

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ КУРКУМИНА И ГЛИОТОКСИНА НА ФИБРОБЛАСТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ КРУПНЫХ ПОРТАЛЬНЫХ ТРАКТОВ КРЫС *RATTUS NORVEGICUS*

О. Миянович, М.Н. Журавлева, М.О. Гомзикова, А.А. Ризванов, А.П. Киясов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Effect of curcumin and gliotoxin on fibroblasts from the large portal tracts of Rattus norvegicus

O. Mijanovic, M.N. Zhuravleva, M.O. Gomzikova, A.A. Rizvanov, A.P. Kiasov

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

В последние годы активно ведутся исследования, посвященные способам подавления функции клеток соединительной ткани в печени больных хроническими гепатитами. Большая часть исследований веществ, потенциально рассматривающихся в качестве препаратов для лечения фиброза печени, была выполнена на звездчатых клетках печени. Однако существует теория участия портальных фибробластов в фиброзе печени, так как в большинстве случаев процессы фиброгенеза начинаются как с главного портального тракта, так и внутрипеченочных протоков. Подавление фиброгенеза путем предотвращения активации и индукции апоптоза портальных фибробластов сейчас рассматриваются как терапевтические стратегии для лечения фиброза печени.

Ключевые слова: куркумин, глиотоксин, фиброз печени, портальные фибробласты.

Эффект куркумина на процессы фиброгенеза в печени исследуется уже на протяжении длительного времени. Известно его влияние на различные клеточные процессы: адгезия, экспрессия генов, секреция различных факторов роста и медиаторов [1], участие в ангиогенезе, иммуномодуляции [2]. Кроме того, куркумин проявляет свойства ингибитора окислительного стресса и воспаления [3]. Были проведены исследования воздействия куркумина на клеточный цикл разных клеточных линий [4]. До сих пор неизвестно, почему эквивалентные концентрации куркумина вызывают апоптоз активированных звездчатых клеток печени (ЗКП) и не оказывают воздействия на покоящиеся ЗКП и другие клетки печени, такие как гепатоциты. Lin с соавт., изучая действие куркумина на иммортализованную линию HSC-T6, показали, что низкие концентрации куркумина (1,25–10 мкМ) не оказывают эффекта на клеточную выживаемость, в то время как высокая концентрация – 20 мкМ, вызывала некроз [5]. Baghdasaryan с соавт. (2010) исследовали действие куркумина на холангиоциты и портальные фибробласты (ПФ) мыши Mdr2^{-/-} и показали, что куркумин уменьшает пролиферацию и активацию ПФ через сигнальный путь ERK1/2 [6]. Кроме того, на эффективность применения куркумина в терапии фиброза печени указывает обнаруженное уменьшение синтеза α -ГМА и коллагена первого типа в печени под его воздействием [7].

Глиотоксин – высокотоксичный вторичный метаболит, относящийся к эпиполитиодиоксиопиперазиновой группе, продуцируемый некоторыми видами грибов, такими как *Gliocladium*, *Aspergillus* и *Penicillium*. Благодаря своему антибактериальному, противогрибковому и противовирусному эффекту глиотоксин является потенциальным лекарственным средством [8, 9]. Обнаружено, что глиотоксин способен индуцировать апоптоз тимоцитов, периферических лим-

In recent years there were lots of researches focused on inhibiting connective tissue cells in the liver of patients with chronic hepatitis. Most studies of the substances which can potentially be considered as drugs for the treatment of liver fibrosis were performed on hepatic stellate cells. However, there is a theory of portal fibroblasts participation in liver fibrosis, as in most cases the processes of fibrogenesis start both at main portal tract and intrahepatic ducts. Suppression of fibrogenesis by preventing the activation and induction of apoptosis of portal fibroblasts are being considered as therapeutic strategies for the treatment of liver fibrosis.

Key words: curcumin, gliotoxin, liver fibrosis, portal fibroblasts.

фоцитов, макрофагов, клеток мастоцитомы P815, фибробластов L929 и ЗКП in vitro, а также клеток тимуса, селезенки, лимфатических узлов брыжейки и печени in vivo [10]. Однако механизм индукции апоптоза глиотоксином остается невыясненным.

Учитывая участие ПФ в синтезе внеклеточного матрикса и их большой вклад в развитие фиброза печени, исследование влияния куркумина и глиотоксина на них, а также сравнение с ЗКП, позволит расширить горизонты поиска новых подходов в терапии фиброза печени. ПФ начинают синтез компонентов внеклеточного матрикса после их активации. Таким образом, используя оптимальные концентрации куркумина и глиотоксина, возможно индуцировать или тормозить процесс активации ПФ, возвращая их в покоящееся состояние, соблюдая баланс между переходом клеток в апоптоз и выживанием.

Материал и методы

Получение эксплантационной культуры клеток ПФ и обработка их куркумином и глиотоксином

Получение эксплантационной культуры фибробластов из крупных портальных трактов проводили, как описано ранее [11]. В общем, желчные протоки выделяли из печени здоровых четырехдневных крыс *Rattus norvegicus* линии Wistar. Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам, принятым в КФУ, рекомендациям местного этического комитета и национальным законам [14]. Выделенный желчный проток механически очищали от паренхимы печени под микроскопом с помощью стерильных инструментов и помещали целиком на культуральный пластик в питательную среду DMEM с добавлением 10% сыворотки плодов коров (FBS), 200 mM L-глутамин и антибиотика, таким образом, чтобы образец ткани был на $\frac{1}{2}$ погружен в питательную среду, а на $\frac{1}{2}$ оставался на

поверхности для улучшения адгезии фрагмента ткани к культуральному пластику за счет сил поверхностного натяжения, чтобы дать возможность клеткам эксплантироваться из фрагмента ткани на пластик.

На основании литературных данных о действии разных концентраций куркумина, глитоксина на ЗКП [12] и наших наблюдений, были выбраны 3 исследуемые концентрации куркумина (100 мкМ, 50 мкМ и 30 мкМ) и глитоксина (0,25 мкМ, 0,1 мкМ, 0,05 мкМ) для обработки культуры клеток ПФ.

Исследование апоптоза методом окрашивания Annexin-V FITC и PI

Клетки высевали на 6-луночный планшет и культивировали до образования монослоя. Добавляли исследуемые вещества в различных концентрациях и инкубировали 24 ч. После этого отбирали супернатант, который центрифугировали 5 мин. при 500 g, для сбора открепившихся клеток. Оставшиеся клетки трипсинизировали, собирали и центрифугировали 5 мин при 500 g. Собирали вместе первый и второй осадки. Промывали два раза 1x Biding buffer и окрашивали Annexin-V FITC PI (Sigma, США), согласно инструкции фирмы-производителя.

Исследование клеточного индекса с помощью прибора xCELLigence Real-Time Cell Analyzer

Технология xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (Roche, Германия) основана на использовании микроэлектронных клеточных сенсоров, интегрированных в дно лунок специальных культуральных планшетов. Клетки культивируются на этих планшетах, при этом с заданной частотой измеряется импеданс между электродами сенсоров, на которые прикрепляются клетки, обладающие диэлектрическими свойствами. Заданная частота измерений в нашем эксперименте составляла каждые 15 мин в течение четырех дней. Перед началом эксперимента вносили по 100 мкл культуральной среды в каждую лунку планшета E-plate и устанавливали фоновое значение (вычитание влияния культуральной среды/среды с исследуемым веществом на значение импеданса) прибора. Затем сеяли по 5000 клеток на лунку планшета E-plate. Через 24 ч добавляли исследуемые вещества в различных концентрациях.

Результаты и обсуждение

Самая высокая из используемых концентраций куркумина (100 мкМ) оказала наиболее токсичное дей-

ствие на клетки. После начального периода адаптации клеток к действию вещества начинался их апоптоз (Annexin-V⁺/PI⁻), а затем и некроз (Annexin-V⁺/PI⁺), что отражено на флуоресцентных фотографиях (рис. 2 И–Р) и в графике косонисходящей кривой клеточного индекса, показывающей снижение пролиферации клеток (рис. 1). При добавлении средней (50 мкМ) концентрации куркумина клетки хорошо адаптировались, наблюдались признаки раннего апоптоза (Annexin-V⁺/PI⁻), лишь единичные клетки находились в стадии позднего апоптоза/некроза (Annexin-V⁺/PI⁺) (рис. 2 И–М). После чего кривая клеточного индекса выходила на фазу плато, однако значения клеточного индекса были ниже контрольных (без добавления веществ) (рис. 1). Эту концентрацию можно считать наиболее значимой, так как 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 воздействии низкой концентрации куркумина (30 мкМ) лишь единичные клетки подвергались апоптозу (рис. 2 Д–З) и практически отсутствовало влияние вещества на клеточный индекс (рис. 1).

Куркумин блокирует экспрессию широкого спектра генов (PPAR- γ , α 1-коллаген, α -ГМА, CTGF, рецептор TGF- β , PDGF, EGF), что указывает на то, что куркумин действует на многие сигнальные пути, в том числе, возможно, на пути активации воспаления и фиброгенеза [13]. Исследование действия куркумина на рост клеток различных клеточных линий *in vitro* показывает, что куркумин оказывает влияние на клетки в широком диапазоне микро- и миллимолярных концентраций. В результате его действия происходит индукция апоптоза клеток и снижение образования активных форм кислорода [4]. Известно, что куркумин обладает сильным антиоксидантным эффектом, даже более сильным, чем витамины С и Е [14–17].

Поскольку при самой низкой концентрации куркумина 30 мкМ практически отсутствовало влияние вещества на клеточный индекс, то эта концентрация может быть предложена для использования *in vivo* в качестве антиоксиданта. Так как куркумин в зависимости от концентрации способен вызывать апоптоз и некроз ПФ *in vitro*, предполагаемой максимально допустимой концентрацией куркумина, которая может быть использована для подавления активированных ПФ и, соответственно, окажет антифиброзный эффект *in vivo*, является 50 мкМ. Однако, механизм его гепатопротективного действия *in vivo* до конца не раскрыт [18].

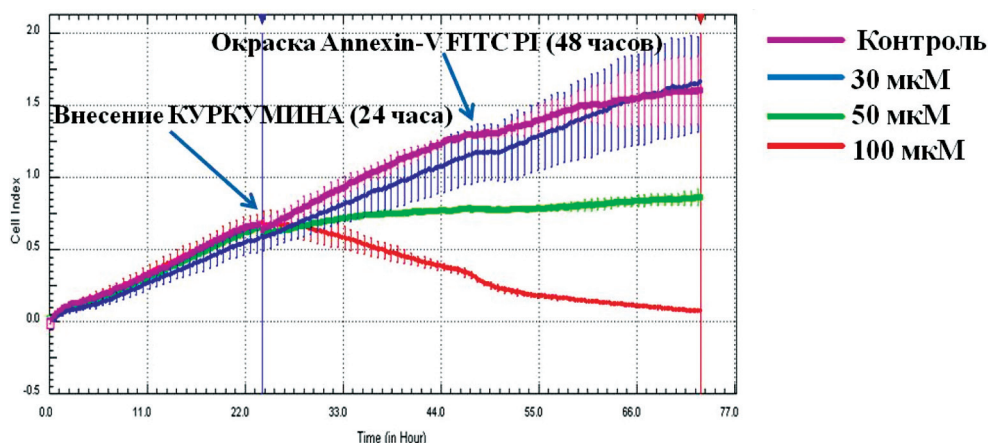


Рис. 1. Клеточный индекс (пролиферативная активность) портальных фибробластов при добавлении куркумина в различных концентрациях (30 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ). Технология микроэлектронных клеточных сенсоров, прибор xCELLigence Real-Time Cell Analyzer

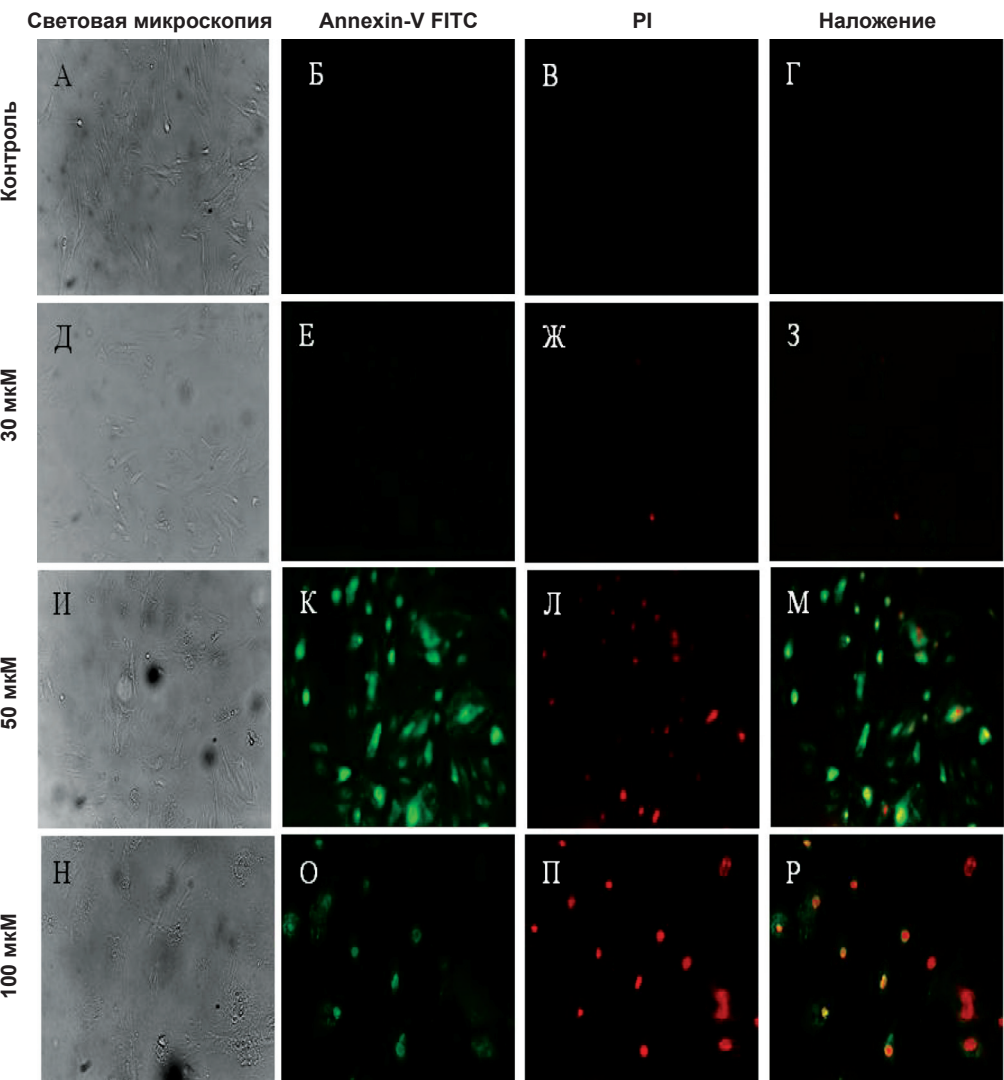


Рис. 2. Культуры порталных фибробластов, инкубированные с куркумином в различных концентрациях (30 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ); выявление клеток в состоянии апоптоза и некроза. AnnexinV-FITC – маркет апоптоза (зеленый); PI – маркер некроза (красный). Флуоресцентная микроскопия. Ув.×20

В результате обработки культуры клеток ПФ глиотоксином происходило изменение морфологии клеток – они округлялись, теряли межклеточные контакты, откреплялись от культурального пластика, подвергались некрозу и переходили в суспензию. Это связано с тем, что глиотоксин ингибирует экспрессию поверхностных маркёров, таких как VCAM, ICAM, Е-селектин, а также участвует в реорганизации цитоскелета (например, актина) [19].

Концентрация глиотоксина 0,05 мкМ в первые 24 ч практически не оказывала влияния на клетки. Клетки на короткий промежуток времени под-

вергались апоптозу (рис. 4, 5), а затем их рост восстанавливался и через 72 ч культивирования их клеточный индекс оказался выше контрольных клеток (рис. 3). При обработке культуры клеток ПФ глиотоксином в концентрации 0,1 мкМ клетки подвергались апоптозу и частично некрозу (рис. 4, 5), при этом в процессе дальнейшего культивирования роста клеточного индекса выживших клеток практически не наблюдалось (рис. 3). Таким образом, глиотоксин в концентрации 0,1 мкМ оказывает на клетки антипролиферативный эффект (рис. 3).

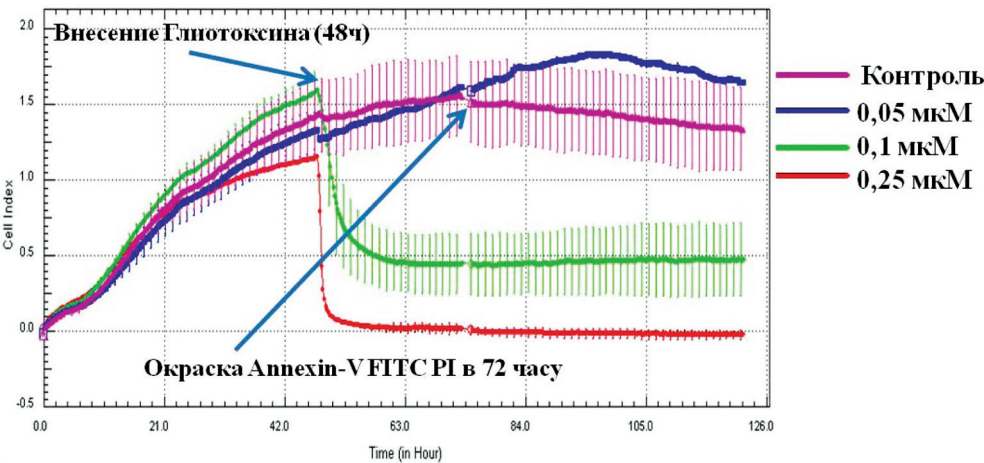


Рис. 3. Клеточный индекс (пролиферативная активность) порталных фибробластов при добавлении глиотоксина в различных концентрациях (0,05 мкМ; 0,1 мкМ; 0,25 мкМ). Технология микроразрешенных клеточных сенсоров, прибор xCELLigance Real-Time Cell Analyzer

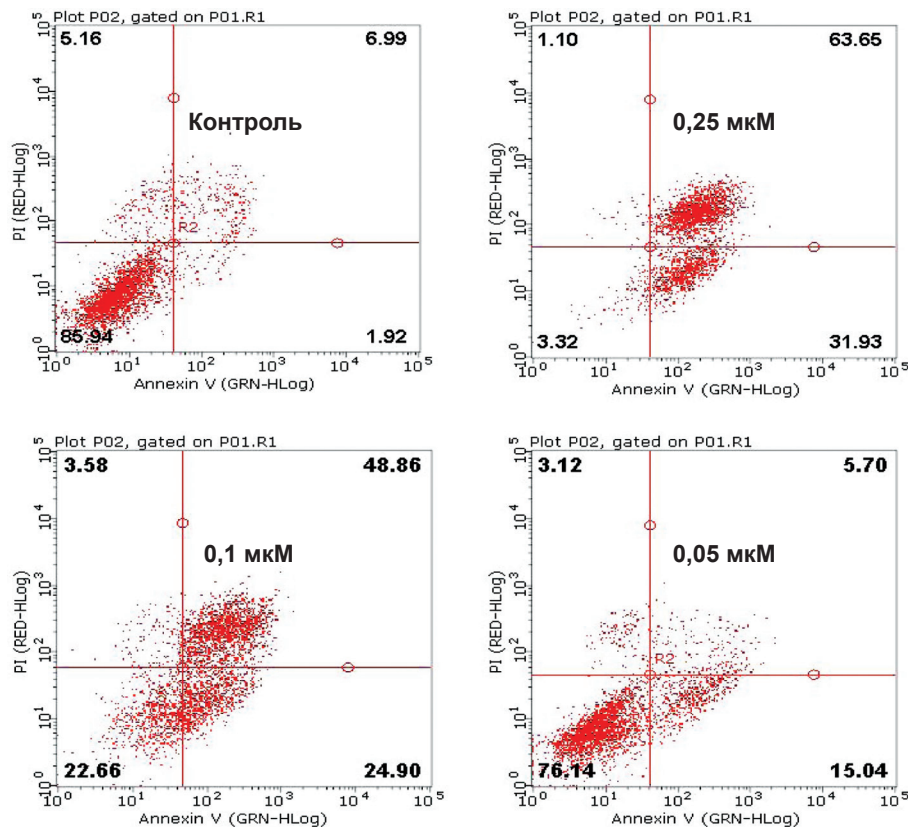


Рис. 4.
Количество порталых фибробластов в состоянии апоптоза и некроза под действием глиотоксина в различных концентрациях (0,05 мкМ, 0,1 мкМ и 0,25 мкМ). AnnexinV-FITC – маркер апоптоза; PI – маркер некроза. Проточная цитофлуориметрия

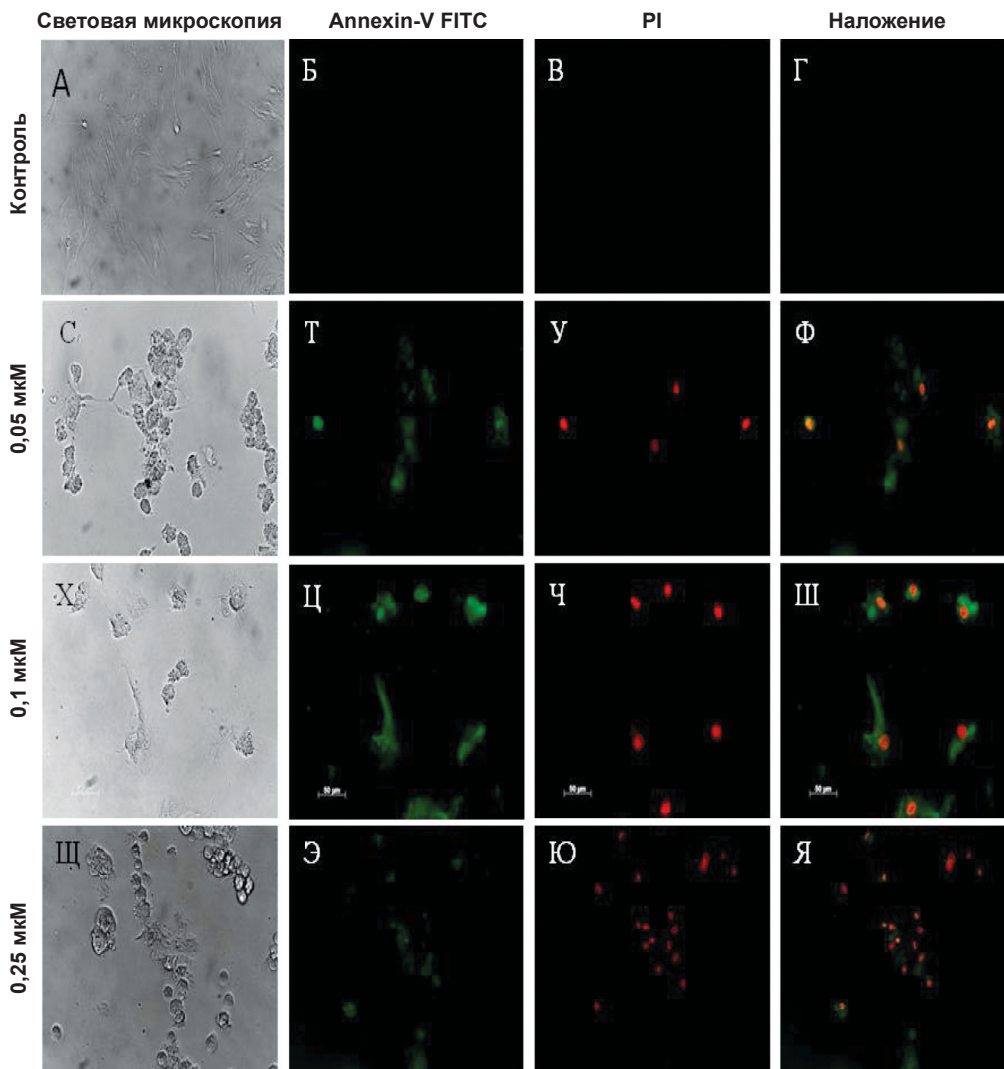


Рис. 5.
Культуры порталых фибробластов, инкубированные с глиотоксином в различных концентрациях (0,05 мкМ, 0,1 мкМ и 0,25 мкМ); выявление клеток в состоянии апоптоза и некроза. AnnexinV-FITC – маркер апоптоза (зеленый); PI – маркер некроза (красный). Флуоресцентная микроскопия. Ув. ×20

Концентрация 0,25 мкМ оказалась слишком токсичной и вызывала некроз исследуемых клеток (рис. 3–5).

По сравнению с куркумином глиотоксин оказывает более токсичное действие на ПФ. Так, при его добавлении в концентрации 0,25 мкМ 63,65% клеток погибали и 31,95% уходили в апоптоз, живыми оставались лишь 3,32% клеток (рис. 4). С уменьшением концентрации глиотоксина (0,1 мкМ) процент мертвых и апоптотических клеток снижался (49,86% и 24,90%, соответственно), и увеличивалось количество живых клеток — 22,66% (рис. 4). Наименьшая из выбранных концентраций глиотоксина (0,05 мкМ) не приводила к немедленной гибели клеток (8,82% некроза), однако апоптозу подвергалось 15,04% клеток, что почти в восемь раз превышает значение спонтанного апоптоза в контроле (1,92%). Количество живых клеток при этом составило 76,14% (рис. 4). Воздействие глиотоксина на культивируемые клетки также исследовали методом инвертированной флуоресцентной микроскопии после окрашивания с AnnexinV-FITC и PI (рис. 5).

Исходя из вышеизложенного следует, что концентрация глиотоксина 0,1 мкМ, не являясь высокотоксичной для клеток, снижает пролиферативную активность ПФ и может оказать значительный

эффект в терапии заболеваний печени, начинающихся в портальных трактах.

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 портальных миофибробластов. Полученные результаты расширяют современные знания о клетках, входящих в фиброгенные популяции печени, и открывают новые возможности для клинического применения биологически активных веществ (куркумина и глиотоксина) *in vivo* при лечении заболеваний печени.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров» и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Pari L., Tewas D., Eckel J. Role of curcumin in health and disease. Arch. Physiol. Biochem. 2008;114(2): 127-49.
2. Basnet P., Skalko-Basnet N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. Molecules 2011; 16(6): 4567-98.
3. Yao Q.Y., Xu B.L., Wang J.Y. et al. Inhibition by curcumin of multiple sites of the transforming growth factor-beta1 signalling pathway ameliorates the progression of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. BMC Complement Altern. Med. 2012; 12: 156.
4. Sharma R.A., Gescher A.J., Steward W.P. Curcumin: the story so far. Eur. J. Cancer. 2005; 41(13): 1955-68.
5. Lin Y.L., Lin C.Y., Chi C.W. et al. Study on antifibrotic effects of curcumin in rat hepatic stellate cells. Phytother. Res. 2009. 23(7): 927-32.
6. Baghdasaryan A., Claudel T., Kusters A. et al. Curcumin improves sclerosing cholangitis in Mdr2^{-/-} mice by inhibition of cholangiocyte inflammatory response and portal myofibroblast proliferation. Gut 2010; 59(4): 521-30.
7. Bisht K., Wagner K.H., Bulmer A.C. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. Toxicology 2010; 278(1): 88-100.
8. Elsharkawy A.M., Oakley F., Mann D.A. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. Apoptosis 2005; 10(5): 927-39.
9. Hur J.M., Yun H.J., Yang S.H. et al. Gliotoxin enhances radiotherapy via inhibition of radiation-induced GADD45a, p38, and NFκappaB activation. J. Cell Biochem. 2008; 104(6): 2174-84.
10. Fitzpatrick L.R., Wang J., Le T. Gliotoxin, an inhibitor of nuclear factor-kappa B, attenuates peptidoglycan-polysaccharide-induced colitis in rats. Inflamm. Bowel. Dis. 2002; 8(3): 159-67.

11. О. Миянович, А.А. Ризванов, А.П. Киясов. Анализ миофибробластов крысы, полученных из структур портальных трактов печени методом эксплантации. Клеточная трансплантология и клеточная инженерия 2013; 8(3): 119-24.
12. Guevara-Lopez U., Covarrubias-Gómez A., Gutierrez-Acar H. et al. Chronic subarachnoid administration of 1-(4chlorobenzoyl)-5methoxy-2methyl-1H-indole-3 acetic acid (indomethacin): an evaluation of its neurotoxic effects in an animal model. Anesth. Analg. 2006; 103(1): 99-102.
13. Aggarwal B.B. Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals. Annu. Rev. Nutr. 2010; 30: 173-99.
14. Venkatanarayana G., Sudhakara G., Sivajyothi P. et al. Protective effects of curcumin and vitamin E on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats. Excli. J. 2012; 11: 641-50.
15. Sahoo D.K., Roy A., Chaity G.B. Protective effects of vitamin E and curcumin on L-thyroxine-induced rat testicular oxidative stress. Chemico-Biol. Interact. 2008; 176(2-3): 121-8.
16. Chereddy K.K., Coco R., Memvanga P.B. et al. Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. J. Controll. Rel. 2013; 171(2): 208-15.
17. Awad A.S. Effect of combined treatment with curcumin and candesartan on ischemic brain damage in mice. J. Stroke Cerebrovasc. Dis. 2011; 20(6): 541-8.
18. Priya S., Sudhakaran P.R. Curcumin-induced recovery from hepatic injury involves induction of apoptosis of activated hepatic stellate cells. Indian J. Biochem. Biophys. 2008; 45(5): 317-25.
19. Oh I.Y., Yoon C.H., Hur J. et al. Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle. Blood 2007; 110(12): 3891-9.

Поступила: 15.08.2014