

Тест-система для оценки активности ингибиторов GSK-3 в качестве антигипоксантов и индукторов дифференцировки эндотелиальных предшественников *in vitro*

Ю. Е. Бурда¹, С. В. Надеждин¹, Е. В. Зубарева¹, М. В. Покровский¹,
С. Ю. Бурда², М. С. Ширина¹

¹ Национальный исследовательский университет «Белгородский государственный университет», 308005, Белгород, Россия

² Курский государственный медицинский университет, 305031, Курск, Россия

Статья поступила 28.01.2016 г. Принята к печати 09.02.2016 г.

Резюме: Описаны этапы разработки модельной тест-системы для проверки *in vitro* антигипоксической и эндотелиально-дифференцировочной активности вновь создаваемых ингибиторов киназы гликогенсинтазы-3 — потенциальных регуляторов клеточной активности. В качестве референтного препарата выбран β4-тимозин, обладающий противоишемическим и ангиогенным действием. Предложенная экспериментальная клеточная модель может быть использована в предварительном тестировании новых химических соединений в плане их лекарственного потенциала при ишемических расстройствах и быть альтернативой методикам с использованием лабораторных животных.

Ключевые слова: киназа гликогенсинтазы-3; GSK-3; β4-тимозин; гипоксия; ишемия; эндотелий.

Библиографическое описание: Бурда ЮЕ, Надеждин СВ, Зубарева ЕВ, Покровский МВ, Бурда СЮ, Ширина МС. Тест-система для оценки активности ингибиторов GSK-3 в качестве антигипоксантов и индукторов дифференцировки эндотелиальных предшественников *in vitro*. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2016; (1): 29–32.

Киназа гликогенсинтазы-3 (Glycogen synthase kinase 3, GSK-3) является тирозинкиназой, принимающей участие во многих центральных путях передачи сигналов в клетку, включая пролиферацию, миграцию и апоптоз. Фосфорилирование белков с ее участием обычно ингибирует активность последующих звеньев в цепочке передачи сигнала. Ингибиторы активности GSK-3 являются многообещающими претендентами на роль лекарств при многих заболеваниях, в том числе в качестве стимуляторов репарации тканей и неопластогенеза, индукторов миелопоэза и в ряде иных направлений [1, 2].

Одной из задач при разработке новых лекарственных препаратов является проведение скрининга биологической активности синтезируемых молекул-претендентов. В настоящее время большая часть экспериментальных и доклинических исследований в России проводится с использованием лабораторных животных, что не является, на наш взгляд, оптимальным решением. На уровне организма сложно выявить и контролировать все химические и биологические процессы, происходящие с лекарственным препаратом, в том числе в силу неизвестных на начальном этапе фармакокинетических особенностей нового химического соединения, неточного соответствия между активностью вещества у животного и у человека. Также существуют вопросы об этичности использования живых моделей и об отсутствии модельных животных для некоторых состояний и болезней. В связи с этим фармакологами и фармпроизводителями на начальных этапах разработки и тестирования новых лекарственных препаратов все активнее используются клеточные культуры [9]. Указанный подход лишен описанных для животных недостатков, при этом широчайший выбор стандартизированных и первичных клеточных линий позволяет разработать адекватную модель практически для любого по-

тенсиального лекарства и проведения скрининга биологической активности синтезируемых молекул-претендентов.

Настоящая работа посвящена разработке модельной клеточной тест-системы для проверки биологической активности новых ингибиторов GSK-3 в опытах *in vitro*. Для любой модели необходимо использование некоего контрольного вещества, обладающего известной активностью, для проведения сравнительного исследования новых молекул. Для ингибиторов GSK-3 нами был выбран β4-тимозин, изученный в спортивной фармакологии и в некоторых других областях медицины [3–5] и доступный в качестве готовой субстанции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эндотелиальные предшественники получали из костного мозга 10 крыс Wistar возраста 3–4 недели, умерщвленных декапитацией под эфирным наркозом, по модифицированному методу Nana Y. и соавт. [7]. Костный мозг вымывали с помощью шприца фосфатно-солевым буфером (ФСБ, pH=7,4; Панэко #P074) из диафизов и механически измельченных эпифизов трубчатых костей конечностей. Для очистки от фрагментов костной, мышечной и соединительной ткани вымытый костный мозг фильтровали через нейлоновые фильтры (SPL LifeSciences #93100) с диаметром пор 100 мкм.

Профильтрованную суспензию клеток в ФСБ аккуратно переносили на раствор фиколла-урографина с $\rho = 1,077$ (Панэко #P052) и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре. Мононуклеарную фракцию в виде кольца на поверхности фиколла-урографина аккуратно собирали и переносили в новые центрифужные пробирки (SPL LifeSciences #51115), ресуспендировали в ФСБ и

центрифугировали при 1500 об/мин 10 мин при комнатной температуре. Надосады отсасывали, а осевшие клетки еще раз ресуспендировали в ФСБ и вновь центрифугировали в том же режиме, после чего надосадоочную жидкость удаляли. Клеточный осадок ресуспендировали в полной питательной среде, содержащей среду 199 (Панэко #C210п), 15% сыворотки эмбрионов коров (HyClone #K052/SV30160.03), 10 нг/мл FGFb (Панэко #ФР07010) и 20 нг/мл VEGF (Sigma #V4512), и рассевали на 24-луночный планшет (Corning Costar #3524) из расчета 100 тыс. клеток на лунку. Инкубировали во влажной атмосфере 5% CO₂ при 37 °С.

Через 2 суток не прикрепившиеся к дну лунок клетки удаляли, а к прикрепившимся добавляли новую полную питательную среду. В дальнейшем каждые 3 дня половину среды удаляли и вносили равный объем свежей полной среды в каждую лунку.

Через 11 дней супернатант с клеток полностью удаляли и вносили свежую полную питательную среду, к части клеток — с добавлением β4-тимозина (LCN Bio-Chemicals Limited) в концентрации 2 мкг/мл. Клетки инкубировали в течение 3-х суток во влажной атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. Ишемию клеток моделировали путем прекращения доступа кислорода к клеткам за счет образования масляной пленки на поверхности питательной среды в лунках планшета, с использованием индифферентного для клеток минерального масла (Sigma #M5310). Длительность гипоксии — 2, 4, 6 и 8 ч. Кроме того, часть клеток подвергали дополнительно «голоданию», заменив среду на ФСБ.

Для оценки общего числа клеток производили подсчет клеток в 5 смежных полях зрения в каждой лунке планшета с использованием хоффмановского контрастирования при помощи флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti-S (Nikon). Методом флуоресцентной микроскопии оценивали число жизнеспособных клеток с использованием флуорохромов: кальцеина — АМ (Sigma #17783) и этидиума бромид (Sigma #E7637) в тех же полях зрения. Принадлежность к эндотелиальным предшественникам оценивали по мембранной экспрессии специфического маркера Flk1/VEGFR1 с окраской методом двойных антител (SantaCruz #sc-505 и #sc-2012) флуоресцентным методом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая интерес к противоишемическому и ангиогенному действию ингибиторов GSK-3, была изучена способность β4-тимозина влиять на данные параметры в нашей модели.

При оценке динамики общего числа клеток в лунках планшета в условиях гипоксии (рис. 1) обнаружено протективное действие β4-тимозина на клетки, которое сохраняется на протяжении всего периода гипоксии — даже на 6 и 8 ч гипоксии в опытных лунках с питательной средой и β4-тимозином сохранялось $22,9 \pm 2,7$ и $20,2 \pm 2,0$ клеток соответственно в 5 полях зрения (здесь и далее приведены $M \pm tm$, $n = 10$), в то время, как в контроле их количество продолжало прогрессивно снижаться до $1,9 \pm 1,2$ и $0,9 \pm 0,6$ клеток в эти периоды времени. Различия между контролем и средой с β4-тимозином носили достоверный характер ($p < 0,05$). В условиях гипоксии и «голодания» уже вначале эксперимента отмечено резкое снижение числа клеток — с $54,4 \pm 2,6$ до

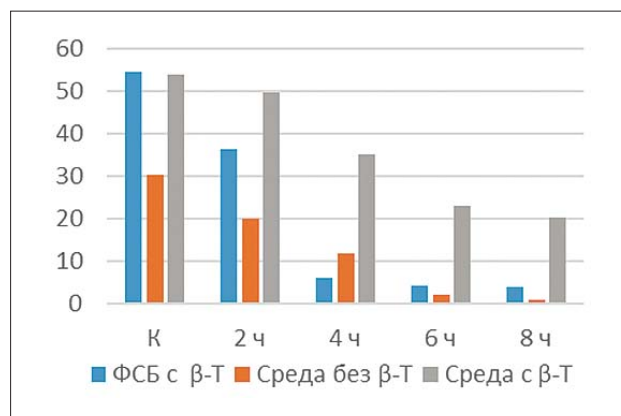


Рис. 1. Абсолютное число клеток в 5 полях зрения

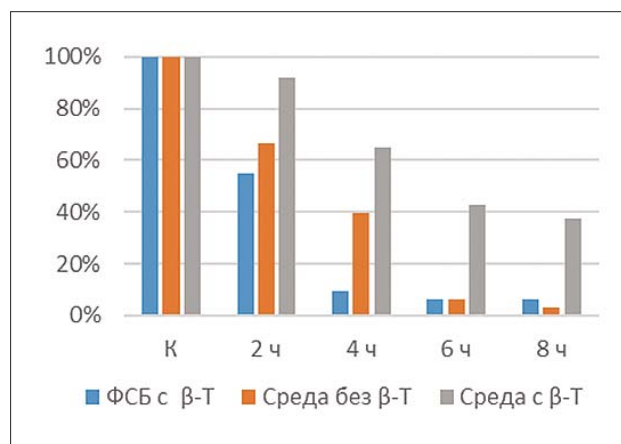


Рис. 2. Процентная динамика числа клеток в 5 полях зрения

$36,2 \pm 1,9$ через 2 ч и до $6,0 \pm 0,7$ клеток через 4 ч, превосходящее контрольные показатели, где количество клеток снижалось с меньшей скоростью — с $30,1 \pm 1,3$ до $20,0 \pm 1,0$ через 2 ч и до $11,8 \pm 1,0$ через 4 ч.

Динамика гибели клеток в лунках относительно их исходного числа отражена на рис. 2.

Исходя из представленных графиков, нельзя исключить некоторый протективный эффект β4-тимозина, проявляющийся при длительном пребывании клеток в условиях гипоксии и «голодания», т.к., несмотря на резкое снижение числа клеток в первые часы комбинированной ишемии, на поздних этапах исследования в лунках с ФСБ сохранилось больше клеток, чем в контроле ($4,1 \pm 0,9$ клетки через 6 ч и $3,9 \pm 0,6$ клеток через 8 ч против $1,9 \pm 1,2$ и $0,9 \pm 0,6$ клеток соответственно — в контроле).

Таблица 1

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК (Flk-1⁺) В КУЛЬТУРЕ КОСТНОМЗГОВЫХ МСК

	Без β4-тимозина	С β4-тимозином
Всего клеток ($M \pm tm$)	$20,8 \pm 1,3$	$51,0 \pm 2,4^*$
Flk-1 ⁺ клеток ($M \pm tm$)	$10,5 \pm 1,1$	$42,2 \pm 2,1^*$
% Flk-1 ⁺ клеток	$50,6 \pm 4,7$	$82,8 \pm 2,2^*$

* — $p < 0,05$

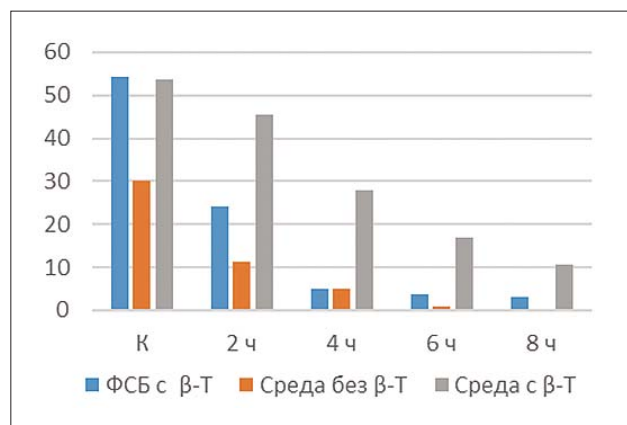


Рис. 3. Абсолютное число живых клеток в 5 полях зрения

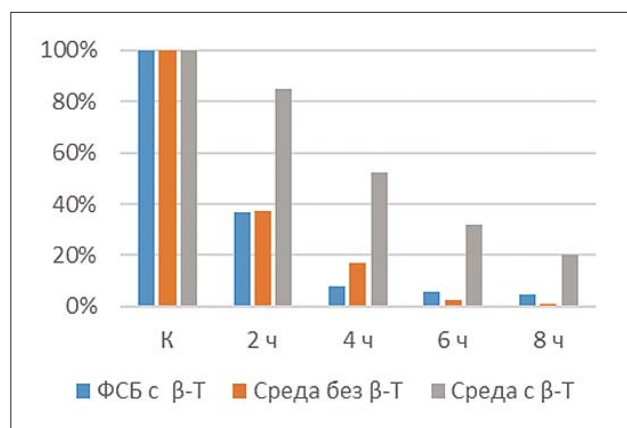


Рис. 4. Процентная динамика числа живых клеток в 5 полях зрения

Более выраженный протективный эффект β4-тимозина на выживаемость клеток в условиях гипоксии и сочетания гипоксии с «голоданием» виден на рисунках 3 и 4, где число и доля живых клеток в контроле значительно ниже, чем в опытных образцах.

По данным литературы известно, что β4-тимозин предотвращает апоптоз эндотелиальных прогениторных клеток в культуре [5]. Этой его способностью, по-видимому, и объясняется большая доля живых клеток в опытных образцах по сравнению с контролем. Но в исследовании обнаружено, что исходное количество клеток в лунках, где культивирование проводилось в течение 3-х суток в присутствии β4-тимозина, выше, чем в лунках без его присутствия (столбцы К на рис. 1). Насколько данный феномен обусловлен антиапоптогенным эффектом β4-тимозина и не обладает ли последний свойством стимулировать пролиферацию клеток, эксперимент ответа не дает, т.к. изучение данных механизмов не проводили. В литературе есть сведения как о стимулирующем, так и ингибирующем влиянии β4-тимозина на пролиферативную активность клеток через реализацию Wnt и инсулинового путей передачи сигналов [1].

ОБ АВТОРАХ

Национальный исследовательский университет «Белгородский государственный университет». Российская Федерация, 308005, Белгород, ул. Победы, 85.

Бурда Юрий Евгеньевич. Доцент кафедры фармакологии медицинского института, канд. мед. наук.

Надеждин Сергей Викторович. Руководитель ОПУ «Клеточные и вспомогательные репродуктивные технологии», канд. биол. наук, доц.

Следующим этапом эксперимента стало изучение эндотелиальной дифференцировки адгезирующей фракции костномозговых мононуклеаров, для чего был произведен подсчет числа клеток, экспрессирующих маркер эндотелиальных прогениторных клеток — ранних предшественников эндотелиоцитов — Flk-1 (VEGFR), представляющий собой рецептор сосудисто-эндотелиального фактора роста. Представленные в таблице 1 результаты показывают, что присутствие β4-тимозина не просто увеличивает общее число клеток, но и заметно повышает процент клеток, экспрессирующий указанный маркер эндотелиальных предшественников — $50,6 \pm 4,7\%$ Flk⁺ клеток в контроле и $82,8 \pm 2,2\%$ — при культивировании в течение 3-х суток с β4-тимозином.

Наряду с показанными другими исследователями кардиопротективными свойствами ингибиторов GSK-3β [6, 8], способность стимулировать дифференцировку МСК в эндотелиальном направлении делает еще более перспективным их изучение в плане профилактики и лечения ишемической болезни сердца и облитерирующих заболеваний артерий.

Таким образом, полученные в эксперименте данные согласуются с результатами других исследователей, занимающихся изучением биологической активности ингибиторов GSK-3 и, в частности, β-тимозина. Последний в дальнейшем может служить референс-агентом в сравнительных исследованиях. Поэтому предложенная экспериментальная клеточная модель может быть с успехом использована в предварительном тестировании новых химических соединений в плане их лекарственного потенциала при ишемических расстройствах без использования лабораторных животных на ранних этапах исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- Осолодкин ДИ. Молекулярный дизайн потенциальных ингибиторов киназы гликогенинсинтазы 3: дис. ... канд. хим. наук. М.; 2011.
- Шаманская ТВ, Осипова ЕЮ, Румянцев СА. Ex vivo экспансия гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови (обзор литературы). Онкогематология 2012; (1): 35–44.
- Xu TJ, et al. A novel dimeric thymosin beta 4 with enhanced activities accelerates the rate of wound healing. Drug Design, Development and Therapy 2013; 7: 1075–88.
- Chang Z-T, et al. Application of peripheral-blood-derived endothelial progenitor cell for treating ischemia-reperfusion injury and infarction: a preclinical study in rat models. Journal of Cardiothoracic Surgery 2013; 8: 33–43.
- Yanbo Z, β4 activates integrin-linked kinase and decreases endothelial progenitor cells apoptosis under serum deprivation. Journal of Cellular Physiology 2011; 226: 2798–2806.
- Hinkel R, et al. Thymosin β4 Is an Essential Paracrine Factor of Embryonic Endothelial Progenitor Cell-Mediated Cardioprotection. Circulation 2008; 117: 2232–40.
- Nana Y. The characteristics of endothelial progenitor cells derived from mononuclear cells of rat bone marrow in different culture conditions. Cytotechnology 2011; 63: 217–26.
- Miura T, Nishihara M, Miki T. Drug Development Targeting the Glycogen Synthase Kinase-3β (GSK-3β)-Mediated Signal Transduction Pathway: Role of GSK-3β in Myocardial Protection Against Ischemia/Reperfusion Injury. J Pharmacol Sci. 2009; 109: 162–67.
- Marx U, Sandig V, eds. Drug Testing In Vitro. WILEY-VCH; 2007.

Зубарева Екатерина Владимировна. Научный сотрудник ОПУ «Клеточные и вспомогательные репродуктивные технологии», канд. биол. наук.
 Покровский Михаил Владимирович. Заведующий кафедрой фармакологии медицинского института, д-р мед. наук, проф.
 Ширина Мария Сергеевна. Студентка биолого-химического направления.

Курский государственный медицинский университет. Российская Федерация, 305000, Курск, ул. К. Маркса, 3.
 Бурда Светлана Юрьевна. Студентка лечебного факультета.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Бурда Юрий Евгеньевич, burda@bsu.edu.ru

TEST-SYSTEM FOR THE ASSESSMENT OF GSK-3 INHIBITORS ACTIVITY AS ANTIHYPOXANTS AND ENDOTHELIAL DIFFERENTIATION STIMULATORS *IN VITRO*

Yu. E. Burda¹, S. V. Nadezhdin¹, E. V. Zubareva¹, M. V. Pokrovsky¹, S. Yu. Burda², M. S. Shirina¹

¹ Belgorod State National Research University, 308015, Belgorod, Russia

² Kursk State Medical University, 305031, Kursk, Russia

Abstract: The present article describes the stages of the development of the test-system that allows to research the potency of GSK-3 inhibitors to induce endothelial progenitor differentiation and to increase cell survival in hypoxia *in vitro*. β 4-thymosin, which shows anti-ischemic and angiogenic activity, has been used as a reference preparation. The proposed experimental cell model can be useful in the preliminary testing of new chemical compounds in terms of their ability to treat ischemic disorders and it can be used as an alternative for procedures involving animal testing.

Key words: Glycogen synthase kinase 3; GSK-3; β 4-thymosin; hypoxia; ischemia; endothelium.

For citation: Burda YuE, Nadezhdin SV, Zubareva EV, Pokrovsky MV, Burda SYu, Shirina MS. Test-system for the assessment of GSK-3 inhibitors activity as antihypoxants and endothelial differentiation stimulators *in vitro*. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin 2016; (1): 29–32.

REFERENCES

- Osolodkin DI. Molecular design of potential glycogen synthase kinase 3 inhibitors: Dr. Chem. Sci [dissertation]. Moscow; 2011 (in Russian).
- Shamanskaya TV, Osipova EYu, Rumyantsev SA. Ex vivo expansion of cord blood-derived hemopoietic stem cells (review). *Onkologematologiya* 2012; (1): 35–44 (in Russian).
- Xu TJ, et al. A novel dimeric thymosin beta 4 with enhanced activities accelerates the rate of wound healing. *Drug Design, Development and Therapy* 2013; 7: 1075–88.
- Chang Z-T, et al. Application of peripheral-blood-derived endothelial progenitor cell for treating ischemia-reperfusion injury and infarction: a preclinical study in rat models. *Journal of Cardiothoracic Surgery* 2013; 8: 33–43.
- Yanbo Z, et al. Thymosin β 4 activates integrin-linked kinase and decreases endothelial progenitor cells apoptosis under serum deprivation. *Journal of Cellular Physiology* 2011; 226: 2798–2806.
- Hinkel R, et al. Thymosin β 4 Is an Essential Paracrine Factor of Embryonic Endothelial Progenitor Cell-Mediated Cardioprotection. *Circulation* 2008; 117: 2232–40.
- Nana Y. The characteristics of endothelial progenitor cells derived from mononuclear cells of rat bone marrow in different culture conditions. *Cytotechnology* 2011; 63: 217–26.
- Miura T, Nishihara M, Miki T. Drug Development Targeting the Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β)-Mediated Signal Transduction Pathway: Role of GSK-3 β in Myocardial Protection Against Ischemia/Reperfusion Injury. *J Pharmacol Sci.* 2009; 109: 162–67.
- Marx U, Sandig V, eds. *Drug Testing In Vitro*. WILEY-VCH; 2007.

AUTHORS

Belgorod State National Research University, Pobedy street, 85, Belgorod, 308015, Russian Federation.

Burda YuE. Associate professor of the Pharmacology Department. Candidate of Medical Sciences.

Nadezhdin SV. Head of the Experimental-Industrial Department «Cellular and Assisted Reproductive Technologies». Candidate of Biological Sciences.

Zubareva EV. Experimental-Industrial Department «Cellular and Assisted Reproductive Technologies», Scientific associate. Candidate of Biological Sciences.

Pokrovsky MV. Head of the Pharmacology Department. Doctor of Medical Sciences, professor.

Shirina MS. Student.

Kursk State Medical University, K. Marx street, 3, Kursk, 305000, Russian Federation.

Burda Svetlana. Student.