

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ОНКОТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК В ПРИСУТСТВИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

PROLIFERATIVE ACTIVITY OF ONCOTRANSFORMED CELLS IN THE PRESENCE OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS (EXPERIMENTAL STUDY)

В. А. Бондаренко^{1,2}, М. Ю. Юркевич^{1,2}

V. A. Bondarenko^{1,2}, M. Yu. Yurkevich^{1,2}

¹Белорусский государственный университет, БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

kaf_immunal@iseu.by, ocdx02@gmail.com

¹Belarusian State University, BSU, Minsk, Republic of Belarus

²International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Наряду с плюрипотентными свойствами мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки обладают тропизмом к опухолям и могут взаимодействовать с онкотрансформированными клетками с помощью разных механизмов: через гуморальные факторы, через процессы ангиогенеза в опухоли, а также путем модификации микроокружения опухоли. Установлено, что при совместном культивировании мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток с клеточной линией K562 в соотношении 1:10, соответственно, наблюдается подавление роста и пролиферации онкотрансформированных клеток.

Along with pluripotent multipotent mesenchymal stromal cells, they have a tropism for tumors and mix in combination with oncotransformed cells using various mechanisms: through humoral factors, through the processes of angiogenesis in the tumor, and also as a result of the development of the tumor microenvironment. It has been established that during the general cultivation of multipotent mesenchymal stromal cells with the K562 cell line, a ratio of 1:10 is observed, an increase in the growth and proliferation of oncotransformed cells is observed.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, костный мозг, линия клеток K562, совместное культивирование.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, bone marrow, K562 cell line, co-cultivation.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-1-202-205>

Ежегодно в мире регистрируется 9 млн новых случаев злокачественных новообразований и более 6 млн смертей от них. Такой рост количества онкологических заболеваний связывают с постоянным изменением состояния внешней среды. Общеизвестно, что ряд химических веществ, производственных процессов, физические факторы – ионизирующее и ультрафиолетовое излучения, некоторые экзогенные вирусы, а также образ жизни и вредные привычки являются этиологическими факторами новообразований человека [1]. Стандартные методы терапии, включая лучевую и химиотерапию, имеют ограниченную эффективность при онкологических заболеваниях. В связи с этим разработка новых методов терапии данных патологий является актуальной задачей, а с учетом достижений клеточной и молекулярной биологии одним из перспективных направлений является использование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) содержатся во многих тканях, имеющих мезенхимное происхождение. ММСК способны дифференцироваться не только в многочисленные типы клеток мезенхимного происхождения, включая клетки костной, хрящевой, мышечной, сухожильной и жировой ткани, но также в клетки других зародышевых листков, включая глиальные клетки, гепатоциты, клетки панкреатических островков [2]. Кроме того, ММСК проявляют иммунорегуляторные свойства и синтезируют огромный спектр цитокинов и ростовых факторов (трансформирующий ростовой фактор – β , простагландин E2, фактор некроза опухоли α , фактор роста фибробластов, интерлейкины -1,6 и другие) [1, 2].

Многообразие свойств ММСК позволяет рассматривать их как многообещающие кандидаты для клеточной терапии различных заболеваний, включая аутоиммунные патологии, воспалительные процессы, неврологические расстройства, онкологические патологии и др. Данные о влиянии ММСК на онкотрансформированные клетки достаточно противоречивы [3 - 5]. Выявлен тропизм ММСК к онкотрансформированным клеткам, а также обнаружена способность ММСК дифференцироваться в опухолассоциированные фибробласты, формирующие в строме опухоли фибробластную сеть. Установлено, что клетки меланомы B-16, введенные аллогенным

мышам совместно с ММСК, приводили к формированию большего числа опухолевых очагов, чем без ММСК, что указывает на наличие у ММСК иммуносупрессивного эффекта, который способствовал росту опухолей [3]. Аналогичные данные получены и с В-клеточной лимфомой человека, что объясняется продукцией ММСК лимфотоксина и фактора некроза опухоли, способных подавлять иммунные реакции [3]. Установлено, что введение ММСК лабораторным животным с экспериментальной моделью саркомы Капоши приводит к значительному подавлению роста опухолевой ткани. Кроме того, у бестимусных животных с саркомой также наблюдалось ММСК-опосредованное снижение роста опухоли, что служит доказательством о превалировании неиммунных механизмов торможения опухолевого процесса [4]. Имеются результаты о способности ММСК тормозить деление клеток рака молочной железы за счет продукции протеина Dickkopf 1 (DKK-1), подавляющего экспрессию бета-катенина – белка, находящегося в комплексе с молекулами клеточной адгезии [5].

Целью данной работы являлось оценка влияния мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на пролиферацию клеток опухолевой линии K562 при их совместном культивировании.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование проводили с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и в научных целях (Страсбург, 1991 г.), и в соответствии с постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 21.05.2010 №36 «Ветеринарно-санитарные правила по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в вивариях научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках». Все манипуляции с клетками выполняли со строгим соблюдением правил стерильности в ламинарном боксе II класса защиты.

Костномозговую суспензию получали из берцовых костей лабораторных крыс, наслаивали на градиент плотности фиколл-верографина ($\rho=1,088 \text{ г/см}^3$, «Sigma», Германия) и центрифугировали в течение 30 минут при 1500 об/мин. Образовавшееся интерфазное кольцо отмывали центрифугированием (10 мин., 1500 об/мин.) в фосфатно-буферном растворе и высеивали в концентрации $2 - 4 \times 10^5$ клеток/см² на адгезивный пластик в минимальную среду Игла с низким содержанием глюкозы, модифицированную по способу Дульбекко (DMEM, «Lonza», Бельгия), содержащую 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ глутамин, 100Ед/мл бензилпенициллин натрия, 100Ед/мл стрептомицин сульфата, 100Ед/мл неомицин сульфата («Gibco», Великобритания). Культивирование осуществляли при 37°C в условиях 5% CO₂ во влажной атмосфере. Замена культуральной среды осуществлялась каждый третий день. По достижении состояния конfluence для диссоциации адгезивных клеток проводили инкубацию культур с 0,25% раствором трипсин-этилендиаминтетрауксусной кислоты в течение 10 мин. при 37°C с последующим двукратным центрифугированием в физиологическом растворе (10 мин., 1500 об/мин.).

Клетки K562 – это линия клеток хронической миелоидной лейкемии, которые не прикрепляются к лабораторному пластику и в культурах характеризуются округлой эритроцитоподобной морфологией. Культивирование клеток линии K562 осуществляли в виде суспензии в полной питательной среде RPMI-1640 («Lonza», Бельгия), содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин и 1 % смесь антимикотика-антибиотиков.

Для совместного культивирования ММСК костного мозга первого пассажа высеивали в лунку 24-луночного планшета в концентрации $1 \times 10^4/\text{см}^2$. К суточным культурам ММСК добавляли клетки K562 в соотношении ММСК : клетки K562 – 1:10. Культивирование осуществляли в полной питательной среде RPMI, содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин и 1% смесь антимикотика-антибиотиков при стандартных условиях 37°C и 5% CO₂.

Для мониторинга клеточных культур и визуализации роста *in vitro* использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп BS – 7000 («BestScore», КНР). Оценку жизнеспособности клеток проводили методом исключения трипанового синего.

Пролиферативная активность клеток опухолевой линии K562 оценивалась на 5 день культивирования в монокультурах или в ко-культурах с ММСК костного мозга. Число (ЧУП) и время (ВУП) удвоения клеточных популяций рассчитывали по следующим формулам:

$$\text{ЧУП} = \frac{n}{N} * 3,33$$

$$\text{ВУП} = \frac{\text{время роста культуры (дни)}}{\text{ЧУП}},$$

где n – число клеток после культивирования; N – число клеток для посева.

Статистический анализ проводили в пакете прикладных программ STATISTICA 8.0. Данные представляли в виде медианы (25%÷75% процентилей). Для сравнения данных в зависимых группах использовали непараметрический Т-критерий Вилкоксона. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости (p) менее 0,05.

Полученные результаты. Первичные культуры адгезивных клеток костного мозга лабораторных животных характеризовались морфологической гетерогенностью. В клеточных культурах в течение нескольких суток после посева наблюдалось значительное количество прикрепленных округлых неделящихся клеток, наряду с отдельными колониями веретеновидных фибробластоподобных клеток, которые в последующем покрывали всю поверхность культурального пластика.

Начиная с первого пассажа, ММСК костного мозга были морфологически неразличимы и представляли гомогенные культуры клеток, характеризующихся веретеновидной фибробластоподобной морфологией с четко различимым ядром, ядрышками и цитоплазматической перинуклеарной зернистостью, что может указывать на выраженную секреторную активность этих клеток. На уровне второго пассажа и при последующем субкультивировании морфологические и пролиферативные особенности культур клеток сохранялись. Жизнеспособность клеточных культур составляла более 95% (98% (95%÷99%). Таким образом, полученные клеточные культуры соответствовали основным критериям идентификации ММСК (Международное общество клеточной терапии, Ванкувер, Канада, 2006 г.).

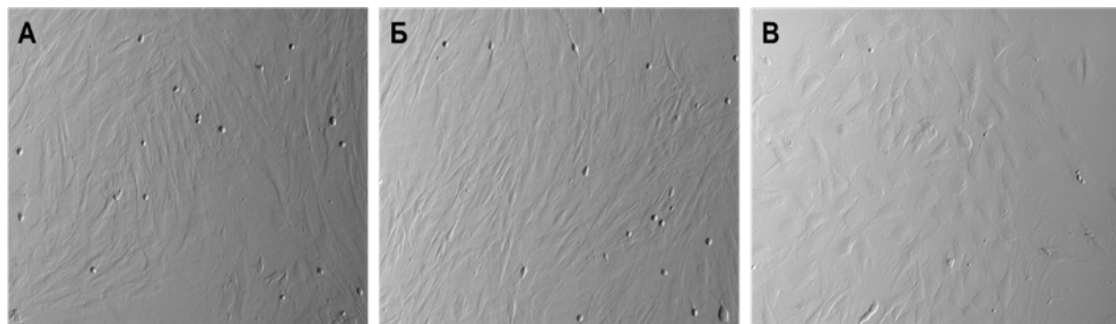


Рисунок 1 – Морфология культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга лабораторных животных в стандартных условиях культивирования, ув. 40х, световая микроскопия (А – первичная культура; Б – 1 пассаж; В – 2 пассаж)

Существуют достаточно противоречивые данные о влиянии ММСК на клетки опухолевых линий как *in vivo* так и *in vitro*; механизмы супрессорных и стимулирующих эффектов пока что до конца не ясны. ММСК могут взаимодействовать с онкотрансформированными клетками с помощью разных механизмов: напрямую или опосредованно через гуморальные факторы; через процессы ангиогенеза в опухоли, а также путем модификации микроокружения опухоли. ММСК также могут взаимодействовать с резидентными клетками опухолей – Т-и В-лимфоцитами, натуральными киллерными клетками макрофагами, эндотелиальными клетками сосудов. Кроме того, сами ММСК являются не однородной фракцией, а гетерогенны по своей природе, на что указывают данные о широком спектре синтезируемых ими цитокинов и многообразии фенотипических признаков.

Для оценки влияния ММСК на пролиферацию онкотрансформированных клеток *in vitro* осуществлено совместное культивирование ММСК, выделенных из костного мозга крыс, с клетками линии K562 в соотношении ММСК: K562 – 1:10. Культивирование осуществлялось в полной культуральной среде RPMI с 10% эмбриональной телячьей сывороткой, 1 % L-глутамина и 1 % антибиотика-антимикотика в стандартных условиях 37 °С и 5 % CO₂. Через 6 суток культивирования оценивался пролиферативный потенциал клеток K562 по показателям частоты и времени удвоения популяций. Результаты определения показателей представлены в таблице 1.

Согласно представленным результатам, на 6 день культивирования ММСК и клеток линии K562 наблюдалось снижение частоты удвоения популяции ($p=0,02$) и повышение времени удвоения популяций ($p=0,01$), что подтверждает влияние ММСК на рост и пролиферацию онкотрансформированных клеток *in vitro*.

Таблица 1 – Частота (ЧУП) и время (ВУП) удвоения популяций клеток K562 при их совместном культивировании с ММСК костного мозга

Показатели	Культуры клеток		Уровень значимости (p)
	Клеточная линия K562	K562+ММСК 10:1	
ЧУП	6,1 (5,7÷6,9)	4,3 (4,0÷4,5)	0,02
ВУП	1,1 (0,8÷1,7)	2,3 (2,0÷2,9)	0,01

Согласно данным литературы ММСК могут оказывать ингибирующее влияние на пролиферацию лейкоэмических клеток линии K562 [5]. Рассматривается роль молекулы DKK-1 (dickkopf-1), секретируемой ММСК и являющейся негативным регулятором WNT-сигнальных путей, в ингибировании пролиферации. При нейтрализации DKK-1 с помощью анти-DKK-1 антител или при снижении экспрессии гена DKK-1 ингибирующий эффект ММСК на пролиферацию лейкоэмических клеток линии K562 уменьшался [5].

Вывод. Культивирование ММСК костного мозга с клеточной линией K562 в соотношении 1:10 соответственно приводило к подавлению роста и пролиферации онкотрансформированных клеток, что подтверждалось статистически значимым уменьшением удвоения числа K562 и увеличением количества время удвоения этих клеток в культурах с ММСК по сравнению с монокультурами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rastegar, F. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications / D. Shenaq, J. Huang et al // World J. Stem Cells. – 2010. – P. 7-60.

2. Hass, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC / C. Kasper, S. Bohm et al // Cell Commun. Signal. – 2011. – P. 12.
3. Djouad, F. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals/ P. Plence, C. Bony et al// Blood. – 2003. – P. 3837–3844.
4. Brooke, G. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells / M. Cook, C. Blair, et al// Semin Cell Dev Biol. – 2007. – P. 58.
5. Zhu, Y. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1/ Y. Zhu, Z. Sun, Q. Han, L. Liao, J. Wang, C. Bian, R. C. Zhao// Leukemia. – 2009. – P. 33.

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕКСАГИДРОХИНОЛОНОВ И АКРИДИНДИОНОВ ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HEXAHYDROQUINOLINES AND ACRIDINDIONES

Е. И. Тарун^{1,2}, В. А. Нелюбина^{1,2}, А. Н. Пырко^{1,2}
E. I. Tarun^{1,2}, V. A. Nelyubina^{1,2}, A. N. Pyrko^{1,2}

¹Белорусский государственный университет, БГУ
²Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
kfl@iseu.by, ktarun@tut.by

¹Belarusian State University, BSU
²International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University,
ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Проведена сравнительная характеристика антиоксидантных свойств 3 гексагидрохинолонов и 4 акридиндионов различной структуры. Получены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от логарифма концентрации гексагидрохинолонов, из которых графически определены показатели IC_{50} , которые находились в пределах $2,37-13 \cdot 10^{-9}M$ для гексагидрохинолонов и $0,316-31,6 \cdot 10^{-9}M$ для акридиндионов. Гексагидрохинолоны восстанавливали флуоресценцию флуоресцеина до 90–92 % при концентрации образцов $10^{-6}-10^{-3}M$. Акридиндионы восстанавливали флуоресценцию флуоресцеина до 90–94 % при концентрации образцов $10^{-6}-10^{-3}M$.

The comparative study of the antioxidant activity of 3 hexahydroquinolones and 4 acridinediones of various structures have been carried out. The dependences of the fluorescence intensity of fluorescein on the logarithm of the concentration of hexahydroquinolones were obtained, from which the IC_{50} values were graphically determined, which were in the range of $2,37-13 \cdot 10^{-9}M$ for hexahydroquinolones and $0,316-31,6 \cdot 10^{-9}M$ for acridinediones. Hexahydroquinolones restored fluorescein fluorescence to 90–92% at a sample concentration of $10^{-6}-10^{-3}M$. Acridinediones restored fluorescein fluorescence to 90–94% at a sample concentration of $10^{-6}-10^{-3}M$.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, гексагидрохинолоны, акридиндионы, флуоресцеин.

Keywords: antioxidant activity, hexahydroquinolones, acridinediones, fluorescein.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-1-205-208>

Развитие химии неароматических азотсодержащих гетероциклов имеет важное значение для создания аналогов природных соединений, обладающих специфическим биологическим действием и играющих уникальную роль в живых системах. Азотсодержащие гетероциклы являются одним из основных классов соединений, используемых для изыскания и отбора новых лекарственных препаратов с широким спектром физиологической активности. Среди соединений класса гексагидрохинолонов найдены вещества, проявляющие кардиоваскулярную, гепатопротекторную, антиоксидантную, антидиабетическую, противоязвенную, противотуберкулезную, антибактериальную, противовирусную активности [1,2]. Акридиндионы проявляют антипролиферативную активность в отношении раковых клеток [3].

В настоящей работе проведена сравнительная характеристика антиоксидантных свойств 3 гексагидрохинолонов различной структуры (табл. 1) и 4 акридиндионов (табл. 2).

Метод определения антиоксидантной активности (АОА) по отношению к активированным формам кислорода (АФК) основан на измерении интенсивности флуоресценции окисляемого соединения и ее уменьшении под воздействием АФК. В настоящей работе для детектирования свободных радикалов использован флуоресцеин. Генерирование свободных радикалов осуществляли, используя систему Фентона, в которой образуются гидроксильные радикалы при взаимодействии комплекса железа (Fe^{2+}) с этилендиаминтетрауксусной кислотой