

На правах рукописи

Оля Миянович

Миянович Оля

**Влияние куркумина и глиотоксина на звездчатые клетки печени и
портальные фибробласты крыс *in vitro***

03.01.04 – Биохимия

03.03.04. цитология гистология и клеточная биология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Казань-2014

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент **Ризванов Альберт Анатольевич**

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор **Киясов Андрей Павлович**

Официальные оппоненты:

Шевлюк Николай Николаевич, доктор биологических наук, профессор, кафедры гистологий, Оренбургской медицинской академии

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Защита состоится «26» июня 2014г. в 13.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008 г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, ауд.211. Телефон: 7(843)23-37-842

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» www.krfu.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2014 год

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

 **Абрамова З.И.**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Хронические заболевания печени, в результате которых развивается цирроз, занимают восьмое место в причинах смертности взрослого населения в мире (Martin, et. al // *Hepatology*. 2014.V.59; Parola, et al. // *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2009. V.2). В связи с этим огромное значение имеют исследования молекулярных механизмов активации и ингибирования профиброгенного потенциала паренхиматозных и непаренхиматозных клеток печени, связей биохимических внутриклеточных процессов с деятельностью отдельных популяций клеток печени. Подобные исследования позволяют выяснить причины развития фиброза и цирроза печени и изыскать новые пути их эффективного лечения. Единственным эффективным методом лечения цирроза печени на данный момент является трансплантация донорского органа печени, но многие аспекты функционирования печени в этих условиях с биохимической и клеточной точки зрения изучены недостаточно. Именно поэтому ведутся активные поиски новых биологически активных веществ, а также проводится исследование физиологического действия уже известных лекарственных средств с целью расширения их показаний и возможностей применения в медицине, что позволит предотвратить развитие, замедлить и обратить вспять фиброз печени. Перспективными подходами представляются применение клеточной терапии стволовыми и прогениторными клетками, генная терапия, одновременно ведутся поиски новых химических соединений, оказывающих влияние на процессы образования внеклеточного матрикса (ВКМ) в печени (DeLeve, 2013 // *J. Clin. Invest.* 2013. Vol.5.; Isao Oakazaki, *Extracellular Matrix and the Liver* // book auth. 2003). Доклинические исследования различных препаратов и методов лечения включают эксперименты *in vitro* на культурах клеток. Однако, до сих пор не установлены клеточные типы, обладающие профиброгенным потенциалом и участвующие в развитии фиброза в печени (Bataller, et al // *J. Clin. Invest.* 2005.Vol. 2.; Diehl, et al // *Journal of Clinical Investigation*. 2013. Vol. 5; Yin, et. al // *Journal of Clinical Investigation*. 2013. Vol. 5). Не до конца выясненными остаются сигнальные пути и каскады, запускающие синтез компонентов ВКМ в ответственных клетках (Iredale, et. al // *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 2013. Vol.7). Исследование клеточных основ процессов фиброзирования-дефиброзирования в печени и молекулярных основ активации и ингибирования этого процесса может помочь в создании принципиально

новых подходов в лечении хронических гепатитов и их грозных осложнения фиброза и цирроза органа. Одним из перспективных подходов для успешного лечения заболеваний печени является применение биологических веществ, проявляющих антифиброзную активность. Примерами таких веществ являются куркумин и глиотоксин (Dai, et al // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2013. Vol. 6; Qiu, et al // Eur J Pharmacol. 2014. Vol. 728; Tian, et al., // Molecular Medicine Reports. 2014. Vol. 9)

Цель работы: Характеристика молекулярно-биохимических механизмов дифференцировки, морфогенеза и апоптоза *in vitro* клеток печени с фиброгенным потенциалом в ответ на воздействие куркумина, глиотоксина, инсулина и TNF- α .

В соответствии с поставленной целью решали следующие задачи:

1. Получить культуры звездчатых клеток печени и портальных фибробластов методом эксплантации и ферментативной обработки из фрагментов печени и крупных портальных трактов здоровых четырёхдневных новорожденных крыс *Rattus norvegicus*.
2. Провести иммунофенотипический анализ полученных культур клеток и исследовать их способность к дифференцировке и трансдифференцировке *in vitro*.
3. Определить влияние биологически активных веществ: куркумина, глиотоксина, инсулина и TNF- α , на биохимические показатели культур звездчатых клеток печени и портальных фибробластов, в том числе и на пролиферацию, апоптоз и биосинтез компонентов цитоскелета.

Научная новизна работы

Получены приоритетные данные по дозозависимому влиянию куркумина, глиотоксина, инсулина и TNF- α на биосинтез компонентов цитоскелета звездчатыми клетками печени и портальными фибробластами, а также их пролиферацию и апоптоз. Несомненной новизной обладают данные по влиянию куркумина, глиотоксина, инсулина и TNF- α на культуры клеток портальных фибробластов из крупных портальных трактов по сравнению со звездчатыми клетками печени. Впервые проведено сравнение двух методов (эксплантация и ферментативная обработка) получения культур звездчатых клеток печени и портальных фибробластов из эксплантов печени и крупных портальных трактов четверодневных крыс. Проведен сравнительный анализ иммунофенотипа полученных культур клеток и исследована их способность к дифференцировке и трансдифференцировке *in vitro*. На основании

полученных данных впервые экспериментально показано, что не только звездчатые клетки печени, но и портальные фибробласты составляют важную фиброгенную популяцию клеток печени.

Теоретическая и научная значимость

В рамках проведенного исследования предложен новый подход для получения звездчатых клеток печени и портальных фибробластов. Метод является более простым и удобным с практической точки зрения и позволяет получать клетки для моделирования фиброза печени *in vitro*. Подобная модель может быть использована для исследования процессов фиброгенеза в печени и доклинического исследования действия различных биологически активных веществ на культуры клеток, обладающих фиброгенным потенциалом. В ходе исследования влияния куркумина, глиотоксина, инсулина и TNF- α на культуры звездчатых клеток печени из фрагментов печени и портальных фибробластов из крупных портальных трактов, были определены концентрации веществ, токсичные для клеток и обладающие антипролиферативным эффектом. Полученные данные об активации апоптоза и подавлении биосинтеза компонентов цитоскелета (один из маркеров фиброгенеза) глиотоксином и куркумином открывают перспективу применения исследуемых веществ в медицине для лечения фиброза печени.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Антифиброзное действие куркумина и глиотоксина связано с их непосредственным апоптотическим эффектом, как на звездчатые клетки печени, так и на портальные фибробласты.
2. Портальные фибробласты, наравне со звездчатыми клетками печени, способны к дифференцировке в миофибробласты и участию в процессах фиброза.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на XVI Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (г.Казань, 2011), XVII Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (г.Казань, 2012), I научно-практической конференции студентов и молодых ученых Института фундаментальной медицины и биологии «Современные проблемы фундаментальной медицины и биологии» (г.Казань, 2013), Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2014» (г.Москва, 2014).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа в объеме 137 страниц состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Диссертационная работа иллюстрирована 32 рисунка и 5 таблиц. Библиографический указатель включает 182 источников литературы (3 отечественных и 179 иностранных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе использованы крысы *Rattus norvegicus*, линия Wistar, полученные из питомника лабораторных животных «ПУЩИНО», содержание и использование которых соответствовало правилам, принятым в К(П)ФУ, рекомендациям местного этического комитета (Генин А. М. и др // Авиа космическая и экологическая медицина, 2001. №4).

Исследованные вещества: Куркумин (*Curcuma longa* (Turmeric) Sigma (C1386): 100 мкМ, 50 мкМ, 30 мкМ; глиотоксин (*Gliocladium fimbriatum*, Sigma G9893): 0,1 мкМ; 0,05 мкМ; 0,25 мкМ ; инсулин (ПанЭко): 1000 мкМ, 500 мкМ, 200 мкМ ; TNF- α (PAN Biotech GmbH): 10 нг/мл, 20 нг/мл, 50 нг/мл.

Получение эксплантационной культуры из печени крыс проводили из здоровых четырехдневных животных, которых подвергали декапитации и обрабатывали 70% этанолом. Все последующие манипуляции проводили в стерильных условиях под бинокулярным операционным микроскопом StemiDV4 CarlZeiss (Германия). Осуществляли операционный доступ, извлекали печень, снимали Глиссонову капсулу. Паренхиму печени разделяли на фрагменты размером около 3 мм³ и помещали в питательную среду DMEM с добавлением 10% FBS, 200 mM L-глутамин и антибиотика, на культуральный пластик. Фрагменты инкубировали в термостате при 37°C в атмосфере увлажненного воздуха с содержанием 5% CO₂. Прижизненное наблюдение за процессом эксплантации осуществляли инвертированной световой микроскопией. На 3-и сутки фрагменты печени удаляли, а питательную среду заменяли на свежую.

Получение эксплантационной культуры из крупных портальных трактов и дальнейшее культивирование осуществляли аналогично описанному выше. Однако печень при этом, не извлекали.

Получение культуры портальных фибробластов методом эксплантации после проназно-коллагеназной обработки. Выделение портальных трактов осуществляли по выше описанной методике. Далее портальные тракты инкубировали 30 мин при 37°C и постоянном покачивании в растворе DMEM (ПанЭко), содержащем 0,066% коллагеназу Clostridium hystolyticum (Sigma), 0,055% проназу (Sigma), 0,006% дезоксирибонуклеазу (Биолот), 3% FBS, 0,1% БСА (Sigma), 10 mM HEPES и антибиотики. Полученную клеточную суспензию пропускали через 40 мкм монофиламентный сетчатый фильтр. Оставшуюся на фильтре ткань помещали в среду DMEM и инкубировали при 37°C в атмосфере увлажненного воздуха с содержанием 5% CO₂.

Фибробласты (ФБ) из кожи четырёхдневных крыс получали в стерильных условиях, измельчая фрагменты ткани до 1–2 мм кусочков хирургическим скальпелем и помещая образцы в лунки 6-луночного культурального планшета. Затем добавляли в каждую лунку по 2 мл культуральной среды и инкубировали 7 дней при 37°C во влажной атмосфере, 5% CO₂. На 7 сутки культуральную среду заменяли. Через 16–21 день инкубации формировался плотный монослой клеток.

При получении мультипотентных стромальных клеток (МСК) из костного мозга крыс из костномозговой полости крупных трубчатых костей вымывали костный мозг раствором DPBS в стерильную пробирку, который затем гомогенизировали, центрифугировали 5 мин при 500 g. Образовавшийся осадок ресуспендировали в питательной среде α -MEM и высевали на культуральный пластик.

Пероксидазно-антипероксидазный метод. Клетки фиксировали 10 мин 4% параформальдегидом и промывали 4 раза водопроводной водой. Для окрашивания на внутриклеточные антигены проводили 2 мин пермеабиллизацию клеточных мембран 1% Тритоном X-100. Проводили пероксидазный блок с 0,06% H₂O₂ 20 мин. и промывали TBS однократно 5 мин. Затем 1 ч инкубировали с первичными антителами и промывали 3 раза по 5 мин TBS. Для визуализации результатов использовали систему Novolink (Novocastra, UK). Проявляли окрашиванием аминоэтилкарбазолом (АЭК). Ядра окрашивали гематоксилином по стандартной методике.

Иммунофлуоресцентный метод. Фиксацию клеток в лунках культурального планшета проводили охлажденным метанол (карбинол, Тат ХимПродукт, Россия) после удаления культуральной среды, инкубируя при -20 °C 10 мин. Затем клетки промывали 3 раза по 5 мин 50 mM раствором Триса, pH 7,6, включающим 150 mM NaCl, TBS. Инкубацию с первичными антителами (разведение 1:200) проводили в TBS 1 ч, затем промывали 3 раза

по 5 мин в TBS и инкубировали 1 ч с вторичными антителами (разведение 1:2000 в TBS). После трёхкратной промывки по 5 мин в TBS добавляли DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, разведенный 1:50000 TBS; Invitrogen, США) и инкубировали 5 мин и повторяли отмывку TBS. Далее в лунки добавляли по 500 мкл TBS и анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии AxioObserverZ1 (Carl Zeiss, Германия).

Иммуногистология.

http://www.bdbiosciences.com/resources/protocols/paraffin_sections.jsp

Проточная цитофлуориметрия. Клетки фиксировали 30 мин при 40°C в фиксативе CellFix, на основе формальдегида, 10 мин пермеабилizировали мембрану 0,1% раствором Твина-20 в PBS. Суспензию клеток 1 ч инкубировали с первичными антителами, затем 30 мин с вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом Alexa 488. Результаты анализировали на проточном цитофлуориметре GuavaeasyCyte 8HT.

Исследование апоптоза методом окрашивания Annexin-V FITC и PI. На 7-ой день культивирования к клеткам добавляли исследуемые вещества в различных концентрациях и инкубировали 24 ч. Затем клетки собирали центрифугированием 5 мин при 500 g, оставшиеся прикрепленными клетки трипсинизировали, снова собирали, после чего 1-й и 2-й осадок объединяли, промывали два раза и окрашивали Annexin-V FITC PI согласно инструкции фирмы-производителя (Sigma).

Иммуноблотинг. После электрофоретического разделения белковых молекул в соответствии с рекомендациями фирмы Bio-Rad Mini-PROTEIN 3 Cell. Далее проводили перенос белков с гелей на Immun-Blot PVDF-мембрану (Bio-Rad). Мембрану в 5% обезжиренном молоке 40 мин при комнатной температуре, а потом инкубировали с первичными антителами при +40°C в течение ночи. Затем мембрану тщательно отмывали в PBS-Tween-20, после чего инкубировали 40 мин со вторичными антителами. Визуализацию иммунного преципитата проводили с помощью набора для хемилюминесцентной детекции белка Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Bio-Sciences AB, #RPN2232) и прибора ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad, Сингапур).

Трансфекция. Клетки трансфицировали *in vitro* плазмидными конструкциями с помощью коммерческого трансфицирующего реагента Turbofect согласно инструкции фирмы-производителя (ThermoFisher)

xCELLigance Real-Time Cell Analyzer (Roche). (метод проводили по инструкции фирмы Roche)

MTS-тест. Цитотоксичность куркумина, глиотоксина, инсулина и TNF- α на культурах клеток определяли колориметрически с помощью реагента

CellTiter 96® Aqueous MTS Reagent Powder (Promega, США) на планшетном анализаторе CERES 900HDi (Bio-Tek Instruments Inc., США). Для этого при 490 нм определяли влияние исследуемых веществ на активность митохондриальных дегидрогеназ. Статистический анализ проводили методом t-критерия Стьюдента в программе Microsoft Excel 2007.

Дифференцировка. Для индукции дифференцировки, осуществляемой в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях в соответствии с методом (Dogan A. et al // International Journal of Nanomedicine. 2012) клеточные культуры инкубировали со специальными средами согласно стандартном протоколу.

Результаты и их обсуждение

1. Фенотипический анализ клеток, получаемых методом эксплантации из фрагментов печени и крупных портальных трактов новорожденных крыс

Поскольку влияние веществ, в частности куркумина, глиотоксина, инсулина, TNF- α , на процессы активации /ингибирования фиброза печени невозможно исследовать без надежной модели эксплантации культуры клеток с целью получения миофибробластов (МФ), необходимо было выполнить фенотипический анализ клеток, получаемых методом эксплантации из фрагментов печени и крупных портальных трактов новорожденных крыс.

Методов выделения ЗКП (звездчатые клетки печени), не содержащих в своей цитоплазме витамина А и находящихся на стадии МФ, в литературе не описано. Вследствие их высокой биосинтетической активности и способности трансдифференцироваться в МФ, которые синтезируют макромолекулы межклеточного матрикса соединительной ткани, ЗКП считают главными «виновниками» развития цирроза и фиброза печени (Ramadori, et al., // Liver. 2002. Vol. 22). Однако в последнее время появляется всё больше данных о том, что, помимо ЗКП, источником МФ могут являться фибробласты портальных трактов, или ПФ (портальные фибробласты). Таким образом, на сегодняшний день обе эти популяции клеток, ЗКП и ПФ, рассматриваются как источник МФ и соединительной ткани при фиброзе печени (Iwaisako, et al., // J Gastroenterol Hepatol. 2012: Vol. 27).

Мы предположили, что для получения МФ с целью моделирования активации ЗКП и ПФ может быть использован метод эксплантации, при котором клетки, обладающие высокой биосинтетической активностью,

мигрируют из фрагментов тканей *in vitro* с образованием монослойной культуры.

Общепринятым маркером МФ является альфа-гладкомышечный актин (α -ГМА). Отличительным признаком МФ, происходящих из ЗКП, является сохранение в цитоскелете миофибробластов десмина. Характерным маркером ПФ является Thy-1.

На первом этапе работы были получены клеточные культуры из эксплантов печени и крупных портальных трактов. Клетки, получаемые как из фрагментов печени, так и из крупных портальных трактов, имели морфологию, характерную для МФ.

При исследовании фенотипа клеток, полученных из эксплантов печени, была показана устойчивая экспрессия десмина маркера ЗКП крыс, что позволяет нам предположить, что мигрировавшие клетки являлись преимущественно МФ-ЗКП. (Рис. 1 А, Б).

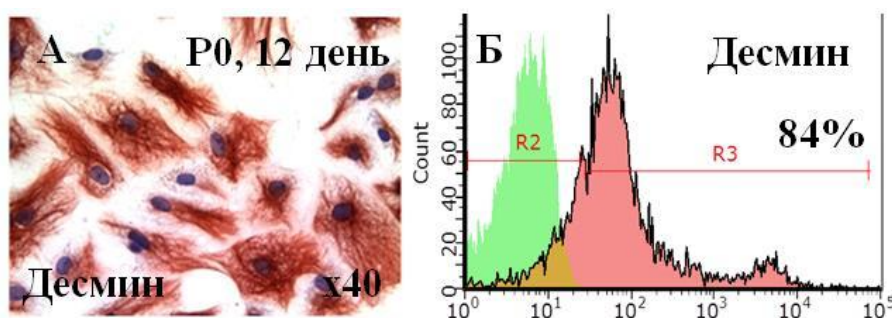


Рис.1.Иммуноцитохимический анализ клеток, окрашенных антителами на (А) Десмина,12 день, пассаж 0 (P0), x40 (увеличение), (Б) Проточная цитофлуориметрия клеток, полученных из эксплантов печени (пассаж 1): – окрашивание на Десмин (зеленый пик – контроль (R2), красный- опыт (R3- 84%))

При исследовании фенотипа клеток, полученных из крупных портальных трактов, было выявлено 81% положительно окрашенных клеток на Thy-1, что подтверждает получение МФ-ПФ (Рис.2)

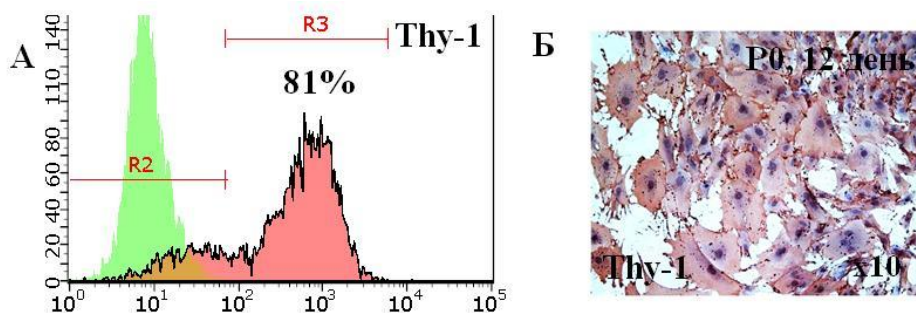


Рис.2. Проточная цитофлуориметрия клеток полученных из крупных портальных трактов окрашенных на Thy-1, пассаж 1(P1) зеленый пик –контроль (R2), красный- опыт (R3- 81%), (Б) Иммуноцитохимический анализ клеток полученных из крупных портальных трактов , окрашенных антителами на (А) Thy-1,12 день,пассаж 0 (P0), x 10 (увеличение).

Поскольку экспрессия цитокератинов 18 и 19 не была выявлена, можно утверждать, что полученные культуры клеток были не эпителиального происхождения. А отсутствие экспрессии альбумина и α -фетопротеина было показателем того, что полученные клетки не были зрелыми гепатоцитами (Рисунок 3).

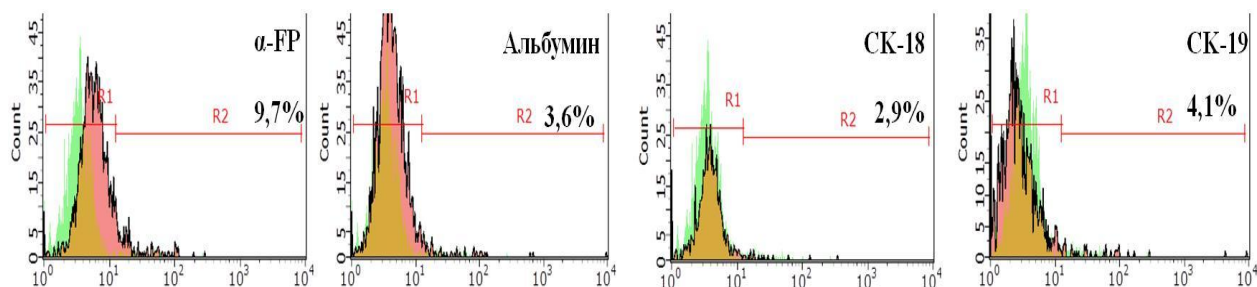


Рисунок 3 - Проточная цитофлуориметрия клеток полученных из эксплантов печени, пассаж 1 (P1) окрашенных на α -FP, Альбумин, СК-18, СК19. Зеленый пик –контроль (R2), красный- опыт (R1)

2. Влияние химических веществ куркумин и глитоксин (инсулин, TNF- α) на ПФ и ЗКП, полученных из крупных портальных трактов

Исследование веществ, потенциально рассматривающихся в качестве препаратов для лечения фиброза печени, ранее проводилось на ЗКП. Учитывая участие ПФ в синтезе внеклеточного матрикса и их большой вклад в развитие фиброза печени, сравнительный анализ влияния на них и на ЗКП различных веществ поможет в поиске новых подходов к лечению фиброза печени.

Поскольку ЗКП и ПФ начинают синтез компонентов внеклеточного матрикса после активации в ответ на повреждение печени. Биологически активные вещества, влияющие на эти клетки, потенциально способны модулировать процессы фиброза. Мы предположили, что использование известных ингибиторов фиброза куркумина и глитоксина может влиять на пролиферацию, жизнеспособность и статус активации МФ-ПФ.

С целью выбора оптимальных концентраций, было исследовано влияние широкого диапазона концентраций всех веществ на полученную культуру клеток МФ-ЗКП: куркумин 5–200 мкМ; глитоксин 0,025–30 мкМ; инсулин 10-1000 мкМ; TNF- α 1-50 нг/мл. Все концентрации добавляли через 24 ч после посева клеток, анализ действия химических веществ оценивали с помощью прибора xCELLigance Real-Time Cell Analyzer, который позволяет наблюдать влияние различных концентраций веществ на клеточный индекс в реальном времени.

На основании литературных данных по действию разных концентрации куркумина, глиотоксина, инсулина и TNF- α на МФ-ЗКП и наших наблюдений, были выбраны 3 ключевые концентрации каждого вещества: куркумин (100 мкМ, 50 мкМ и 30 мкМ), глиотоксин (0,25 мкМ, 0,1 мкМ, 0,05 мкМ), инсулин (1000 мкМ, 500 мкМ и 200 мкМ) и TNF- α (20 нг/мл и 10 нг/мл).

Самая высокая из используемых концентрация куркумина –100 мкМ-оказала наиболее токсичное действие на клетки. После начального периода адаптации клеток к влиянию вещества, начинался их апоптоз, а потом и некроз, что отражено в графике косонисходящей кривой, показывающей снижение пролиферации клеток (Рис. 4 А).

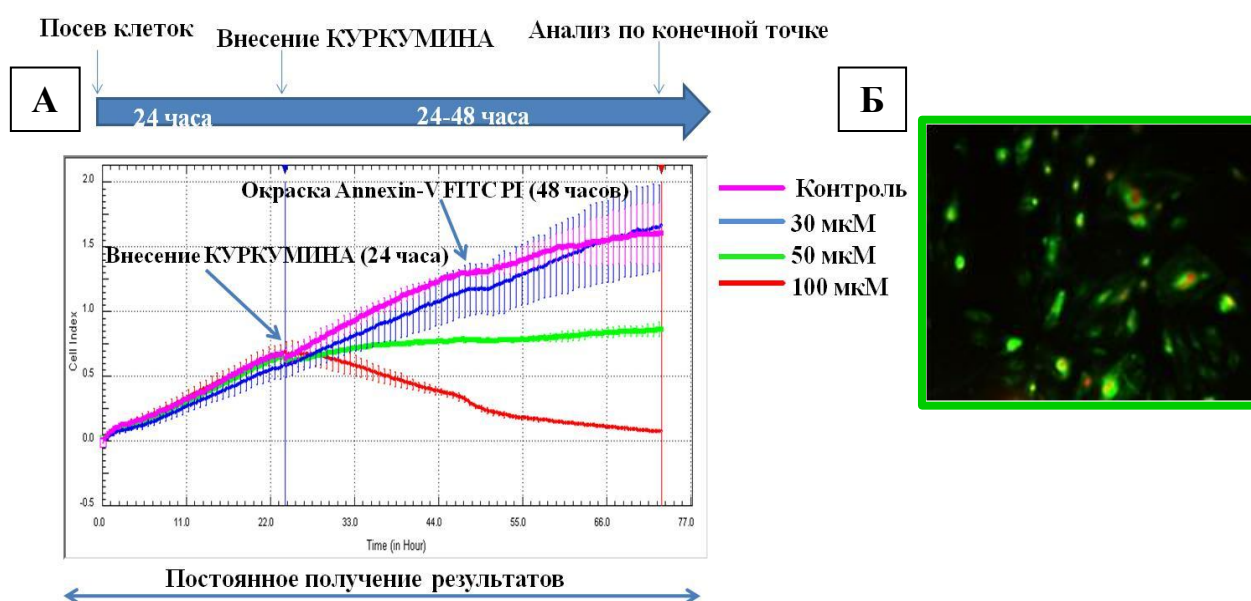


Рис. 4. (А) Исследование клеточного индекса ПФ, при добавлении куркумина. Куркумин в различных концентрациях (30 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ) добавляли в культуру клеток и пролиферативную активность клеток определяли на основе клеточного индекса, полученного с помощью прибора xCELLigence Real-Time Cell Analyzer. (Б) Ранний апоптоз после инкубации с куркумином в концентраций 50 мкМ. Окраска красителями Annexin V-FITC (маркер апоптоза, зеленая флуоресценция) и PI (маркер некроза, красная флуоресценция), x20 (увеличение)

При добавлении средней (50 мкМ) концентрации куркумина клетки хорошо адаптировались, наблюдались лишь признаки раннего апоптоза (Рис. 4 Б). После чего клеточный индекс достигал фазы плато, однако клеточный индекс достигал более низкого уровня по сравнению с контрольными клетками, которым ничего не добавляли (Рис. 4 А). Эту концентрацию можно считать наиболее значимой, т.к. клетки сохраняют способность к пролиферации, хотя и на более низком уровне. Видно, что рост клеток по

отношению к клеткам контрольной группы снижается примерно на 50%. При самой низкой концентраций в 30мкМ практически отсутствовало влияние вещества на клеточный индекс (Рис.4 А).

По сравнению с куркумином глиотоксин оказывает более токсичное действие на ПФ. Глиотоксин добавляли к культивируемым клеткам через 48 ч. Концентрация 0,05 мкМ практически не оказывала влияния на клетки, некроза впервые, 24 ч отмечено не было. Клетки на короткий промежуток времени подвергались апоптозу, а затем их рост восстанавливался и на 72 ч культивирования их клеточный индекс был больше, чем у контрольных клеток (Рис. 5 А). Такие показатели сохранялись до конца эксперимента.

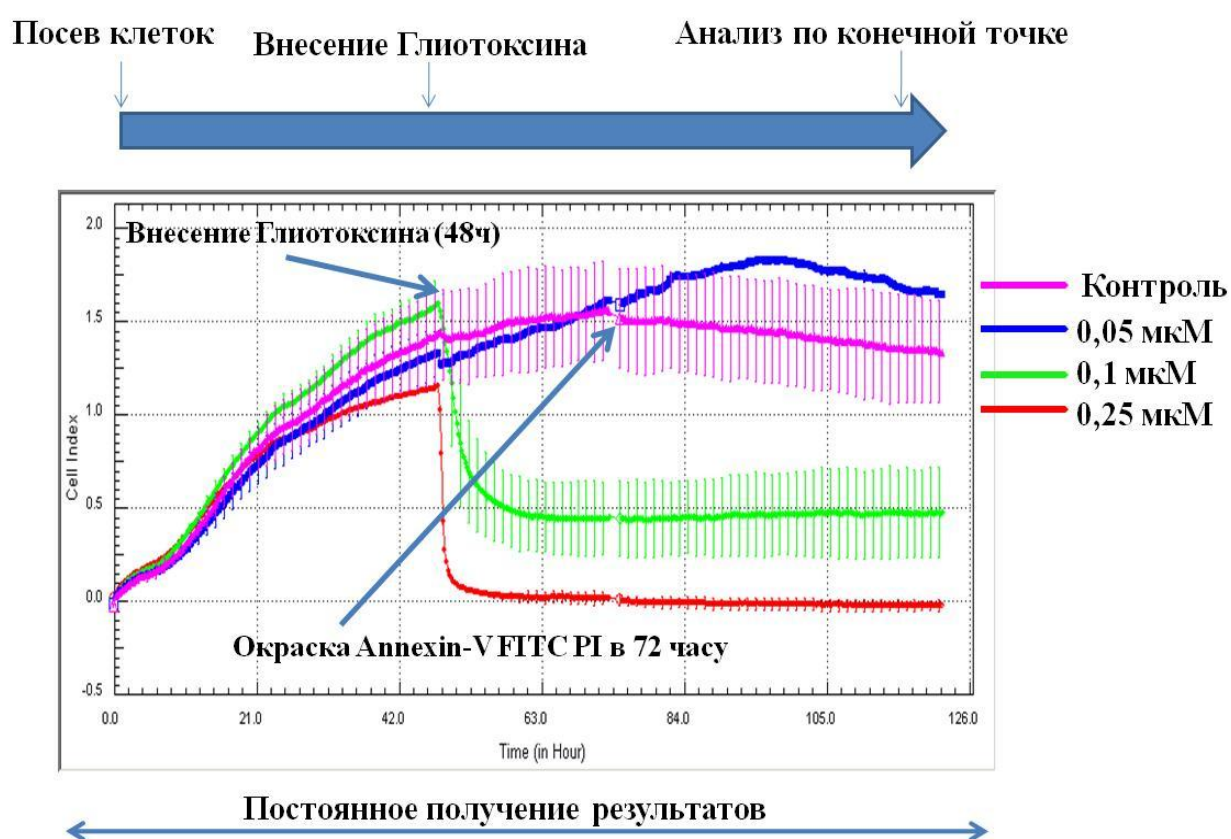


Рис. 5. Исследование клеточного индекса ПФ, при добавлении глиотоксина. Глиотоксин в различных концентрациях (0,05 мкМ; 0,1 мкМ; 0,25 мкМ) добавляли в культуру клеток (через 48 ч после посева клеток) и пролиферативную активность клеток определяли на основе клеточного индекса, полученного с помощью прибора xCELLigance Real-Time Cell Analyzer. Определение некроза/апоптоза клеток в дальнейшем проводили с помощью флуоресцентных красителей Annexin V-FITC и PI

При концентрации глиотоксина 0,1 мкМ клетки подвергались апоптозу, а частично и некрозу. Часть клеток выживала, однако практически не наблюдалось роста клеточного индекса в процессе дальнейшего

культивирования. Таким образом, глиотоксин в концентрации 0,1 мкМ оказывает на клетки антипролиферативный эффект (Рис. 5 А). Концентрация 0,25 мкМ оказалась слишком токсичной и вызывала некроз исследуемых клеток (Рис. 5 А) Следует отметить, что полученные данные о токсичности веществ актуальны для исследуемого типа клеток и зависят от концентрации и изначального их количества.

Методом проточной цитофлуориметрии показано что при его добавлении в концентрации 0,25 мкМ 63,65% клеток погибали и 31,93% уходили в апоптоз, живыми оставались лишь 3,32% клеток (Рис. 6 Б).

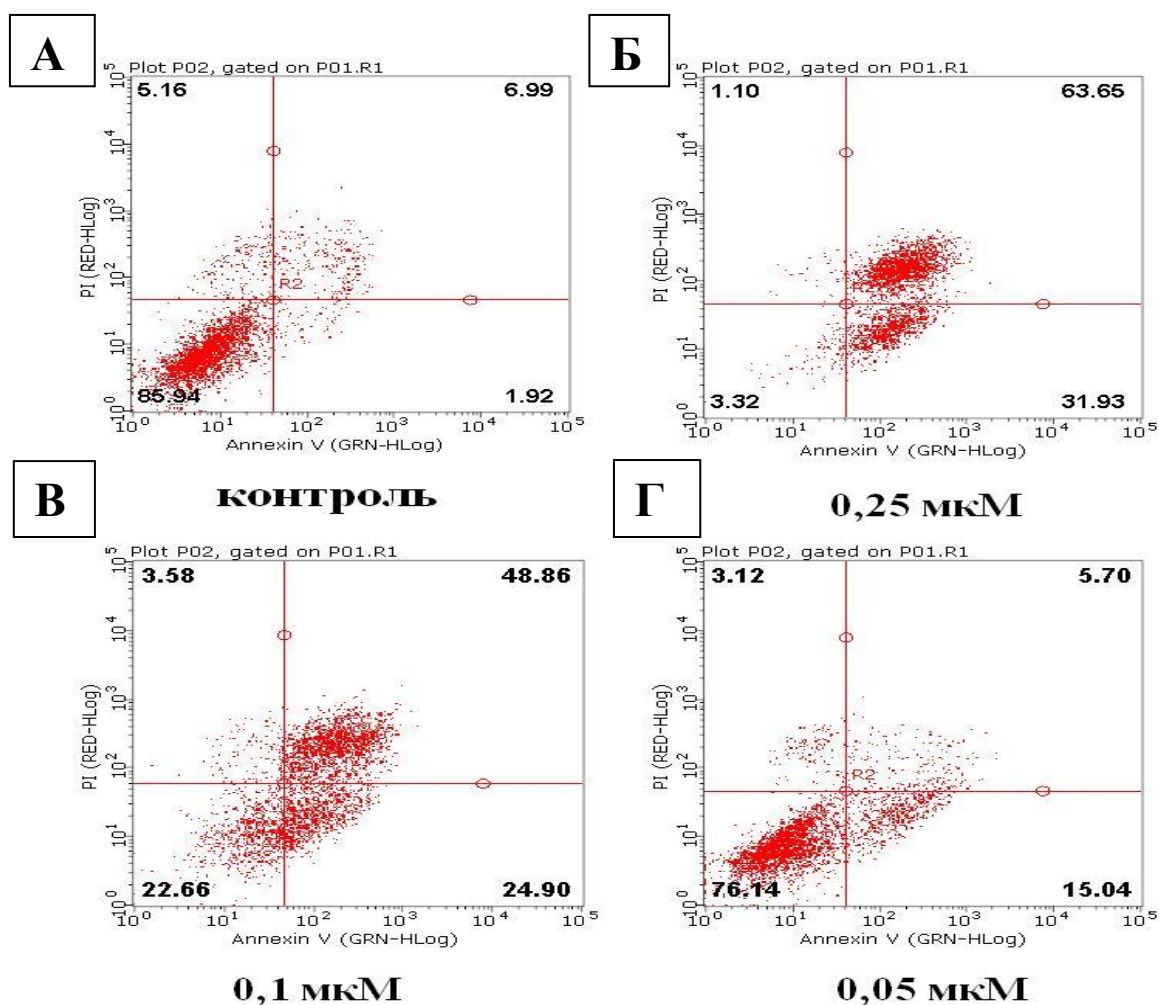


Рис. 6. Влияние глиотоксина на процессы некроза и апоптоза в ПФ. Глиотоксин добавляли в культуру клеток в концентрациях 0,05 мкМ, 0,1 мкМ и 0,25 мкМ. После инкубаций 24 ч апоптоз/некроз клеток определяли с помощью флуоресцентных красителей Annexin V-FITC (маркер апоптоза, зеленая флуоресценция) и PI (маркер некроза, красная флуоресценция). Анализ проводили с помощью проточной цитофлуориметрии

С уменьшением концентрации глиотоксина (0,1 мкМ) процент мертвых и ушедших в апоптоз клеток снижался (48,86% и 24,90%, соответственно), и

увеличивалось количество живых клеток –22,66% (Рис. В). Наименьшая из выбранных концентраций глиотоксина (0,05 мкМ) не приводила к немедленной гибели клеток (5,70% некроза), однако апоптозу подвергалось 15,04% клеток, что почти в восемь раз превышает значение спонтанного апоптоза в контроле (1,92%-Рис.6 А), количество живых клеток при этом составило 76,14% (Рис. 6 Г).

На основании тестов по определению активности митохондриальных дегидрогеназ были подтверждены результатами xCelligance и максимальные нетоксичные концентрации куркумина и глиотоксина.

Кроме того, было исследовано влияние веществ с противоположным эффектом на клетки ПФ инсулина и TNF- α .

Хотя инсулин является известным митогеном, действуя на клетки через специфичные рецепторы, его влияние на ПФ оставалось недостаточно изученным. В ходе исследований показано, что инсулин способствует пролиферации ПФ. Получены экспериментальные данные, которые показывают, что от самой низкой 200 мкМ до самой высокой 1000 мкМ концентрации, инсулин способствовал росту клеточного индекса (Таблица 1).

Таблица 1.

Влияние куркумина, глиотоксина, TNF- α и инсулина на ПФ крыс *in vitro*

ВЕЩЕСТВО	КОНЦЕНТРАЦИЯ	ПРОЛИФЕРАЦИЯ	α -ГМА	Annexin-V FITC PI	
				АПОПТОЗ	
				РАННИЙ	ПОЗДНИЙ
КУРКУМИН	30 мкМ	+	+++	–	+
	50 мкМ	–/+	++	+	–
	100 мкМ	–	+	–	+
ГЛИОТОКСИН	0,05 мкМ	–/+	+++	–	+
	0,1 мкМ	–/+	++	–	+
	0,25 мкМ	–	+	–	+
TNF-α	10 нг/мл	+	+	*	*
	20 нг/мл	++	++	*	*
ИНСУЛИН	200 мкМ	+	+	*	*
	500 мкМ	++	++	*	*
	1000 мкМ	+++	+++	*	*

(–) – снижение пролиферации, биосинтеза ГМА или отсутствие апоптоза.

(+) – увеличение пролиферации, биосинтеза ГМА или индукция апоптоза.

* – не определяли

Хотя известно, что цитокин TNF- α обладает множеством эффектов имеющих критическое значение в процессах регенерации, изменение роста клеток после добавления TNF- α в течение 24 ч практически не наблюдалось, однако после 48 ч инкубации наблюдалось увеличение пролиферативной активности по отношению к клеткам контрольной группы (Таблица 1).

Результаты, полученные в ходе нашего исследования, направленного на изучение влияния нескольких биологически активных веществ в различных концентрациях на пролиферативную активность, биосинтез компонента цитоскелета α -ГМА и апоптоз ПФ, обобщены в Таблице 1.

Таким образом, исследовано действие куркумина и глиотоксина на ПФ, предложены оптимальные концентрации куркумина (50 мкМ) и глиотоксина (0,1 мкМ), которые могут быть использованы для подавления пролиферации и активации МФ-ПФ. Полученные результаты расширяют современные знания о клетках, входящих в фиброгенные популяции печени, их превращении, и открывают новые возможности для клинического применения биологически активных веществ (куркумина и глиотоксина) *in vivo* при лечении заболеваний печени.

ВЫВОДЫ

- 1) Получены культуры звездчатых клеток печени из фрагментов печени и культуры портальных фибробластов из крупных портальных трактов крыс *Rattus norvegicus* методом эксплантации и ферментативной обработки (пропазой и коллагеназой).
2. Из результатов иммунофенотипирования следует, что звездчатые клетки печени десмин-положительные, а портальные фибробласты Thy-1-положительные при культивировании *in vitro*.
3. В процессе культивирования звездчатые клетки печени и портальные фибробласты дифференцируются в процессе культивирования в миофибробласты, экспрессирующие альфа гладкомышечный актин.
4. Установлено пролиферативное влияние TNF- α и инсулина на культуру клеток портальных фибробластов и увеличение биосинтеза компонентов цитоскелета (α -ГМА).
5. Добавление куркумина и глиотоксина в культуру звездчатых клеток печени и портальных фибробластов оказывает дозозависимый про-

апоптотический эффект и снижает биосинтез компонентов цитоскелета (α -ГМА).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. **Миянович О.** Выделение и культивирование миофибробластов печени крыс методом эксплантации / О. Миянович, А.К. Шафигуллина, А.А. Ризванов, А.П. Киясов// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.- VII (3).-2012 . - С.112-115 (Список ВАК – авт. 0,125 п.л.).

2. **Миянович О.** Анализ миофибробластов крысы, полученных из структур портальных трактов печени методом эксплантации / О. Миянович, М.Н. Катина, А.А. Ризванов, А.П. Киясов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.-VIII(3). –2013. - С.119–124 (Список ВАК – авт. 0,1875 п.л.).

II. Тезисы докладов региональных и международных конференций:

1. **Миянович О.** Роль NFκB в активации каскада клеточных реакций при фиброзе печени / О. Миянович, А. Шафигуллина // XVI Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине», секция «Фундаментальные науки»: Материалы конференции. – Казань, 2011. – С.130.

2. **Миянович О.** Иммуноцитохимический анализ фенотипа звездчатых клеток печени / О. Миянович, А. Шафигуллина // Материалы XVII Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2012. – С.145.

3. **Mijanovic O.** The role of NF-κB in hepatic stellate cells during liver fibrosis / O. Mijanovic, A.P. Kiyasov, A.A. Rizvanov // Міжнародна наукова конференція студентів і молодих вчених «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини 19-20 квітня 2012 року»: Тезисоповидей. – 2012. – С.46-47.

4. **Mijanovic O.** The role of NF-κB in the activation of a cascade of cellular reactions in liver fibrosis / Mijanovic O. // The 4th international IMBG conference for young scientists «Molecular biology: Advances and perspectives». - Kyiv, 2011. – p.14-17.

5. **Миянович О.** Выделение и культивирование миофибробластов печени крыс методом эксплантации / О. Миянович, А.К. Шафигуллина, А.А. Ризванов, А.П. Киясов // Международная конференция «Биология - наука XXI века». - Москва, 2012.- С.587-589.
6. **Миянович О.** Перспективы применения куркумина при хронических гепатозах / О. Миянович, М.Н. Катина // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2014». – Москва, 2014.
7. Проттой Р.А. Качественное и количественное определение экспрессии транскрипционного фактора NF-κB в культуре миофибробластов печени крысы / Проттой Р.А., **О. Миянович**, А.А. Ризванов // I научно-практическая конференция студентов и молодых ученых Института фундаментальной медицины и биологии «Современные проблемы фундаментальной медицины и биологии»: Сборник тезисов. – Казань, 2013. - С.104-105.