

Э.И. Севко- студент

А.А. Прачева – кандидат биологических наук

Information about the authors

E.I. Sevko – student

Pracheva A.A. – Ph.D. of Biological Sciences

УДК 616.092.9

РОЛЬ ФЕРМЕНТОВ РЕПАРАЦИИ СЕМЕЙСТВА PARP ПРИ АКТИВАЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ НА ФОНЕ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Диана Аслямовна Султанова¹, Ирина Юрьевна Маклакова², Дмитрий Юрьевич Гребнев³

¹⁻³Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

^{2,3}ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологии», Екатеринбург, Россия

dina.s01@mail.ru

Аннотация

Введение. Известно, что введение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) может улучшить функцию печени и активировать регенерацию данного органа в условиях его повреждения. **Цель исследования** - изучить влияние аллогенной трансплантации ММСК на уровень экспрессии ферментов репарации семейства PARP на фоне частичной гепатэктомии (ЧГЭ).

Материалы и методы. Исследования проводились на здоровых белых аутбредных мышках-самцах. После частичной резекции печени по методике С. Mitchell и Н. Willenbring опытной группе мышей в латеральную хвостовую вену вводили ММСК в количестве 120 тысяч кл./мышь. Оценка репаративной регенерации печени проводилась на 7 сутки после введения клеток с помощью компьютерной программы анализа изображений Biovision (Россия).

Результаты. Проведенные исследования показали, что трансплантация ММСК в условиях ЧГЭ вызывает активацию митотической функции гепатоцитов, подавление апоптоза, увеличение ядерно-цитоплазматического индекса, увеличение экспрессии ферментов репарации семейства PARP. **Обсуждение.**

Выявленные изменения можно объяснить повышением пролиферативной активности гепатоцитов резецированной печени после введения ММСК, способностью этих клеток индуцировать в клетках печени выработку белков теплового шока, что обеспечивает защиту ферментов репарации семейства PARP от разрушения и приводит к исправлению нарушений в молекуле ДНК.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о способности ММСК уменьшать запрограммированную клеточную гибель гепатоцитов, уменьшать количество клеток с микроядрами путем индуцирования выработки гепатоцитами ферментов репарации семейства PARP.

Ключевые слова: частичная гепатэктомия, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, Поли (АДФ-рибоза)-полимер, PARP, регенерация печени.

ROLE OF REPAIR ENZIES OF THE PARP FAMILY IN ACTIVATION OF LIVER REGENERATION IN THE BACKGROUND OF PARTIAL HEPATECTOMY AFTER INTRODUCTION OF MESENCHYMAL STROMALE CELLS

Diana A. Sultanova¹, Irina Yu. Maklakova², Dmitriy Yu. Grebnev³

¹⁻³ - Ural state medical university, Yekaterinburg, Russia

^{2,3} - Institute of Medical Cellular Technologies, Yekaterinburg, Russia

dina.s01@mail.ru

Abstract

Introduction. It is known that the introduction of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) can improve liver function and activate the regeneration of this organ in conditions of its damage. **The aim of this study** - to study the effect of allogeneic MMSC transplantation on the expression level of PARP family repair enzymes against the background of partial hepatectomy (PH). **Materials and methods.** The studies were conducted on healthy white outbred male mice. After partial liver resection by C. Mitchell and H. Willenbring an experimental group of mice was injected with MMSC in the amount of 120 thousand cells /mouse into the lateral caudal vein. The assessment of the reparative regeneration of the liver was carried out on the 7th day after the introduction of cells using the computer image analysis program Biovision (Russia). **Results.** The conducted studies have shown that MMSC transplantation under conditions of PH causes activation of the mitotic function of hepatocytes, suppression of apoptosis, an increase in the nuclear cytoplasmic index, an increase in the expression of repair enzymes of the PARP family. **Discussion.** The revealed changes can be explained by an increase in the proliferative activity of hepatocytes of the resected liver after the introduction of MMSC, the ability of these cells to induce the production of heat shock proteins in liver cells, which protects the repair enzymes of the PARP family from destruction and leads to the correction of violations in the DNA molecule. **Conclusions.** The results obtained indicate the ability of MMSCs to reduce programmed cell death of hepatocytes, to reduce the number of cells with micronuclei by inducing the production of repair enzymes by hepatocytes of the PARP family.

Keywords: partial hepatectomy, multipotent mesenchymal stromal cells, Poly (ADP-ribose)-polymer, PARP, liver regeneration.

ВВЕДЕНИЕ

Печень обладает высокой способностью к регенерации, чтобы компенсировать утраченные или поврежденные структуры органа. Одной из наиболее широко описанных модельных систем для изучения регенерации печени является ЧГЭ [1]. Данные зарубежных и отечественных исследователей свидетельствуют о том, что введение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) может улучшить функцию печени и активировать регенерацию данного органа в условиях его повреждения [1, 2]. ММСК– это

прикрепляющиеся к пластику фибробластоподобные клетки, которые могут дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном и адипоцитарном направлениях. ММСК отличаются относительной простотой выделения и культивирования, способностью пролиферировать длительное время *in vitro*. Первоначальное открытие ММСК приписывается Friedenstein et al., которые получены из костного мозга мышей и морских свинок [3]. В дальнейшем были отработаны методики выделения ММСК из плаценты, жировой ткани, тимуса, жировой ткани и др. [1]. ММСК участвуют в регенерации печени, высвобождая цитокины, такие как фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста фибробластов (FGF), IL-6, TGF- α , которые эффективно усиливают пролиферацию гепатоцитов [4]. ММСК обладают иммуносупрессивными свойствами [4], секретируя большое число растворимых факторов, таких как индоламин-2,3-диоксеназа, PG-E2, IL-10, TGF- β , оксид азота, белок-индуцибельный фактор- индуцируемый опухолевым геном 6 (TSG-6). Иммуносупрессивные способности ММСК делают возможным проведение аллогенной трансплантации этих клеток. В раннее проведенных исследованиях было установлено, что ММСК путем формирования межклеточных контактов способны индуцировать выработку белков теплового шока (БТШ, 70 кД). БТШ обеспечивают поддержание структуры и функции внутриклеточных белков, в том числе ферментов репарации ДНК [5].

В настоящем исследовании изучена способность жизнеспособных плацентарных ММСК влиять на митотическую активность, апоптоз гепатоцитов, количество гепатоцитов с микроядрами.

Цель исследования - оценка уровня экспрессии ферментов репарации семейства PARP на фоне частичной гепатэктомии после введения ММСК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 21 здоровых белых аутбредных мышах-самцах возраста 6-8 месяцев. Эксперименты по получению культуры ПКП выполнены из печени 10 лабораторных животных возраста 6-8 месяцев, массой 25-27 г. Получение культуры ММСК осуществлялось из хориона плаценты 3 мышей-самок возраста 3-4 месяца, срок гестации составлял 18 дней. Мышей содержали в стандартных условиях вивария ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России. Выделение культуры ММСК осуществлялось согласно модифицированному методу Тепляшина А.С. с соавторами 2004 г. Культивирование клеток осуществляли в условиях CO₂ инкубатора при 37°C в увлажненной атмосфере с содержанием CO₂ 5 %. Смену питательной среды производили каждые 3-4 суток. Были выделены опытная и контрольная группы мышей. Опытным группам производилось введение в хвостовую вену ММСК в дозе 120 тыс. клеток/мышь. Клетки суспендированы в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Опытной группе животных соответствовала контрольная группа, которой производилось введение 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Введение клеток осуществлялось в физиологических условиях (без моделирования патологии печени) и через 1 час после частичной гепатэктомии. Также была выделена группа сравнения – животные без моделирования патологического воздействия и без введения

клеток. В каждой группе было по 7 лабораторных мышей. Производилась оценка морфометрических показателей печени на 7 сутки после введения клеток. Для морфометрического анализа данных использовали компьютерные программы анализа изображений Biovision (Россия). Также производился расчет следующих морфометрических показателей: площадь гепатоцитов, площадь ядер гепатоцитов, площадь цитоплазмы гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ), количество гепатоцитов на 1 мм², количество двуядерных клеток. Подсчет митотического (МИ) и апоптотического индексов (АИ) производился путем определения отношения клеток, находящихся в состоянии митоза и апоптоза соответственно к 1000 подсчитанных гепатоцитах. Уровень выраженности апоптоза гепатоцитов был определен путем подсчета АИ с использованием набора первичных и вторичных антител на гистологических срезах продольной ориентации по идентификации эффекторной каспазы-3 (Caspase-3) (Santa Cruz Biotech, USA). Постановка микроядерного теста осуществлялась по методу Belmont-Díaz J., López-Gordillo A.P., Garduño E.M., 2014 г. Оценка уровня Поли-АДФ-рибозилирования осуществлялась методом проточной цитофлуориметрии (Kunzmann A. и соавт., 2018) в клетках печени с использованием первичных (Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymerantibody, abcam, Великобритания) и вторичных антител (Rabbit Anti-Chicken IgY H&L (FITC) abcam, Великобритания). Иммунофенотипирование суспензии ММСК было проведено методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами (Becton Dickinson, США).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась на основании принципов вариационной статистики. Достоверность различий (p) между средними значениями в группах оценивали согласно t-критерию Стьюдента для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При изучении морфометрических показателей печени после резекции у аутобредных мышей на фоне ЧГЭ после трансплантации ММСК выявлено восстановление массы печени до значений нормы. Введение ММСК обеспечило увеличение массы печени по сравнению с контрольной группой на 24,8 % (p <0,05). Это происходит за счет повышения митотической активности и угнетения запрограммированной клеточной гибели. Так, было выявлено повышение митотического индекса на 21,7 % (p <0,05) и снижение апоптотического индекса гепатоцитов на 24,8 % (p <0,05). Также выявлено уменьшение количества гепатоцитов с микроядрами на 25,3 % по сравнению с контрольной группой, что может говорить о снижении выраженности патологических митозов в клетках печени. Обнаружено повышение количества двуядерных гепатоцитов на 22,8 %, увеличение размеров ядра на 20,8 % (p <0,05). Эти изменения привели к повышению ядерно-цитоплазматического индекса на 31 % по сравнению с контрольной группой. Также в данном исследовании установлено повышение количества поли (АДФ-рибоза) полимера в клетках печени на 35,5 % (p<0,05) по сравнению с контрольной

группой. Это свидетельствует о повышении активности ферментов репарации повреждений ДНК семейства PARP (таблица 1).

Таблица 1

Морфофункциональная характеристика репаративных процессов в печени мышей на 7 сутки после частичной гепатэктомии

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК
Масса печени, г	1,15±0,09*	1,53±0,12**
Апоптотический индекс, ‰	1,25±0,09*	0,94±0,07* **
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰	2,77±0,23*	2,21±0,16**
Митотический индекс, ‰	4,51±0,47*	5,76±0,49* **
Активность ферментов семейства PARP в клетках печени, MFI, усл. ед.	59,3±5,2*	80,6±7,5* **
Количество гепатоцитов на 1 мкм ²	1427,71±116,98	1485,14±116,20
Площадь гепатоцита (мкм ²)	286,41±22,44	275,14±24,16
Площадь цитоплазмы гепатоцита (мкм ²)	223,03±17,97	204,37±22,80
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)	63,39±5,12*	76,63±4,92* **
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,29±0,02*	0,38±0,02* **
Количество двухъядерных гепатоцитов на 1 мм ²	320,77±10,64*	393,90±23,23* **

Примечание: * p<0,05 с подгруппой сравнения зрелых мышей; ** p<0,05 с контрольной подгруппой зрелых мышей.

ОБСУЖДЕНИЕ

ММСК могут влиять на восстановление печени следующими основными путями: 1) замена поврежденных и недостающих клеток путем трансдифференцировки в гепатоциты и (или) слияния с гепатоцитами; 2) синтез ростовых факторов и цитокинов; 3) прямое и опосредованное воздействие на Т- и В-лимфоциты, что снижает степень активности воспалительного ответа в поврежденной печени [1]. При анализе морфометрических показателей выявлены статистически значимые отличия между группами при определении массы печени, АИ, МИ, активности ферментов семейства PARP в клетках печени, диаметра ядра, площади гепатоцитов, ЯЦИ, количества двухъядерных гепатоцитов. Выявленные изменения можно объяснить повышением пролиферативной активности гепатоцитов резецированной печени после введения ММСК, которое связано со способностью ММСК к выработке фактора роста гепатоцитов (HGF - Hepatocyte growth factor), который взаимодействует с рецептором HGFR/c-Met (mesenchymal-epithelial transition factor) (трансмембранная тирозиновая киназа), экспрессирующимся в клетках печени. Активация данного рецептора вызывает повышение пролиферации

гепатоцитов [4]. HGF является мощным митогеном для гепатоцитов, обладает антиапоптогенным действием. Ингибирование апоптоза при введении ММСК можно объяснить способностью этих клеток индуцировать в клетках печени выработку белков теплового шока [5], что обеспечивает защиту ферментов репарации семейства PARP (поли (АДФ-рибоза) полимера) от разрушения и приводит к исправлению нарушений в молекуле ДНК. Введение ММСК лабораторным животным приводит к повышению количества двуядерных гепатоцитов, что может быть результатом полиплоидизирующих митозов. Снижение количества гепатоцитов с микроядрами при введении ММСК свидетельствует об уменьшении числа патологических митозов при повышении активности ферментов репарации семейства PARP.

ВЫВОДЫ

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о способности ММСК: 1. Уменьшать запрограммированную клеточную гибель гепатоцитов, уменьшать количество клеток с микроядрами путем индуцирования выработки гепатоцитами ферментов репарации семейства PARP (поли (АДФ-рибоза) полимеразы). 2. Активировать клеточную регенерацию. 3. Увеличивать массу печени за счет повышения митотической активности и снижения апоптоза гепатоцитов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Рудаков В.С., Деев Р.В., Губарев К.К., Астрелина Т.А., Еремин И.И., Жгутов Ю.А., Онницев Е.И., Мавликеев М.О., Титова А.А., Восканян С.Э. Влияние трансплантации аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на регенерацию печени после обширной резекции в эксперименте // Гены и клетки. 2018. Т. 13. №2. С.83-88.
2. Hu C., Zhao L., Wu Z., Li L. Transplantation of mesenchymal stem cells and their derivatives effectively promotes liver regeneration to attenuate acetaminophen-induced liver injury. *Stem Cell Res Ther.* 2020; Vol.11(1). №88.
3. Fitzsimmons R.E.B., Mazurek M.S., Soos A., Simmons C.A. Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Stem Cells Int.* 2018. Vol.19.
4. Reenam S. A. Comparison of Phenotypic and Functional Properties of Mesenchymal Stromal Cells and Multipotent Adult Progenitor Cells/ Reenam S. Newsome Kh and Ph // *Frontiers in Immunology.* 2019; 10: 1-16.
5. Li T, Liu Y, Yu L, Lao J, Zhang M, Jin J, Lu Z, Liu Z, Xu Y. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Protect Against SCA3 by Modulating the Level of 70 kD Heat Shock Protein. *Cell Mol Neurobiol.* 2018; 38(3): 641-655.

Сведения об авторах

Д.А Султанова – студент

И.Ю. Маклакова – доктор медицинских наук, доцент;

Д.Ю. Гребнев - доктор медицинских наук, доцент.

Information about the authors

D.A. Sultanova– student

I.Yu. Maklakova – Doctor of Science (Medicine), Assistant Professor;
D.Yu. Grebnev- Doctor of Science (Medicine), Assistant Professor.

УДК: 615.012.1

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ ПЛАТИНЫ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Мария Дмитриевна Тохтуева¹, Яна Борисовна Кокшарова², Альфия Флюровна Сулейманова³, Олег Станиславович Ельцов⁴, Всеволод Викторович Мелехин⁵

¹⁻⁵ИЦ ХФТ ХТИ, ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия

⁵ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

¹ezhneva@icloud.com

Аннотация

Введение. Выраженная токсичность многокурсовой химиотерапии и формирование лекарственной устойчивости к ней остаются одними из самых основных проблем в лечении больных с онкологическими патологиями. Соединения платины известны как наиболее эффективные противоопухолевые химические агенты, в особенности цисплатин. Однако при его длительном использовании у опухолевых клеток может развиться резистентность к нему.

Цель исследования – изучить влияние циклоплатинированных комплексов на жизнеспособность опухолевых клеток и синтезировать химические соединения для создания новых противоопухолевых препаратов. **Материалы и методы.**

Исследование проводилось на культурах опухолевых клеток глиобластомы (ГБ), остеосаркомы (ОС), карциномы печени (КП), карциномы легкого (КЛ) и на нормальных клетках почки эмбриона человека. Клеточные культуры инкубировали в 96-луночных планшетах, куда позднее вносили суспензии исследуемых соединений. В качестве сравнения использовали цисплатин.

Результаты. Полученные в ходе исследования данные указывают на влияние циклоплатинированного комплекса SAF-08 на жизнеспособность опухолевых клеток, причем соединение показало избирательность действия в отношении опухолей различного происхождения. На нормальные клетки токсическое влияние было на значительно меньшем уровне. **Обсуждение.** На основе качественного и количественного анализа был выявлен потенциально возможный противоопухолевый агент, обладающий выраженной активностью в отношении подавления жизнедеятельности культивируемых клеток злокачественных новообразований. **Выводы.** Избирательность соединения SAF-08 в отношении нормальных клеток и опухолевых клеток различного генеза позволяет рассматривать данное соединение как достаточно эффективное против опухолевых линий и не чрезмерно токсичное для здоровых клеток.

Ключевые слова: цитотоксический эффект, цисплатин, циклоплатинированные комплексы, противоопухолевая активность.