

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА
CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

УДК 16.379-008.64
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-3-263-274>

Поступила в редакцию 29.04.2020
Received 29.04.2020

М. А. Машкова, Т. В. Мохорт, В. А. Горанов

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

**ВЛИЯНИЕ ИММУННЫХ ФАКТОРОВ ПАЦИЕНТОВ
С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ
КЛЕТОК КОЖИ *IN VITRO***

Аннотация. На сегодняшний день большой научный интерес представляет изучение роли иммунных факторов в патогенезе язвы стопы при сахарном диабете (СД).

Цель исследования – изучить с помощью 3D-клеточной модели *in vitro* характер взаимодействия между клетками кожи (кератиноциты и фибробласты) и факторами иммунной системы, выделенными из периферической крови пациентов с СД второго типа (СД2) и лиц с СД2 с хронической язвой стопы.

Для создания 3D-клеточной модели кожи использовали первичную культуру фибробластов, кератиноциты линии HaCaT (иммортализованные кератиноциты), сыворотку крови и мононуклеары периферической крови пациентов – 9 здоровых доноров без СД, 9 пациентов с СД2 и 9 пациентов с СД2 с синдромом диабетической стопы (СДС) с хронической язвой.

При сокультивировании клеток кожи с мононуклеарной суспензией здоровых доноров, пациентов с СД2 и лиц с СДС доля жизнеспособных фибробластов составила 95,40 [91,75; 99,05] % vs 83,78 [79,03; 89,53] % vs 70,18 [66,38; 72,10] % ($H = 21,259, p < 0,001$), кератиноцитов – 96,40 [92,82; 100,50] % vs 93,61 [86,80; 97,10] % vs 92,87 [85,15; 95,25] % ($H = 4,459, p = 0,108$) соответственно. При отдельном использовании 20 %-ной сыворотки крови доля жизнеспособных фибробластов в этих группах составила 95,61 [92,39; 100,19] % vs 95,80 [88,99; 102,15] % vs 96,20 [99,69; 88,70] % ($H = 0,353, p = 0,838$), кератиноцитов – 99,40 [95,35; 102,05] % vs 98,60 [90,55; 100,40] % vs 94,79 [91,65; 98,16] % ($H = 3,030, p = 0,220$) соответственно.

Установлено, что мононуклеары, выделенные из периферической крови пациентов с СД2 и СД2 с СДС, значительно снижают выживаемость фибробластов при сокультивировании в 3D-модели кожи *in vitro*, не оказывая при этом достоверного влияния на жизнеспособность/выживаемость кератиноцитов. В то же время иммунные факторы, содержащиеся в сыворотке крови пациентов указанных выше групп, не оказывали достоверного эффекта на жизнеспособность клеток кожи в 3D-системе *in vitro*.

Ключевые слова: 3D-клеточная модель кожи, патонез синдрома диабетической стопы, иммунные механизмы, сахарный диабет, мононуклеары

Для цитирования: Машкова, М. А. Влияние иммунных факторов пациентов с сахарным диабетом на жизнеспособность клеток кожи *in vitro* / М. А. Машкова, Т. В. Мохорт, В. А. Горанов // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 3. – С. 263–274. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-3-263-274>

Maryia A. Mashkova, Tatiana V. Mokhort, Vitaly A. Goranov

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

**IMPACT OF DIABETIC (DIABETES MELLITUS) PATIENTS IMMUNE FACTORS
ON THE SKIN CELL VIABILITY *IN VITRO***

Abstract. At the moment, a lot of scientific research focused on the role of immune mechanisms in diabetic foot ulcers development and impaired healing. A 3D skin culture system as a relevant skin model may prove valuable in investigating these mechanisms and may be a useful tool to study interactions between different cell types such as keratinocytes, fibroblasts, and immune cells.

The aim of our research was to study keratinocytes and fibroblasts viability in co-culture with immune factors of patients with diabetes mellitus type 2 (DM2) and patients with diabetes and chronic foot ulcers in a 3D skin culture system.

In this study, the multilayer 3D immunocompetent model of human skin comprising keratinocytes, fibroblasts, and mononuclears in an agarose-fibronectin gel was used. The human immortalized keratinocyte cell line, HaCaT, and primary fibroblast cell culture isolated from skin samples of healthy man in abdominal surgery were used for the 3D system. For the experiment 20 % serum of 9 patients with chronic diabetic foot ulcers (without active inflammation signs), 9 diabetic type 2 patients and 9 healthy people, and mononuclears of the same groups of patients were used. 9 experimental series with 3 repeats were carried out.

Mononuclears of patients with DM2 and DM2 and diabetic foot syndrome (DFS) had a greater inhibitory effect on fibroblasts, significantly inhibiting their proliferation to a level of 83.78 [79.03; 89.53] % vs 70.18 [66.38; 72.10] % vs 95.40 [91.75; 99.05] %, $H = 21.259$, $p < 0.001$ – DM2, DFS, and the control group, respectively. There was no significant difference in the cytotoxic effect of mononuclears on keratinocytes between different groups: 96.40 [92.82; 100.50] % vs 93.61 [86.80; 97.10] % vs 92.87 [85.15; 95.25] %, $H = 4.459$, $p = 0.108$ – control, DM2 and DFS group, respectively. Adding serum to the culture system influenced significantly the viability of neither keratinocytes – 99.40 [95.35; 102.05] % vs 98.60 [90.55; 100.40] % vs 94.79 [91.65; 98.16] %, $H = 3.030$, $p = 0.220$ nor of fibroblasts – 95.61 [92.39; 100.19] % vs 95.80 [88.99; 102.15] % vs 96.20 [99.69; 88.70] %, $H = 0.353$, $p = 0.838$, control, DM2 and DFS group, respectively.

It was determined that the fibroblasts viability significantly decreases after introducing mononuclears of patients with DM and patients with DM and chronic diabetic foot ulcers to the co-culture system. Adding serum of these patient groups to the culture system doesn't influence significantly the viability of skin cells

Keywords: 3D skin culture system, diabetic foot syndrome pathogenesis, immune mechanisms, diabetes mellitus, mononuclears

For citation: Mashkova M. A., Mokhort T. V., Goranov V. A. Impact of diabetic (diabetes mellitus) patients immune factors on the skin cell viability *in vitro*. *Vesti Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 3, pp. 263–274 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-3-263-274>

Введение. Согласно данным Международной диабетологической федерации, количество пациентов с сахарным диабетом (СД) в возрасте 20–79 лет на 2018 г. составило 463 млн человек [1]. Синдром диабетической стопы (СДС) – одно из наиболее тяжелых поздних осложнений СД. Исследования показывают, что риск формирования язвы стопы у пациентов с СД в течение жизни может достигать 25 % [2], а в развитых странах диабет является самой частой причиной нетравматических ампутаций [3].

Общепринятыми факторами в патогенезе СДС являются диабетическая дистальная полинейропатия с нарушением протективной чувствительности и деформациями стоп, нарушение периферического кровотока в артериях нижних конечностей и инфекция. В соответствии с патогенетическими факторами основополагающими принципами в лечении СДС являются разгрузка стопы, восстановление артериального кровотока, борьба с инфекцией, коррекция гипергликемии и адекватная местная обработка раны [4]. Однако, по данным специализированных центров, даже при соблюдении всех указанных выше условий до 25 % при СД составляют резистентные к стандартному лечению хронические язвы [4]. Поэтому на сегодняшний день большой научный интерес представляет изучение роли дополнительных факторов и механизмов, участвующих в патогенезе и хронической персистенции язв стоп. Изменения в системе иммунитета, которые приводят к нарушению течения репаративных процессов, – один из таких факторов.

Кожа – орган, играющий важную роль физического барьера, а также выполняющий множество других функций. Учитывая сложность анатомии и физиологии кожи человека, трудности изучения ее как органа и процессов, происходящих в ней *in vivo*, уже давно разрабатываются и используются разнообразные клеточные системы для изучения патофизиологии кожи *in vitro*. В идеале такие системы должны быть доступными, информативными, физиологически и клинически значимыми и должны отражать, по крайней мере частично, сложность строения и функционирования человеческого покрова. Многие исследования *in vitro* проводятся в двумерных (2D) однослойных монокультурах, которые не имитируют в достаточной мере сложность строения кожи человека и не являются предикторами реакции тканей на аналогичные раздражители *in vivo*. К объемным трехмерным (3D) моделям относятся искусственные эквиваленты кожи, включающие несколько слоев клеток и формирующие определенную пространственную структуру. Использование трехмерных моделей для исследования поведения клеток в заданных условиях может обеспечить значимые корреляции между реакциями *in vitro* и *in vivo* [5].

Цель данного исследования – изучить с помощью 3D-клеточной модели *in vitro* характер взаимодействия между клетками кожи (кератиноциты и фибробласты) и факторами иммунной

системы, выделенными из периферической крови пациентов с сахарным диабетом второго типа и сахарным диабетом второго типа с хронической язвой стопы.

Материалы и методы исследования. Для создания 3D-клеточной модели кожи использовали фибробласты, выделенные из образцов кожи передней брюшной стенки здоровых доноров при плановых хирургических вмешательствах. После отделения дермы от эпидермиса ее разрезали ножницами на мелкие кусочки и обрабатывали коллагеназой первого типа при 37 °С в течение 1,5 ч. Затем приготовленную суспензию центрифугировали 10 мин при 1200 об/мин, супернатант сливали, а осевшие клетки ресуспендировали в среде для фибробластов (Дульбекко модифицированная среда Игла (DMEM) с добавлением сыворотки эмбрионов коров и антибиотиков). Полученную суспензию вносили в культуральные планшеты и на 1–3 недели помещали в стандартные условия (5 % CO₂, 37 °С) до получения первичной культуры. Каждые 24 ч производили смену питательной среды. По мере роста и достижения субконфлюэнтного слоя клетки снимали с помощью трипсина и этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и переносили в новый культуральный флакон с большей площадью поверхности роста клеток (рис. 1).

Для построения 3D-модели использовали кератиноциты линии HaCaT (иммортиализованные кератиноциты), так как выделенные из кожи клетки высокочувствительны к условиям культивирования и количеству проведенных пассажей. В то же время предварительные эксперименты подтвердили схожую реакцию на применяемые цитотоксины/ирританты (описаны ниже) клеток 2–4-го пассажа первичной культуры кератиноцитов и клеток линии HaCaT. Последние обладают высоким пролиферативным потенциалом и не требовательны к условиям культивирования (рис. 2).

При создании 3-мерной модели взаимодействия различных клеточных элементов за основу нами была принята модель, разработанная Y. David с соавт. [6]. В качестве несущей основы использовали планшет со вставками, содержащими пористую полипропиленовую мембрану (поры диаметром 3 мкм). На нижнюю поверхность мембраны были высажены фибробласты в концентрации 1,5·10⁵/мл и культивированы в течение суток при температуре 37 °С и 5 % CO₂. После этого внутрь вставки были высажены кератиноциты в концентрации 5·10⁵/мл (рис. 3), а через 24 ч был введен гидрогель с моноклеарной клеточной фракцией (МФ). Для выделения моноцитов использовали периферическую венозную кровь. Забор материала для анализа производили в вакуумные пробирки с ЭДТА K2. Моноклеары выделяли на градиенте перколлы плотностью 1,131 г/мл. Полученную взвесь моноклеаров дважды отмывали фосфатно-солевым буфером. В камере Горяева подсчитывали количество моноцитов в полученной взвеси и определяли их жизнеспособность с помощью окраски 1 %-ным раствором трипанового синего. Во избежание ошибок при определении количества моноцитов в полученной клеточной взвеси

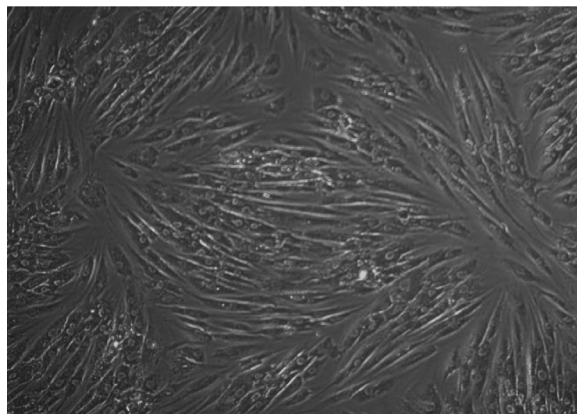


Рис. 1. Первичная культура фибробластов человека, 7-е сутки, 5-й пассаж. ×200

Fig. 1. Primary human fibroblast culture, 7th day, 5th passage. ×200

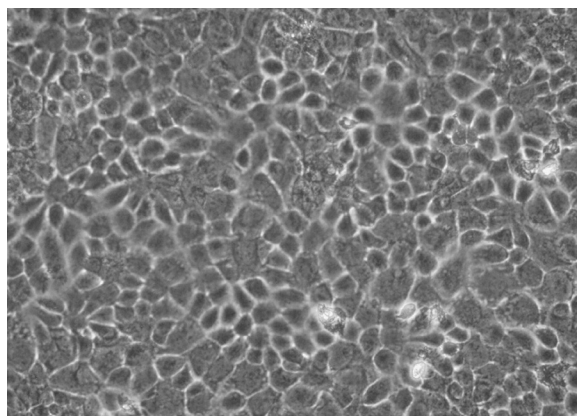


Рис. 2. Культура клеток HaCaT, 5-е сутки, 17-й пассаж. ×200

Fig. 2. HaCaT cell culture, 5th day, 17th passage. ×200

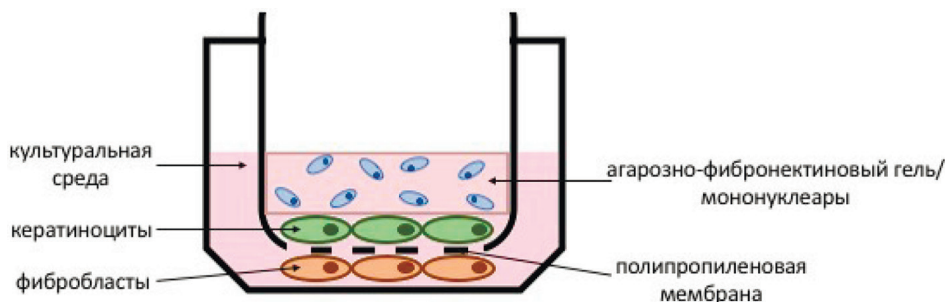


Рис. 3. Экспериментальная 3D-модель межклеточных взаимодействий (по Y. David с соавт. (2013) в нашей модификации)

Fig. 3. Experimental 3D model of intercellular interactions (according to Y. David et al. (2013) in our modification)

на основании только их морфологической структуры использовали моноклональные антитела CD14+ к специфическому моноцитарному рецептору и CD45+ к панлейкоцитарному рецептору. Учет производили с помощью проточного цитофлуориметра. Содержание моноцитов в полученной взвеси составляло не менее 80 %. Клеточные элементы МФ демонстрировали способность к свободной миграции в остальные клеточные слои и сквозь поры поддерживающей мембраны. Однако в количественном отношении примесь этих клеток в популяции кератиноцитов и фибробластов была незначительна (контроль с использованием световой и флуоресцентной микроскопии).

Пример гистологического исследования трехмерной культуры на основе клеток (фибробласты, кератиноциты, мононуклеарная фракция), послойно интегрированных с использованием пористой вставки, представлен на рис. 4.

Полученную 3D-модель совместного культивирования клеток после 4-суточной инкубации применяли для дальнейших экспериментов. В ходе эксперимента использовали 20 %-ную сыворотку и МФ, выделенную из периферической крови 9 пациентов с СДС (с хроническими язвами стоп без признаков активного местного и системного воспаления согласно рекомендациям WGDF/IDSA [4]), 9 пациентов с СД2 без СДС и 9 здоровых доноров без СД. Система была протестирована также со стандартными ирритантами – диметилсульфоксидом (ДМСО), липополисахаридом (ЛПС), додецилсульфатом натрия (НДС). В каждой серии опыты проводили тоекратно.

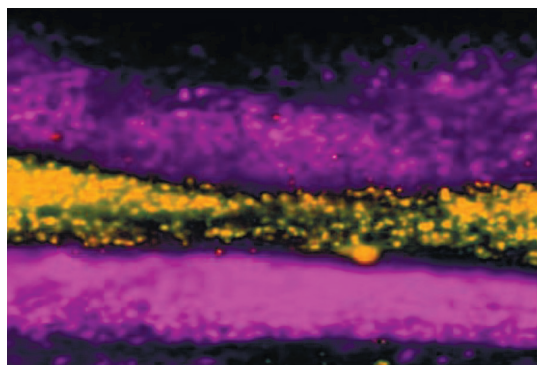


Рис. 4. Поперечный срез трехмерной культуры (3D-культуры), иммобилизованной на пористой полипропиленовой мембране: верхний слой – МФ в составе гидрогеля, средний – кератиноциты, нижний – фибробласты. Конфокальная флуоресцентная микроскопия. $\times 40$

Fig. 4. Porous polypropylene membrane-immobilized 3D cell culture cross-section: top layer – hydrogel-encapsulated mononuclear cell fraction, middle layer – keratinocytes, bottom layer – fibroblasts. Confocal fluorescence microscopy. $\times 40$

Жизнеспособность клеток оценивали согласно протоколу, предложенному для определения метаболической активности клеток, с использованием резазурина [7]. После инкубации с исследуемыми факторами в каждую лунку было добавлено 22 мкл резазурина в конечной концентрации 50 мкМ. Планшеты инкубировали в течение 2 ч. Для построения калибровочной кривой кератиноциты и фибробласты высевали отдельно в планшет в разных концентрациях и инкубировали одновременно с тестируемой культурой. Оптическую плотность образцов определяли с помощью планшетного ридера (TECAN Infinite 200® PRO, Австрия) при длине волны 570 и 600 нм. Калибровочная кривая определяла диапазон, при котором сохранялась линейная зависимость между интенсивностью поглощения и числом клеток в культуре. При помощи калибровочной кривой рассчитывали количество клеток в культуре с исследуемым фактором после инкубации и в контрольной.

Долю жизнеспособных клеток определяли по отношению количества клеток в исследуемом образце к контролю.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы SPSS, версия 23.0, с использованием непараметрических методов: для сравнения двух независимых выборок использовали критерий Манна–Уитни, для сравнения трех и более независимых выборок – критерий Краскелла–Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования. Результаты тестирования 3D-клеточной системы с сывороткой и мононуклеарами пациентов представлены на рис. 5–8. Как видно на рис. 5, 6, добавление сыворотки крови как здоровых доноров, так и пациентов с СД2 и СД2 с СДС не оказывало достоверного эффекта на жизнеспособность кератиноцитов и фибробластов в 3D-модели кожи. При сокультивировании клеток кожи с мононуклеарами пациентов доля жизнеспособных фибробластов для группы здоровых доноров, пациентов с СД2 и пациентов с СДС составила 95,40 [91,75; 99,05] % vs 83,78 [79,03; 89,53] % vs 70,18 [66,38; 72,10] % соответственно ($H = 21,259$, $p < 0,001$) (рис. 7). Таким образом, сокультивирование клеток кожи с мононуклеарной суспензией пациентов с СД2 и СД2 с СДС существенно снижало выживаемость фибробластов в 3D-системе. Статистически достоверные различия отмечались также в выраженности (силе) эффекта подавления метаболической активности фибробластов ($Z_{\text{СД2-СДС}} = -3,488$, $p < 0,001$) между мононуклеарами пациентов с СД2 и СД2 с СДС. В то же время не выявлены достоверные различия в действии МФ пациентов разных групп на жизнеспособность кератиноцитов – для группы здоровых доноров, пациентов с СД2 и пациентов с СДС доля жизнеспособных кератиноцитов составила 96,40 [92,82; 100,50] % vs 93,61 [86,80; 97,10] % vs 92,87 [85,15; 95,25] % соответственно ($H = 4,459$, $p = 0,108$) (рис. 8).

Влияние совместного культивирования кератиноцитов и фибробластов с лимфоцитарно-моноцитарной суспензией и сывороткой пациентов с добавлением стандартных ирритантов на жизнеспособность клеток кожи в 3D-системе приведены в таблице.

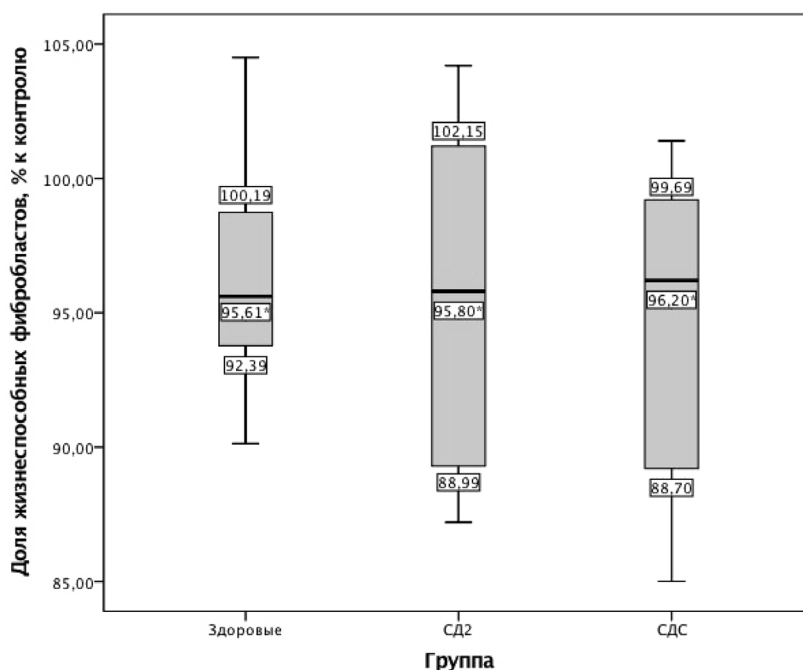


Рис. 5. Выживаемость фибробластов при совместном культивировании клеток кожи с сывороткой крови пациентов разных групп в 3D-модели. * – отсутствие достоверных различий между группами ($H = 0,353$, $p = 0,838$)

Fig. 5. Fibroblasts viability in co-cultivation with keratinocytes and blood serum in the 3D skin model.

* – no significant difference between the groups ($H = 0.353$, $p = 0.838$)

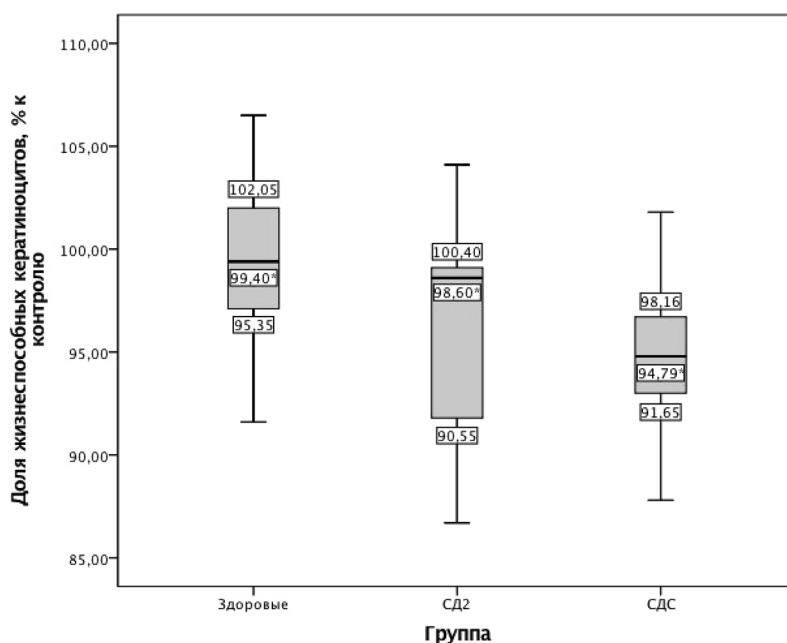


Рис. 6. Выживаемость кератиноцитов при совместном культивировании клеток кожи с сывороткой крови пациентов разных групп в 3D-модели. * – отсутствие достоверных различий между группами ($H = 3,030, p = 0,220$)

Fig. 6. Keratinocytes viability in co-cultivation with fibroblasts and blood serum in the 3D skin model. * – no significant difference between the groups ($H = 3.030, p = 0.220$)

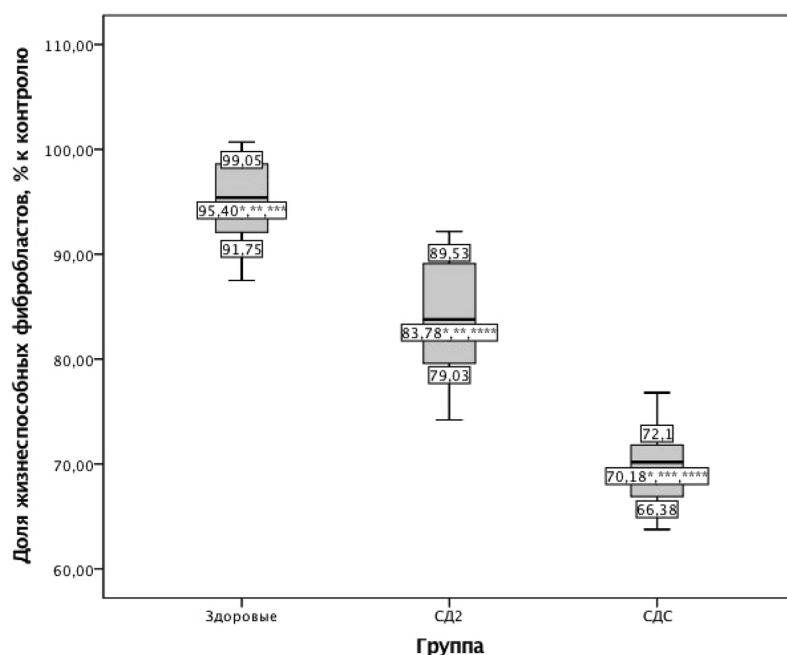


Рис. 7. Выживаемость фибробластов при совместном культивировании клеток кожи с мононуклеарной суспензией пациентов разных групп в 3D-модели. Достоверность различий: * – между всеми группами ($H = 21,259, p < 0,001$); ** – между группой здоровых и группой СД2 ($Z_{зд-сд2} = -3,048, p = 0,001$); *** – между группой здоровых и группой СДС ($Z_{зд-сдс} = -3,578, p < 0,001$); **** – между группами СД2 и СДС ($Z_{сд2-сдс} = -3,488, p < 0,001$)

Fig. 7. Fibroblasts viability in co-cultivation with keratinocytes and mononuclears in the 3D skin model. Significant difference: * – between the groups ($H = 21.259, p < 0.001$); ** – between the healthy group and the DM2 group ($Z_{H-DM2} = -3.048, p = 0.001$); *** – between the healthy group and the DFS group ($Z_{H-DFS} = -3.578, p < 0.001$); **** – between the DM2 and DFS groups ($Z_{DM2-DFS} = -3.488, p < 0.001$)

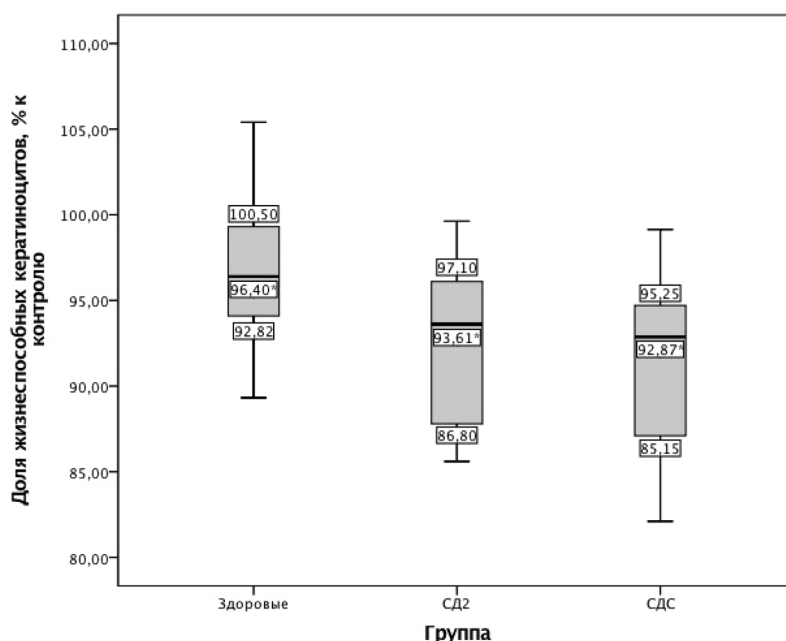


Рис. 8. Выживаемость кератиноцитов при совместном культивировании клеток кожи с мононуклеарной суспензией у пациентов разных групп в 3D-модели. * – отсутствие достоверных различий между группами ($H = 4,459, p = 0,108$)

Fig. 8. Keratinocyte survival in co-cultivation of skin cells with a mononuclear suspension of different patient groups in the 3D cell system. * – no significant difference between the groups ($H = 4.459, p = 0.108$)

Выживаемость кератиноцитов и фибробластов при совместном культивировании с лимфоцитарно-моноцитарной суспензией и сывороткой крови пациентов с добавлением стандартных ирритантов в 3D-клеточной системе, %

Survival of keratinocytes and fibroblasts when co-cultured with lymphocyte-monocytic suspension and patient serum with the addition of standard irritants in the 3D cell system, %

Ирритант	Контроль (только стандартные ирританты)		Лимфоциты/моноциты + сыворотка крови здоровых доноров		Лимфоциты/моноциты + сыворотка крови пациентов с СД 2		Лимфоциты/моноциты + сыворотка крови пациентов с СДС	
	Кератиноциты	Фибробласты	Кератиноциты	Фибробласты	Кератиноциты	Фибробласты	Кератиноциты	Фибробласты
Контроль	100,00	100,00	–	–	–	–	–	–
ДМСО (1000 мкг/мл)	101,10 [96,65; 105,36] ¹	104,80 [98,95; 107,15]	97,56 [94,75; 100,23]	96,28 [91,53; 97,50]	95,41 [91,64; 97,93]	85,67 [81,30; 89,21]	94,17 [91,06; 96,98]	73,69 [71,17; 78,93]
ЛПС (10 мкг/мл)	108,60 [105,43; 11,72]	100,36 [98,70; 103,45]	92,54 [90,92; 96,78]	90,14 [84,32; 90,57] ⁴	90,98 [88,94; 94,29]	76,43 [73,13; 81,12] ⁴	89,76 [87,78; 95,36] ³	66,45 [62,63; 70,17] ²
НДС (5 мкг/мл)	94,50 [91,22; 97,81]	96,15 [91,40; 97,79]	96,18 [93,03; 99,20]	95,21 [91,26; 97,36]	91,23 [89,11; 97,63]	83,89 [79,28; 88,82]	92,13 [88,45; 93,89]	71,43 [69,21; 76,20]
Только лимфоциты/моноциты + сыворотка крови	–	–	95,24 [92,30; 97,61]	94,23 [91,87; 96,55] ⁴	92,98 [90,72; 96,50]	85,13 [80,81; 87,82] ³	91,78 [88,52; 95,11]	70,42 [68,10; 74,79] ²

Примечание. ¹ – данные представлены в виде Ме [25; 75]; достоверные различия между группами: ² – при $U = 16,0, p = 0,031$; ³ – при $U = 10,0, p = 0,006$; ⁴ – при $U = 5,0, p = 0,001$.

Одновременное добавление сыворотки и мононуклеарной суспензии не оказывало дополнительного токсического эффекта по сравнению с одними мононуклеарами: доля жизнеспособных кератиноцитов для здоровых доноров, пациентов с СД2 и лиц с СДС составила 95,24 [92,30; 97,61] % vs 96,40 [92,82; 100,50] % ($U = 35,0, p = 0,666$), 92,98 [90,72; 96,50] % vs 93,61 [86,80;

97,10] % ($U = 37,0$, $p = 0,796$), 91,78 [88,52; 95,11] vs 92,87 [85,15; 95,25] % ($U = 37,0$, $p = 0,796$); фибробластов – 94,23 [91,87; 96,55] % vs 95,40 [91,75; 99,05] % ($U = 36,0$, $p = 0,730$), 85,13 [80,81; 87,82] % vs 83,78 [79,03; 89,53] % ($U = 38,0$, $p = 0,863$), 70,42 [68,10; 74,79] % vs 70,18 [66,38; 72,1] % ($U = 36,5$, $p = 0,730$) соответственно. При этом, как видно из таблицы, дополнительное использование стандартных ирритантов (ДМСО, ЛПС и НДС) в основном не оказывало существенного влияния на жизнеспособность клеток кожи. Добавление ЛПС в культуру к мононуклеарам и сыворотке крови пациентов незначительно потенцировало действие иммунных клеток на выживаемость фибробластов: для пациентов с СДС доля жизнеспособных фибробластов составила 66,45 [62,63; 70,17] % vs 70,42 [68,10; 74,79] % ($U = 16,0$, $p = 0,031$), для пациентов с СД2 – 76,43 [73,13; 81,12] vs 85,13 [80,81; 87,82] % ($U = 10,0$, $p = 0,006$), для здоровых доноров – 90,14 [84,32; 90,57] % vs 94,23 [91,87; 96,55] % ($U = 5,0$, $p = 0,001$), с ЛПС и без ЛПС соответственно.

Обсуждение. Как известно, в норме в процессе заживления раневых дефектов выделяют 4 фазы – гемостаза/коагуляции, воспаления, пролиферации и ремоделирования, которые плавно перетекают одна в другую. У пациентов с СД изменение течения репаративных процессов на всех стадиях заживления проявляется в виде пролонгации воспалительной фазы, нарушения ангиогенеза, формирования внеклеточного матрикса и грануляционной ткани, процессов реэпителизации и ремоделирования [8].

Фибробласты – одни из ключевых клеток в заживлении ран. Они участвуют в процессах продуцирования и ремоделирования внеклеточного матрикса, ангиогенеза и формирования грануляционной ткани, поддерживают реэпителизацию. Со снижением пролиферативной способности фибробластов и уменьшением их количества в области повреждения связывают нарушение течения репаративных процессов при СД [7]. Традиционно участие фибробластов в процессе заживления ран было изучено в 2D-монослойных клеточных культурах [9]. Однако ввиду отсутствия «объемности», межклеточных перекрестных связей и взаимодействия между клетками и внеклеточным матриксом имеет место упрощенный взгляд на процесс заживления, что ограничивает актуальность этих результатов *in vivo*. Морфология, экспрессия генов и передача сигналов у фибробластов, выращенных в 3D-средах, более сходны с их аналогами *in vivo*, чем с выращенными в 2D-монослоях. Кожные эквиваленты имитируют гетеротипические перекрестные связи между фибробластами и кератиноцитами, которые необходимы для стратификации эпидермиса и дифференцировки кератиноцитов [10]. Поэтому выраженность токсического действия различных молекул и клеток на фибробласты, которая наблюдается *in vitro* в 3D-модели, может быть важным показателем отрицательного влияния этих агентов на течение репаративного процесса *in vivo*. В нашем исследовании для создания 3D-модели преднамеренно использованы фибробласты здоровых доноров – чтобы изучить влияние на их жизнеспособность лимфоцитарно-моноцитарной фракции пациентов с СД, исключив при этом влияние измененного фенотипа самих фибробластов при СД.

Роль макрофагов в развитии хронического системного воспаления, связанного с ожирением и СД2, хорошо описана в работе [11]. Макрофаги также являются одними из ключевых клеток в процессе заживления ран [8]. Однако их роль в нарушении течения репаративных процессов и поддержании хронического воспаления в области раневого дефекта изучена недостаточно. Известно, что для хронических язв при СД характерно усиление миграции моноцитов к месту повреждения и их активация, однако этот процесс сочетается с нарушением нормальной фагоцитарной активности макрофагов, их способности к эффероцитозу. Также отмечается длительная персистенция провоспалительного М1 фенотипа макрофагов в месте повреждения и нарушение переключения на противовоспалительный М2 фенотип в позднюю воспалительную фазу [12]. В большинстве исследований изучается влияние различных цитокинов, ростовых факторов, других регуляторных молекул и клеток на процессы поляризации и пластичность макрофагов непосредственно в самом очаге повреждения. Однако в недавнем исследовании К. А. Gallagher с соавт. [13] показана роль метилирования гистонов стволовых/прогениторных клеток костного мозга в «программировании» моноцитов в сторону провоспалительного фенотипа. В исследовании на мышцах с ожирением авторами обнаружено, что в клетках-предшественницах в костном мозге снижена экспрессия репрессивного маркера $H3K27me3$ в промоторе гена *IL12* и эта эпиге-

нетическая модификация сохраняется также в периферических «раневых» макрофагах. Согласно их данным, увеличение количества деметилазы H3K27, Jmjd3, приводит к увеличению экспрессии гена *ИЛ12*, а следовательно, и продукции самого провоспалительного цитокина у мышей с СД. Ингибирование же Jmjd3 приводит к снижению продукции *ИЛ12* макрофагами. Исследователями было даже высказано предположение, что если моноциты, поступающие в системный кровоток из костного мозга, уже «запрограммированы на провоспалительный фенотип», то используемые в клинической практике методы лечения, направленные на изменение раневой среды в очаге, становятся менее эффективными, поскольку они не решают системную проблему на уровне стволовых/прогениторных клеток костного мозга и уже predeterminedной провоспалительной поляризации макрофагов [13]. Так как в нашем исследовании использованы мононуклеары, выделенные из периферической крови пациентов с СД, то с определенными ограничениями можно предположить, что описанная выше «запрограммированность» токсического действия моноцитов еще до миграции их в очаг воспаления и трансформации в макрофаги может быть одним из вариантов объяснения полученного результата. Безусловно, это требует дальнейших исследований с использованием отдельных клеточных фракций.

Данных об участии лимфоцитов в процессах заживлении раневых дефектов в целом и при СД в частности значительно меньше, чем о роли макрофагов. Известно, что при физиологическом течении репаративного процесса В-лимфоциты ассоциированы в основном с поздней пролиферативной фазой и присутствуют в месте повреждения в относительно небольшом количестве (около 100 клеток/мм³) [14]. Однако в ряде исследований показано, что В-клетки могут действовать как мощные модуляторы регенерации тканей. В дополнение к их способности дифференцироваться в продуцирующие антитела плазматические клетки В-клетки также могут эффективно представлять антигены Т-клеткам и модулировать местный иммунный ответ посредством секреции про- и противовоспалительных цитокинов [15]. Интересно, что выделенные из крови очищенные В-лимфоциты, нанесенные на поврежденную область, оказывали выраженное репаративное действие в исследованиях на мышах [14]. В-клетки, выделенные из костного мозга и непосредственно введенные в места ишемического повреждения миокарда крыс, улучшали сердечную функцию и приводили к восстановлению мышечной ткани, демонстрируя лучшие результаты по сравнению с CD117+ гемопоэтическими стволовыми клетками [16]. Исследования, в которых изучалось влияние В-клеток на процессы заживления при травматических повреждениях, также описывают их благоприятное воздействие. У мышей со спленэктомией, у которых было удалено большинство зрелых В-лимфоцитов, наблюдалось замедленное заживление ран после повреждения кожи, тогда как системное повторное введение изолированных В-клеток способствовало ускорению репаративных процессов [17]. Исследование с использованием CD19-дефицитных животных показало, что гиалуроновая кислота в ранах может функционировать как эндогенный лиганд для toll-like рецептора 4 (TLR-4) на поверхности В-лимфоцитов, вызывая усиленную секрецию интерлейкина (ИЛ)-6, ИЛ-10 и трансформирующего фактора роста (ТФР)-β. Эти цитокины, в свою очередь, способствуют процессу репарации [18]. При заживлении переломов бедренной кости у мышей В-клетки в большом количестве проникали в область каллуса и активно стимулировали регенерацию посредством секреции остеопротегерина 12 [19]. В недавнем исследовании R. F. Sirbulescu с соавт. продемонстрировано, что зрелые наивные B220+/CD19 +/IgM+/IgD+ В-клетки улучшали заживление ран у мышей с СД после однократного местного применения. Однако этот эффект не наблюдался при использовании разрушенных В-клеток, а также жизнеспособных Т-клеток и гемопоэтических стволовых клеток [17]. Таким образом, согласно большинству имеющихся данных, В-лимфоциты оказывают положительное действие на течение репаративных процессов, в том числе при СД. Согласно данным исследований, проведенным на мышах, CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты, несмотря на их присутствие в области повреждения, участие в воспалительном процессе и влияние на секрецию различных цитокинов, не оказывали значимого эффекта на скорость заживления раневого дефекта, образование коллагена, процессы ангиогенеза [20]. Ряд исследователей связывают нарушение заживления язв стоп при СД с изменением соотношения различных субпопуляций Т-лимфоцитов, увеличением содержания и выраженным цитотоксическим действием CD8+ Т-лимфоцитов [21, 22]. На сегодняшний

день хорошо описана также роль различных субпопуляций Т-лимфоцитов в развитии системного хронического неспецифического воспаления при СД2 и ожирении [21].

И хотя использование суспензии мононуклеаров (несмотря на преимущественное содержание моноцитарной фракции) в 3D-культуре все же не позволяет сделать вывод о конкретном типе иммунных клеток и механизме, обуславливающем снижение выживаемости фибробластов, наши данные подтверждают системный характер изменений, происходящих в организме при СД, в том числе и в системе иммунитета.

Заключение. Таким образом, в данном исследовании было выявлено, что мононуклеары, выделенные из периферической крови пациентов с СД2 и СД2 с СДС, значительно снижают долю жизнеспособных фибробластов при совместном культивировании в 3D-модели кожи *in vitro*, не оказывая при этом достоверного влияния на жизнеспособность кератиноцитов. В то же время сывороточные иммунные факторы указанных выше групп пациентов не оказывают достоверного эффекта на жизнеспособность клеток кожи в 3D-системе *in vitro*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. IDF Diabetes Atlas 9th Edition [Electronic resource] // Int. Diabetes Federation. – Mode of access: <https://www.diabetesatlas.org/en/resources/>. – Date of access: 19.04.2020.
2. Geraghty, T. Current health and economic burden of chronic diabetic osteomyelitis / T. Geraghty, G. LaPorta // Expert Rev. Pharmacoecon. Outcomes Res. – 2019. – Vol. 19, N 3. – P. 279–286. <https://doi.org/10.1080/14737167.2019.1567337>
3. IDF Clinical Practice Recommendations on the Diabetic Foot – 2017. A guide for healthcare professionals / A. Ibrahim [et al.]. – Brussels : Int. Diabetes Federation, 2017. – 70 p.
4. The 2019 IWGDF Guidance Documents on prevention and management of foot problems in diabetes [Electronic resource] // International Working Group on the Diabetic Foot. – Mode of access: <https://iwgdfguidelines.org/guidelines/guidelines/>. – Date of access: 19.04.2020.
5. Ud-Din, S. Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: *In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo* models of wounds and scars in human skin / S. Ud-Din, A. Bayat // Wound Repair Regen. – 2017. – Vol. 25, N 2. – P. 164–176. <https://doi.org/10.1111/wrr.12513>
6. The development of a 3D immunocompetent model of human skin / D. Y. S. Chau [et al.] // Biofabrication. – 2013. – Vol. 5, N 3. – P. 035011. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/5/3/035011>
7. Ahmed, S. A. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay / S. A. Ahmed, R. M. Gogal, J. E. Walsh // J. Immunol. Meth. – 1994. – Vol. 170, N 2. – P. 211–224. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90396-4)
8. Baltzis, D. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights / D. Baltzis, I. Eleftheriadou, A. Veves // Adv. Ther. – 2014. – Vol. 31, N 8. – P. 817–836. <https://doi.org/10.1007/s12325-014-0140-x>
9. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast. impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia / O. Z. Lerman [et al.] // Am. J. Pathol. – 2003. – Vol. 162, N 1. – P. 303–312. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63821-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63821-7)
10. Three-dimensional human tissue models that incorporate diabetic foot ulcer-derived fibroblasts mimic *in vivo* features of chronic wounds / A. G. Maione [et al.] // Tissue Eng. Part C Meth. – 2015. – Vol. 21, N 5. – P. 499–508. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2014.0414>
11. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? / M. J. Kraakman [et al.] // Front Immunol. – 2014. – Vol. 5. – Art. 470. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00470>
12. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice / S. Khanna [et al.] // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5, N 3. – P. e9539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009539>
13. Epigenetic changes in bone marrow progenitor cells influence the inflammatory phenotype and alter wound healing in type 2 diabetes / K. A. Gallagher [et al.] // Diabetes. – 2015. – Vol. 64, N 4. – P. 1420–1430. <https://doi.org/10.2337/db14-0872>
14. Mature B cells accelerate wound healing after acute and chronic diabetic skin lesions / R. F. Sîrbulescu [et al.] // Wound Repair Regen. – 2017. – Vol. 25, N 5. – P. 774–791. <https://doi.org/10.1111/wrr.12584>
15. Cytokine-defined B cell responses as therapeutic targets in multiple sclerosis / R. Li [et al.] // Front Immunol. – 2016. – Vol. 6. – Art. 626. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00626>
16. Bone marrow-derived B cells preserve ventricular function after acute myocardial infarction / T. T. Goodchild [et al.] // JACC Cardiovasc. Interv. – 2009. – Vol. 2, N 10. – P. 1005–1016. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2009.08.010>
17. Antibodies to wounded tissue enhance cutaneous wound healing / N. Nishio [et al.] // Immunology. – 2009. – Vol. 128, N 3. – P. 369–380. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03119.x>
18. CD19, a response regulator of B lymphocytes, regulates wound healing through hyaluronan-induced TLR4 signaling / Y. Iwata [et al.] // Am. J. Pathol. – 2009. – Vol. 175, N 2. – P. 649–660. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080355>
19. T and B cells participate in bone repair by infiltrating the fracture callus in a two-wave fashion / I. Könnicke [et al.] // Bone. – 2014. – Vol. 64. – P. 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.03.052>

20. Absence of CD4 or CD8 lymphocytes changes infiltration of inflammatory cells and profiles of cytokine expression in skin wounds, but does not impair healing / L. Chen [et al.] // *Exp. Dermatol.* – 2014. – Vol. 23, N 3. – P. 189–194. <https://doi.org/10.1111/exd.12346>
21. Immune aging in diabetes and its implications in wound healing / J. Moura [et al.] // *Clin. Immunol.* – 2019. – Vol. 200. – P. 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.02.002>
22. Impaired T-cell differentiation in diabetic foot ulceration / J. Moura [et al.] // *Cell. Mol. Immunol.* – 2017. – Vol. 14, N 9. – P. 758–769. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.116>

References

1. *IDF Diabetes Atlas 9th Edition*. Available at: <https://www.diabetesatlas.org/en/resources/> (accessed 19.04.2020).
2. Geraghty T., LaPorta G. Current health and economic burden of chronic diabetic osteomyelitis. *Expert Review of Pharmacoeconomics and Outcomes Research*, 2019, vol. 19, no. 3, pp. 279–286. <https://doi.org/10.1080/14737167.2019.1567337>
3. Ibrahim A., Jude E., Langton K., Martinez-De Jesus F. R., Harkless L. B., Gawish H. [et al.]. *IDF Clinical Practice Recommendations on the Diabetic Foot – 2017. A guide for healthcare professionals*. Brussels, International Diabetes Federation, 2017. 70 p.
4. *The 2019 IWGDF Guidance Documents on prevention and management of foot problems in diabetes*. Available at: <https://iwgdfguidelines.org/guidelines/guidelines/> (accessed 19.04.2020).
5. Ud-Din S., Bayat A. Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: *In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo* models of wounds and scars in human skin. *Wound Repair and Regeneration*, 2017, vol. 25, no. 2, pp. 164–176. <https://doi.org/10.1111/wrr.12513>
6. Chau D. Y. S., Johnson C., MacNeil S., Haycock J. W., Ghaemmaghami A. M. The development of a 3D immunocompetent model of human skin. *Biofabrication*, 2013, vol. 5, no. 3, p. 035011. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/5/3/035011>
7. Ahmed S. A., Gogal R. M., Walsh J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, 1994, vol. 170, no. 2, pp. 211–224. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90396-4)
8. Baltzis D., Eleftheriadou I., Veves A. *Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights*. *Advances in Therapy*, 2014, vol. 31, no. 8, pp. 817–836. <https://doi.org/10.1007/s12325-014-0140-x>
9. Lerman O. Z., Galiano R. D., Armour M., Levine J. P., Gurtner G. C. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast. Impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *American Journal of Pathology*, 2003, vol. 162, no. 1, pp. 303–312. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63821-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63821-7)
10. Maione A. G., Brudno Y., Stojadinovic O., Park L. K., Smith A., Tellechea A. [et al.]. Three-dimensional human tissue models that incorporate diabetic foot ulcer-derived fibroblasts mimic *in vivo* features of chronic wounds. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2015, vol. 21, no. 5, pp. 499–508. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2014.0414>
11. Kraakman M. J., Murphy A. J., Jandeleit-Dahm K., Kammoun H. L. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? *Frontiers in Immunology*, 2014, vol. 5, art. 470. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00470>
12. Khanna S., Biswas S., Shang Y., Collard E., Azad A., Kauh C., Bhasker V., Gordillo G. M., Sen C. K., Roy S. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS ONE*, 2010, vol. 5, no. 3, pp. e9539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009539>
13. Gallagher K. A., Joshi A., Carson W. F., Schaller M., Allen R., Mukerjee S. [et al.]. Epigenetic changes in bone marrow progenitor cells influence the inflammatory phenotype and alter wound healing in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2015, vol. 64, no. 4, pp. 1420–1430. <https://doi.org/10.2337/db14-0872>
14. Sîrbulescu R. F., Boehm C. K., Soon E., Wilks M. Q., Ilies J., Yuan H. [et al.]. Mature B cells accelerate wound healing after acute and chronic diabetic skin lesions. *Wound Repair and Regeneration*, 2017, vol. 25, no. 5, pp. 774–791. <https://doi.org/10.1111/wrr.12584>
15. Li R., Rezk A., Healy L. M., Muirhead G., Prat A., Gommerman J. L., Bar-Or A. Cytokine-defined B cell responses as therapeutic targets in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 2016, vol. 6, art. 626. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00626>
16. Goodchild T. T., Robinson K. A., Pang W., Tondato F., Cui J., Arrington J. [et al.]. Bone marrow-derived B cells preserve ventricular function after acute myocardial infarction. *JACC: Cardiovasc Interventions*, 2009, vol. 2, no. 10, pp. 1005–1016. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2009.08.010>
17. Nishio N., Ito S., Suzuki H., Isobe K. Antibodies to wounded tissue enhance cutaneous wound healing. *Immunology*, 2009, vol. 128, no. 3, pp. 369–380. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03119.x>
18. Iwata Y., Yoshizaki A., Komura K., Shimizu K., Ogawa F., Hara T. [et al.]. CD19, a response regulator of B lymphocytes, regulates wound healing through hyaluronan-induced TLR4 signaling. *American Journal of Pathology*, 2009, vol. 175, no. 2, pp. 649–660. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080355>
19. Könnecke I., Serra A., Khassawna T., Schlundt C., Schell H., Hauser A. [et al.]. T and B cells participate in bone repair by infiltrating the fracture callus in a two-wave fashion. *Bone*, 2014, vol. 64, pp. 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.03.052>
20. Chen L., Mehta N. D., Zhao Y., DiPietro L. A. Absence of CD4 or CD8 lymphocytes changes infiltration of inflammatory cells and profiles of cytokine expression in skin wounds, but does not impair healing. *Experimental Dermatology*, 2014, vol. 23, no. 3, pp. 189–194. <https://doi.org/10.1111/exd.12346>

21. Moura J., Madureira P., Leal E. C., Fonseca A. C., Carvalho E. Immune aging in diabetes and its implications in wound healing. *Clinical Immunology*, 2019, vol. 200, pp. 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.02.002>

22. Moura J., Rodrigues J., Gonçalves M., Amaral C., Lima M., Carvalho E. Impaired T-cell differentiation in diabetic foot ulceration. *Cellular and Molecular Immunology*, 2017, vol. 14, no. 9, pp. 758–769 <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.116>

Информация об авторах

Машкова Мария Александровна – аспирант, ассистент. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mashkova.maryia@gmail.com

Мохорт Татьяна Вячеславовна – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tatsiana-mokhort@gmail.com

Горанов Виталий Анатольевич – канд. мед. наук, науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vitgoranov@gmail.com

Information about the authors

Maryia A. Mashkova – Postgraduate student, Assistant. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskii Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mashkova.maryia@gmail.com

Tatiana V. Mokhort – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskii Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tatsianamokhort@gmail.com

Vitaly A. Goranov – Ph. D. (Med.), Researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskii Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vitgoranov@gmail.com