Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology, Phone: +79044930674,

E-mail: lenakost@mail.ru;

Suhovej J. G., MD (Medicine), Professor, Director «Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;

Unger I. G., PhD (Medicine), leading research associate «Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia.