© Коллектив авторов, 2020
УДК 57.085.23
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15085>
ISSN – 2073-8137

ВЛИЯНИЕ D-АСПАРАГИНА НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

Ю. А. Сергеева¹, А. И. Трофименко², Т. В. Федоренко², И. В. Гилевич²,
Е. А. Коломийцева², А. Х. Каде¹

¹ Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница № 1 им. С. В. Очаповского, Краснодар, Российская Федерация

INFLUENCE OF D-ASPARAGINE ON THE PROLIFERATIVE ACTIVITY OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS

Sergeeva Yu. A.¹, Trofimenko A. I.², Fedorenko T. V.², Gilevich I. V.²,
Kolomiychova E. A.², Kade A. H.¹

¹ Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

² S. V. Ochapovsky Scientific-Research Institute – Regional Clinical Hospital № 1, Krasnodar, Russian Federation

Изучено влияние D-аспарагина на пролиферативную и метаболическую активность и на морфологию дермальных фибробластов человека. Показано, что D-аспарагин при воздействии в течение 2–6 часов в концентрации 0,013–0,13 г/л оказывает стимулирующее влияние на пролиферативную активность фибробластов человека, при 24–48-часовом воздействии отмечен обратный эффект. При этом антипролиферативное действие D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л сопряжено с выраженным изменением морфологии клеток. Использование тетразолиевых методов для оценки изменений метаболической активности клеток в случае D-аспарагина не было показательным. Таким образом, выявлена обратно-пропорциональная зависимость между временем воздействия D-аспарагина (2–48 часов) и выраженностью пролиферативной активности дермальных фибробластов человека.

Ключевые слова: D-аспарагин, дермальные фибробласты, пролиферативная активность, человек

The effect of D-asparagine at a concentration of 0.013–0.13 g/l on proliferative and metabolic activity, as well as the morphology of human dermal fibroblasts, was studied. It was shown that D-asparagine, when exposed for 2–6 hours at a concentration of 0.013–0.13 g/l, rendered a stimulating effect on the proliferative activity of human fibroblasts, and with a 24–48 hour exposure, the opposite influence was marked. Moreover, the antiproliferative effect of D-asparagine at a concentration of 0.13 g/l was associated with a substantial changes in cell morphology. Applying of tetrazolium methods for evaluation of changes in the metabolic activity of cells in the case of D-asparagine does not seem indicative. Thereby, the inverse-proportional relationship between the exposure time of D-asparagine (2–48 hours) and the proliferative activity of human dermal fibroblasts was shown.

Keywords: D-asparagine, dermal fibroblast, proliferative activity, human

Для цитирования: Сергеева Ю. А., Трофименко А. И., Федоренко Т. В., Гилевич И. В., Коломийцева Е. А., Каде А. Х. ВЛИЯНИЕ D-АСПАРАГИНА НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2020;15(3):360-363. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15085>

For citation: Sergeeva Yu. A., Trofimenko A. I., Fedorenko T. V., Gilevich I. V., Kolomiychova E. A., Kade A. H. INFLUENCE OF D-ASPARAGINE ON THE PROLIFERATIVE ACTIVITY OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS. *Medical News of North Caucasus*. 2020;15(3):360-363. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15085> (In Russ.)

Выявление антипролиферативного эффекта D-аспарагина (моноамид D-аспарагиновой кислоты) положило начало разработке новых противорубцовых препаратов на его основе [1, 2]. Этому способствовало изучение биологической роли D-аспарагиновой кислоты, которая является одним из важнейших нейротрансмиттеров, участвует в регуляции деятельности иммунной системы и оказывает влияние на секрецию мелатонина, пролактина, тестостерона, лютеинизиру-

ющего и соматотропного гормонов, присутствуя в коже и соединительной ткани человека [3, 4].

Найдены упоминания как об угнетающем влиянии D-аспарагиновой кислоты на пролиферативную активность опухолевых клеток, так и о стимуляции роста онкогенных клеток, в частности эпителия молочной железы человека (линия MCF-7) [5, 6].

Если рассматривать D-аспарагин в качестве основы для разработки препарата, способного ограничить разрастание рубцовой ткани, то исходно не-

обходимо выяснить особенности его влияния на рост фибробластов человека. Однако исследования, посвященные оценке влияния D-аспарагиновой кислоты и D-аспарагина на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека, в доступной нам литературе найти не удалось.

Цель исследования – изучить влияние D-аспарагина на пролиферативную и метаболическую активность, а также морфологию дермальных фибробластов человека.

Материал и методы. Исследование выполнено на культуре дермальных фибробластов человека. Первичная культура фибробластов выделена путем механической дезагрегации и последующей ферментативной обработки кожного лоскута площадью 10 см², забранного у взрослого донора по медицинским показаниям (после получения информированного согласия на забор и использование биоматериала). Культуральная часть работы проводилась в CO₂-инкубаторе (BINDER BF56) при 37 °C, 5 % CO₂ и 100 % влажности. Первичная культура дермальных фибробластов пассирована до 3-го пассажа, с использованием стандартной питательной среды, состоящей из раствора DMEM (Gibco), 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco) и 100 ед/мл антибиотика-антимикотика (Thermo Fisher Scientific).

На 3-м пассаже фибробласты засевались в 24-луночные и 96-луночные планшеты с плотностью посева 1500 кл/мл. Далее проводили культивирование клеток в течение 24 часов до их закрепления. Затем производили замену питательной среды на ту же, но с добавлением D-аспарагина (Sigma-Aldrich) в исследуемой концентрации 0,013 г/л (группы 1–4) и 0,13 г/л (группы 5–8). Культивирование фибробластов на питательной среде с D-аспарагином проводили в течение 2 (группа 1 и 5), 6 (группа 2 и 6), 24 (группа 3 и 7) и 48 часов (группа 4 и 8). После окончания времени воздействия проводили смену питательной среды на ту же, но без D-аспарагина и продолжали культивировать до достижения 72 часов с момента засева (в лунках с 48-часовым воздействием среды не проводили – группы 4–8). Контролем служили фибробласты, параллельно выращиваемые в течение 72 часов без добавления D-аспарагина.

После окончания 72-часового цикла культивирования проведены: определение пролиферативной активности, ХТТ-тест, цитологическое и иммуноцитохимическое исследование, а также кариотипирование.

Пролиферативную активность оценивали по среднему времени удвоения популяции фибробластов. Время рассчитывали по формуле $t = T / \log_2 (N/N_0)$, где t – среднее время удвоения популяции; T – время культивирования клеток; N – плотность клеточного монослоя после культивирования; N_0 – плотность посева; $\log_2 (N/N_0)$ – количество удвоений за время T .

Метаболическую активность клеток оценивали колориметрическим методом с использованием

соли тетразолия ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилид). Оптическую плотность в опытных лунках сравнивали с характеристикой контрольных образцов. Процент метаболически активных клеток в опытных образцах рассчитывали относительно контрольных образцов, приняв их за 100 %. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 450 нм на спектрофотометре SpectraMax 250 (Molecular Devices).

Для проведения кариотипирования и составления морфологической характеристики клеток их обрабатывали колхицином, а затем окрашивали азур-эозином (Минимед) по Романовскому – Гимзе.

Иммуноцитохимические исследования на виментин и Ki-67 проводили на цитологических микропрепаратах непрямым пероксидазным методом согласно протоколам производителя (ABCAM). Использовали следующие разведения первичных антител (Rabbit Anti-Ki67 antibody (ab833) 1:100; Mouse Anti-Vimentin antibody (ab8978) 1:100) и вторичных антител (Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (ab205719), 1:400; Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718), 1:200). Комплекс антиген-антитело визуализировали перекисью водорода и диаминобензидин тетрагидрохлоридом (ДАВ хромоген). Фотографии микропрепаратов выполнены с помощью микроскопа Микмед-5 («Ломо», Россия) и окулярной камеры Levenhuk M300 Base («Levenhuk», США).

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программного обеспечения «Statistica 13» («StatSoft Inc», США). Разница между значениями показателей ХТТ-теста выражалась в виде расчета процента по отношению к контролю, а остальных – в виде процентного изменения. Для оценки влияния проведенного вмешательства на пролиферативную активность фибробластов применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), при $F > F_{\text{крит}}$ с $p < 0,05$ отклоняли нулевую гипотезу об отсутствии эффекта.

Результаты и обсуждение. В ходе исследования выявлены существенные различия в скорости пролиферации клеток в зависимости от времени воздействия и используемой концентрации D-аспарагина (табл.).

Сравнительный анализ воздействия D-аспарагина в течение 2 часов, на среднее количество и время удвоения клеток опытных групп с контролем, показал следующие результаты. В группе 1 отмечено статистически значимое сокращение времени удвоения фибробластов на 17,22 % ($p < 0,0001$) и увеличение их среднего количества на 97,23 % ($p < 0,0001$), что свидетельствует об их крайне высокой пролиферативной активности. В группе 5 изменения были менее выраженными: время удвоения статистически значимо сократилось на 6,96 % ($p < 0,0001$) и их количество возросло на 27,28 % ($p < 0,05$) соответственно.

Таблица

Влияние времени воздействия D-аспарагина в разной концентрации на пролиферативную и метаболическую активность дермальных фибробластов человека по отношению к контролю

Время воздействия, час	D-аспарагин 0,013 г/л			D-аспарагин 0,13 г/л		
	Среднее количество клеток $\times 10^3$ /мл	Время удвоения популяции клеток (t)	ХТТ-тест, %	Среднее количество клеток $\times 10^3$ /мл	Время удвоения популяции клеток (t)	ХТТ-тест, %
2	212***	13,08***	95,03	140*	14,7***	124***
6	120**	15,4	92,2	128,3*	15,1	124***
24	81,7**	17,5***	105,5	108,3	15,9	136***
48	46,7**	21,67***	109	70**	18,4**	130***
Контроль	110	15,8	100	110	15,8	100

Примечание. Достоверность изменений показателей по отношению к контролю при: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,0001$.

После 6 часов воздействия D-аспарагина время удвоения клеток в группах 2 и 6 было сопоставимо с контрольной группой ($p > 0,05$), количество клеток было увеличено только на 9,1 % в группе 2 ($p < 0,01$) и 16,64 % в группе 6 ($p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют, что при инкубации в течение 2–6 часов, вне зависимости от концентрации D-аспарагина, отмечена тенденция к росту пролиферативной активности дермальных фибробластов человека (более выраженная при концентрации D-аспарагина 0,013 г/л).

При 24-часовой инкубации клеток с D-аспарагином в группе 3 наблюдалось увеличение времени удвоения их популяции на 9,71 % ($p < 0,0001$) и снижение количества фибробластов на 25,73 % ($p < 0,01$) по сравнению с контролем, что указывало на подавление пролиферации клеток. В группе 7 отсутствовали значимые изменения: время удвоения и количество фибробластов было сопоставимо с контролем ($p > 0,05$).

При 48-часовой инкубации клеток с D-аспарагином отмечено выраженное снижение пролиферативной активности клеток. В группе 4 время удвоения популяции клеток статистически значимо увеличилось на 37,15 %, а среднее количество клеток снизилось на 57,55 % ($p < 0,01$). В группе 8 количество клеток статистически значимо снизилось на 36,36 % ($p < 0,01$),

среднее время удвоения популяции клеток увеличилось на 16,46 % ($p < 0,01$) по сравнению с контролем.

По результатам ХТТ-теста метаболическая активность дермальных фибробластов человека, культивированных с 0,013 г/л D-аспарагином, во все изученные сроки достоверно не отличалась от контроля. Напротив, в группах с увеличенной нагрузкой D-аспарагином наблюдался заметный статистически значимый рост метаболической активности от 2 до 48 часов на 24–36 % ($p < 0,001$). Несоответствие между пролиферативной активностью и данными ХТТ-теста предположительно объясняется тем, что при росте времени экспозиции и концентрации D-аспарагина включается механизм окислительно-го дезаминирования D-аминокислот, что приводит к завышению результатов теста за счет активации FAD-зависимого пути образования формазана [7].

При цитологическом и иммуноцитохимическом исследовании фибробластов, подвергнутых инкубации в среде с 0,013 г/л D-аспарагина, выявлено, что клетки сохранили характерную для фибробластов морфологию (рис. А) и показывают высокий уровень экспрессии виментина. В группах 1–3 пролиферативный индекс, определенный по экспрессии маркера Ki-67, составил 70–90 %, а к 48 часам инкубации он снизился до 30 % по отношению к контролю.

Рис. Культура дермальных фибробластов человека, культивированных с D-аспарагином в концентрации 0,013 г/л в течение 2 (А) и в концентрации 0,13 г/л в течение 48 (В) часов. Окраска Романовского – Гимзы; иммуноцитохимическая окраска на виментин; иммуноцитохимическая окраска на Ki-67

При морфологической оценке образцов из групп 5–7, подвергнутых инкубации в среде с 0,13 г/л D-аспарагина, отмечено снижение позитивной реакции клеток с антителами к виментину до умеренной, на фоне сохранной экспрессии маркера Ki-67. Однако цитологическое исследование показало наличие множества реактивно измененных клеток (дистрофичные и полиморфные) с наличием атипичных митозов. В группе 8 наблюдалось выраженное нарушение функциональной активности клеток, что проявилось исчезновением у клеток иммуноцитохимической окраски на виментин, снижением полученного по Ki-67 индекса пролиферации до 30 %. Полученные в группе 8 данные свидетельствуют о развитии кле-

точной атипии фибробластов, что указывает на явное токсическое воздействие D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л и времени инкубации 48 часов (рис. В).

Экспериментальные данные о влиянии D-аспарагина на пролиферативную и метаболическую активность, а также морфологию дермальных фибробластов человека косвенно свидетельствуют о наличии нескольких механизмов, обуславливающих вызванные эффекты. Стимулирующее влияние D-аспарагина на пролиферативную активность клеток, по-видимому, обусловлено взаимодействием с NMDA-рецепторами на их поверхности [5]. В отношении антипролиферативного действия D-аспарагина обсуждается возможность нарушения аминокис-

лотно обмена, обусловленная ингибированием специфических трансаминаз [8]. Кроме того, важным механизмом антипролиферативного эффекта D-аспарагина предположительно является торможение белкового синтеза, обусловленное аминокислотированием тРНК [9]. D-аспарагат, накапливающийся в составе белков при длительной инкубации, может оказывать негативное влияние на их функциональную активность. Это подтверждается тем, что функционирование L-изоаспарата DL-аспарата O-метилтрансферазы (конвертирует D-аспарат в L-форму) является критичным для нормального деления и дифференцировки клеток [10].

Заключение. D-аспарагин при воздействии в течение 2–6 часов в концентрации 0,013–0,13 г/л оказывает стимулирующее влияние на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека. При 24–48-часовом воздействии имеет место обратный эффект. Антипролиферативное действие

D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л, особенно при времени инкубации 48 часов, сопряжено с выраженным изменением морфологии клеток. Это свидетельствует о его выраженном токсическом воздействии при данном режиме кондиционирования. Культуральные исследования на разных клеточных линиях с целью изучения характера и механизмов влияния D-аспарагина на пролиферативную активность клеток являются перспективным путем в разработке новых классов противорубцовых и противоопухолевых препаратов.

Информированное согласие: В работе соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, в редакции 2000); исследование выполнено согласно основным правилам к проведению клинических исследований и одобрено комитетом по этике.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Chitanava T., Egiev I., Chechelian V., Dzhopua M., Trofimenko A. [et al.]. The Influence of D-Asparagine on the Glial Cicatrix Formation in Experimental Spinal Stroke. *American Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2017;5(3):93-96. <https://doi.org/10.11648/j.ajcem.20170503.15>
2. Сергеева Ю. А., Каде А. Х., Гайворонская Т. В., Трофименко А. И., Басов А. А. [и др.]. Повышение эффективности липофилинга при лечении экспериментальных рубцов кожи с помощью D-аспарагина. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2019;9(3):41-47. [Sergeeva Yu. A., Kade A. Kh., Gaivoronskaya T. V., Trofimenko A. I., Basov A. A. [et al.]. Improvement of lipofilling efficacy in treatment of experimental dermal scars by using D-asparagine. *Krymsky zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny. – Crimea Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2019;9(3):41-47. (In Russ.)].
3. D'aniello A. D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain research reviews*. 2007;53(2):215-234. <https://doi.org/10.3390/nu11092205>
4. de Rosa V., Secondo A., Pannaccione A., Ciccone R., Formisano L. [et al.]. D-Aspartate treatment attenuates myelin damage and stimulates myelin repair. *EMBO Molecular Medicine*. 2019;11(1):e9278. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809278>
5. Genchi G. An overview on D-amino acids. *Amino Acids*. 2017;49(9):1521-1533. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2459-5>
6. Du S., Wang Y., Alatrash N., Weatherly C.A., Roy D. [et al.]. Altered profiles and metabolism of l- and d-amino acids in cultured human breast cancer cells vs. non-tumorigenic human breast epithelial cells. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2019;164:421-429. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.10.047>
7. Sacchi S., Cappelletti P., Murtas G. Biochemical Properties of Human d-amino Acid Oxidase Variants and Their Potential Significance in Pathologies. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2018;5:55. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00055>
8. D'Aniello A., D'Onofrio G., Pischetola M., D'Aniello G., Vetere A. [et al.]. Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. Effects of D-amino acids. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(36):26941-26949.
9. Fujino T., Goto Y., Suga H., Murakami H. Reevaluation of the D-amino acid compatibility with the elongation event in translation. *Journal of the American Chemical Society*. 2013;135(5):1830-1837. <https://doi.org/10.1021/ja309570x>
10. Yamashita M., Ogasawara M., Kawasaki Y., Niisato M., Saito H. [et al.]. Deficiency of protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyl-transferase expression under endoplasmic reticulum stress promotes epithelial mesenchymal transition in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2018;9(17):13287-13300. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24324>

Сведения об авторах:

Сергеева Юлия Анатольевна, аспирант;
тел.: 89180293415; e-mail: doctor-sergeeva@mail.ru

Трофименко Артем Иванович, кандидат медицинских наук,
научный сотрудник научно-организационного отдела;
тел.: 89182531100; e-mail: artentrofimenko@mail.ru

Федоренко Татьяна Владимировна, кандидат медицинских наук, биолог лаборатории;
тел.: 89183877909; e-mail: fedorenko.tv@mail.ru

Гилевич Ирина Валериевна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией;
тел.: 89183227556; e-mail: giliv@list.ru

Коломийцева Елена Анатольевна, биолог лаборатории;
тел.: 89883601532; e-mail: kmc78@mail.ru

Каде Азамат Халидович, доктор медицинских наук,
профессор, заведующий кафедрой общей и клинической патологической физиологии;
тел.: 89882420477; e-mail: akh_kade@mail.ru