

Корисна модель належить до наукових досліджень у галузі імунофізіології і може бути використана у дослідках для вивчення клітинних і молекулярних механізмів регульованої клітинної загибелі в умовах моделювання окисного стресу *in vitro*.

Регульована загибель клітин є життєво важливим фізіологічним процесом. Клітинна загибель відіграє важливу роль у розвитку, гомеостазі тканин, запаленні, імунитеті та багатьох патофізіологічних станах, вона може виникнути внаслідок порушень внутрішньоклітинного або позаклітинного мікрооточення, зокрема через вплив активних форм кисню (АФК) і пошкодження ДНК. Показано, що ключовою ланкою в ланцюзі патофізіологічних порушень є розвиток окисного стресу [1; 2]. Відомо, що такі невідворотні побічні продукти метаболізму як активні форми кисню, постійно генеруються в клітинах, в основному електронно транспортним ланцюгом мітохондрій. Якщо такі реактивні хімічні речовини ефективно не нейтралізуються, можуть виникати окисдаційні ушкодження біомолекул [3]. Так, окисний стрес, який генерується дисфункцією мітохондрій, вважається, сьогодні, однією з основних причин порушень в регульованій загибелі клітин [4;5].

Аутофагія - вид клітинної загибелі, при якому відбувається деградація органел і цитоплазматичного матеріалу клітини, що здійснюється за участю внутрішньоклітинних мембранних структур, через активацію аутофагосом і активного функціонування лізосом. Причиною запуску аутофагічної загибелі клітин, як вважають, можуть бути різного виду клітинні "стреси", такі як: пошкодження ДНК, цитозольні перевантаження кальцієм, іонізуюче випромінювання, дія АФК тощо. Є дані, що АФК виступають регуляторами активації аутофагії.

Апоптоз відіграє важливу роль за фізіологічних умов, тому втручання в цей процес може призвести до негативних наслідків. Необхідно вирішувати питання доцільності пригнічення апоптозу в конкретній ситуації. Важливо вивчати загибель імунокомпетентних клітин та клітин кишечника, оскільки як недостатній, так і надмірний рівень апоптозу клітин може бути патологічним чинником. Апоптотична загибель клітин відбувається за ретельно регульованою програмою, без втрати цілості плазматичної мембрани клітин і стимуляції запальних та імунних процесів внаслідок виходу клітинного вмісту в оточуючу тканину.

Другий основний шлях загибелі клітин - некротичний - пов'язаний з втратою цілості плазматичної мембрани клітин, що призводить до стимуляції запальних та імунних процесів внаслідок виходу клітинного вмісту в оточуюче середовище.

Окисне пошкодження та пов'язана з ним мітохондріальна дисфункція можуть призвести до виснаження енергії, накопичення цитотоксичних медіаторів і загибелі клітин. Тому розуміння взаємодії адаптації до стресу та загибелі клітин є важливим для розуміння окисно-відновної біології та патогенезу загибелі.

У даній роботі використовували модельні умови, що імітують наслідки окисного стресу на клітини тимуса, лімфатичних вузлів та ентероцитів клубового відділу кишечника для вивчення регульованої клітинної загибелі (апоптоз, некроз, аутофагія).

Аналогом корисної моделі є спосіб імітації наслідків окисного стресу *in vitro*. Даний спосіб полягає у застосуванні розчину пероксиду водню (H_2O_2) в середовищі культивування, як джерела активних форм кисню, що відповідає окисному стресу для клітин при запальному процесі [6]. Цей спосіб має низку обмежень, наприклад є привертання уваги до того факту, що пряме застосування H_2O_2 до клітин призводить до утворення кисню (O_2) завдяки присутності каталази. Запропонована корисна модель дає можливість дослідити внутрішньоклітинне пошкодження, яке викликано слабким, середнім та сильним окисним стресом *in vitro*.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб імітації наслідків порушення регульованої загибелі клітин тимуса, лімфатичних вузлів та ентероцитів клубового відділу кишечника за умов окисного стресу *in vitro*. Технічним результатом корисної моделі, що запропонована, є отримання даних про різні шляхи загибелі клітин апоптоз, аутофагія та некроз в результаті застосування різних концентрацій розчину пероксиду водню 50; 250; 500 мкМ в середовищі культивування клітин тимуса, лімфатичних вузлів та ентероцитів клубового відділу кишечника.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб моделювання порушення регульованої загибелі клітин тимуса, лімфатичних вузлів та ентероцитів клубового відділу кишечника мишей лінії Albino, що ґрунтується на застосуванні розчину пероксиду водню в середовищі культивування клітин, згідно з корисною моделлю, в середовище культивування клітин вводять концентрації розчину пероксиду водню 50, 250 та 500 мкМ, після чого проводять оцінку шляхів регульованої загибелі клітин тимуса, лімфатичних вузлів та ентероцитів клубового відділу кишечника.

Приклад.

Дослідження проводили на клітинах пахових лімфатичних вузлів, клітинах тимуса та клітинах клубового відділу кишечника статевозрілих самок мишей лінії Albino. Відповідно до мети дослідження було сформовано план експерименту що включав наступні етапи: виділення клітин тимуса, лімфовузлів та ентероцитів клубового відділу кишечника, стандартизація зразків клітинних суспензій, культивування зразків в експериментальних умовах, оцінка співвідношення живих, некротичних, апоптотичних та аутофагічних клітин за умов окисного стресу *in vitro*.

Отримання клітин тимуса та лімфовузлів. Клітинну суспензію отримували шляхом механічного подрібнення та вимивання клітин в охолоджену фізіологічну розчині рН 7,4. Після виділення клітин проводили оцінку життєздатності методом включення прижиттєвого барвника - трипанового синього (0,2 % розчин трипанового синього (Trypan blue, Sigma-Aldrich, USA) у PBS (рН=7,4)). Підрахунок кількості життєздатних клітин проводили в камері Горяєва. Клітини культивували в кількості 1×10^5 на 100 мкл середовища. Культивування клітин проводили в поживному середовищі RPMI 1640 (RPMI 1640, Sigma, USA) протягом 30 хв за температури 37 °С (контроль), для моделювання окисного стресу *in vitro*, в середовище культивування додавали розчин пероксиду водню протягом 30 хв за температури 37 °С.

Виділення ентероцитів. Відпрепарували клубовий відділ тонкого кишечника миші, промивали крижаним розчином із фосфатним буфером Дульбекко (DPBS). Отриманий матеріал розрізали вздовж і поперек на маленькі шматочки 0,5-1 см. Механічно виділяли під світловим мікроскопом суспензію клітин, пропускали через нейлонову сітку, відмивали за допомогою центрифугування (1200-1500 обертів/за хвилину) при температурі від 0 °С до +4 °С. Після третього центрифугування та промивання холодним розчином DPBS клітини перевіряли на життєздатність - шляхом фарбування трипанового синього. Для вивчення морфології клітин користувалися методом фарбування клітин кристал-фіолетом.

Метод подвійного прижиттєвого забарвлення клітин здійснювали з використанням флюорисцентних барвників нуклеїнових кислот Хехст 33342 та йодиду прониїдиму. Клітини інкубували в темряві у термостаті при t 37 °С протягом 10 хв в присутності ядерних барвників пропідію йодиду (Propidium iodide, Sigma-Aldrich, США) та Хехст 33342 (НОЕСІІST 33342, Sigma-Aldrich, США). Забарвлені клітини відмивали в PBS, ресуспендували і робили мазки на предметних скельцях. Зв'язані з хроматином барвники дають змогу оцінити морфологічні особливості ядерного матеріалу, притаманні апоптозу: виражену конденсацію хроматину та його периферичне розташування, ущільнення та фрагментацію ядер. Хехст 33342 може проникати в клітини через неушкоджені мембрани (забарвлюючи їх ядра в зелений колір), тоді як пропідію йодид проникає тільки в клітини з ушкодженими мембранами й забарвлює їх в червоний колір, що (за умов відсутності морфологічних ознак апоптозу) дає можливість визначити некротичну загибель. Клітини без ушкодження плазматичної мембрани та без апоптотичних змін ядер рахувались як живі. Живі, некротичні та апоптотичні клітини підраховували за допомогою люмінесцентного мікроскопа "Люам І-1" з водно-імерсійним об'єктивом х85 та окуляром х5. Оцінювали не менш ніж 300 клітин. Результати представляли у відсотковому співвідношенні типів клітин в кожному зразку.

Фарбування аутофагічних везикул флуоресцентними барвниками. Флуоресцентний барвник MDS (Dancylcadavarine, Sigma-Aldrich, USA) використовується для *in vitro* визначення наявності аутофагічних вакуолей в різних типах клітин [7]. Використовуючи даний барвник можна візуалізувати за допомогою флуорисцентної мікроскопії скупчення сферичних структур з локалізацією в перинуклеарному просторі клітини. Клітини інкубували в темряві в термостаті при температурі 37 °С протягом 10 хв в розчині MDS що готували на PBS. Після завершення інкубації клітини двохкратно відмивали в PBS. Пофарбовані клітини фіксували в розчині формаліну, відмивали, ресуспендували та виготовляли мазки на предметних скельцях. Клітини з вираженими аутофагічними везикулами підраховували за допомогою люмінесцентного мікроскопу "Люам І-1" з водно-імерсійним об'єктивом х85 та окуляром х5.

Статистичний аналіз проводили за допомогою програми Graph Pad Prism, version 8.1.0.325 for Windows (Graph Pad Software, USA).

Показано, що модель окисного стресу викликає зменшення живих ентероцитів та відповідно збільшує їх загибель. За умов "слабкого" окисного стресу (H_2O_2 50 мкМ) відбувається зменшення живих клітин та зростання клітин з ознаками апоптозу ($n=6$, $p<0,05$) порівняно з контролем. За умов "середнього" окисного стресу (H_2O_2 250 мкМ) відбувається зменшення живих клітин, зростання клітин з ознаками некрозу ($n=6$, $p<0,05$) та апоптозу ($n=6$, $p<0,01$) порівняно з контролем. В умовах "сильного" окисного стресу (H_2O_2 500 мкМ) відбувається зменшення живих клітин, зростання клітин з ознаками некрозу та апоптозу ($n=6$, $p<0,01$) порівняно з контролем (Табл. 1), де * - $p<0,05$ - вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі; ** - $p<0,01$ - вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі.

Таблиця 1

Група тварин	Живі клітини, %	Некроз, %	Апоптоз, %
Контроль	86,17±1,47	4,67±1,03	9,17±1,47
H_2O_2 (50 мкМ)	78,13±1,96*	7,25±1,04	14,57±2,07*
H_2O_2 (250 мкМ)	66,00±1,69*	11,88±1,46*	22,13±2,23**
H_2O_2 (500 мкМ)	50,75±1,67**	19,13±1,96**	30,13±1,25**

В умовах окисного стресу також відбувається зменшення живих клітин тимуса та лімфовузлів, зростання клітин з ознаками некрозу та апоптозу порівняно з контролем. Вплив різних концентрацій H_2O_2 на частки живих та загиблих шляхами апоптозу та некрозу клітин лімфовузлів показан в Табл.2. де * - $p < 0,05$ - вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі; ** - $p < 0,01$ вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі.

Таблиця 2

Група тварин	Живі клітини, %	Некроз, %	Апоптоз, %
Контроль	79,90±2,20	13,20±1,50	7,70±1,60
H_2O_2 (50 мкМ)	71,11±1,10	17,61±1,79	11,28±0,60
H_2O_2 (250 мкМ)	52,14±1,10**	20,67±0,20*	27,18±1,86**
H_2O_2 (500 мкМ)	39,71±1,13**	27,11±1,56**	33,17±1,17**

Вплив різних концентрацій H_2O_2 на частки живих та загиблих шляхами апоптозу та некрозу клітин тимуса показан в табл. 3, де ** - $p < 0,01$ - вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі.

Таблиця 3

Група тварин	Живі клітини, %	Некроз, %	Апоптоз, %
Контроль	94,51±0,80	1,90±0,40	3,60±0,90
H_2O_2 (50 мкМ)	87,70±0,70	3,80±0,60	8,50±0,70
H_2O_2 (250 мкМ)	69,42±2,01**	12,71±2,23**	17,86±1,48**
H_2O_2 (500 мкМ)	48,71±1,13**	21,13±1,56**	30,15±1,17**

За умов різних концентрацій H_2O_2 (50мкМ, 250 мкМ, 500 мкМ) спостерігалось пропорційне зростання аутофагії в ентероцитах, порівняно з контрольними значеннями. Вплив різних концентрацій H_2O_2 на частки живих та загиблих шляхом аутофагії ентероцитів клубового відділу кишечника показано в Табл. 4, де * - $p < 0,05$ - вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі; ** - $p < 0,01$ вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі.

Таблиця 4

	Живі, %	Аутофагічні, %
Контроль	86,50±2,07	13,83±2,64
H_2O_2 (50 мкМ)	78,00±3,14*	22,00±3,14*
H_2O_2 (250 мкМ)	67,75±2,12*	32,25±2,12*
H_2O_2 (500 мкМ)	54,37±2,97**	45,62±2,97**

Нами показано що, вплив окисного стресу in vitro на клітини лімфатичних вузлів та тимуса призводив до зростання рівня аутофагії порівняно з контрольною групою. Вплив різних концентрацій H_2O_2 на частки живих та загиблих шляхом аутофагії клітин тимуса представлений таблицею 5. де * - $p < 0,05$ - вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі; ** - $p < 0,01$ - вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі.

Таблиця 5

	Живі, %	Аутофагічні, %
Контроль	89,44±1,67	10,53±1,64
H_2O_2 (50 мкМ)	81,34±1,78	18,63±1,81
H_2O_2 (250мкМ)	70,47±1,94*	29,51±2,32*
H_2O_2 (500мкМ)	51,32±1,67**	48,67±2,03**

Вплив різних концентрацій H_2O_2 на частки живих та загиблих шляхом аутофагії клітин лімфовузлів показан в табл. 6, де * - $p < 0,05$ - вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі;

** - $p < 0,01$ - вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі.

Таблиця 6

	Живі, %	Аутофагічні, %
Контроль	77,68±1,13	22,31±1,64
H ₂ O ₂ (50 мкМ)	71,37±1,88	28,63±1,11
H ₂ O ₂ (250 мкМ)	61,43±1,34*	38,58±2,14*
H ₂ O ₂ (500 мкМ)	43,74±1,38**	56,25±2,41**

Запропонована корисна модель має низку переваг: можливість вивчати наслідки окисного стресу різного ступеня (слабого, середнього та сильного); можливість детального аналізу механізмів регульованої клітинної загибелі в модельних умовах. Розроблений нами спосіб моделювання дозволяє отримати нові дані величин регульованої клітинної загибелі ентероцитів клубового відділу кишечника та імунокомпетентних клітин (лімфатичних вузлів і тимуса) у самок мишей, які можуть бути використані в подальших фундаментальних досягненнях.

ДЖЕРЕЛА ІНФОРМАЦІЇ:

1. Васильченко В.С. Кількісні зміни індоксилу сульфату за хронічної хвороби нирок. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2022. - 2-11-16.
2. Qian M Zhou, Lu Zhe, Russell J Brooke, Melissa M Hudson, Yan Yuan. A relationship between the incremental values of area under the ROC curve and of area under the precision-recall curve. Diagn Progn Res. 2021 Jul 14;5(1):13.
3. Zoltan Ungvari, Rochelle Buffenstein, Steven N Austad, Andrej Podlutsky, Gabor Kaley, Anna Csiszar. Oxidative stress in vascular senescence: lessons from successfully aging species. Front Biosci 2008 May 1:13:5056-70.
4. Julia Kim, Emre Seli. Mitochondria as a biomarker for IVF outcome. Reproduction. 2019 Jun;157(6):R235-R242.
5. Qing Liu, Zhiming Yu, Fengwei Tian, Jianxin Zhao, Hao Zhang, Qixiao Zhai, Wei Chen. Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier. Microb Cell Fact. 2020 Feb 5;19(1):23.
6. Ransy C, Vaz C, Lombes A, Bouillaud F. Use of H₂O₂ to Cause Oxidative Stress, the Catalase Issue. Int J Mol Sci. 2020; 21:9149.
7. Vazquez CL, Colombo MI. Chapter 6 Assays to Assess Autophagy Induction and Fusion of Autophagic Vacuoles with a Degradative Compartment. 2009; 452:85-95.