

## ПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ ИНТЕРЛЕЙКИНА 4 НА ФИБРОБЛАСТЫ В 3D-КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ КОЖИ И ИММУННЫМИ КЛЕТКАМИ ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА С ХРОНИЧЕСКИМИ ЯЗВАМИ СТОП

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

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

На сегодняшний день много внимания уделяется роли иммунных механизмов в нарушении заживления и длительной персистенции язв стоп при сахарном диабете (СД). Сложность процессов, происходящих в области повреждения, вовлеченность в этот процесс множества клеток, факторов роста, цитокинов и других молекул делает затруднительным проведение исследований *in vivo*. Использование 3D моделей для изучения поведения клеток *in vitro* в заданных условиях представляет собой хорошую альтернативу.

Целью данного исследования было изучить влияние ИЛ-1 и ИЛ-4 на жизнеспособность кератиноцитов и фибробластов, а также определить уровень продукции эндогенных интерлейкинов (ИЛ1, 4, 6, 8) в культуральную среду при совместном культивировании клеток кожи с мононуклеарами и сывороткой крови пациентов с СД 2 типа и СД 2 типа с хроническими язвами стоп в 3D-клеточной модели *in vitro*.

Основным результатом было получение протективного эффекта ИЛ4 на фибробласты – в высокой концентрации (50 пг/мл) данный интерлейкин достоверно увеличивал процент жизнеспособных фибробластов при совместном культивировании клеток кожи с мононуклеарами и сывороткой крови пациентов с СД 2 типа (85,13 [80,81; 87,82]% vs. 90,34 [85,92; 94,74]%,  $T=-2,668$ ,  $p=0,008$ ) и СД 2 типа с хроническими язвами стоп (70,42 [68,10; 74,79]% vs. 82,10 [76,37; 84,39]%,  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$ ). Добавление ИЛ1 в супрафизиологической концентрации в культуру потенцировало токсический эффект мононуклеаров пациентов с СД2 и СД2 с хроническими язвами стоп на фибробласты а также приводило к снижению процента жизнеспособных кератиноцитов в 3D-культуре. Увеличение секреции ИЛ1 и отсутствие достаточного и достоверного снижения секреции ИЛ6 в культуральную среду в течение 24 часов совместной инкубации клеток кожи с мононуклеарами пациентов с СД2 свидетельствовало об активации иммунных механизмов и длительном поддержании воспалительного ответа.

**Ключевые слова:** 3D клеточная модель кожи, сахарный диабет, хронические язвы стоп, интерлейкин 1, интерлейкин 4, интерлейкин 6.

**Для цитирования:** Машкова, М. А. Протективный эффект интерлейкина 4 на фибробласты в 3D-клеточной модели взаимодействия между клетками кожи и иммунными клетками пациентов с сахарным диабетом 2 типа и сахарным диабетом 2 типа с хроническими язвами стоп / М. А. Машкова, Т. В. Мохорт, В. А. Горанов // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2020. Т. 18, № 4. С. 410-416. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2020-18-4-410-416>.

### Введение

Синдром диабетической стопы (СДС) – одно из наиболее тяжелых хронических осложнений сахарного диабета (СД). Ежегодная частота новых случаев язв стоп среди пациентов с СД составляет около 2% [1].

Общеизвестно, что СД оказывает влияние на многие системы организма, в том числе и иммунную, однако данных с описанием конкретных иммунологических механизмов, приводящих к нарушению течения репаративных процессов при СД, на сегодняшний день недостаточно [2]. Дисрегуляция воспалительной фазы [3, 4, 5] – часто встречающийся дефект в процессе заживления диабетических язв, который характеризуется поздним образованием, но длительной персистенцией воспалительного инфильтрата [4]. Для ран при СД характерно изменение уровней экспрессии провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкин 1 (ИЛ1), ИЛ6, ИЛ8 и, по-видимому, разная регуляция их секреции на ранних и более поздних этапах заживления ран, с преобладанием избыточной экспрессии в позднюю воспалитель-

ную фазу [2, 6]. Имеются немногочисленные данные о возможном влиянии ИЛ4 на течение репаративных процессов в ране [7, 8].

Огромное количество и сложность процессов, происходящих в области повреждения, вовлеченность в этот процесс множества клеток, факторов роста, цитокинов и других молекул делает затруднительным проведение исследований *in vivo*. Использование 3D моделей для изучения поведения клеток *in vitro* в заданных условиях представляет собой хорошую альтернативу и может обеспечить значимые корреляции между наблюдаемыми реакциями *in vitro* и процессами *in vivo* [9, 10].

**Цель исследования** – изучить влияние ИЛ-1 и ИЛ-4 на жизнеспособность кератиноцитов и фибробластов, а также определить уровень продукции эндогенных интерлейкинов (ИЛ1, 4, 6, 8) в культуральную среду при совместном культивировании клеток кожи с мононуклеарами и сывороткой крови пациентов с СД 2 типа и СД 2 типа с хроническими язвами стоп в 3D-клеточной модели *in vitro*.

### Материал и методы

Для создания 3D клеточной модели кожи использовались фибробласты, выделенные из кожи здоровых доноров (использованы образцы кожи передней брюшной стенки, полученные при плановых хирургических вмешательствах). После отделения дермы от эпидермиса ее разрезали ножницами на мелкие кусочки и обрабатывали коллагеназой 1 типа при 37°C в течение 1,5 часов. Затем приготовленную суспензию центрифугировали 10 минут при 1200 об/мин, супернатант сливали, осевшие клетки ресуспендировали в среде для фибробластов (дьюльбекко модифицированная среда Игла с добавлением сыворотки эмбрионов коров и антибиотиков). Полученную суспензию вносили в культуральные планшеты и помещали в стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) в течение 1-3 недель до получения первичной культуры. Каждые 24 часа производили смену питательной среды. По мере роста и достижения субконфлюэнтного слоя клетки снимали с помощью трипсина и этилендиаминтетрауксусной кислоты, затем переносили в новый, большей площадью, культуральный флакон.

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

В наших исследованиях по созданию трехмерной модели взаимодействия разных клеточных элементов за основу была принята модель, разработанная Y. David et al. [11] (рис. 1). 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 1,5×10<sup>5</sup>/мл и культивированы в течение суток при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. После этого внутрь вставки были высажены кератиноциты в концентрации 5×10<sup>5</sup>/мл и через 24 часа (клетки обеих линий в состоянии субконфлюэнтного монослоя около 70% площади) был введен гидрогель с мононуклеарной клеточной фракцией (МФ).

Пример гистологического исследования монокомпонентного слоя кератиноцитов и трехмерной культуры на основе клеток (фибробласты, кератиноциты, мононуклеарная фракция) послойно интегрированных с использованием пористой вставки, представлен на рисунках 2 и 3.

Для выделения моноцитов использовали периферическую венозную кровь. Мононуклеары выделяли на градиенте перколла плотностью 1,131 г/мл. Дважды отмывали полученную взвесь мононуклеаров фосфатно-солевым буфером. Подсчитывали количество моноцитов в

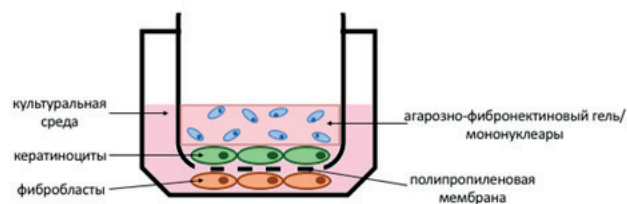


Рисунок 1. – Экспериментальная 3D-модель межклеточных взаимодействий (по David Y. et al. (2013) в нашей модификации)

Figure 1. – 3D culture model (by David Y. et al. (2017) as modified)

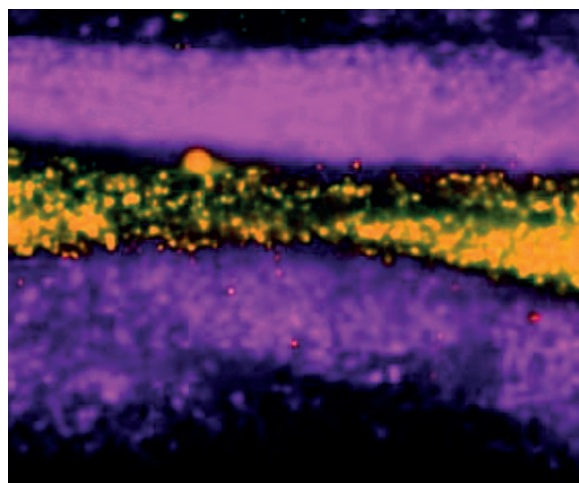


Рисунок 2. – Поперечный срез трехмерной культуры (3D-культуры), иммобилизованной на пористой полипропиленовой мембране. Верхний слой – МФ в составе гидрогеля, средний – кератиноциты, нижний – фибробласты (конфокальная флуоресцентная микроскопия, 40× увеличение)

Figure 2. – 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, 40× magnification)

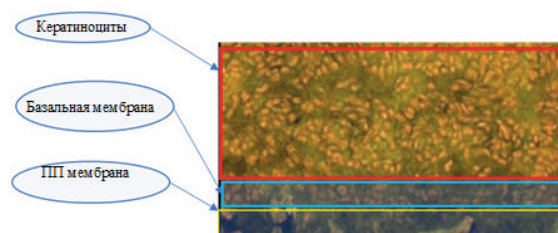


Рисунок 3. – Монокомпонентный кератиноцитарный слой на поверхности пористой полипропиленовой (ППП) мембраны во вставках для культуральных планшетов (окраска нитратом серебра, 20× увеличение)

Figure 3. – Porous polypropylene membrane-immobilized monocomponent keratinocyte layer (silver nitrate staining, 20× magnification)

полученной взвеси в камере Горяева и определяли их жизнеспособность с помощью окраски 1% раствором трипанового синего. 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 флюоресцентной микроскопии).

Полученную 3D-модель совместного культивирования клеток после 4-суточной инкубации использовали для дальнейшего тестирования. Для эксперимента применялась 20% сыворотка и МФ, выделенная из периферической крови пациентов с СДС (с хроническими язвами стоп без признаков активного местного и системного воспаления, согласно рекомендациям WGDF/IDSA [2]) (9 чел.), пациентов с СД 2 типа без СДС (9 чел.) и здоровых доноров без СД (9 чел.). В клеточную культуру вносились следующие цитокины: интерлейкин 1 (ИЛ1) в концентрации 250 пг/мл и ИЛ 4 в концентрации 50 пг/мл. Дополнительно исследовано выделение эндогенных интерлейкинов (ИЛ1, ИЛ4, ИЛ6, ИЛ8) в 3D культуре в присутствии МФ разных групп пациентов. Каждая серия проведена с 3 повторами.

Жизнеспособность клеток определялась согласно протоколу, предложенному для аламарового синего. После инкубации с исследуемыми факторами в каждую лунку было добавлено 22 мкл резазурина с конечной концентрацией 50 мкМ. Планшеты инкубировали в течение 2 часов. Для построения калибровочной кривой кератиноциты и фибробласты высевались отдельно в планшет в разных концентрациях и инкубировались одновременно с тестируемой культурой. Оптическая плотность образцов определялась с помощью планшетного ридера («TECAN» Infinite 200® PRO, Австрия) при длине волны 570 нм, 600 нм. Калибровочная кривая определяла диапазон, на котором сохранялась линейная зависимость между интенсивностью поглощения и числом клеток в культуре. При помощи калибровочной кривой рассчитывалось количество клеток в культуре с исследуемым фактором после инкубации и в контрольном. Процент жизнеспособных клеток определялся как отношение количества клеток в исследуемом образце к контролю. Концентрация ИЛ 1, 4, 6, 8 в культуральной среде определялась с использованием наборов ИФА «Вектор-Бест», РФ с помощью планшетного ридера («TECAN» Infinite 200® PRO, Австрия). Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ИЛ в исследуемых образцах не превышала 5 пг/мл.

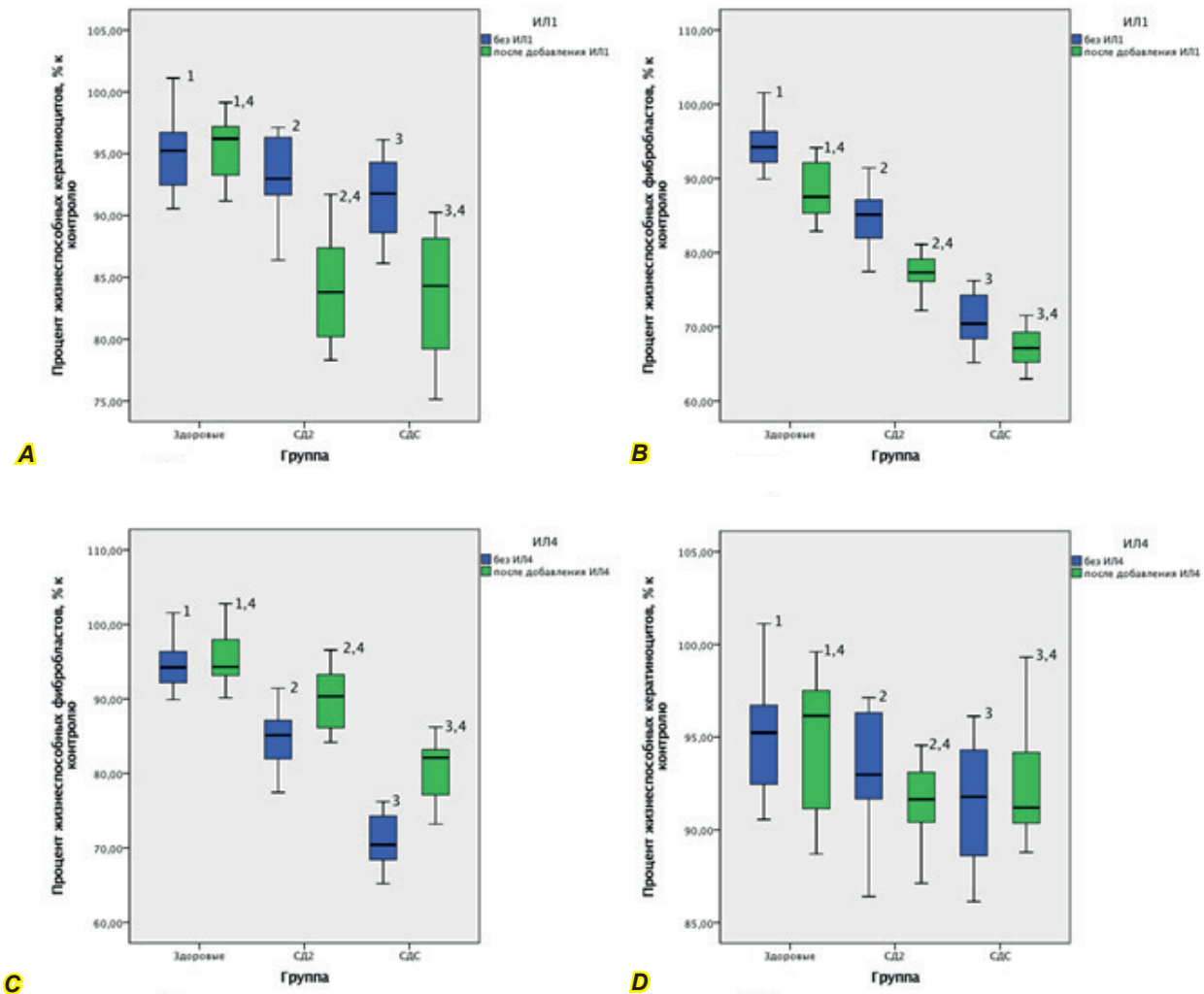
Статистическая обработка данных проводилась с помощью программ SPSS v 23.0 с использованием методов описательной статистики (данные представлены в формате Me [25; 75]), непараметрических методов: для сравнения двух зависимых выборок использовался Т-критерий Вилкоксона, двух независимых выборок – U-критерий Манна-Уитни, трех и более независимых – H-критерий Краскелла-Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Результаты совместного культивирования клеток кожи с мононуклеарами и сывороткой пациентов в отсутствие и при добавлении ИЛ1 и ИЛ4 представлены на рисунке 4. Совместное культивирование кератиноцитов с мононуклеарами и сывороткой крови пациентов с СД2 и СД2 с СДС (рис. 4а) не влияло на жизнеспособность кератиноцитов по сравнению с мононуклеарами и сывороткой здоровых доноров. Процент жизнеспособных кератиноцитов составил: 95,24 [92,30; 97,61]% vs. 92,98 [90,72; 96,50]% vs. 91,78 [88,52; 95,11]%,  $H=3,792$ ,  $p=0,150$ , для группы здоровых доноров, пациентов с СД2 и СД2 с СДС, соответственно. Добавление ИЛ1 в культуру к мононуклеарам и сыворотке пациентов с СД2 и СД2 с СДС приводило к достоверному снижению процента жизнеспособных кератиноцитов – 83,79 [80,15; 87,92]% vs. 92,98 [90,72; 96,50]%,  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$ , 84,32 [78,51; 88,54]% vs. 91,78 [88,52; 95,11]%,  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$  для группы СД2 и СД2 с СДС с ИЛ1 и без ИЛ1, соответственно. Для группы здоровых доноров достоверного влияния ИЛ1 на жизнеспособность кератиноцитов не наблюдалось: 96,21 [92,28; 97,69]% vs. 95,24 [92,30; 97,61]%,  $T=-0,296$ ,  $p=0,767$ , с ИЛ1 и без ИЛ1, соответственно.

Сокультивирование клеток кожи с мононуклеарной суспензией и сывороткой крови у пациентов с СД2 и СД2 с СДС существенно снижало выживаемость фибробластов в 3D системе по сравнению с мононуклеарами и сывороткой здоровых доноров (рис. 4б). Процент жизнеспособных фибробластов составил 94,23 [91,87; 96,55] % vs. 85,13 [80,81; 87,82]% vs. 70,42 [68,10; 74,79]%,  $H=22,861$ ,  $p < 0,001$ , для группы здоровых доноров, пациентов с СД2 и СД2 с СДС, соответственно. Статистически достоверные различия отмечались также в выраженности токсического действия на фибробласты между мононуклеарами и сывороткой пациентов с СД2 и СД2 с СДС –  $p < 0,001$ . Добавление ИЛ1 в культуру к мононуклеарам и сыворотке пациентов приводило к достоверному снижению процента жизнеспособных фибробластов – 87,52 [84,74; 92,64]% vs. 94,23 [91,87; 96,55]%,  $T=-2,547$ ,  $p=0,011$ , 77,31 [75,13; 79,76] % vs. 85,13 [80,81; 87,82]%,  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$ , 67,13 [64,72; 69,74]% vs. 70,42 [68,10; 74,79]%,  $T=-2,192$ ,  $p=0,028$ , для группы здоровых, СД2 и СД2 с СДС с ИЛ1 и без ИЛ1, соответственно.

Добавление ИЛ4 в культуру к мононуклеарам и сыворотке пациентов с СД2 и СД2 с СДС приводило к достоверному увеличению процента жизнеспособных фибробластов после 24 ч инкубации – 90,34 [85,92; 94,74]% vs. 85,13 [80,81; 87,82]%,  $T=-2,668$ ,  $p=0,008$ , 82,10 [76,37; 84,39]% vs. 70,42 [68,10; 74,79]%,  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$ , для группы СД2 и СД2 с СДС с ИЛ4 и без ИЛ4, соответственно. Для сыворотки и мононуклеаров здоровых доноров процент жизнеспособных фибробластов составил 94,30 [92,02; 99,24]% vs. 94,23 [91,87; 96,55]%,  $T=-0,652$ ,  $p=0,515$ , с ИЛ4 и без ИЛ4, соответственно (рис. 4с). Выраженность протективного эффекта ИЛ4 на жизне-



A) 1 нет достоверных различий между группами,  $T=-0,296$ ,  $p=0,767$ ; 2 достоверные различия между группами,  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$ ; 3 достоверные различия между группами,  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$ ; 4 достоверные различия между группами,  $H=16,554$ ,  $p<0,001$ ;  
 B) 1 достоверные различия между группами,  $T=-2,547$ ,  $p=0,011$ ; 2 достоверные различия между группами,  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$ ; 3 достоверные различия между группами,  $T=-2,192$ ,  $p=0,028$ ; 4 достоверные различия между группами,  $H=23,143$ ,  $p<0,001$ ;  
 C) 1 нет достоверных различий между группами,  $T=-0,652$ ,  $p=0,515$ ; 2 достоверные различия между группами,  $T=-2,668$ ,  $p=0,008$ ; 3 достоверные различия между группами,  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$ ; 4 достоверные различия между группами,  $H=17,633$ ,  $p<0,001$ ;  
 D) 1 нет достоверных различий между группами,  $T=-0,059$ ,  $p=0,953$ ; 2 нет достоверных различий между группами,  $T=-1,007$ ,  $p=0,314$ ;  
 3 нет достоверных различий между группами,  $T=-0,533$ ,  $p=0,594$ ; 4 нет достоверных различий между группами,  $H=3,631$ ,  $p=0,163$

**Рисунок 4. – Выживаемость кератиноцитов (A, D) и фибробластов (B, C) при совместном культивировании клеток кожи с мононуклеарами и сывороткой крови разных групп пациентов с добавлением ИЛ1 (A, B) и ИЛ4 (C, D) в 3D-клеточной системе**

A) 1 no significant difference between groups,  $T=-0,296$ ,  $p=0,767$ ; 2 significant difference between groups,  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$ ; 3 significant difference between groups,  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$ ; 4 significant difference between groups,  $H=16,554$ ,  $p<0,001$ ; D) 1 significant difference between groups,  $T=-2,547$ ,  $p=0,011$ ; 2 significant difference between groups,  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$ ; 3 significant difference between groups,  $T=-2,192$ ,  $p=0,028$ ; 4 significant difference between groups,  $H=23,143$ ,  $p<0,001$ ; C) 1 no significant difference between groups,  $T=-0,652$ ,  $p=0,515$ ; 2 significant difference between groups,  $T=-2,668$ ,  $p=0,008$ ; 3 significant difference between groups  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$ ; 4 significant difference between groups,  $H=17,633$ ,  $p<0,001$ ; D) 1 no significant difference between groups,  $T=-0,059$ ,  $p=0,953$ ; 2 no significant difference between groups,  $T=-1,007$ ,  $p=0,314$ ; 3 no significant difference between groups,  $T=-0,533$ ,  $p=0,594$ ; 4 no significant difference between groups,  $H=3,631$ ,  $p=0,163$

**Figure 4. – Fibroblasts (B, C) and keratinocytes (A, D) viability in coculturer with patients mononuclears and IL1(A, B) or IL4 (C, D) in a 3D skin model**

способность фибробластов составила 5,13 [4,15; 7,19]% для мононуклеаров и сыворотки пациентов с СД2 и 9,36 [7,94; 11,28]% для мононуклеаров и сыворотки пациентов с СД3. Процент жизнеспособных кератиноцитов составил 95,5 [92,1; 98,9]% для мононуклеаров и сыворотки пациентов с СД2 и 84,3 [79,3; 89,3]% для мононуклеаров и сыворотки пациентов с СД3.

неспособных фибробластов достоверно различался между группами пациентов с СД2 и СД3 после инкубации с ИЛ4 – 90,34 [85,92; 94,74]% vs. 82,10 [76,37; 84,39]%,  $p<0,001$ . Добавление

**Таблица** – Результаты оценки продукции эндогенных интерлейкинов в комплексной культуре в присутствии мононуклеаров разных групп пациентов

**Table** – Endogenous interleukin production in a 3D culture system (skin cells in cocultures with patients monocytes)

ИЛ, (пг/мл)	Здоровые		СД2		СДС	
	Время инкубации = 0 ч	Время инкубации = 24 ч	Время инкубации = 0 ч	Время инкубации = 24 ч	Время инкубации = 0 ч	Время инкубации = 24 ч
ИЛ1	44,72 [35,37; 48,03]	48,91 [39,66; 51,96]	51,82 [48,43; 55,92]	73,95 [68,13; 75,53]	54,91 [51,17; 62,98]	85,17 [82,99; 91,51]
ИЛ4	<5	<5	<5	<5	<5	<5
ИЛ6	19,75 [13,57; 25,03]	<5	26,28 [20,82; 28,49]	23,76 [22,38; 27,58]	27,54 [24,33; 30,03]	26,12 [23,64; 28,90]
ИЛ8	<5	<5	<5	<5	<5	<5

ИЛ4 в культуру к мононуклеарам и сыворотке пациентов не приводило к достоверному изменению процента жизнеспособных кератиноцитов – 96,15 [90,98; 98,41]% vs. 95,24 [92,30; 97,61]%,  $T=-0,059$ ,  $p=0,953$ , 91,65 [90,30; 93,64]% vs. 92,98 [90,72; 96,50]%,  $T=-1,007$ ,  $p=0,314$ , 91,20 [90,26; 94,64]% vs. 91,78 [88,52; 95,11]%,  $T=-0,533$ ,  $p=0,594$  для группы здоровых, СД2 и СД2 с СДС с ИЛ4 и без ИЛ4, соответственно (рис. 4d).

Дополнительно было исследовано выделение эндогенных интерлейкинов – ИЛ1, ИЛ4, ИЛ6, ИЛ8 – в комплексной культуре кератиноцитов/фибробластов в присутствии мононуклеаров здоровых доноров и пациентов с СД (таблица).

Исходный уровень секреции ИЛ1 в культуральную среду был достоверно выше после добавления мононуклеаров пациентов с СД2 и СД2 с СДС по сравнению с мононуклеарами здоровых доноров – 54,91 [51,17; 62,98] пг/мл vs. 51,82 [48,43; 55,92] пг/мл vs. 44,72 [35,37; 48,03] пг/мл,  $N=10,427$ ,  $p=0,005$ . Достоверных различий для мононуклеаров пациентов с СД2 и СД2 с СДС не выявлено –  $p=0,190$ . Для всех групп мононуклеаров после 24-часовой инкубации регистрировалось достоверное увеличение концентрации ИЛ1 – 48,91 [39,66; 51,96] пг/мл vs. 44,72 [35,37; 48,03] пг/мл,  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$ , 73,95 [68,13; 75,53] пг/мл vs. 51,82 [48,43; 55,92] пг/мл,  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$ , 85,17 [82,99; 91,51] пг/мл vs. 54,91 [51,17; 62,98] пг/мл,  $T=-2,666$ ,  $p=0,008$ , для группы здоровых, СД2 и СД2 с СДС, соответственно. Однако для мононуклеаров здоровых доноров амплитуда увеличения концентрации ИЛ1 за 24 часа инкубации была значительно ниже, чем в группах СД2 и СД2 с СДС – 4,24 [3,65; 5,01] пг/мл vs. 20,21 [18,18; 23,51] пг/мл vs. 30,26 [26,62; 34,95] пг/мл,  $N=22,317$ ,  $p<0,001$ , соответственно. Увеличение концентрации ИЛ1 также было достоверно выше для мононуклеаров пациентов с СД2 с СДС, чем для мононуклеаров пациентов с СД2 без СДС –  $p<0,001$ . Исходная концентрация ИЛ6 также была несколько выше для мононуклеаров пациентов с СД2 и СД2 с СДС, чем здоровых доноров – 26,28 [20,82; 28,49] пг/мл vs.

27,54 [24,33; 30,03] пг/мл vs. 19,75 [13,57; 25,03] пг/мл,  $N=8,892$ ,  $p=0,012$ , для группы СД2, СД2 с СДС и здоровых, соответственно. В образцах с мононуклеарами здоровых доноров уровень ИЛ6 не определялся используемыми наборами (концентрация ИЛ6 составила менее 5 пг/мл, исходя из характеристик наборов ИФА, согласно инструкции по применению). В образцах с мононуклеарами пациентов с СД2 и СД2 с СДС секреция ИЛ6 в культуральную среду сохранялась на прежнем уровне – 26,28 [20,82; 28,49] пг/мл vs. 23,76 [22,38; 27,58] пг/мл,  $T=-1,125$ ,  $p=0,260$  и 27,54 [24,33; 30,03] пг/мл vs. 26,12 [23,64; 28,90] пг/мл,  $T=-1,836$ ,  $p=0,066$  для группы СД2 и СД2 с СДС, соответственно. Концентрация ИЛ4 и ИЛ8 в культуральной среде используемыми ИФА наборами не определялась, что также можно объяснить уровнем данных цитокинов ниже минимальной, достоверно определяемой наборами, концентрации (менее 5 пг/мл).

### Выводы

ИЛ4 в высокой концентрации (50 пг/мл) достоверно увеличивает процент жизнеспособных фибробластов при совместном культивировании клеток кожи с мононуклеарами и сывороткой крови пациентов с СД 2 типа и СД 2 типа с хроническими язвами стоп. Добавление ИЛ1 в супрафизиологической концентрации в культуру потенцирует токсический эффект мононуклеаров пациентов с СД2 и СД2 с СДС на фибробласты и приводит к дополнительному снижению процента жизнеспособных фибробластов; ИЛ1 также приводит к снижению процента жизнеспособных кератиноцитов в 3D-культуре, чего не наблюдается при совместном культивировании клеток кожи с мононуклеарами и сывороткой как здоровых доноров, так и пациентов с СД2 и СД2 с СДС без ИЛ1. Увеличение секреции ИЛ1 и отсутствие достаточного и достоверного снижения секреции ИЛ6 в культуральную среду в течение 24 часов совместной инкубации клеток кожи с мононуклеарами пациентов с СД2 свидетельствует об активации иммунных механизмов и поддержании воспалительного ответа.



## Литература

1. IDF Diabetes Atlas 9<sup>th</sup> Edition [Electronic resource] // International Diabetes Federation. – Mode of access: <https://www.diabetesatlas.org/en/resources/>. – Date of access: 26.05.2020.
2. Interleukin 6 Function in the Skin and Isolated Keratinocytes Is Modulated by Hyperglycemia / E. G. Lee [et al.] // *Journal of Immunology Research*. – 2019. – № 5087847. – P. 1-9. – doi: 10.1155/2019/5087847.
3. Baltzis, D. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights / D. Baltzis, I. Eleftheriadou, A. Veves // *Advances Therapy*. – 2014. – Vol. 31, № 8. – P. 817-836. – doi: 10.1007/s12325-014-0140-x.
4. Effects of Acute Diabetes on Rat Cutaneous Wound Healing / M. C. Komesu [et al.] // *Pathophysiology*. – 2004. – Vol. 11, № 2. – P. 63-67. – doi: 10.1016/j.pathophys.2004.02.002.
5. Mirza, R. Dysregulation of Monocyte/Macrophage Phenotype in Wounds of Diabetic Mice / R. Mirza, T. J. Koh // *Cytokine*. – 2011. – Vol. 56, № 2. – P. 256-264. – doi: 10.1016/j.cyto.2011.06.016.
6. Diabetes Impairs the Late Inflammatory Response to Wound Healing / T. J. Fahey [et al.] // *The Journal of Surgical Research*. – 1991. – Vol. 50, № 4. – P. 308-313. – doi: 10.1016/0022-4804(91)90196-s.
7. Stabilized Interleukin-4-Loaded Poly(lactic-co-glycolic) Acid Films Shift Proinflammatory Macrophages toward a Regenerative Phenotype in vitro / A. M. Ziemba [et al.] // *ACS Applied Bio Materials*. – 2019. – Vol. 2, № 4. – P. 1498-1508. – doi: 10.1021/acsabm.8b00769.
8. Implication of Interleukin-4 in Wound Healing / V. Salmon-Her [et al.] // *Laboratory Investigation*. – 2000. – Vol. 80. – P. 1337-1343. – doi: 10.1038/labinvest.3780141.
9. 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 and Regeneration*. – 2017. – Vol. 25, № 2. – P. 164-176. – doi: 10.1111/wrr.12513.
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 Engineering Part C Methods*. – 2015. – Vol. 21, № 5. – P. 499-508. – doi: 10.1089/ten.TEC.2014.0414.
11. The development of a 3D immunocompetent model of human skin / D. Y. S. Chau [et al.] // *Biofabrication*. – 2013. – Vol. 5, № 3. – P. 035011. – doi: 10.1088/1758-5082/5/3/035011.

## References

1. IDF Diabetes Atlas 9<sup>th</sup> Edition [Internet]. Available from: <https://www.diabetesatlas.org/en/resources/>.
2. Lee EG, Luckett-Chastain LR, Calhoun KN, Frempham B, Bastian A, Gallucci RM. Interleukin 6 Function in the Skin and Isolated Keratinocytes Is Modulated by Hyperglycemia. *Journal of Immunology Research*. 2019;(5087847):1-9. doi: 10.1155/2019/5087847.
3. Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Advances in Therapy*. 2014;1. 31(8):817-836. doi: 10.1007/s12325-014-0140-x.
4. Komesu MC, Tanga MB, Buttros KR, Nakao C. Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. *Pathophysiology*. 2004;11(2):63-67. doi: 10.1016/j.pathophys.2004.02.002.
5. Mirza R, Koh TJ. Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. *Cytokine*. 2011;56(2):256-264. doi: 10.1016/j.cyto.2011.06.016.
6. Fahey TJ, Sadaty A, Jones WG, Barber A, Smoller B, Shires GT. Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. *The Journal of Surgical Research*. 1991;50(4):308-313. doi: 10.1016/0022-4804(91)90196-s.
7. Ziemba AM, D'Amato AR, MacEwen TM, Puhl DL, Koppes AN, Koppes RA, Lennartz MR, Gilbert RJ. Stabilized Interleukin-4-Loaded Poly(lactic-co-glycolic) Acid Films Shift Proinflammatory Macrophages toward a Regenerative Phenotype in Vitro. *ACS Applied Bio Materials*. 2019;2(4):1498:1508. doi:10.1021/acsabm.8b00769.
8. Salmon-Her V, Ramont L, Godeau G, Birembaut P, Guenounou M, Bernard P. Maquart FX. Implication of Interleukin-4 in Wound Healing. *Laboratory Investigation*. 2000;80:1337-1343. doi: 10.1038/labinvest.3780141.
9. 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;25(2):164-176. doi: 10.1111/wrr.12513.
10. Maione AG, Brudno Y, Stojadinovic O, Park LK, Smith A, Tellechea A, Leal EC, Kearney CJ, Veves A, Tomic-Canic M, Mooney DJ, Garlick JA. 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;21(5):499-508. doi: 10.1089/ten.TEC.2014.0414.
11. Chau DYS, Johnson C, MacNeil S, Haycock JW, Ghaemmaghami AM. The development of a 3D immunocompetent model of human skin. *Biofabrication*. 2013;5(3):035011. doi: 10.1088/1758-5082/5/3/035011.

## THE CYTOPROTECTIVE EFFECT OF INTERLEUKIN 4 ON FIBROBLASTS COCULTURED WITH THE MONONUCLEARS OF PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND THOSE WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND CHRONIC FOOT ULCERS IN A 3D CULTURE MODEL

*Mashkova M. A., Mokhort T. V., Goranov V. A.  
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

*Our 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, has proved valuable in investigating these mechanisms and is a useful tool to study interactions between keratinocytes, fibroblasts and immune cells.*

The aim of this study was to evaluate the effect of IL1 and IL4 on the keratinocytes and fibroblasts viability and assess endogenous interleukin (IL1,4,6,8) production into the culture medium by the skin cells cocultured with mononuclears of patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and those with T2DM and chronic foot ulcers (CFU) in a 3D culture model.

The main result of this study was the protective effect of IL4 on fibroblasts – this interleukin (50 pg/ml) significantly increased the percentage of viable fibroblasts cocultured with keratinocytes, mononuclears and blood serum of T2DM patients (85.13 [80.81; 87.82]% vs. 90.34 [85.92; 94.74]%,  $T=-2.668$ ,  $p=0.008$ ) and those with T2DM and CFU (70.42 [68.10; 74.79]% vs. 82.10 [76.37; 84.39]%,  $T = -2.666$ ,  $p=0.008$ ). IL1 in high concentration potentiated the toxic effect of mononuclears in T2DM and T2DM with CFU patients on fibroblasts and also decreased keratinocytes viability in the 3D culture system. An increase in IL1 and absence of a sufficient and significant decrease in IL6 production into the culture medium during 24-hour cocultivation of skin cells with T2DM patients mononuclears indicate the activation of immune mechanisms and the maintenance of persistent inflammatory response.

**Keywords:** 3D skin culture system, diabetes mellitus, chronic foot ulcers, interleukin 1, interleukin 4, interleukin 6.

**For citation:** Mashkova MA, Mokhort TV, Goranov VA. The cytoprotective effect of interleukin 4 on fibroblasts cocultured with the mononuclears of patients with type 2 diabetes mellitus and type 2 diabetes mellitus with chronic foot ulcers in a 3D culture model. Journal of the Grodno State Medical University. 2020;18(4):410-416. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2020-18-4-410-416>.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.  
**Financing.** The study was performed without external funding.

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом.  
**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the local ethics committee.

#### Об авторах / About the authors

\*Машкова Мария Александровна / Mashkova Maryia, e-mail: mashkova.maryia@gmail.com  
Мохорт Татьяна Вячеславовна / Mokhort Tatsiana, e-mail: tatsianamokhort@gmail.com, ORCID: 0000-0002-5040-3460  
Горанов Виталий Анатольевич / Goranov Vitaliy, e-mail: vitgoranov@gmail.com  
\* – автор, ответственный за переписку / corresponding author

Поступила / Received: 10.06.2020

Принята к публикации / Accepted for publication: 01.07.2020



Воронко, Елена Валентиновна. Психодидактическая технология минимизации алекситимии студентов : монография / Е. В. Воронко, Л. В. Маришук ; Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Учреждение образования "Гродненский государственный медицинский университет", Кафедра психологии и педагогики. – Гродно : ГрГМУ, 2020. – 247 с. : рис., табл. – Библиогр.: с. 222-244. – Список собственных (авторских) публикаций: с. 245-247. – ISBN 978-985-595-242-9.

В монографии проанализирована проблема психодидактической алекситимии, методологически обоснована и разработана психодидактическая технология минимизации алекситимии студентов, эмпирически подтверждена эффективность технологии.

Материалы монографии могут использоваться для профессиональной подготовки и переподготовки специалистов психологического и медико-психологического профиля; для разработки профилактических мероприятий по предупреждению нарушения психологического здоровья, для психолого-педагогической поддержки субъектов образовательного процесса; для диагностико-консультативного сопровождения субъектов образовательного процесса специалистами социально-педагогических и психологических служб учреждений высшего образования.