

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ISSN 0041-3771

ЦИТОЛОГИЯ

TSITOLOGIYA

2024. Том 66

2024. Vol. 66

2



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

СОДЕРЖАНИЕ

Том 66, номер 2, 2024

Пуповинная кровь как трофико-ростовая добавка для проведения культуральных работ <i>А. Г. Гончаров, В. В. Шуплецова, Н. Д. Газатова, О. Б. Мелашенко, К. А. Юрова, Л. С. Литвинова</i>	107
Роль гликоделина в конверсии CD11b ⁺ -клеток в MDSC и регуляции их функциональной активности <i>К. Ю. Шардина, С. А. Заморина, М. С. Бочкова, В. П. Тимганова, С. В. Ужвиюк, М. Б. Раев</i>	122
Нокаут <i>PTEN</i> вызывает преждевременное старение эндометриальных стромальных клеток человека <i>П. С. Парфенова, П. И. Дерябин, Д. Ю. Поздняков, А. В. Бородкина</i>	131
Влияние ингибитора активности HSF1 из семейства карденолидов (CL-43) на опухолевые и нетрансформированные клетки <i>С. А. Владимирова, Б. А. Маргулис, И. В. Гужова, А. Д. Никотина</i>	143
Роль кальциевых каналов в регуляции поглощения глюкозы в клеточной <i>in vitro</i> модели поляризованного кишечного эпителия <i>Д. Е. Бобков, А. В. Лукачева, Л. В. Кевер, В. В. Фурман, С. Б. Семенова</i>	150
Трициклический антидепрессант амитриптилин подавляет Ca ²⁺ -ответы в перитонеальных макрофагах крысы <i>Л. С. Миленина, З. И. Крутецкая, В. Г. Антонов, Н. И. Крутецкая</i>	161
Альфа-токоферилсукцинат индуцирует стресс ЭПР, нарушение метаболизма липидов и апоптоз в культуре нормальных и опухолевых клеток эпидермального происхождения <i>М. А. Савицкая, И. И. Захаров, А. А. Саидова, Е. А. Смирнова, Г. Е. Онищенко</i>	173
Исследование связи динамики развития и характера химеризма с проявлениями РТПХ в органах мышей после аллогенной трансплантации цельного костного мозга <i>Е. В. Богданенко, Л. А. Сергиевич, А. В. Карнаухов, Н. А. Карнаухова, И. А. Лизунова</i>	188

CONTENTS

Volume 66, No. 2, 2024

Umbilical blood as a trophic-growth supplement for cultural work

A. G. Goncharov, V. V. Shupletsova, N. D. Gazatova, O. B. Melashchenko, K. A. Yurova, L. S. Litvinova 107

The role of glycodelin in the conversion of Cd11b⁺ cells to MDSC and the regulation of their functional activity

K. Yu. Shardina, S. A. Zamorina, M. S. Bochkova, V. P. Timganova, S. V. Uzhviyuk, M. B. Raev 122

PTEN knockout leads to premature senescence of human endometrial stromal cells

P. S. Parfenova, P. I. Deryabin, D. Y. Pozdnyakov, A. V. Borodkina 131

Effect of the HSF1 inhibitor Cl-43 on tumors and non-transformed cells

S. A. Vladimirova, B. A. Margulis, I. V. Guzhova, A. D. Nikotina 143

Role of calcium channels in glucose uptake regulation in the in vitro model of polarized intestinal epithelium

D. E. Bobkov, A. V. Lukacheva, L. V. Kever, V. V. Furman, S. B. Semenova 150

Tricyclic antidepressant amitriptyline attenuates Ca²⁺ responses in rat peritoneal macrophages

L. S. Milenina, Z. I. Krutetskaya, V. G. Antonov, N. I. Krutetskaya 161

Alpha-tocopheryl succinate induces ER stress, disregulates lipid metabolism and leads to apoptosis in normal and tumorous cell lines of epidermal origin

M. A. Savitskaya, I. I. Zakharov, A. A. Saidova, E. A. Smirnova, G. E. Onishchenko 173

A study of the relationship of the dynamics of development and characteristics of chimerism with manifestations of graft-vs.-host disease in the organs of mice after allogeneic transplantation of whole bone marrow

E. V. Bogdanenko, L. A. Sergievich, A. V. Karnaukhov, N. A. Karnaukhova, I. A. Lizunova 188

УДК 57.085.23;616-03

ПУПОВИННАЯ КРОВЬ КАК ТРОФИКО-РОСТОВАЯ ДОБАВКА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ РАБОТ

© 2024 г. А. Г. Гончаров¹, В. В. Шуплецова¹, Н. Д. Газатова¹,
О. Б. Мелашенко¹, К. А. Юрова¹, Л. С. Литвинова^{1, 2, *}

¹Центр иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета
им. И. Канта, Калининград, 236041, Россия

²Лаборатория клеточных и микрофлюидных технологий Сибирского государственного
медицинского университета, Томск, 634050, Россия

* E-mail: larisalitinova@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.09.2023 г.

После доработки 15.09.2023 г.

Принята к публикации 15.09.2023 г.

В обзоре проанализированы результаты современных высокотехнологичных исследований по применению сыворотки (плазмы) пуповинной крови в качестве добавки к культуральным средам для выращивания клеточных культур. Поскольку питательные среды являются ключевым фактором культивирования клеток, в обзоре рассматривается состав и свойства основных культуральных сред, применяемых в клеточной биологии и регенеративной медицине. Особое внимание авторы уделили факторам роста; описаны функциональные характеристики основных семейств этих полипептидов (факторы роста фибробластов, эпидермальные факторы роста, трансформирующие факторы роста, ростовые дифференцировочные, эпидермальные факторы роста, факторы роста эндотелиальных клеток, гемопоэтические ростовые факторы и др.). Отмечено, что одним из перспективных источников факторов роста является сыворотка (плазма) пуповинной крови. В обзоре приведены основные технологии получения пуповинной крови, а также систематизированы исследования, отражающие содержание ростовых факторов, цитокинов, экзосом и мРНК в пуповинной крови; описаны экспериментальные данные по применению сыворотки пуповинной крови в качестве добавки к культуральным средам для выращивания различных культур клеток животного происхождения. Сыворотка пуповинной крови человека, по сравнению с источниками животного происхождения, является доступным, безопасным продуктом, содержащим высокие уровни биологически активных молекул. Для широкого внедрения ее в качестве добавки к культуральным средам необходима разработка стандартов получения и тестирования этого продукта.

Ключевые слова: пуповинная кровь, сыворотка/плазма, пуповинная кровь, среда для культивирования, животная клетка, фактор роста, цитокин, экзосома, мРНК, культивирование, животная клетка

Принятые сокращения: МСК – мезенхимные стволовые клетки; ПК – пуповинная кровь человека; ФБС – фетальная бычья сыворотка.

DOI: 10.31857/S0041377124020019, EDN: RKMSZJ

Развитие регенеративной медицины предполагает широкое применение одного из основных ее инструментов, а именно клеточных культур различного типа и генеза (de Kinderen et al., 2022; Hassanzadeh et al., 2022; Ríos-Galacho et al., 2022). К клеточным культурам, используемым как в медицинских, так и в научных (экспериментальных) целях, предъявляется ряд требований, которые включают в себя как минимум следующие показатели: высокая степень гомогенности, жизнеспособность, функциональная активность, воспроизводимость. Важной характеристикой культур клеток является “клеточность” – количество жизнеспособных клеток в единице объема.

Среди факторов, оказывающих влияние на этот параметр, помимо метода получения первичной культуры, соблюдения правил асептики и анти-септики и др., важнейшими являются характеристики используемой питательной среды (Price, 2017; Трухан, 2018; Zimmermann et al., 2000).

От состава питательной среды, наличия в ней ростовых факторов зависит метаболизм клетки, ее рост и дифференцировка в том или ином направлении. Источником ростовых факторов могут быть как рекомбинантные белки, полученные, например, на культурах *E. coli* и дрожжевых клеток, высоко очищенные факторы роста, выделяемые из сывороток различного

происхождения, и, наконец, донорская плазма, эмбриональная телячья сыворотка и сыворотка крупного рогатого скота, добавляемые в культуральные среды как источник белка и факторов роста. Альтернативным источником таких добавок в последние годы все чаще рассматривается плазма (сыворотка), получаемая из пуповинной крови человека (ПК).

Цель настоящего обзора — критический анализ современного опыта применения компонентов ПК человека в клеточных культуральных работах и оценка перспектив использования этого сырья для развития (нужд) регенеративной медицины.

СОВРЕМЕННЫЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СРЕДЫ

В настоящее время для оптимального выращивания клеточных культур как в терапевтических, так и в экспериментальных целях на рынке биомедицинских товаров предлагается достаточно широкий выбор коммерческих сред, среди которых можно выделить естественные и синтетические среды. К первым относят различные биологические жидкости, такие как плазма, сыворотка, лимфа, амниотическая жидкость и др. Несмотря на то, что с биологической точки зрения они являются наиболее полноценными (содержат все компоненты для роста и пролиферации клеток), они не нашли широкого применения в биомедицине из-за значительного разброса составляющих ингредиентов, что отражается на качественных и количественных показателях конечного клеточного продукта. Помимо этого, применение таких сред существенно увеличивает риск вирусной или микробной контаминации клеточной культуры. Наибольшее применение нашли синтетические (искусственные) среды, созданные на основе буферных систем. Можно выделить среды, содержащие сыворотку человека или животного и бессывороточные. Последние, особенно безбелковые, с одной стороны, легко стандартизируются, с другой — легко могут быть модифицированы в зависимости от цели исследования с помощью добавок необходимых компонентов (Price, 2017; Трухан, 2018). В зависимости от типа клеток и цели культивирования, такими компонентами являются:

- соли (обеспечение ионами натрия, калия, кальция, поддержание осмолярности);
- заменимые и незаменимые аминокислоты (как исходный материал для синтеза белков);

- углеводы (глюкоза, фруктоза и галактоза в качестве источника энергии);
- белки и пептиды (выполняющие транспортные и адгезивные функции);
- жиры и жирные кислоты (выполняющие энергетическую и пластическую функции);
- витамины (обеспечивающие процессы роста и пролиферации клеток);
- антибиотики и антимикотики (для профилактики бактериальной и грибковой контаминации);
- гормоны и факторы роста (для усиления процессов роста, пролиферации, дифференцировки клеток, их активации).

Ассортимент культуральных сред постоянно обновляется. Тем не менее на рынке присутствуют хорошо зарекомендовавшие себя питательные среды, широко применяемые в научных и производственных работах (Baust et al., 2017). Примером может послужить среда MEM (minimum essential medium) и серия ее модификаций DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium), IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium), используемые для культивирования различных типов клеток, в том числе эмбриональных и гибридов (Зорин и др., 2014); RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), среды F-12 и F-10, применяемые для основного спектра клеточных культур. Для отмывания клеточных культур и в качестве базовых оснований для приготовления питательных сред при культивировании животных клеток часто используют растворы Хэнкса (Hanks' balanced salt), Эрла (Earle's balanced salts) (Колокольцева и др., 2016; Phelan, May, 2017) и др.

В настоящее время появляются новые типы сред без добавления сыворотки или с понижением ее концентрации. Они предназначены для роста и пролиферации конкретных клеточных типов (гибридомные, нейрональные, стволовые, эмбриональные, iPSc) или их дифференцировки (остео-, хондро-, адиподифференцировки). Такие среды, как правило, содержат два компонента: базовую среду и комплекс ростовых и (или) дифференцировочных компонентов, добавляемых непосредственно перед проведением культуральных работ (StemPro hESC SFM, StemPro MSC SFM XenoFree, NutriStem® hPSC XF Culture Media, NutriStem® hPSC GF-free) (Зорин и др., 2014). Выбор культуральной среды определяется целями и задачами исследования, а грамотный подбор добавочных компонентов позволяет получить культуру клеток высокого качества (Трухан, 2018).

ФАКТОРЫ РОСТА И ИХ ИСТОЧНИКИ

Факторы роста — это разнообразные и многочисленные полипептиды, объединенные, как правило, в специфические семейства. Их функции осуществляются по эндокринным, паракринным и аутокринным механизмам. В организме они могут играть роль митогенов, хемоаттрактантов, регуляторов миграции и дифференцировки, выступают в качестве сигнальных молекул и регуляторов нормального и патологического неоангиогенеза. Данные полипептиды могут быть как естественного (донорская плазма крови, тромболизат, сыворотка пуповинной крови, фетальная сыворотка животных) (Vlaski-Lafarge et al., 2020; Widyaningrum et al., 2021; Custo et al., 2022; Li et al., 2022; Lopez et al., 2022), так и искусственного происхождения, полученные в биотехнологических процессах с использованием клеточных линий и рекомбинантных микроорганизмов, например бактерий *Escherichia coli* или дрожжей (Belladonna, Grohmann, 2013; Hessefort et al., 2021; Zhou et al., 2021; Balaban et al., 2022).

Ростовые факторы могут использоваться как самостоятельные фармакологические препараты (Zhang et al., 2018; Sousa et al., 2021; Nandi et al., 2022), а также как дополнительные компоненты питательных сред при наращивании клеток в научных, доклинических исследованиях и при производстве клеточных препаратов для клинического применения. Часть этих факторов оказывает влияние на рост и дифференцировку нескольких типов клеток, другая специфично влияет на единичные клеточные линии. Иногда один тип клеток может быть простимулирован разными ростовыми факторами. К ростовым факторам в настоящее время относят более сотни полипептидных биоактивных молекул. Некоторые из них применимы в клеточном культивировании для поддержания пролиферативной активности и сохранения морфофункционального статуса клеток в культуре.

Семейство факторов роста фибробластов (FGF) насчитывает более 20 членов и помимо фибробластов контролируют пролиферацию и дифференцировку многих других клеток, а также принимают участие в процессах ангиогенеза. В клеточных технологиях применима чаще всего основная изоформа этого семейства bFGF. Ряд его представителей играют значимую роль в неоангиогенезе опухолевых процессов и имеют прогностическое значение (Ornitz, Itoh, 2015; Jing et al., 2016; Markan, Potthoff, 2016; Farooq et al., 2021; Sun C. et al., 2022). Фактор KGF (FGF7) специ-

фичен для эпителиальных клеток, его митогенная активность преимущественно проявляется в кератиноцитах. Он важен в морфогенезе эпителия, реэпителизации ран, развитии волос и легких, на стадии раннего органогенеза. В ряде клинических испытаний показана его эффективность в терапии поражений эпителия (Yen et al., 2014; Sadeghi et al., 2021; Bartolo et al., 2022; Shimizu et al., 2022).

Надсемейство эпидермальных факторов роста (EGF) рассматривается отдельно в специальной литературе. Его первый представитель фактор EGF стимулирует рост и пролиферацию эпителиальных, глиальных клеток, фибробластов, является активным участником эмбриогенеза (Pikula et al., 2015; Richani, Gilchrist, 2018; Liu et al., 2022). Близко связан с ним фактор HB-EGF — гепаринсвязывающий белок, участвующий в процессах пролиферации и миграции клеток эпителиального покрова (Taylor et al., 2014; Kuo et al., 2019; Anderegg et al., 2021; Li et al., 2021).

Трансформирующие факторы роста (TGF) — большое суперсемейство, включающее около 40 членов. Его представители TGF- α , TGF- β — многофункциональные цитокины, играющие ключевую роль в регуляции роста, дифференцировки и метаболизма различных типов клеток в норме и при различных патологиях (Dewidar et al., 2019; Tominaga, Suzuki, 2019; Yamada et al., 2019; Muscella et al., 2020; Ishibashi, Isohama, 2021; Sulaiman et al., 2021).

Ростовые дифференцировочные факторы (GDF) оказывают регуляторное и протекторное действие на клетки многих органов и тканей (гепатопротекторы, кардиопротекторы, нейропротекторы, хондропротекторы), могут являться биомаркерами развития ряда патологий (Stavropoulos, Wikesjo, 2012; Абишева и др., 2017; Hodgkinson et al., 2019; Rochette et al., 2020).

Фактор миостатин оказывает широкое регуляторное действие на клетки мышечных тканей (Baig et al., 2022; Esposito et al., 2022; Venugopal et al., 2022).

Значимыми и активно изучаемыми представителями надсемейства EGF также являются амфирегулин (AR), бетацеллюлин (BTC), нейрегулины (NRG), эпирегулин (EPR), эпиген, являющиеся лигандами и факторами-предшественниками при запуске каскада действия комплекса ростовых факторов в процессе физиологической и репаративной регенерации (Berasain, Avila et al., 2014; Zaiss et al., 2015; Huang et al., 2020; Diaz-Saez et al., 2021; Laplace-Builhe et al., 2021; Lees-Shepard

et al., 2021; Wang et al., 2021; Dong et al., 2022; Singh et al., 2022).

Факторы группы роста BMP первоначально открыты благодаря их способности воздействовать на формирование кости и хряща. Сейчас показано, что белки BMP — одна из основных групп морфогенетических сигнальных белков, которые организуют построение тканей в теле и имеют прогностическое значение (Chung et al., 2018; Lowery, Rosen, 2018; Heubel, Nohe, 2021; Ponomarev et al., 2021; Yan, Wang et al., 2021).

Факторы роста эндотелиальных клеток — ECGF, митогенный фактор роста эндотелиальных клеток сосудов, влияет на функциональную активность моноцитов/макрофагов, стимулирует нейрогенез. Представители семейства ECGF1 и ECGF2 идентичны кислом (FGF1) и основному (FGF2) фактору роста фибробластов (Drouin et al., 2013; Chen et al., 2020; Marei et al., 2022).

Факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) — отдельное семейство факторов, синергичных ECGF и FGF. Отдельные представители семейства являются непосредственными регуляторами ангиогенеза, другие выступают предшественниками других ростовых факторов (bFGF, PDGF), тем самым, опосредовано участвуя в пролиферации эндотелиальных клеток (Lee et al., 2021; Sousa et al., 2021; Eguchi et al., 2022).

Инсулиноподобные факторы роста (IGF), ингибируя протеинкиназу B, тормозят развитие апоптоза и стимулируют рост и пролиферацию различных клеток (Al-Samerri, Radovick, 2021; Lin et al., 2021).

Фактор роста нервной ткани (NGF) усиливает рост и пролиферацию нейронов и поддерживает рост β -клеток поджелудочной железы (Ibrahim et al., 2022; Oo, Hunter, 2021; Reis et al., 2022; Ostrovskaya, Ivanov, 2022).

Факторы роста тромбоцитов (PDGF) — группа полипептидов, включающая пять изоформ. Являясь митогенами для клеток мезенхимного происхождения, играют важную роль в выживании и регенерации фибробластов, остеобластов, гладкомышечных и глиальных клеток (Wang et al., 2016; Kazlauskas, 2017; Gillman et al., 2021; Sun J., et al., 2022).

Гемопоэтические ростовые факторы представляют собой группу полипептидов, регулирующих пролиферацию, дифференцировку и миграцию клеток крови, в том числе и иммунокомпетентных клеток. К этим факторам можно отнести моноцитарно-гранулоцитарные факторы роста:

M-CSF (CSF1), G-CSF (CSF3), GM-CSF — регуляторы гранулоцитарного звена лейкоцитов, а также стромальных тканевых предшественников, таких как МСК. EPO — регулятор митогенеза и дифференцировки предшественников эритроцитарного ряда; THPO (TPO, MGDF) — стимулятор и регулятор тромбоцитопоэза; SCF (KL) — фактор роста стволовых клеток, стимулирующий не премированные гемопоэтические клетки и их комитированные предшественники (Dougan et al., 2019; Kim et al., 2020; Mun et al., 2020; Nakamura-Ishizu, Suda, 2020).

С учетом того, что ряд ростовых факторов участвует в процессе канцерогенеза, их применение в клинике и при производстве биомедицинских клеточных продуктов требует продуманной стратегии и расчета концентраций (Taeger et al., 2011; Франциянц и др., 2020; Derynck et al., 2021). Однако альтернативой применения единичных изолированных и/или синтезированных ростовых факторов могут стать природные источники регуляторов метаболизма, дифференцировки и пролиферации. Основными источниками дополнительных компонентов для питательных сред в настоящее время являются лошадиная сыворотка, сыворотка крупного рогатого скота, телячья эмбриональная (фетальная) сыворотка. В специальной литературе описано применение лизата донорской тромбоцитарной массы (Schär et al., 2015; Noh et al., 2018; Ziegler et al., 2019; Imam et al., 2022). Использование сыворотки (плазмы) пуповинной крови также считается перспективным источником дополнительных компонентов в составе культуральных сред (Гончаров и др., 2021).

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПУПОВИННОЙ КРОВИ

Применение пуповинной крови в качестве донорской было начато в Советском Союзе еще в начале 30-х годов прошлого столетия. Были разработаны нормативные документы, регламентирующие организацию, сбор, хранение и использование этого ценного продукта для переливания крови. Однако в послевоенные годы с развитием службы крови такая практика не получила развития. В настоящее время заготовка пуповинной крови выполняется в ряде родовспомогательных учреждений, в первую очередь для получения гемопоэтических стволовых клеток для последующей трансплантации ее пациентам со злокачественными заболеваниями крови. Плазма (сыворотка) пу-

повинной крови остается пока невостребованным продуктом.

В РФ зарегистрировано несколько банков пуповинной крови, объединенных в Ассоциацию “Рускорд” (<https://ruscord.com>), основной целью которой является содействие развитию надлежащей клинической и лабораторной практики на всех этапах работы с пуповинной кровью. В настоящее время есть ряд законодательных актов, напрямую и косвенно регламентирующих заготовку продуктов, получаемых из пуповинной крови: Федеральный закон “О донорстве крови и ее компонентов” от 20.07.2012 № 125-ФЗ; Национальные стандарты РФ ГОСТ Р 52938-2008 “Кровь донорская и ее компоненты. Контейнеры с консервированной кровью или ее компонентами. Маркировка”, ГОСТ Р 53434-2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)”.

Взятие пуповинной крови в родильном доме включает в себя несколько этапов. Предварительно, как и в любой процедуре забора биологического материала, исследователю необходимо заручиться одобрением локального этического комитета, подготовить информационный листок для пациента, получить информированное согласие на получение образца пуповинной крови у матери будущего ребенка. По действующему законодательству именно она является в данном случае донором (Национальный стандарт РФ ГОСТ Р ИСО 13022–2016 “Продукты медицинские, содержащие жизнеспособные человеческие клетки. Применение менеджмента риска и требований к методикам обработки”).

Кровь забирают из пуповинной вены сразу после отсечения пуповины в гематологический контейнер. Объем получаемой крови может составлять от 30 до 80 мл. Описанная манипуляция безболезненна, безопасна для матери и ребенка. Риск бактериального заражения пуповинной крови минимален и обеспечивается соблюдением стандартных операционных процедур. Примером таких детализированных поэтапных процедур могут быть разработанные О.В. Тюминой с соавторами (2012) процедуры заготовки пуповинной крови. Применение автоматического или дискретного плазмафереза, хорошо зарекомендовавшего себя на станциях переливания крови, для получения плазмы из ПК ввиду небольших ее объемов не оптимально.

Фракционирование крови объемом до 80 мл наиболее удобно проводить центрифугированием (Белобородов, Кельчевская, 2020). Вопрос

о преимуществах того или иного вида антикоагулянтов, например на основе цитрата натрия, которые широко используются службой крови, остается открытым. Требуется дополнительно изучить влияние разных антикоагулянтов на уровень и активность факторов роста, присутствующих в плазме ПК. Для получения сыворотки, в которой, по мнению ряда исследователей, концентрация цитокинов выше по сравнению с плазмой ПК, возможно применение гемоконтейнеров (стерильных шприцев) без добавок антикоагулянтов и гемоконсервантов.

Содержание ростовых факторов, цитокинов, экзосом и мРНК в пуповинной крови. Получаемая из ПК сыворотка (плазма) в последние годы рассматривается как перспективный источник компонентов для проведения культуральных работ. В плазме пуповинной крови выявляется значительное количество цитокинов: IL-1 β , IL-6, IL-1 α , IL-4, IL-10, IL-13, IL-2, IL-7, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-5, IL-9, IL-15, G-CSF, GM-CSF, PDGF-bb, FGF-2, VEGF, IL-8, эотаксин, MCP-1, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, 6Cine, BCA-1, CTACK, ENA-78, эотаксин 2 и 3, фракталкин, GCP, Gro- α , Gro- β , I-309, I-TAC, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC, MIF, MIG, MIP-3 α , MIP3- β , MPIF-1, SCYB16, SDF-1 α b, TARC, TERC (Garanina et al., 2017; Sane et al., 2018).

Среди преимуществ этого биологического продукта можно отметить его доступность, наличие в составе практически всех факторов для роста и дифференцировки тканей, отсутствие ксеногенных компонентов. Содержание в ПК (сыворотке) цитокинов (в том числе ростовых факторов) в значительной степени лабильно (Garanina et al., 2017).

В ряде публикаций отмечено, что в плазме ПК, по сравнению с донорской плазмой, на фоне относительно повышенных уровней хемокина IL-8 и ряда факторов роста (M-CSF, HGF, PDGF-BB, SCGF- β , IL-8 и SCF, VEGF, G-CSF, EGF, FGF) регистрируются более низкие концентрации провоспалительных цитокинов (Романов, Романов, 2018; Ehrhart et al., 2018; Romanov et al., 2019). Отмечается также, что плазма ПК содержит более высокие концентрации основных ростовых факторов TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 2, TGF- β 3, EGF, HGF, PDGF-BB, VEGF-A и D, чем донорская (Rhéaume et al., 2021).

В то же время плазма и сыворотка ПК содержит более низкие концентрации IGF-I и II (Rhéaume et al., 2022). Важно отметить, что авторы подчеркивают более высокую “функциональность”

сыворотки/плазмы ПК по сравнению с фетальной бычьей сывороткой при культивировании клеточных линий. Кроме того, исследователи отмечают, что при использовании в качестве культуральной добавки эмбриональной бычьей сыворотки (в отличие от плазмы ПК) мезенхимальные стромальные клетки в большей степени экспрессировали маркеры, характерные для остеогенной активности, что является признаком нежелательной дифференцировки (Rallapalli et al., 2021).

В плазме ПК регистрируются достаточно высокий уровень глюкозы и более низкое содержание глутамата, лактата, а также аминокислот аланина, лейцина, изолейцина и валина. По содержанию протеиногенных аминокислот, нуклеотидов, липидов плазма ПК соответствует широко применяемой в культуральных работах фетальной телячьей сыворотке. Использование плазмы ПК для культивирования клеток пульпы зуба показало улучшение метаболических характеристик клеточной линии по сравнению с применением телячьей эмбриональной сыворотки (Caseiro et al., 2018; Rhéaume et al., 2022).

Как правило, концентрация биологически активных молекул в сыворотке ПК выше по сравнению с плазмой ПК (Caseiro et al., 2018; Romanov et al., 2019). В целом можно отметить, что концентрации цитокинов в плазме (сыворотке) ПК превышают таковые в донорской плазме и в эмбриональной телячьей сыворотке, однако уровень некоторых компонентов достаточно вариабелен. Подчеркивается, что индивидуальные особенности донора ПК, такие как возраст, число родов, наличие воспалительного заболевания, срок беременности, способ родоразрешения, оказывают существенное влияние на состав пуповинной крови. Важно отметить, что это касается не только содержания в ПК гемопоэтических стволовых клеток, но и ряда биологически активных молекул (D'Arena et al., 1996; Campagnoli et al., 2000; Pranke et al., 2006; Dauber et al., 2011; Танасийчук и др., 2017).

Например, описан более низкий уровень IL-6 в ПК при родоразрешении посредством планового кесарева сечения, чем при нормальных родах, тогда как содержание IL-8, IL-16 сопоставимо (Denihan et al., 2013; Barug et al., 2014). Другие авторы выявили более высокое содержание IL-1 β в ПК у рожениц, которым было проведено экстренное кесарево сечение, чем у женщин, у которых были нормальные роды или плановое кесарево сечение (Gedikbaşı et al., 2014). Описано влияние времени года рождения ребенка на со-

держание IL-5, IL-10 и IFN- γ в ПК: наибольшие уровни этих цитокинов отмечали в осенний период (Keski-Nisula et al., 2010). У рожениц с воспалительными заболеваниями описан повышенный уровень провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α и др.) не только в материнской крови, но и в ПК (Pickler et al., 2010; Che et al., 2022).

Особый интерес вызывают данные о содержании ангиопоэтических факторов и микроРНК в ПК, полученной от доношенных и недоношенных детей. Описано, что проангиогенные факторы, такие как VEGF, ангиопоэтин-1, PDGF-AA, FGF-a и FGF-b (в отличие от эндостатина и тромбоспондина-2) были в более низкой концентрации в ПК, собранной у недоношенных новорожденных, чем у доношенных детей. Кроме того, у недоношенных новорожденных была существенно снижена экспрессия участвующих в ангиогенезе микроРНК (MiR-125, MiR-126, MiR-145, MiR-150) (Gródecka-Szwajkiewicz et al., 2020).

Наличие в сыворотке ПК микроРНК, широкого спектра цитокинов, биологические эффекты этих продуктов в свою очередь свидетельствует о присутствии в этих средах важнейшего компонента пуповинной крови — микровезикул (экзосом). Экзосомы, являющиеся членами семейства внеклеточных везикул, происходят из различных клеток и играют существенную роль в регуляции гомеостаза, обеспечивая межклеточные коммуникации (Meldolesi, 2018; Skuratovskaia, 2021). Биологические эффекты экзосом определяются их содержанием, зависящим от клетки-родительницы, в первую очередь — от гемопоэтических клеток ПК. Микровезикулы содержат белки (в том числе белки комплекса МНС (стресс-белки)), липиды, регуляторные микроРНК и кодирующие матричные РНК. Из внеклеточной среды функциональные молекулы экзосом путем фагоцитоза, эзоцитоза или слияния с плазматической мембраной попадают в клетку-мишень, модулируют экспрессию генов, меняя метаболизм клетки, активируя процессы регенерации и восстановления (Yáñez-Mó et al., 2015; Terashvili, Bosnjak, 2018; Pietrowska et al., 2019). Внесение малых внеклеточных везикул в высоких концентрациях в различные клеточные культуры, а также их внутривенное введение грызунам продемонстрировало, что они не обладают высокой токсичностью (Rodrigues et al., 2021).

В литературе нам не удалось найти сведений, отражающих содержание экзосом в плазме/сыворотке ПК, что, по-видимому, связано с гете-

рогенностью их размеров и состава (Jeppesen et al., 2019). О количестве экзосом в биологической жидкости можно судить по количеству микро-РНК, однако их определение затруднено присутствием альбуминов (Pietrowska et al., 2019). Оценка количества микровезикул существенно зависит от метода их выделения (ультрацентрифугирование, ультрафильтрация в сочетании с эксклюзионной хроматографией, фракционирование на градиенте плотности, применение набора реагентов ExoQuick или реагента для полной изоляции экзосом (TEI)) (Tang et al., 2017; Jeppesen et al., 2019; Cardoso et al., 2021). По-видимому, содержание экзосом в ПК, как и содержание цитокинов, их спектр, варьирует в достаточно широком диапазоне и зависит от множества факторов, начиная от течения беременности и заканчивая родами.

Важно отметить, что содержание факторов роста в разных продуктах получаемых из ПК (плазма, сыворотка, индуцированная сыворотка и плазма, обогащенная фактором роста), различаются по концентрации ростовых пептидов, что позволяет в перспективе целенаправленно создавать добавки с разными свойствами (Rhéaume et al., 2022; Rhéaume et al., 2022). В связи со сказанным ранее вопросы стандартизации получения ПК и, соответственно, плазмы ПК имеют принципиальное значение.

Как уже упоминалось, для получения плазмы ПК авторы использовали разные методологические подходы: подбор доноров, анализ их анамнеза, методику забора ПК, различные по составу антикоагулянты и режимы центрифугирования. По-видимому, потребуется значительная работа по унификации подходов к процедуре забора ПК и получения из нее конечных продуктов, выбора одного или нескольких основных компонентов, которые позволяли бы судить о составе продукта. Возможным подходом к стандартизации состава добавки из плазмы ПК, вероятно, может стать технология пулирования образцов от нескольких доноров, что позволит усреднить концентрацию цитокинов и других компонентов.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ СЫВОРОТКИ/ ПЛАЗМЫ ПК В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ РАБОТАХ

Клеточные линии, на основе которых получают биомедицинские клеточные продукты, должны быть в первую очередь безопасны. С этой точки зрения применение ПК для культивирования клеток, по сравнению с сывороткой крупного

рогатого скота, более оптимально, поскольку оно снижает риск заражения вирусами, прионами, бактериями, микоплазмами, дрожжами, грибами и эндотоксинами (Simonetti et al., 2007; Pereira et al., 2014; Dessels et al., 2016; Bui et al., 2021).

Важны вопросы экономической целесообразности применения продуктов ПК в культуральных работах и их эффективности с точки зрения характеристик (качества) получаемых клеточных культур. К настоящему времени накоплен достаточно большой опыт применения плазмы и сыворотки, полученной из ПК для получения первичных культур и культивирования самых разнообразных клеточных линий (различных типов мезенхимных стволовых клеток, клеток нервной ткани, эндотелиальных клеток и др.).

Описаны положительные эффекты добавления в культуральную среду сыворотки и плазмы ПК в технологиях масштабирования как стволовых гемопоэтических клеток CD34⁺, так и МСК, полученных из других источников (Esmaeli et al., 2016; Hassan et al., 2017; Caseiro et al., 2018; Pour et al., 2020; Rallapalli et al., 2021; Afzal et al., 2023). Эти компоненты добавляли в культуральную среду, не содержащую сыворотки животных, как источник ростовых факторов для поддержания роста и дифференцировки клеток (Kwok et al., 2007; Murphy et al., 2012; Wu et al., 2015; Blázquez-Prunera et al., 2017; Pour et al., 2020; Rallapalli et al., 2021). Использование продуктов ПК позволило существенно сократить время удвоения популяции МСК (от 30 до 48 ч) по сравнению с культурой клеток с добавкой ФБС (от 38 до 95 ч), что способствовало увеличению количества клеток, пригодных для клинического применения за наименьшее количество пассажей.

Культуры МСК, полученные с добавками продуктов из ПК, сохраняли свою морфологию и способность дифференцироваться в адипоциты и остециты, экспрессия поверхностных маркеров CD90, CD105 и CD44 была значительно выше по сравнению с культурами, в которые добавляли ФБС (Hassan et al., 2017). Подобные результаты описаны в работе, в которой культивирование МСК в среде, содержащей 5–10% пуповинной сыворотки, способствовало десятикратному увеличению популяции клеток, тогда как использование коммерческой ФБС демонстрировало показатели в два раза ниже (Afzal et al., 2023).

В литературе описано применение в культуральных работах сыворотки ПК в сочетании с кондиционированной средой или в комбина-

ции с лизатом тромбоцитов. Кондиционированная среда, полученная при культивировании МСК, существенно повышала скорость их пролиферации и миграции МСК и стромальных клеток костного мозга. Кондиционированная среда индуцировала секрецию VEGF-A и остеопротегерина, что способствовало ангиогенезу эндотелиальных клеток и положительно влияло на остеогенную дифференцировку МСК (Sane et al., 2018).

Применение плазмы ПК, обогащенной лизатом тромбоцитов ПК, в качестве ростовой добавки для культивирования МСК пуповины направляло и поддерживало остеобластическую дифференцировку этих клеток (Baba et al., 2019). В пользу применения плазмы ПК также говорят и результаты сравнительной оценки влияния ФБС и сыворотки ПК, полученной с использованием гидроксипропилкрахмала, на основные характеристики МСК пуповины (Pour et al., 2020). Показано, что экспрессия гена *hTERT*, являющегося ключевым в поддержании стабильности генетического аппарата клетки в процессе ее многократного деления, была выше, чем при использовании ФБС (Pour et al., 2020).

При использовании плазмы ПК для культивирования клеток пульпы зуба отмечали улучшение метаболических характеристик клеточной линии по сравнению с телячьей эмбриональной сывороткой (Caseiro et al., 2018).

Для культивирования стромальных клеток эндометрия были протестированы различные варианты сывороток, в том числе плазма, полученная из ПК, и плазма крови взрослого человека (de Miguel-Gómez, 2021). В результате наибольшее увеличение пролиферации *in vitro* и скорости миграции было обнаружено в той модели, где использовали плазму ПК. Так же и в эксперименте *in vivo* на мышах поврежденная ткань матки экспрессировала больше прорегенеративных маркеров (Stat5a, Uba3, Thy1) после применения плазмы ПК, чем после обогащенной тромбоцитами плазмы крови взрослого донора (de Miguel-Gómez et al., 2021).

Сравнительная оценка жизнеспособности мезенхимных клеток ПК, культивированных в полной питательной среде, содержащей или пуповинную плазму, или плазму взрослого донора, или эмбриональную бычью сыворотку, продемонстрировала высокую долю жизнеспособных клеток при культивировании в присутствии именно плазмы взрослого человека. Интересно, что в культуре с использованием плазмы ПК было

зафиксировано значительно большее соотношение живых клеток к мертвым, а количество апоптотических клеток было наименьшим, нежели в других вариантах культуры (Ehrhart et al., 2018).

Есть сообщение об успешном использовании сыворотки ПК человека вместо фетальной бычьей для культуры *ex vivo* лимбальных эпителиальных клеток, используемых для клинической трансплантации (Chakraborty et al., 2013). При этом результаты сравнительного анализа морфологии клеток и их пролиферативной активности оказались аналогичными при использовании фетальной бычьей сыворотки и сыворотки ПК.

Сыворотка, полученная из ПК человека, была успешно протестирована на культуре клеток фибробластов. Так, помимо высокой скорости пролиферации, линии фибробластов сохраняли плюрипотентность и кариотипическую стабильность в процессе длительного культивирования (Rungsiwut et al., 2016). В другой работе авторы не отметили преимуществ плазмы ПК перед стандартно применяемой ФБС при культивировании МСК (Ding et al., 2013).

В целом публикации о применении плазмы/сыворотки ПК при культивировании клеток свидетельствуют о ее существенных преимуществах: доступности, относительной безопасности для культивирования (пролиферации) и последующего клинического применения МСК (Pour et al., 2020). Кроме того, криоконсервация ПК не влияет на ее свойства (Baba et al., 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для развития регенеративной медицины принципиальное значение имеет получение жизнеспособных культур клеток с заданными свойствами и в количестве, способном обеспечить терапевтический эффект. Необходимым условием для этого является разработка оптимальных методов культивирования, в которых важнейшим компонентом выступают ростовые факторы. Плазма/сыворотка, полученная из пуповинной крови человека, в сравнении с источниками животного происхождения выступает уникальным продуктом, обладающим рядом ценных характеристик — безопасностью, более высоким содержанием биологически активных молекул, что открывает широкие перспективы для их применения в области клеточных технологий. Мы считаем, что, несмотря на необходимость уточнения состава сыворотки ПК и механизма действия, созрели условия для широкого внедрения

этих продуктов в практику. Ключевыми преимуществами использования пуповинной сыворотки является то, что ее можно легко и массово получить из ПК. Она не содержит патогенов животного происхождения и имеет значительно более низкую иммуногенность. Безусловно, необходимо усовершенствовать и стандартизировать методы получения и тестирования плазмы/сыворотки ПК, разработать протоколы применения этого продукта для различных клеточных линий. Немаловажной в настоящее время характеристикой плазмы/сыворотки ПК является ее доступность и относительно невысокие затраты на ее получение.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа профинансирована за счет средств бюджета Балтийского федерального университета им. И. Канта (госзадание № FZWM-2024-0012).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абишева З.С., Журунова М.С., Жетписбаева Г.Д. 2017. Влияние белка GDF11 (growth differentiation factor-11) на организм (обзорная статья). Вестник КазНМУ. Т. 2. Р. 227. (Abisheva Z.S., Zhurunova M.S., Zhetpisbaeva G.D. 2017. The effect of GDF11 protein (growth differentiation factor-11) on the body (review article). Bulletin of KazNMU. V. 2. P. 227).
- Белобородов В.А., Кельчевская Е.А. 2020. Переливание крови и ее компонентов: учеб. пособие. ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, Иркутск: ИГМУ. 87 с. (Beloborodov V.A., Kelchevskaya E.A. 2020. Transfusion of blood and its components: textbook. allowance. FGBOU VO ISMU of the Ministry of Health of Russia, Irkutsk: ISMU. 87 p.)
- Гончаров А.Г., Юрова К.А., Шуплецова В.В., Газатова Н.Д., Мелашченко О.Б., Литвинова Л.С. 2021. Характеристика пуповинной крови и ее использование в клинической практике. Цитология. Т. 63. № 5. С. 411. (Goncharov A.G., Yurova K.A., Shupletsova V.V., Gazatova N.D., Melashchenko O.B., Litvinova L.S. 2021. Characterization of cord blood and its use in clinical practice. Tsitologiya. V. 63. P. 411). <https://doi.org/10.31857/S0041377121050059>
- Зорин В.Л., Копнин П.Б., Зорина А.И., Еремин И.И., Лазарева Н.Л., Чаузова Т.С., Самчук Д.П., Петрикина А.П., Еремин П.С., Корсаков И.Н., Гринаковская О.С., Котенко К.В., Пулин А.А. 2014. Оптимизация условий получения и ведения культур фибробластов кожи и десны человека. Гены & Клетки. Т. IX. № 2. С. 53. (Zorin V.L., Koprnin P.B., Zorina A.I., Eremin I.I., Lazareva N.L., Chauzova T.S., Samchuk D.P., Petrikina A.P., Eremin P.S., Korsakov I.N., Grinakovskaya O.S., Solovieva E.V., Kotenko K.V., Pulin A.A. 2014. Optimization of conditions of skin and gingival mucosa derived human fibroblasts obtainment and cultivation. Genes and Cells. V. IX. P. 53).
- Колокольцева Т.Д., Сабурова И.Н., Кубатиев А.А. 2016. Современные способы выделения и культивирования клеток человека и животных: учебное пособие. М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО. 50 с. (Kolokoltseva T.D., Saburina I.N., Kubatiev A.A. 2016. Modern isolation and cultivation of human and animal cells: a textbook. Moscow: FGBOU DPO RMANPO. 50 p.)
- Литвинова Л.С., Гончаров А.Г., Шуплецова В.В., Газатова Н.Д., Мелашченко О.Б., Юрова К.А., Пестрикова А.А. 2020. Анализ правового регулирования обращения пуповинной крови и ее компонентов в Российской Федерации и за рубежом. Гены и Клетки. Т. 15. № 4. С. 88. (Litvinova L.S., Goncharov A.G., Shupletsova V.V., Gazatova N.D., Melashchenko O.B., Yurova K.A., Pestrikova A.A. 2020. Analysis of the legal regulation of the circulation of cord blood and its components in the Russian Federation and abroad. Genes and Cells. V. 15. P. 88). <https://doi.org/10.23868/202012014>
- Романов Ю.А., Романов А.Ю. 2018. Ткани перинатального происхождения – уникальный источник клеток для регенеративной медицины. Часть I. Пуповинная кровь. Неонатология: новости, мнения, обучение. Т. 6. № 2/20. С. 64. (Romanov Yu.A., Romanov A.Yu. 2018. Tissues of perinatal origin – a unique source of cells for regenerative medicine. Part I. Cord blood. Neonatology: news, opinions, training. V. 6. P. 64).
- Танасийчук И.С., Михайленко Л.П., Маланчук О.Н., Фетисова О.А. 2017. Общий анализ пуповинной крови как возможного источника гемопоэтических стволовых клеток. Лабораторная диагностика. Восточная Европа. Т. 6. № 3. С. 380. (Tanasiychuk I.S., Mikhailenko L.P., Malanchuk O.N., Fetisova O.A. 2017. General analysis of cord blood as a possible source of hematopoietic stem cells. Laboratory Diagnostics. Eastern Europe. V. 6. P. 380).
- Трухан И.С. 2018. Питательная среда как ключевой фактор культивирования клеток млекопитающих. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. Т. 12. № 1. С. 165. (Trukhan I.S. 2018. Nutrient medium as a key factor in the cultivation of mammalian cells International J. Applied Basic Res. V. 12. P. 165).
- Тюмина О.В. 2012. Пуповинная кровь: заготовка, хранение, трансплантация и регенеративная медицина. СПб.: Синтез Бук, Наука. С. 352. (Tyumina O.V. 2012. Cord blood: harvesting, storage, transplantation and regenerative medicine. St. Petersburg: Synthesis Book, Nauka. P. 352).
- Франциянц Е.М., Моисеенко Т.И., Якубова Д.Ю., Черярина Н.Д., Меньшенина А.П., Вереникина Е.В.,

- Адамян М.Л. 2020. Факторы семейства VEGF, IGF и TGF- β 1 в ткани сальника при раке яичников. РМЖ. Медицинское обозрение. Т. 3. С. 132. <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2020-4-3-132-136>. (Frantsyants E.M., Moiseenko T.I., Yakubova D.Yu., Cheryarina N.D., Menshenina A.P., Verenikina E.V., Adamyanyan M.L. 2020. VEGF, IGF and TGF- β 1 family factors in omental tissue in ovarian cancer. RMJ. Med. Review. V. 3. P. 132).
- Afzal E., Pakzad M., Nouri M., Moghadasali R., Zarrabi M. 2023. Human umbilical cord serum as an alternative to fetal bovine serum for *in vitro* expansion of umbilical cord mesenchymal stromal cells. Cell Tissue Bank. V. 24. P. 59. <https://doi.org/10.1007/s10561-022-10011-x>
- Al-Samerria S., Radovick S. 2021. The role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the control of neuroendocrine regulation of growth. Cells. V. 10. P. 2664. <https://doi.org/10.3390/cells10102664>
- Andereg U., Halfter N., Schnabelrauch M., Hintze V. 2021. Collagen/glycosaminoglycan-based matrices for controlling skin cell responses. Biol. Chem. V. 402. P. 1325. <https://doi.org/10.1515/hsz-2021-0176>
- Baba K., Yamazaki Y., Sone Y., Sugimoto Y., Moriyama K., Sugimoto T., Kumazawa K., Shimakura Y., Takeda A. 2019. An *in vitro* long-term study of cryopreserved umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma containing growth factors-PDGF-BB, TGF- β , and VEGF. J. Craniomaxillofac. Surg. V. 47. P. 668. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2019.01.020>
- Baig M.H., Ahmad K., Moon J.S., Park S.Y., Ho Lim J., Chun H.J., Qadri A.F., Hwang Y.C., Jan A.T., Ahmad S.S., Ali S., Shaikh S., Lee E.J., Choi I. 2022. Myostatin and its regulation: A comprehensive review of myostatin inhibiting strategies. Front. Physiol. V. 13. P. 876078. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.876078>
- Balaban C.L., Suarez C.A., Boncompain C.A., Peressutti-Bacci N., Ceccarelli E.A., Morbidoni H.R. 2022. Evaluation of factors influencing expression and extraction of recombinant bacteriophage endolysins in *Escherichia coli*. Microb. Cell Fact. V. 21. P. 40. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01766-9>
- Bartolo I., Reis R.L., Marques A.P., Cerqueira M.T. 2022. Keratinocyte growth factor-based strategies for wound re-epithelialization. Tiss. Eng. Part. B Rev. V. 28. P. 665. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2021.0030>
- Barug D., Goorden S., Herruer M., Müller M., Brohet R., de Winter P. 2014. Reference values for interleukin-6 and interleukin-8 in cord blood of healthy term neonates and their association with stress-related perinatal factors. PLoS One. V. 9. P. e114109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114109>
- Baust J.M., Buehring G.C., Campbell L., Elmore E., Harbell J.W., Nims R.W., Price P., Reid Y.A., Simione F. 2017. Best practices in cell culture: an overview. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. V. 53. P. 669. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0177-7>
- Belladonna M.L., Grohmann U. 2013. Bioengineering heterodimeric cytokines: Turning promiscuous proteins into therapeutic agents. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. V. 29. P. 149. <https://doi.org/10.1080/02648725.2013.801228>
- Berasain C., Avila M.A. 2014. Amphiregulin. Semin. Cell Dev. Biol. V. 28. P. 31. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.005>
- Blázquez-Prunera A., Díez J.M., Gajardo R., Grancha S. 2017. Human mesenchymal stem cells maintain their phenotype, multipotentiality, and genetic stability when cultured using a defined xeno-free human plasma fraction. Stem Cell Res. Ther. V. 8. P. 103. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0552-z>
- Bui H.T.H., Nguyen L.T., Than U.T.T. 2021. Influences of xeno-free media on mesenchymal stem cell expansion for clinical application. Tiss. Eng. Regen. Med. V. 18. P. 15. <https://doi.org/10.1007/s13770-020-00306-z>
- Campagnoli C., Fisk N., Overton T., Bennett P., Watts T., Roberts I. 2000. Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood. Blood. V. 95. P. 1967.
- Cardoso R.M.S., Rodrigues S.C., Gomes C.F., Duarte F.V., Romão M., Leal E.C., Freire P.C., Neves R., Simões-Correia J. 2021. Development of an optimized and scalable method for isolation of umbilical cord blood-derived small extracellular vesicles for future clinical use. Stem Cells Transl. Med. V. 10. P. 910. <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0376>
- Caseiro A.R., Ivanova G., Pedrosa S.S., Branquinho M.V., Georgieva P., Barbosa P.P., Santos J.D., Magalhães R., Teixeira P., Pereira T., Maurício A.C. 2018. Human umbilical cord blood plasma as an alternative to animal sera for mesenchymal stromal cells *in vitro* expansion – A multicomponent metabolomic analysis. PLoS One. V. 13. P. e0203936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203936>
- Chakraborty A., Dutta J., Das S., Datta H. 2013. Effect of cord blood serum on ex vivo human limbal epithelial cell culture. J. Ocul. Biol. Dis. Infor. V. 5. P. 77. <https://doi.org/10.1007/s12177-013-9106-5>
- Che X., Hornig M., Bresnahan M., Stoltenberg C., Magnus P., Surén P., Mjaaland S., Reichborn-Kjennerud T., Susser E., Lipkin W.I. 2022. Maternal mid-gestational and child cord blood immune signatures are strongly associated with offspring risk of ASD. Mol. Psychiatry. V. 27. P. 1527. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01415-4>
- Chen X.D., Liu S.X., Shan Y.L., Cai W., Tan S., Hu M.Y., Lu Z.Z. 2020. The proatherogenic effect of high salt diet combined with focal hypoperfusion on spontaneous hypertension rat. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. V. 100. P. 3407. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112137-20200806-02292>
- Chung M.I., Bujnis M., Barkauskas C.E., Kobayashi Y., Hogan B.L.M. 2018. Niche-mediated BMP/SMAD signaling regulates lung alveolar stem cell proliferation and differentiation. Development. V. 145, dev163014. <https://doi.org/10.1242/dev.163014>
- Custo S., Baron B., Felice A., Seria E. 2022. A comparative profile of total protein and six angiogenically-active growth factors in three platelet products. GMS Interdiscip. Plast. Reconstr. Surg. DGPW. V. 11. Doc06. <https://doi.org/10.3205/iprs000167>
- D'Arena G., Musto P., Cascavilla N., Di Giorgio G., Zendoli F., Carotenuto M. 1996. Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. Haematologica. V. 81. P. 404.

- Dauber K., Becker D., Odendahl M., Seifried E., Bonig H., Tonn T.* 2011. Enumeration of viable CD34⁺ cells by flow cytometry in blood, bone marrow and cord blood: results of a study of the novel BD™ stem cell enumeration kit. *Cytother.* V. 13. P. 449.
<https://doi.org/10.3109/14653249.2010.529894>
- De Kinderen P., Meester J., Loeys B., Peeters S., Gouze E., Woods S., Mortier G., Verstraeten A.* 2022. Differentiation of induced pluripotent stem cells into chondrocytes: Methods and applications for disease modeling and drug discovery. *J. Bone Miner. Res.* V. 37. P. 397.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.4524>
- de Miguel-Gómez L., López-Martínez S., Campo H., Francés-Herrero E., Faus A., Díaz A., Pellicer A., Domínguez F., Cervelló I.* 2021. Comparison of different sources of platelet-rich plasma as treatment option for infertility-causing endometrial pathologies. *Fertil. Steril.* V. 115. P. 490.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.07.053>
- Denihan N.M., Looney A., Boylan G.B., Walsh B.H., Murray D.M.* 2013. Normative levels of Interleukin 16 in umbilical cord blood. *Clin. Biochem.* V. 46. P. 1857.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.07.012>
- Derynck R., Turley S.J., Akhurst R.J.* 2021. TGFβ biology in cancer progression and immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* V. 18. P. 9.
<https://doi.org/10.1038/s41571-020-0403-1>
- Dessels C., Potgieter M., Pepper M.S.* 2016. Making the switch: Alternatives to fetal bovine serum for adipose-derived stromal cell expansion. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 4. P. 115.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00115>
- Dewidar B., Meyer C., Dooley S., Meindl-Beinker A.N.* 2019. TGF-β in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis-updated. *Cells.* V. 8. P. 1419.
<https://doi.org/10.3390/cells8111419>
- Díaz-Saez F., Blanco-Sinfreu C., Archilla-Ortega A., Sebastian D., Romero M., Hernandez-Alvarez M.I., Mora S., Testar X., Ricart W., Fernandez-Real J.M., Moreno-Navarrete J.M., Aragones J., Camps M., Zorzano A., Guma A.* 2021. Neuregulin 4 downregulation induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through inflammation and autophagic degradation of GLUT4 vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 12960.
<https://doi.org/10.3390/ijms222312960>
- Ding Y., Lu Z., Yuan Y., Wang X., Li D., Zeng Y.* 2013. Comparison of human cord blood mesenchymal stem cell culture between using human umbilical cord plasma and using fetal bovine serum. *Sheng Wu Yi, Xue Gong Cheng, Xue Za Zhi.* V. 30. P. 1279.
- Dong L., Zhang R.H., Zhou W.D., Li Y.F., Li H.Y., Wu H.T., Shi X.H., Jonas J.B., Wei W.B.* 2022. Epiregulin, epigen and betacellulin antibodies and axial elongation in young guinea pigs with lens-induced myopization. *BMC Ophthalmol.* V. 22. P. 193.
<https://doi.org/10.1186/s12886-022-02417-8>
- Dougan M., Dranoff G., Dougan S.* 2019. GM-CSF, IL-3, and IL-5 Family of cytokines: Regulators of inflammation. *Immunity.* V. 50. P. 796.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.022>
- Drouin E.E., Seward R.J., Strle K., McHugh G., Katchar K., Londoño D., Yao C., Costello C.E., Steere A.C.* 2013. A novel human autoantigen, endothelial cell growth factor, is a target of T and B cell responses in patients with Lyme disease. *Arthritis Rheum.* V. 65. P. 186.
<https://doi.org/10.1002/art.37732>
- Eguchi R., Kawabe J.I., Wakabayashi I.* 2022. VEGF-independent angiogenic factors: Beyond VEGF/VEGFR2 signaling. *J. Vasc. Res.* V. 59. P. 78.
<https://doi.org/10.1159/000521584>
- Ehrhart J., Sanberg P.R., Garbuzova-Davis S.* 2018. Plasma derived from human umbilical cord blood: Potential cell-additive or cell-substitute therapeutic for neurodegenerative diseases. *J. Cell Mol. Med.* V. 22. P. 6157. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13898>
- Esmaeli A., Moshrefi M., Shamsara A., Eftekhari-Vaghefi S.H., Nematollahi-Mahani S.N.* 2016. Xeno-free culture condition for human bone marrow and umbilical cord matrix-derived mesenchymal stem/stromal cells using human umbilical cord blood serum. *Int. J. Reprod. Biomed.* V. 14. P. 567.
- Esposito P., Picciotto D., Battaglia Y., Costigliolo F., Viazzi F., Verzola D.* 2022. Myostatin: Basic biology to clinical application. *Adv. Clin. Chem.* V. 106. P. 181.
<https://doi.org/10.1016/bs.acc.2021.09.006>
- Farooq M., Khan A.W., Kim M.S., Choi S.* 2021. The role of fibroblast growth factor (FGF) signaling in tissue repair and regeneration. *Cells.* V. 10. P. 3242.
<https://doi.org/10.3390/cells10113242>
- Garanina E.E., Gatina D., Martynova E.V., Rizvanov A., Khaiboullina S., Salafutdinov I.* 2017. Cytokine profiling of human umbilical cord plasma and human umbilical cord blood mononuclear cells. *Blood.* V. 130. P. 4814.
https://doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.4814.4814
- Gedikbaşı A., Salihoğlu Ö., Çankaya A., Arica V., Akkuş Ch., Hatipoğlu S., Yaşar L.* 2014. The evaluation of cord blood interleukin-1β levels in normal and caesarean deliveries. *Hum. Exp. Toxicol.* V. 33. P. 1193.
<https://doi.org/10.1177/0960327113499049>
- Gillman C.E., Jayasuriya A.C.* 2021. FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. *Mater Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* V. 130. P. 112466.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112466>
- Gródecka-Szwajkiewicz D., Ulańczyk Z., Zagrodnik E., Łuczowska K., Rogińska D., Kawa M.P., Steciewicz I., Safranow K., Machaliński B.* 2020. Differential secretion of angiopoietic factors and expression of microRNA in umbilical cord blood from healthy appropriate-for-gestational-age preterm and term newborns-in search of biomarkers of angiogenesis-related processes in preterm birth. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 1305.
<https://doi.org/10.3390/ijms21041305>
- Hassan G., Kasem I., Soukkaieh C., Aljamali M.* 2017. A simple method to isolate and expand human umbilical cord derived mesenchymal stem cells: Using explant method and umbilical cord blood serum. *Int. J. Stem Cells.* V. 10. P. 184. <https://doi.org/10.15283/ijsc17028>
- Hassanzadeh A., Shamlou S., Yousefi N., Nikoo M., Verdi J.* 2022. Genetically-modified stem cell in regenerative medicine and cancer therapy. A new era. *Curr. Gene Ther.* V. 22. P. 23.
<https://doi.org/10.2174/1566523221666210707125342>
- Hessefort H., Gross A., Seeleithner S., Hessefort M., Kirsch T., Perkams L., Bundgaard K.O., Gottwald K., Rau D.,*

- Graf C.G.F., Rozanski E., Weidler S., Unverzagt C. 2021. Chemical and enzymatic synthesis of sialylated glycoforms of human erythropoietin. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* V. 60. P. 25922. <https://doi.org/10.1002/anie.202110013>
- Heubel B., Nohe A. 2021. The role of BMP signaling in osteoclast regulation. *J. Dev. Biol.* V. 9. P. 24. <https://doi.org/10.3390/jdb9030024>
- Hodgkinson T., Shen B., Diwan A., Hoyland J.A., Richardson S.M. 2019. Therapeutic potential of growth differentiation factors in the treatment of degenerative disc diseases. *JOR Spine.* V. 2, e1045. <https://doi.org/10.1002/jsp2.1045>
- Huang H., Yin K., Tang H. 2020. Macrophage amphiregulin-pericyte TGF- β axis: A novel mechanism of the immune system that contributes to wound repair. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* V. 52. P. 463. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa001>
- Ibrahim A.M., Chauhan L., Bhardwaj A., Sharma A., Fayaz F., Kumar B., Alhashmi M., AlHajri N., Alam M.S., Pottoo F.H. 2022. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative disorders. *Biomedicines.* V. 10. P. 1143. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051143>
- Imam S.S., Al-Abbasi F.A., Hosawi S., Afzal M., Nadeem M.S., Ghoneim M.M., Alshehri S., Alzarea S.I., Alquraini A., Gupta G., Kazmi I. 2022. Role of platelet rich plasma mediated repair and regeneration of cell in early stage of cardiac injury. *Regen. Ther.* V. 19. P. 144. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2022.01.006>
- Ishibashi J., Isohama Y. 2021. Bisacodyl suppresses TGF- α -induced MUC5AC production in NCI-H292 cells. *Biol. Pharm. Bull.* V. 44. P. 590. <https://doi.org/10.1248/bpb.b20-00886>
- Jeppesen D.K., Fenix A.M., Franklin J.L., Higginbotham J.N., Zhang Q., Zimmerman L.J., Liebler D.C., Ping J., Liu Q., Evans R., Fissell W.H., Patton J.G., Rome L.H., Burnette D.T., Coffey R.J. 2019. Reassessment of exosome composition. *cell.* V. 177. P. 428. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029>
- Jing Q., Wang Y., Liu H., Deng X., Jiang L., Liu R., Song H., Li J. 2016. FGFs: Crucial factors that regulate tumour initiation and progression. *Cell Prolif.* V. 49. P. 438. <https://doi.org/10.1111/cpr.12275>
- Kazlauskas A. 2017. PDGFs and their receptors. *Gene.* V. 614. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.03.003>
- Keski-Nisula L., Lappalainen M.H., Mustonen K., Hirvonen M.R., Pfefferle P.I., Renz H., Pekkanen J., Roponen M. 2010. Production of interleukin-5, -10 and interferon- γ in cord blood is strongly associated with the season of birth. *Clin. Exp. Allergy.* V. 40. P. 1658. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03601.x>
- Kim J.M., Lin C., Stavre Z., Greenblatt M.B., Shim J.H. 2020. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis. *Cells.* V. 9. P. 2073. <https://doi.org/10.3390/cells9092073>
- Kuo D., Ding J., Cohn I.S., Zhang F., Wei K., Rao D.A., Roza C., Sokhi U.K., Shanaj S., Oliver D.J., Echeverria A.P., DiCarlo E.F., Brenner M.B., Bykerk V.P., Goodman S.M., Raychaudhuri S., Rättsch G., Ivashkiv L.B., Donlin L.T. 2019. HBEGF⁺ macrophages in rheumatoid arthritis induce fibroblast invasiveness. *Sci. Transl. Med.* V. 11, eaau8587. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau8587>
- Kwok Y.K., Tang M.H., Law H.K., Ngai C.S., Lau Y.L., Lau E.T. 2007. Maternal plasma or human serum albumin in wash buffer enhances enrichment and *ex vivo* expansion of human umbilical cord blood CD34⁺ cells. *Br. J. Haematol.* V. 137. P. 468. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06606.x>
- Laplace-Builhe B., Barthelaix A., Assou S., Bohaud C., Pratlong M., Severac D., Tejedor G., Luz-Crawford P., Nguyen-Chi M., Mathieu M., Jorgensen C., Djouad F. 2021. NRG1/ErbB signalling controls the dialogue between macrophages and neural crest-derived cells during zebrafish fin regeneration. *Nat. Commun.* V. 12. P. 6336. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26422-5>
- Lee H.J., Hong Y.J., Kim M. 2021. Angiogenesis in chronic inflammatory skin disorders. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 12035. <https://doi.org/10.3390/ijms222112035>
- Lees-Shepard J.B., Flint K., Fisher M., Omi M., Richard K., Antony M., Chen P.J., Yadav S., Threadgill D., Maihle N.J., Dealy C.N. 2021. Cross-talk between EGFR and BMP signals regulates chondrocyte maturation during endochondral ossification. *Dev. Dyn.* V. 251. P. 75. <https://doi.org/10.1002/dvdy.438>
- Li T., Lu H., Zhou L., Jia M., Zhang L., Wu H., Shan L. 2022. Growth factors-based platelet lysate rejuvenates skin against ageing through NF- κ B signalling pathway: *In vitro* and *in vivo* mechanistic and clinical studies. *Cell Prolif.* V. 55, e13212. <https://doi.org/10.1111/cpr.13212>
- Li Y., Su G., Zhong Y., Xiong Z., Huang T., Quan J., Huang J., Wen X., Luo C., Zheng W., Chen J., Cheng J., Yao W., Lai T. 2021. HB-EGF-induced IL-8 secretion from airway epithelium leads to lung fibroblast proliferation and migration. *BMC Pulm. Med.* V. 21. P. 347. <https://doi.org/10.1186/s12890-021-01726-w>
- Lin H., Tian S., Peng Y., Wu L., Xiao Y., Qing X., Shao Z. 2022. IGF signaling in intervertebral disc health and disease. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 9. P. 817099. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.817099>
- Liu X., Li C., Li J., Xie L., Hong Z., Zheng K., Zhao X., Yang A., Xu X., Tao H., Qiu M., Yang J. 2022. EGF signaling promotes the lineage conversion of astrocytes into oligodendrocytes. *Mol. Med.* V. 28. P. 50. <https://doi.org/10.1186/s10020-022-00478-5>
- Lopez J.F., Mikkola A., Sarkanen J.R., Kaartinen I.S., Kuokkanen H.O., Ylikomi T. 2022. Adipose tissue as a source of growth factors to promote wound healing: a human study of skin graft donor sites. *J. Wound. Care.* V. 31. P. 282. <https://doi.org/10.12968/jowc.2022.31.4.282>
- Lowery J.W., Rosen V. 2018. The BMP pathway and its inhibitors in the skeleton. *Physiol. Rev.* V. 98. P. 2431. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2017>
- Marei I., Chidiac O., Thomas B., Pasquier J., Dargham S., Robay A., Vakayil M., Jameesh M., Triggle C., Raffi A., Jayyousi A., Suwaidi J. A., Khalil C.A. 2022. Angiogenic content of microparticles in patients with diabetes and coronary artery disease predicts networks of endothelial dysfunction. *Cardiovasc. Diabetol.* V. 21. P. 17. <https://doi.org/10.1186/s12933-022-01449-0>
- Markan K.R., Potthoff M.J. 2016. Metabolic fibroblast growth factors (FGFs): Mediators of energy homeostasis. *Semin.*

- Cell Dev. Biol. V. 53. P. 85. <https://doi.org/10.1016/j.semedb.2015.09.021>
- Meldolesi J. 2018. Exosomes and ectosomes in intercellular communication. *Curr. Biol.* V. 28. P. R435. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.059>
- Mun S.H., Park P.S.U., Park-Min K.H. 2020. The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond. *Exp. Mol. Med.* V. 52. P. 1239. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0484-z>
- Murphy M.B., Blashki D., Buchanan R.M., Yazdi I.K., Ferrari M., Simmons P.J., Tasciotti E. 2012. Adult and umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma for mesenchymal stem cell proliferation, chemotaxis, and cryo-preservation. *Biomaterials.* V. 33. P. 5308. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.007>
- Muscella A., Vetrugno C., Cossa L.G., Marsigliante S. 2020. TGF- β 1 activates RSC96 Schwann cells migration and invasion through MMP-2 and MMP-9 activities. *J. Neurochem.* V. 153. P. 525. <https://doi.org/10.1111/jnc.14913>
- Nakamura-Ishizu A., Suda T. 2020. Multifaceted roles of thrombopoietin in hematopoietic stem cell regulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* V. 1466. P. 51. <https://doi.org/10.1111/nyas.14169>
- Nandi S., Dey R., Samadder A., Saxena A., Saxena A.K. 2022. Natural sourced inhibitors of EGFR, PDGFR, FGFR and VEGFR mediated signaling pathways as potential anticancer agents. *Curr. Med. Chem.* V. 29. P. 212. <https://doi.org/10.2174/0929867328666210303101345>
- Noh K.C., Liu X.N., Zhuan Z., Yang C.J., Kim Y.T., Lee G.W., Choi K.H., Kim K.O. 2018. Leukocyte-poor platelet-rich plasma-derived growth factors enhance human fibroblast proliferation in vitro. *Clin. Orthop. Surg.* V. 10. P. 240. <https://doi.org/10.4055/cios.2018.10.2.240>
- Oo W.M., Hunter D.J. 2021. Nerve growth factor (NGF) inhibitors and related agents for chronic musculoskeletal pain: A comprehensive review. *BioDrugs.* V. 35. P. 611. <https://doi.org/10.1007/s40259-021-00504-8>
- Ornitz D.M., Itoh N. 2015. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* V. 4. P. 215. <https://doi.org/10.1002/wdev.176>
- Ostrovskaya R.U., Ivanov S.V. 2022. Neuroprotective substances: are they able to protect the pancreatic beta-cells too? *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.* V. 22. P. 834. <https://doi.org/10.2174/1871530322666220303162844>
- Pereira T., Ivanova G., Caseiro A.R., Barbosa P., Bartolo P.J., Santos J.D., Luís A.L., Maurício A.C. 2014. MSCs conditioned media and umbilical cord blood plasma metabolomics and composition. *PloS one.* V. 9, e113769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113769>
- Phelan K., May K.M. 2017. Mammalian cell tissue culture techniques. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* V. 117. P. A.3F.1. <https://doi.org/10.1002/cpmb.31>. PMID: 28060407
- Pickler R., Brown L., McGrath J., Lyon D., Rattican D., Cheng C.Y., Howland L., Jallo N. 2010. Integrated review of cytokines in maternal, cord, and newborn blood: Part II – associations with early infection and increased risk of neurologic damage in preterm infants. *Biol. Res. Nurs.* V. 11. P. 377. <https://doi.org/10.1177/1099800409344619>
- Pietrowska M., Wlosowicz A., Gawin M., Widlak P. 2019. MS-based proteomic analysis of serum and plasma: problem of high abundant components and lights and shadows of albumin removal. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 1073. P. 57. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12298-0_3
- Pikula M., Langa P., Kosikowska P., Trzonkowski P. 2015. Stem cells and growth factors in wound healing. *Postepy Hig. Med. Dosw (Online).* V. 69. P. 874. <https://doi.org/10.5604/17322693.1162989>
- Ponomarev L.C., Ksiazkiewicz J., Staring M.W., Luttun A., Zwijsen A. 2021. The BMP pathway in blood vessel and lymphatic vessel biology. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 6364. <https://doi.org/10.3390/ijms22126364>
- Pour M.S.S., Vahidi R., Lashkari M., Derakhshani A., Ameri Z., Farsinejad A. 2020. Cord blood serum harvesting by hydroxyethyl starch: a fetal bovine serum alternative in expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnol.* V. 72. P. 551. <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00404-9>
- Pranke P., Hendrikx J., Alespeiti G., Nardi N., Rubinstein P., Visser J. 2006. Comparative quantification of umbilical cord blood CD34⁺ and CD34⁺ bright cells using the ProCount-BD and ISHAGE protocols. *Braz. J. Med. Biol. Res.* V. 39. P. 901. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2006000700008>
- Price P.J. 2017. Best practices for media selection for mammalian cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* V. 53. P. 673. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0186-6>
- Rallapalli S., Guhathakurta S., Bishi D.K., Subbarayan R., Mathapati S., Korrapati P.S. 2021. A critical appraisal of humanized alternatives to fetal bovine serum for clinical applications of umbilical cord derived mesenchymal stromal cells. *Biotechnol. Lett.* V. 43. P. 2067. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03180-4>
- Reis C., Chambel S., Ferreira A., Cruz C.D. 2022. Involvement of nerve growth factor (NGF) in chronic neuropathic pain – a systematic review. *Rev. Neurosci.* V. 34. P. 75. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2022-0037>
- Rhéaume M.E., Perreault J., Fournier D., Trépanier P. 2022. Preparation and growth factor characterization of cord blood-derived plasma, serum, growth factor-rich plasma and induced serum. *Cytokine.* V. 149. P. 155756. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155756>
- Richani D., Gilchrist R.B. 2018. The epidermal growth factor network: Role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Hum. Reprod. Update.* V. 24. P. 1. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx029>
- Ríos-Galacho M., Martínez-Moreno D., López-Ruiz E., Gálvez-Martin P., Marchal J.A. 2022. An overview on the manufacturing of functional and mature cellular skin substitutes. *Tissue Eng. Part B Rev.* V. 28. P. 1035. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2021.0131>
- Rochette L., Mazini L., Meloux A., Zeller M., Cottin Y., Vergely C., Malka G. 2020. Anti-aging effects of GDF11 on skin. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 2598. <https://doi.org/10.3390/ijms21072598>
- Rodrigues S.C., Cardoso R.M.S., Gomes C.F., Duarte F.V., Freire P.C., Neves R., Simoes-Correia J. 2021. Toxicological profile of umbilical cord blood-derived small extracellular vesicles. *Membranes (Basel).* V. 11. P. 647. <https://doi.org/10.3390/membranes11090647>

- Romanov Y.A., Vtorushina V.V., Dugina T.N., Romanov A.Y., Petrova N.V. 2019. Human umbilical cord blood serum/plasma: Cytokine profile and prospective application in regenerative medicine. *Bull. Exp. Biol. Med.* V. 168. P. 173. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04670-2>
- Rungsiwiwut R., Ingrungruanglert P., Numchaisrika P., Virutamasen P., Phermthai T., Pruksananonda K. 2016. Human umbilical cord blood-derived serum for culturing the supportive feeder cells of human pluripotent stem cell lines. *Stem Cells Int.* V. 2016. P. 4626048. <https://doi.org/10.1155/2016/4626048>
- Sadeghi S., Kalhor H., Panahi M., Abolhasani H., Rahimi B., Kalhor R., Mehrabi A., Vahdatinia M., Rahimi H. 2021. Keratinocyte growth factor in focus: A comprehensive review from structural and functional aspects to therapeutic applications of palifermin. *Int. J. Biol. Macromol.* V. 191. P. 1175. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.151>
- Sane M.S., Misra N., Mousa O.M., Czop S., Tang H., Khoo L.T., Jones C.D., Mustafi S.B. 2018. Cytokines in umbilical cord blood-derived cellular product: a mechanistic insight into bone repair. *Regen. Med.* V. 13. P. 881. <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0102>
- Schär M.O., Diaz-Romero J., Kohl S., Zumstein M.A., Nesic D. 2015. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clin. Orthop. Relat. Res.* V. 473. P. 1635. <https://doi.org/10.1007/s11999-015-4192-2>
- Shimizu Y., Ntege E.H., Sunami H. 2022. Current regenerative medicine-based approaches for skin regeneration: A review of literature and a report on clinical applications in Japan. *Regen. Ther.* V. 21. P. 73. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2022.05.008>
- Simonetti A.B., Englert G.E., Campos K., Mergener M., De David C., De Oliveira A.P., Roehe P.M. 2007. Nanobacteria-like particles: A threat to cell cultures. *Brazilian J. Microbiol.* V. 38. P. 153.
- Singh S.S., Chauhan S.B., Kumar A., Kumar S., Engwerda C.R., Sundar S., Kumar R. 2022. Amphiregulin in cellular physiology, health, and disease: Potential use as a biomarker and therapeutic target. *J. Cell Physiol.* V. 237. P. 1143. <https://doi.org/10.1002/jcp.30615>
- Skuratovskaia D., Vulf M., Khaziakhmatova O., Malashchenko V., Komar A., Shunkin E., Gazatova N., Litvinova L. 2021. Exosome limitations in the treatment of inflammatory diseases. *Curr. Pharm. Des.* V. 27. P. 3105. <https://doi.org/10.2174/1381612826666201210120444>
- Sousa F., Costa-Pereira A.I., Cruz A., Ferreira F.J., Gouveia M., Bessa J., Sarmiento B., Travasso R.D.M., Pinto I.M. 2021. Intratumoral VEGF nanotrappor reduces glioblastoma vascularization and tumor cell mass. *J. Control. Release.* V. 339. P. 381. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.09.031>
- Stavropoulos A., Wikesjö U.M. 2012. Growth and differentiation factors for periodontal regeneration: A review on factors with clinical testing. *J. Periodontal Res.* V. 47. P. 545. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2012.01478.x>
- Sulaiman A., McGarry S., Chilumula S. Ch., Kandunuri R., Vinod V. 2021. Clinically translatable approaches of inhibiting TGF- β to target cancer stem cells in TNBC. *Biomedicines.* V. 9. P. 1386. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101386>
- Sun C., Tian X., Jia Y., Yang M., Li Y., Fernig D.G. 2022. Functions of exogenous FGF signals in regulation of fibroblast to myofibroblast differentiation and extracellular matrix protein expression. *Open Biol.* V. 12. P. 210356. <https://doi.org/10.1098/rsob.210356>
- Sun J., Hu Y., Fu Y., Zou D., Lu J., Lyu C. 2022. Emerging roles of platelet concentrates and platelet-derived extracellular vesicles in regenerative periodontology and implant dentistry. *APL Bioeng.* V. 6. P. 031503. <https://doi.org/10.1063/5.0099872>
- Taeger J., Moser C., Hellerbrand C., Mycielska M.E., Glockzin G., Schlitt H.J., Geissler E.K., Stoeltzing O., Lang S.A. 2011. Targeting FGFR/PDGFR/VEGFR impairs tumor growth, angiogenesis, and metastasis by effects on tumor cells, endothelial cells, and pericytes in pancreatic cancer. *Mol. Cancer. Ther.* V. 10. P. 2157. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0312>
- Tang Y.T., Huang Y.Y., Zheng L., Qin S.H., Xu X.P., An T.X., Xu Y., Wu Y.S., Hu X.M., Ping B.H., Wang Q. 2017. Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *Int. J. Mol. Med.* V. 40. P. 834. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3080>
- Taylor S.R., Markesbery M.G., Harding P.A. 2014. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) and proteolytic processing by a disintegrin and metalloproteinases (ADAM): a regulator of several pathways. *Semin. Cell Dev. Biol.* V. 28. P. 22. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.004>
- Terashvili M., Bosnjak Z.J. 2019. Stem cell therapies in cardiovascular disease. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* V. 33. P. 209. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2018.04.048>
- Tominaga K., Suzuki H.I. 2019. TGF- β Signaling in cellular senescence and aging-related pathology. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 5002. <https://doi.org/10.3390/ijms20205002>
- Venugopal H., Hanna A., Humeres C., Frangogiannis N.G. 2022. Properties and functions of fibroblasts and myofibroblasts in myocardial infarction. *Cells.* V. 11. P. 1386. <https://doi.org/10.3390/cells11091386>
- Vlaski-Lafarge M., Chevalere J., Cohen J., Ivanovic Z., Lafarge X. 2020. Discarded plasma obtained after cord blood volume reduction as an alternative for fetal calf serum in mesenchymal stromal cells cultures. *Transfusion.* V. 60. P. 1910. <https://doi.org/10.1111/trf.15920>
- Wang J.F., Li F.H., Shen D.L., Song Y., Wang Y.Y., Zhou J.M., Ge J.B. 2021. Effect of neuregulin-1 on cardiac glucose metabolism in rats with experimental myocardial infarction. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* V. 49. P. 912. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112148-20210628-00549>
- Wang Y., Appiah-Kubi K., Wu M., Yao X., Qian H., Wu Y., Chen Y. 2016. The platelet-derived growth factors (PDGFs) and their receptors (PDGFRs) are major players in oncogenesis, drug resistance, and attractive oncologic targets in cancer. *Growth Factors.* V. 34. P. 64. <https://doi.org/10.1080/08977194.2016.1180293>
- Widyaningrum R., Burnouf T., Nebie O., Delila L., Wang T.J. 2021. A purified human platelet pellet lysate rich in neurotrophic factors and antioxidants repairs and protects corneal endothelial cells from oxidative stress. *Biomed. Pharmacother.* V. 142. P. 112046. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112046>

- Wu J.Y., Lu Y., Chen J.S., Wu S.Q., Tang X.W., Li Y. 2015. Pooled umbilical cord blood plasma for culturing UCMSC and ex vivo expanding umbilical cord blood CD34⁺ Cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. V. 23. P. 1112. <https://doi.org/10.7534/j.issn.1009-2137.2015.04.040>
- Yamada N., Matsushima-Nishiwaki R., Masue A., Taguchi K., Kozawa O. 2019. Olive oil polyphenols suppress the TGF- α -induced migration of hepatocellular carcinoma cells. *Biomed. Rep.* V. 1. P. 1. <https://doi.org/10.3892/br.2019.1215>
- Yan Y., Wang Q. 2021. BMP Signaling: Lighting up the way for embryonic dorsoventral patterning. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 9. P. 799772. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.799772>
- Yáñez-Mó M., Siljander P.R., Andreu Z., Zavec A.B., Borràs F.E., Buzas E.I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J., Colás E., Cordeiro-da Silva A., Fais S., Falcon-Perez J.M., Ghobrial I.M.; et al.; 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles*. V. 4. P. 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yen T.T., Thao D.T., Thuoc T.L. 2014. An overview on keratinocyte growth factor: From the molecular properties to clinical applications. *Protein Pept. Lett.* V. 21. P. 306. <https://doi.org/10.2174/09298665113206660115>
- Zaiss D.M.W., Gause W.C., Osborne L.C., Artis D. 2015. Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair. *Immunity*. V. 42. P. 216. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.020>
- Zhang X., Kang X., Jin L., Bai J., Liu W., Wang Z. 2018. Stimulation of wound healing using bioinspired hydrogels with basic fibroblast growth factor (bFGF). *Int. J. Nanomedicine*. V. 13. P. 3897. <https://doi.org/10.2147/IJN.S168998>
- Zhou W., Wu F., Yao D., Xie C. 2021. Production of high-purity recombinant human vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) by *Pichia pastoris*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. V. 37. P. 4083. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.210021>
- Ziegler C.G., Van Sloun R., Gonzalez S., Whitney K.E., DePhillipo N.N., Kennedy M.I., Dornan G.J., Evans T.A., Huard J., LaPrade R.F. 2019. Characterization of growth factors, cytokines, and chemokines in bone marrow concentrate and platelet-rich plasma: A prospective analysis. *Am. J. Sports Med.* V. 47. P. 2174. <https://doi.org/10.1177/0363546519832003>
- Zimmerman A.M., Vierck J.L., O'Reilly B.A., Dodson M.V. 2000. Formulation of a defined medium to maintain cell health and viability in vitro. *Methods Cell Sci.* V. 22. P. 43. <https://doi.org/doi:10.1023/a:1009832828007>

UMBILICAL BLOOD AS A TROPHIC-GROWTH SUPPLEMENT FOR CULTURAL WORK

A. G. Goncharov^a, V. V. Shupletsova^a, N. D. Gazatova^a,
O. B. Melashchenko^a, K. A. Yurova^a, L. S. Litvinova^{a, b, *}

^aCenter of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041, Russia

^bLaboratory of Cellular and Microfluidic Technologies, Siberian State Medical University, Tomsk, 634050, Russia

*e-mail: larisalitvinova@yandex.ru

This review analyzes the results of modern high-tech research on the use of umbilical cord blood serum/plasma as an additive to culture media for cell culture growth. Since culture media are a key factor in cell culture, the review addresses the composition and properties of the major culture media used in cell biology and regenerative medicine. The authors pay special attention to growth factors; they describe the functional properties of the main families of these polypeptides (fibroblast growth factors, epidermal growth factors, transforming growth factors, differentiation growth factors, epidermal growth factors, endothelial cell growth factors, hematopoietic growth factors, etc.). It was found that one of the most promising sources of growth factors is cord blood serum/plasma. In this publication, the main technologies for cord blood collection and systematic studies on the content of growth factors, cytokines, exosomes and mRNA in cord blood are presented. Experimental data on the use of umbilical cord blood serum/plasma as an additive to culture media for the growth of various cell cultures of animal origin are described. Human umbilical cord blood serum/plasma is an affordable, safe product with a high content of biologically active molecules compared to animal sources. In order for umbilical cord blood serum/plasma to be widely used as an adjunct to culture media, standards for the manufacture and testing of this product must be developed.

Keywords: umbilical cord blood, umbilical cord blood serum/plasma, animal cell culture media, growth factors, cytokines, exosomes and mRNA, animal cell culture

УДК 57.085.23: 571.27:612.63

РОЛЬ ГЛИКОДЕЛИНА В КОНВЕРСИИ CD11b⁺-КЛЕТОК В MDSC И РЕГУЛЯЦИИ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2024 г. К. Ю. Шардина^{1, *}, С. А. Заморина^{1, 2}, М. С. Бочкова^{1, 2},
В. П. Тимганова¹, С. В. Ужвиюк¹, М. Б. Раев^{1, 2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения
Российской академии наук — филиал Пермского федерального исследовательского центра
Уральского отделения РАН, Пермь, 614081, Россия

²Биологический факультет Пермского государственного национального
исследовательского университета, Пермь, 614068, Россия

* E-mail: Shardinak@gmail.com

Поступила в редакцию 20.09.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принята к публикации 23.11.2023 г.

Гликоделин (Gd) обладает выраженными иммуномодулирующими свойствами, участвуя в формировании иммунной толерантности в период беременности. Исследовали роль рекомбинантного Gd в физиологических (0.2 и 2 мкг/мл) и сверхфизиологической (10 мкг/мл) концентрациях в регуляции дифференцировки и функциональной активности миелоидных супрессорных клеток человека (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) в условиях *in vitro*. MDSC генерировали из CD11b⁺-клеток периферической крови здоровых доноров двухэтапной индукцией (IL-1 β + GM-CSF и липополисахарид). Оценивали влияние Gd на уровень полиморфноядерных MDSC (PMN-MDSC) и моноцитарных MDSC (M-MDSC), измеряли внутриклеточный уровень индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), аргиназы-1 (Arg1) и цитокиновый профиль в культурах этих клеток. В целом конверсия CD11b⁺-клеток в MDSC имеет следующие особенности: в результате цитокиновой индукции генерируются преимущественно M-MDSC, но не PMN-MDSC, и практически не детектируется уровень Arg1. Установлено, что Gd повышал количество M-MDSC в концентрациях 2 и 10 мкг/мл. Показано, что Gd не влиял на содержание Arg1, но повышал долю MDSC, экспрессирующих IDO (10 мкг/мл). Gd также модулировал цитокиновый профиль CD11b⁺-клеток (в физиологической концентрации 2 мкг/мл), подавляя продукцию IL-19, IL-26 и TWEAK/ TNFsF12, а в сверхфизиологической концентрации — продукцию IFN- α 2 и IL-26.

Ключевые слова: аргиназа 1, гликоделин, иммунная толерантность, индоламин-2,3-диоксигеназа, культивирование клеток, миелоидная супрессорная клетка, цитокин

Принятые сокращения: АФП — альфа-фетопротеин; ЛПС — липополисахарид; МПК — моноклеары периферической крови; ТБГ — трофобластический бета-1-гликопротеин; Arg1 — аргиназа-1; GdA и Gd — амниотический гликоделин и рекомбинантный Gd соответственно; DPBS — фосфатно-солевой буферный раствор Дальбекко; GM-CSF — гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор; IDO — индоламин-2,3-диоксигеназа; IL — интерлейкин; MDSC — миелоидные супрессорные клетки; M-MDSC — моноцитарные MDSC; PMN-MDSC — полиморфноядерные MDSC.

DOI: 10.31857/S0041377124020027, **EDN:** RKMDZW

Иммунная толерантность при беременности — отсутствие у матери иммунной реакции на развивающийся плод и плаценту. Первоначально полагали, что материнско-фетальная толерантность основана на регуляции Т-клеточного звена иммунитета (Saito et al., 2010), однако теперь очевидно, что этот феномен намного сложнее и затрагивает врожденный иммунитет.

Клетки врожденного иммунитета (макрофаги, врожденные лимфоидные клетки, естественные киллерные (NK) клетки) представляют собой са-

мую большую популяцию децидуальных лейкоцитов и играют важную роль в репродукции. С одной стороны, они противостоят инфекционной угрозе для здоровой беременности, а с другой — играют роль в инвазии трофобласта и ремоделировании спиральных артерий, контролируя имплантацию эмбриона и нормальное развитие плацентарного ложа (Weng et al., 2003). Между тем часть клеток врожденного иммунитета, таких как антигенпрезентирующие клетки, взаимодействуют с Т-клетками и подавляют иммунный ответ, чтобы поддер-

живать оптимальную для развития беременности иммунологическую микросреду на границе между матерью и плодом (Li et al., 2021b).

Относительно недавно стало известно, что миелоидные супрессорные клетки (myeloid-derived suppressor cells, MDSC), являясь клетками врожденного иммунитета, генерируются в процессе нормально протекающей беременности (Ostrand-Rosenberg et al., 2017). В большей степени увеличение MDSC в организме матери проходит за счет субпопуляции полиморфноядерных (PMN) MDSC (PMN-MDSC), однако, концентрация моноцитарных (M) M-MDSC также возрастает, но менее значительно.

Помимо того, что MDSC содержится в периферической крови, показано, что их уровень повышается и в децидуальной оболочке плаценты, и в межворсинчатом пространстве (Köstlin-Gille, 2020). Уровень MDSC также повышен у новорожденных в первые 2 месяца, после чего к 6-му месяцу жизни он снижается до показателей нормы взрослого человека (Gantt et al., 2014). Кроме того, во время беременности MDSC содержатся в пуповинной крови (Rieber et al., 2013).

В настоящее время очевидно, что MDSC принимают участие в поддержании иммунной толерантности. Ключевыми механизмами реализации супрессорной активности является экспрессия ряда поверхностных маркеров, внутриклеточная экспрессия ферментов аргиназы-1 (Arg1), индолемина-2,3-диоксигеназы (IDO) и индуцибельной NO-синтазы (iNOS), а также продукции ряда противовоспалительных цитокинов (Li et al., 2021a). Фенотип MDSC на данном этапе определяется как Lin⁻HLA-DR⁻CD33⁺CD11b⁺. Поскольку генерация клеток в системе *in vitro* является сложной методической задачей, разработка протоколов получения MDSC ведется до сих пор.

Регуляторный континуум, формируемый белками беременности, также вносит свой вклад в формирование иммунной толерантности, в том числе и на уровне MDSC. Известно, что трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ) и альфа-фетопротеин (АФП) способны регулировать дифференцировку и функциональную активность этих клеток в условиях *in vitro* (Тимганова и др., 2023; Shardina et al., 2023).

Один из ключевых белков беременности, амниотический гликоделин (GdA) (синонимы: PP14, PAEP, альфа-2-микроглобулин фертильности), обладает выраженными иммуномодулирующими свойствами (Uchida et al., 2013). Биологическая

активность GdA связана с взаимодействием его уникальных углеводных цепей с мембранными рецепторами сиаловой кислоты (селектины, лектины Ig-связывающего типа), присутствующими на различных типах клеток границы мать—плод (Lam et al., 2011).

Таким образом, целью исследования является изучение влияния рекомбинантного Gd на дифференцировку MDSC в системе *in vitro* с оценкой ряда показателей функциональной активности этих клеток.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) условно здоровых доноров (женщины 22–42 лет, $n = 7$) с их согласия.

Максимальная концентрация GdA в сыворотке крови к концу первого триместра достигает 2 мкг/мл, а его во II триместре концентрация достигает 0.2 мкг/мл, после чего к третьему триместру уровень GdA снижается (Halttunen et al., 2000). В исследовании использовали физиологические концентрации рекомбинантного Gd (источник *E. coli*, MyBioSource, США), которые соответствуют уровню GdA в сыворотке беременных женщин, а также превышающую эти значения концентрацию – 10 мкг/мл. Хотя в работе использовали рекомбинантную, а не нативную форму GdA, важно было отследить возможные перспективы эффектов цельного белка для его использования при различных патологиях, когда имеет значение манипулирование уровнем MDSC.

Объекты исследования. МПК получали центрифугированием на градиенте плотности Diacoll ($\rho = 1.077$ г/см³, “Диа-М”). Из МПК крови доноров с помощью иммуномагнитной сепарации выделяли CD11b⁺-клетки для дальнейшего культивирования. Для выделения использовали магнитные сферы MACSiBeads с антителами к молекуле CD11b и разделительную колонку MS (Miltenyi Biotec, Германия).

Культивирование MDSC. Полученные клетки высевали в 96-луночный планшет в концентрации 10⁶/мл с добавлением полной питательной среды (RPMI-1640, 10% FBS, 10 мМ Hepes (ICN Ph., США), 2 мМ L-глутамин (ICN Ph., США) и 100 мкг/мл пенициллина-стрептомицина-амфотерицина (100 мкл на 10 мл среды; BI, Израиль). В первые сутки в культуральный планшет вносили GM-CSF (Miltenyi Biotec, Германия) в концентрации 20 нг/мл, после чего клетки культивировали

в CO_2 -инкубаторе в течение 2 сут. После завершения первого этапа клетки активировали внесением цитокина $\text{IL-1}\beta$ (20 нг/мл; Miltenyi Biotec, Германия) и ЛПС (0.1 мкг/мл; Sigma-Aldrich, США). На следующий день добавляли Gd в концентрациях 0.2, 2.0 или 10.0 мкг/мл. После добавления активационных молекул и Gd клетки культивировали еще 3 сут в тех же условиях. В целом культивирование клеток происходило в течение 7 сут, после чего клеточные культуры собирали с использованием аккутазы, дополнительно промывая лунки холодным фосфатно-солевым буферным раствором Дальбекко (DPBS) (Thermo Fisher Scientific, США) для более качественного сбора.

Проточная цитометрия. Через 7 сут культивирования клетки окрашивали антителами, меченными флюорохромами (HLA-DR-Alexa Fluor 750, anti-CD33-APC, anti-CD11b-Alexa Fluor 405, anti-CD66b-PE и anti-CD14-PerCP; R&D Systems, США). Чтобы исключить возможное присутствие лимфоцитов и NK-клеток, применяли anti-CD19-AF700, anti-CD56-AF700, anti-CD3-AF700 (Lin). В качестве контролей, определяющих негативные популяции, использовали пробы FMO (fluorescence minus one). Исследования проводили на проточном цитометре Cytotflex S (Beckman Coulter, США).

Гейтирование осуществляли по данным бокового (SSC) и прямого (FSC) светорассеяния. С помощью красителя Zombie Aqua (ZA; BioLegend, США) определяли живые клетки (ZA^-) и в этом гейте выделяли регион клеток, не несущих линейные маркеры (Lin) и HLA-DR. После этого строили двухпараметрический график для CD33 и CD11b, демонстрирующий популяцию MDSC ($\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD33}^+ \text{CD11b}^+$). Для анализа субпопуляционного состава в гейте MDSC дополнительно определяли маркеры CD66b (PMN-MDSC) и CD14 (M-MDSC).

Оценка уровня Arg1 и IDO в MDSC. Помимо поверхностных маркеров, оценивали внутриклеточное содержание ферментов Arg1 и IDO путем пермеабилзации клеток с использованием моноклональных антител к IDO и Arg1 (R&D Systems, США). Уровень ферментов в клетках PMN-MDSC и M-MDSC детектировали тоже методом проточной цитофлюориметрии.

Анализ цитокинового профиля в культурах CD11b^+ -клеток. Уровень цитокинов определяли в супернатантах культур с помощью коммерческого набора Bio-Plex Pro Human Inflammation panel 1, 37-plex (Bio-Rad, США) согласно инструкции

производителя. Результаты регистрировали, используя систему мультиплексного анализа Bio-Plex MAGPIX (BioRad, США). Данные обрабатывали в программе Belysa. Для построения стандартных кривых использовали пятипараметрический логистический (5PL) метод анализа. Результаты выражали в пг/мл.

Статистический анализ. Для обработки результатов использовали программу GraphPad Prism 8. Для сравнения зависимых выборок применяли критерий Фридмана — непараметрический аналог дисперсионного анализа повторных измерений. Статистически значимыми считали различия при $P < 0.05$. Данные представлены в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартиля ($Q1-Q3$). Для оценки корреляционной связи между всеми измеренными показателями использовали метод Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании периферических мононуклеарных клеток генерируется мало (1–3%) MDSC, поэтому логично выделить клетки по одному из двух главных маркеров MDSC — CD33 (Lechner et al., 2010) или CD11b (Shardina et al., 2023).

В схеме получения MDSC из CD11b^+ -клеток показано, что цитокины и ЛПС способны значительно увеличивать уровень MDSC в нашей экспериментальной системе. В то же время не выявлено влияния Gd на конверсию CD11b^+ -клеток в MDSC (рис. 1).

Учитывая, что MDSC подразделяют на две основные субпопуляции (PMN-MDSC с фенотипом $\text{CD33}^{\text{low}} \text{CD11b}^+ \text{CD14}^- \text{CD15}^+ / \text{CD66b}^+$ и M-MDSC с фенотипом $\text{CD33}^+ \text{CD11b}^+ \text{CD14}^+ \text{HLA-DR}^- / \text{CD15}^- / \text{CD66b}^-$), провели оценку влияния Gd на эти клетки.

Установлено, что на уровне субпопуляций Gd не влиял на пул PMN-MDSC, однако существенно повышал уровень M-MDSC внутри популяции MDSC в концентрациях 2 и 10 мкг/мл (табл. 1). Важно отметить, что фактически наша экспериментальная схема не позволяет генерировать гранулоцитарные MDSC, что может быть связано с двумя причинами — недостаточным количеством гранулоцитарных клеток в МПК, а также не подходящим для PMN-MDSC набором стимуляторов, используемых в работе. Таким образом, Gd усиливал генерацию M-MDSC из CD11b^+ -клеток в концентрациях 2 и 10 мкг/мл.

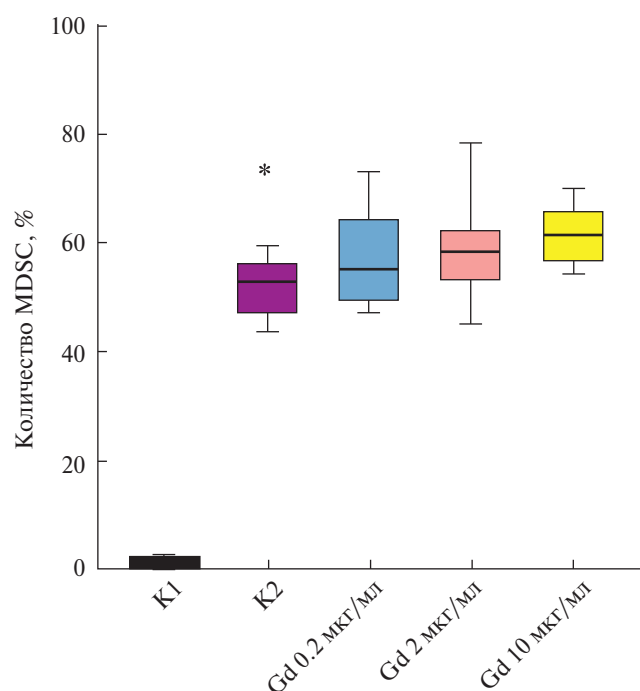


Рис. 1. Влияние гликоделина (Gd) разной концентрации на конверсию CD11b⁺-клеток (из мононуклеарных клеток периферической крови доноров) в фенотип MDSC. Представлены медианы, межквартильный диапазон (Q1–Q3, границы столбцов), минимальное и максимальное значения (вертикальные отрезки); по вертикали: доля живых Lin[–]HLA-DR[–]-клеток в гейте; (K1 – контроль, без добавления цитокинов и гликоделина в среду культивирования, K2 – контроль 2, добавление в среду только цитокинов); различия достоверны при $P < 0.05$: (*) – между K1 и K2 ($n = 7$, критерий Фридмана).

Таблица 1. Влияние Gd на количество клеток с фенотипом MDSC (PMN-MDSC и M-MDSC), продуцирующих фермент Arg1

Воздействие	Количество клеток MDSC, %
Контроль до индукции (без цитокинов и Gd)	0.150 (0.025–0.447)
Индукция (GM-CSF, IL-1 β и ЛПС)	
Контроль (без Gd)	0.920 (0.212–1.538)
Gd, 0.2 мкг/мл	0.510 (0.177–0.985)
Gd, 2 мкг/мл	0.215 (0.022–1.143)
Gd, 10 мкг/мл	0.905 (0.115–2.745)

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартиля (Q1–Q3); ($n = 7$).

Для идентификации MDSC важно понимать, что на сегодня у этих клеток не найден уникальный маркер, по которому можно безошибочно определить клеточную принадлежность к этой группе. Именно поэтому для определения MDSC дополнительно проводят оценку ряда ферментов, участ-

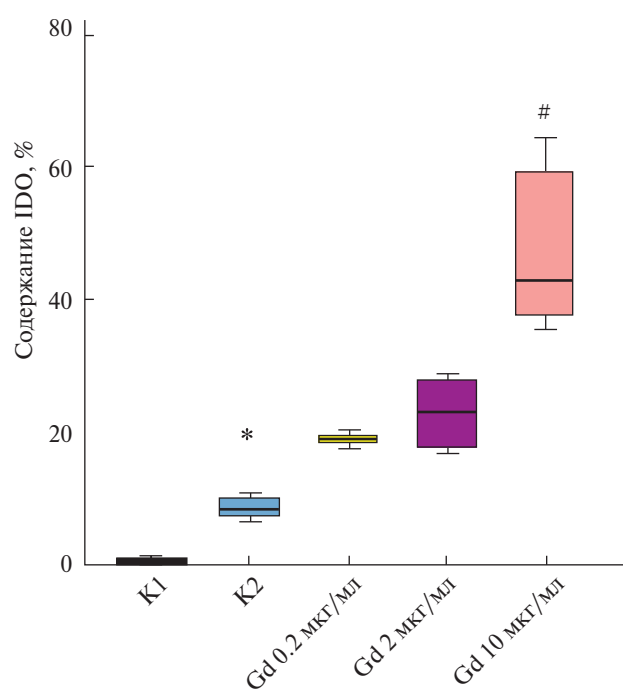


Рис. 2. Содержание индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) в клетках MDSC при использовании гликоделина (Gd) в разной концентрации. Представлены медианы, межквартильный диапазон (Q1–Q3), минимальное и максимальное значения; различия достоверны при $P < 0.05$ (критерий Фридмана): (*) – между контролем индукции (K1, культура без добавления цитокинов и Gd) и K2 (культура с добавлением цитокинов и без Gd); (#) – различия с K2.

вующих в подавлении активности и пролиферации иммунных клеток. Для этих целей в исследовании мы измеряли внутриклеточный уровень двух таких ферментов – Arg1 и IDO. MDSC опосредует ингибирующий эффект посредством многих механизмов, в том числе через истощение L-аргинина (экспрессией гена аргиназы-1) и L-триптофана (экспрессией гена IDO) (Lim et al., 2020).

При оценке уровня Arg1 в MDSC установлено, что этот фермент был экспрессирован небольшим количеством клеток (менее 1%; табл. 2). В результате эксперимента показано, что Gd не влиял на содержание аргиназы-1 в пуле MDSC (см. табл. 2). Однако с учетом того, что Arg1 преимущественно экспрессируется субпопуляцией PMN-MDSC, уровень которых в нашей экспериментальной схеме был крайне низким, основной вывод может быть связан именно с этим. В то же время IDO активно экспрессировался в MDSC. Установлено, что Gd в концентрации 10 мкг/мл повышал экспрессию IDO в MDSC (рис. 2).

Обнаружена прямая корреляционная связь ($r = 0.80$, $P < 0.05$) между экспрессией IDO и про-

Таблица 2. Влияние Gd на продукцию Arg1 в MDSC через 7 сут культивирования CD11b⁺-клеток

Воздействие	Доля клеток, %	
	PMN-MDSC	M-MDSC
K1 (без цитокинов и Gd)	0.040 (0.020–0.095)	0.090 (0.065–0.165)
Индукция (GM-CSF, IL-1 β и ЛПС)		
K2 (без Gd)	0.375 (0.020–1.713)	7.835 ^(a) (0.767–9.608)
Gd 0.2 мкг/мл	0.445 (0.140–3.405)	23.87 (17.90–29.49)
Gd 2 мкг/мл	0.420 (0.202–0.982)	46.90 ^(b) (39.11–51.18)
Gd 10 мкг/мл	0.455 (0.077–2.773)	59.74 ^(b) (50.09–72.76)

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартиля (Q1–Q3); ($n=7$); различия достоверны при $P<0.05$: ^(a) – по сравнению с K1 (K1 – контроль, без добавления цитокинов и гликоделина в среду культивирования, K2 – контроль 2, добавление в среду только цитокинов) и ^(b) – по сравнению с K2.

центным содержанием MDSC в культуре. Известно, что IDO катаболизирует триптофан, создавая локальный дефицит этой незаменимой аминокислоты и подавляя пролиферацию и функцию Т-клеток (Fallarino et al., 2002). Таким образом, Gd в высокой концентрации может вносить свой вклад в угнетение иммунного ответа через повышение экспрессии IDO в миелоидных клетках.

В отношении цитокинового профиля супернатантов CD11b⁺-клеток, индуцированных в фенотип MDSC, показано, что Gd не оказывал влияния на следующие цитокины: APRIL/TNFSF13, BAFF/TNFSF13B, sCD30/TNFRSF8, sCD163, Chitinase-3-like 1, gp130/sIL-6R β , IFN- β , IFN- γ , IL-2, sIL-6R α , IL-8, IL-10, IL-11, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-20, IL-22, IL-27 (p28), IL-28A/IFN- λ 2, IL-29/IFN- λ 1, IL-32, IL-34, IL-35, LIGHT/TNFSF14, MMP-1, MMP-2, MMP-3, osteocalcin, osteopontin, pentraxin-3, sTNF-R1, sTNF-R2, TSLP. Однако Gd (в разных концентрациях) снижал продукцию следующих цитокинов: IFN- α 2 (10 мкг/мл), IL-26 (2 и 10 мкг/мл), IL-19 (2 мкг/мл), TWEAK/ TNFsF12 (2 мкг/мл) (рис. 3). Таким образом, Gd в физиологической концентрации 2 мкг/мл подавлял продукцию IL-19, IL-26 и TWEAK/ TNFsF12, а в сверхфизиологической концентрации – продукцию IFN- α 2 и IL-26.

IFN- α 2 – это гликопротеин, обладающий противовирусным и иммуномодулирующим действием. Известно, что IFN- α 2 способствует пролиферации наивных CD8-клеток и инактивации регуляторных Т-лимфоцитов. IL-26, как и IFN- α 2,

является провоспалительным цитокином. IL-19 долгое время считали противовоспалительной молекулой, гомологичной IL-10, однако в настоящее время IL-19 считают регуляторным цитокином. С одной стороны, IL-19 способствует продукции цитокинов Th2, а с другой – посредством IL-6 и TNF- α обладает провоспалительными свойствами (Savasan et al., 2012). TWEAK/TNFSF12 – цитокин к рецептору для фактора TNFSF12 из надсемейства факторов TNF, способный к индукции апоптоза в клетках и регуляции ангиогенеза (Wiley et al., 2001). Gd способен подавлять продукцию данных цитокинов в условиях *in vitro*, формируя противовоспалительный совокупный вектор.

В целом тенденция снижения ряда провоспалительных цитокинов может укладываться в концепцию иммунорегуляторных свойств Gd, направленных на поддержание иммунной толерантности.

В первую очередь стоит отметить, что данный спектр цитокинов был синтезирован CD11b⁺-клетками, индуцированными в фенотип MDSC. В нашей экспериментальной системе около половины клеток были идентифицированы как MDSC. Поэтому для того, чтобы установить взаимосвязь между цитокинами и MDSC, был проведен корреляционный анализ между процентным содержанием MDSC и цитокинами. Достоверных корреляционных связей между цитокинами и уровнем MDSC не обнаружили.

Однако обнаружена прямая корреляционная связь между экспрессией IDO и продукцией IL-26 ($r=0.8$, $P<0.05$), но обратная между уровнем IDO и продукцией IFN- α 2 ($r=-0.8$, $P<0.05$) под воздействием 10 мкг/мл Gd. Пока нет известных взаимосвязей между уровнем IDO и IL-26, однако IFN I типа может индуцировать экспрессию IDO в клетках (Fallarino et al., 2002). В нашем эксперименте Gd в концентрации 10 мкг/мл повышал уровень IDO, одновременно снижая продукцию IFN- α 2 клетками, что позволяет предположить: индукция IDO не связана с аутогенной продукцией IFN- α 2.

В 2018 г. был продемонстрирован схожий эффект GdA: в эксперименте авторов Gd усиливал экспрессию маркеров IDO децидуальных макрофагов, а блокирование рецептора Siglec-7 на клетках нивелировало биологическое действие Gd на дифференцировку моноцитов, что косвенно указывает на то, что рецептором к GdA может выступать Siglec-7 (Vijayan et al., 2018). Интересно, что позже было проведено исследование, направленное на поиск рецепторов для Siglec на MDSC и в микроокружении опухоли глиомы (Santegoets et

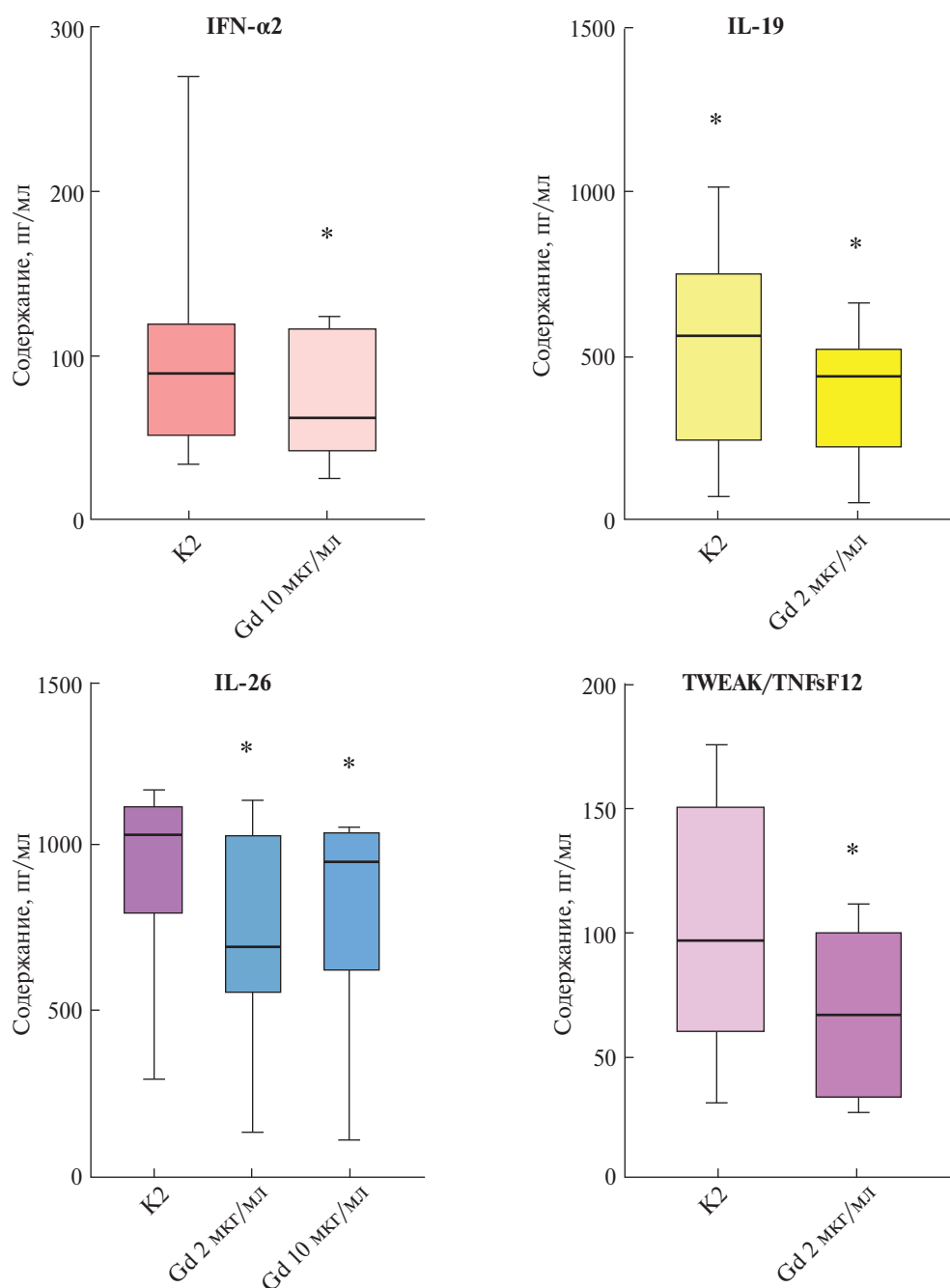


Рис. 3. Продукция цитокинов IFN-α2, IL-19, IL-26 и TWEAK/TNFSF12 клетками CD11b⁺, индуцированными в фенотип MDSC при использовании гликоделина (Gd) в разной концентрации. Показано содержание цитокинов в супернатантах культур MDSC. Представлены медианы, межквартильный диапазон (Q1–Q3, границы столбцов), минимальное и максимальное значения (вертикальные отрезки). (*) – различия медианных значений ($n=7$) достоверны при $P < 0.05$ по сравнению с K2 (культура с добавлением цитокинов и без Gd; непараметрический критерий Фридмана).

al., 2019). Оказалось, что оба подмножества MDSC экспрессируют Siglec-3, -5, -7 и -9, причем на поверхности M-MDSC детектированы более высокие уровни Siglec-3, -7 и -9, а на PMN-MDSC – Siglec-5. Аналогичные профили экспрессии Siglec были обнаружены на MDSC от здоровых доноров. Эти исследования дают основание предположить,

что взаимодействие Gd и MDSC происходит как раз за счет рецептора Siglec-7, который в большей степени экспрессируется именно на M-MDSC.

В рамках изучения иммуномодулирующих эффектов Gd мы исследовали его влияние на конверсию мононуклеарных клеток в MDSC. Было показано, что в концентрациях, соответствующих

здоровой беременности (0.2 и 2 мкг/мл), Gd увеличивал долю MDSC в индуцированных культурах мононуклеарных клеток человека. При анализе подмножеств было выявлено, что этот эффект был обусловлен повышением уровня PMN-MDSC, в то время как уровень M-MDSC оставался неизменным. Этот результат можно интерпретировать как фетопротекторный эффект Gd, так как повышение уровня PMN-MDSC связано с подавлением иммунного ответа на отцовские антигены (Заморина и др., 2021). В нашей работе мы продемонстрировали, что Gd способен также модулировать и M-MDSC, непосредственно стимулируя их супрессорную активность.

В отношении использованных в работе концентраций Gd можно сказать следующее: очевидно, что высокая концентрация Gd оказывала более выраженные эффекты на MDSC, что может дать основание определить иммунофармакологический потенциал этого белка. В то же время в концентрации 2 мкг/мл, соответствующей II-III триместру беременности, Gd индуцировал генерацию M-MDSC и цитокиновый профиль, снижая продукцию IL-19, IL-26 и TWEAK/TNFsF12.

Важно отметить, что другие фетоплацентарные белки также могут стимулировать дифференцировку MDSC *in vitro*: так, нами было показано, что ТБГ увеличивал их количество, преимущественно за счет M-MDSC (Timganova et al., 2023), а АФП повышал количество M-MDSC, экспрессию IDO этими клетками, а также снижал уровень IL-19 (Shardina et al., 2023).

Таким образом, при изучении влияния Gd на генерацию MDSC в условиях *in vitro* установлено следующее.

1. В результате цитокиновой индукции CD11b⁺-клеток генерируются преимущественно M-MDSC, но не PMN-MDSC, и практически не детектируется уровень Arg1.

2. Gd в концентрациях 2 и 10 мкг/мл повышает процентное содержание M-MDSC в культурах клеток.

3. Gd повышает процентное содержание MDSC, экспрессирующих IDO (10 мкг/мл).

4. В физиологической концентрации (2 мкг/мл) Gd модулирует цитокиновый профиль CD11b⁺-клеток, подавляя продукцию IL-19, IL-26 и TWEAK/TNFsF12, а в сверхфизиологической концентрации (10 мкг/мл) — продукцию IFN- α 2 и IL-26.

Таким образом, фетоплацентарные белки способны непосредственно регулировать генера-

цию MDSC, что в условиях беременности способствует формированию иммунной толерантности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-29-04055 “Изучение роли гликоделина (PP14, PAEP) в регуляции ключевых факторов иммунной толерантности в контексте его потенциального применения в трансплантологии” и темы НИОКТР 124020500027-7 (Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводили в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Изыскания также были одобрены комитетом по этике Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь, Россия (IRB00010009) от 15 февраля 2022 г., протокол № 15. Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Заморина С.А., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Шардина К.Ю., Ужвиук С.В., Храмцов П.В., Кропанева М.Д., Раев М.Б. 2021. Роль гликоделина в регуляции дифференцировки миелоидных супрессорных клеток. Мед. иммунология. Т. 21. № 4. С. 603 (Zamorina S.A., Timganova V.P., Bochkova M.S., Shardina K.Yu., Uzhviuk S.V., Khramtsov P.V., Kropaneva M.D., Raev M.B. 2021. The role of glycodelin in the regulation of differentiation of myeloid-derived suppressor cells. Meditsinskaya Immunologiya. V. 23. P. 641). <https://doi.org/10.15789/1563-0625-ROG-2209>
- Тимганова В.П., Шардина К.Ю., Бочкова М.С., Ужвиук С.В., Усанина Д.И., Заморина С.А. 2023. Влияние трофобластического β 1-гликопротеина на дифференцировку миелоидных супрессорных клеток. Мед. иммунология. Т. 25. № 3. С. 513. (Timganova V.P., Shardina K.Yu., Bochkova M.S., Uzhviuk S.V.,

- Usanina D.I., Zamorina S.A. 2023. Effect of pregnancy-specific β 1-glycoprotein on myeloid-derived suppressor cell differentiation. *V. 25. P. 513*.
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-EOP-2838>
- Fallarino F., Grohmann U., Vacca C., Bianchi R., Orabona C., Spreca A., Fioretti M.C., Puccetti P. 2002. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell. Death. Differ. V. 9. P. 1069*. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401073>
- Gantt S., Gervassi A., Jaspas H., Horton H. 2014. The role of myeloid-derived suppressor cells in immune ontogeny. *Front. Immunol. V. 5. P. 1*.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00387>
- Halttunen M., Kämäräinen M., Koistinen H. 2000. Glycodelin: a reproduction-related lipocalin. *Biochim. Biophys. Acta. Protein Struct. Mol. Enzymol. V. 1482. P. 149*.
[https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00158-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00158-8)
- Köstlin-Gille N., Gille C. 2020. Myeloid-derived suppressor cells in pregnancy and the neonatal period. *Front. Immunol. V. 11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.584712>
- Lam K. K., Chiu P. C., Lee C., Pang R. T., Leung C. O., Koistinen H., Seppala M., Ho P. C., Yeung W. S. 2011. Glycodelin-A protein interacts with siglec-6 protein to suppress trophoblast invasiveness by down-regulating extracellular signal-regulated kinase (ERK)/c-Jun Signaling Pathway. *J. Biol. Chem. V. 286. P. 37118*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.233841>
- Li K., Shi H., Zhang B., Ou X., Ma Q., Chen Y., Shu P., Li D., Wang Y. 2021a. Myeloid-derived suppressor cells as immunosuppressive regulators and therapeutic targets in cancer. *Sig. Transduct. Target. Ther. V. 6. P. 362*.
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00670-9>
- Li W. X., Xu X. H., Jin L. P. 2021b. Regulation of the innate immune cells during pregnancy: an immune checkpoint perspective. *J. Cell. Mol. Med. V. 25. P. 10362*.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.17022>
- Lim H. X., Kim T. S., Poh C. L. 2020. Understanding the differentiation. expansion. recruitment and suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells in cancers. *Int. J. Mol. Sci. V. 21. P. 3599*.
<https://doi.org/10.3390/ijms21103599>
- Ostrand-Rosenberg S., Sinha P., Figley C., Long R., Park D., Carter D., Clements V. K. 2017. Frontline Science: Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) facilitate maternal-fetal tolerance in mice. *J. Leukoc. Biol. V. 101. P. 1091*. <https://doi.org/10.1189/jlb.1H11016-306RR>
- Rieber N., Gille C., Köstlin N., Schäfer I., Spring B., Ost M., Spieles H., Kugel H. A., Pfeiffer M., Heininger V., Alkhaled M., Hector A., Mays L., Kormann M., Zundel S., Fuchs J., Handgretinger R., Poets C. F., Hartl D. 2013. Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses. *Clin. Exp. Immunol. V. 174. P. 45*.
<https://doi.org/10.1111/cei.12143>
- Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. 2010. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol. V. 63. P. 601*.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x>
- Santegoets K. C. M., Gielen P. R., Büll C., Schulte B. M., Kers-Rebel E. D., Küsters B., Bossman S. A. J. F. H., Ter Laan M., Wesseling P., Adema G. J. 2019. Expression profiling of immune inhibitory Siglecs and their ligands in patients with glioma. *Cancer. Immunol. Immunother. V. 68. P. 937*. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02332-w>
- Savasan Z. A., Chaiworapongsa T., Romero R., Hussein Y., Kusanovic J. P., Xu Y., Dong Z., Kim C. J., Hassan S. S. 2012. Interleukin-19 in fetal systemic inflammation. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med. V. 25. P. 995*.
<https://doi.org/10.3109/14767058.2011.605917>
- Shardina K., Timganova V., Bochkova M., Uzhviyuk S. 2023. Generation of human myeloid-derived suppressor cells from CD11b⁺ cells *in vitro*. In: Isaeva E., Rocha Á. (eds) *Science and Global Challenges of the 21st Century – Innovations and Technologies in Interdisciplinary Applications*. Perm Forum 2022. Lect. Not. in Netw. and Syst. 622. Springer. Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-28086-3_49
- Timganova V. P., Shardina K. Yu., Bochkova M. S., Uzhviyuk S. V., Usanina D. I., Zamorina S. A. 2023. Effect of pregnancy-specific β 1-glycoprotein on myeloid-derived suppressor cell differentiation. *Med. Immun. (Russia). V. 25. P. 513*.
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-EOP-2838>
- Uchida H., Maruyama T., Nishikawa-Uchida S., Miyazaki K., Masuda H., Yoshimura Y. 2013. Glycodelin in reproduction. *Reprod. Med Biol. V. 12. P. 79–84*.
<https://doi.org/10.1007/s12522-013-0144-2>
- Vijayan M., Lee C. L., Chiu P. C. N., Lee K. F. 2018. Glycodelin-A polarized human macrophages exhibit characteristics and functions similar to decidual macrophages. *Am. J. of Reprod. Immun. V. 80. P. 81*.
https://doi.org/10.1111/aji.55_12984
- Weng J., Couture C., Girard S. 2003. Innate and adaptive immune systems in physiological and patholog. pregn. biology. *V. 12. P. 402*.
<https://doi.org/10.3390/biology12030402>
- Wiley S. R., Cassiano L., Lofton T., Davis-Smith T., Winkles J. A., Lindner V., Liu H., Daniel T. O., Smith C. A., Fanslow W. C. 2001. A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity. V. 15. P. 837*.
[https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00232-1](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00232-1)

THE ROLE OF GLYCODELIN IN THE CONVERSION OF CD11b⁺ CELLS TO MDSC AND THE REGULATION OF THEIR FUNCTIONAL ACTIVITY

K. Yu. Shardina^{a, *}, S. A. Zamorina^{a, b}, M. S. Bochkova^{a, b},
V. P. Timganova^a, S. V. Uzhviyuk^a, M. B. Raev^{a, b}

^a*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Division of the Russian Academy of Sciences —
Branch of Perm State Research Center, Ural Division of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia*

^b*Perm State National Research University, Perm, Russia*

*e-mail: Shardinak@gmail.com

The amniotic variant of glycodelin (Gd) has pronounced immunomodulatory properties and is involved in the formation of immune tolerance during pregnancy. The role of recombinant Gd at physiological (0.2 and 2 µg/ml) and superphysiological (10 µg/ml) concentrations in regulating the differentiation and functional activity of human myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) was investigated in vitro. MDSCs were generated from CD11b⁺ peripheral blood cells of healthy donors by two-step induction (IL-1β + GM-CSF and then lipopolysaccharide (LPS)). The effect of Gd on the content of polymorphonuclear MDSC (PMN-MDSC) and monocytic MDSC (M-MDSC), intracellular expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), arginase-1 (Arg1), and cytokine profile in cell cultures was investigated. In general, the transformation of CD11b⁺ cells into MDSCs exhibits the following characteristics: as a result of cytokine induction, predominantly M-MDSCs but no PMN-MDSCs are formed and Arg1 expression is virtually undetected. Gd was found to increase the number of M-MDSCs at concentrations of 2 and 10 µg/ml. Gd was found not to affect Arg1 expression but increased the percentage of MDSCs expressing IDO (10 µg/ml). Gd also modulated the cytokine profile of CD11b⁺ cells by suppressing the production of IL-19, IL-26 and TWEAK/TNFsF12 at a physiological concentration of 2 µg/ml and the production of IFN-α2 and IL-26 at a supraphysiological concentration. Thus, the role of Gd in the conversion of CD11b⁺ cells to MDSCs was examined under conditions of cytokine induction in vitro.

Keywords: arginase 1, glycodelin immune tolerance, indoleamine 2,3-dioxygenase, cell culture, myeloid suppressor cell, cytokine

УДК 576.38:576.08

НОКАУТ *PTEN* ВЫЗЫВАЕТ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЕ СТАРЕНИЕ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. П. С. Парфенова¹, П. И. Дерябин¹, Д. Ю. Поздняков¹, А. В. Бородин¹, *¹Группа механизмов клеточного старения Института цитологии РАН,

Санкт-Петербург, 194064, Россия

* E-mail: borodkina618@gmail.com

Поступила в редакцию 11.08.2023 г.

После доработки 06.10.2023 г.

Принята к публикации 07.10.2023 г.

Одним из защитных механизмов против неопластической трансформации клеток в ответ на онкогенные стимулы является клеточное старение. Однако способность клеток активировать данную защитную реакцию зависит от их природы и присуща не всем клеточным типам. В нашей работе мы исследовали реакцию эндометриальных стромальных клеток человека (эСК) на классический онкогенный стимул – инактивацию онкосупрессора *PTEN*. Используя технологию направленного редактирования генома CRISPR/Cas9, нам удалось получить линию эСК с нокаутом гена *PTEN*. Мы показали, что снижение экспрессии *PTEN* приводит к потере пролиферативной активности, гипертрофии, накоплению липофусцина и нарушению редокс-баланса клеток. Совокупность выявленных признаков свидетельствует в пользу индукции преждевременного старения в эСК, нокаутных по *PTEN*. При исследовании молекулярных механизмов мы установили ключевую роль PI3K/АКТ сигнального пути в реализации программы старения эСК в условиях нокаута *PTEN*. Ингибирование этого сигнального пути при помощи вещества LY294002 предотвращало как фенотипические проявления преждевременного старения, так и арест клеточного цикла в нокаутных по *PTEN*-клетках. Таким образом, развитие преждевременного старения в условиях сниженной экспрессии онкосупрессора *PTEN* можно рассматривать как защитный механизм, препятствующий злокачественной трансформации эСК.

Ключевые слова: клеточное старение, эндометриальная стромальная клетка человека, туморсупрессор, *PTEN*, *PICS*

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; эСК – эндометриальные стромальные клетки человека; DCF и H₂DCF-DA – дихлорофлуоресцеин и диацетат 2',7'-DCF соответственно; DHR123 – диgidрородамин 123; LY – LY294002 (ингибитор киназы АКТ); PI – йодистый пропилий, *PICS* – клеточное старение, индуцированное потерей *PTEN*; PIP₃ – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат; Rho123 – родамин 123; SA-β-Gal – бета-галактозидаза, ассоциированная со старением.

DOI: 10.31857/S0041377124020035, EDN: RKKFRV

Согласно современным представлениям, клеточное старение, наряду с апоптозом или некрозом, принято рассматривать как важнейшую физиологическую реакцию клеток на стресс (Campisi et al., 1996). Принципиальным отличием этой стресс-реакции является необратимая потеря пролиферации при сохранении жизнеспособности и метаболической активности клеток, что предотвращает распространение поврежденных клеток и, таким образом, препятствует их возможному злокачественному перерождению (Campisi et al., 1996).

За более чем полувековую историю изучения феномена старения клеток ученым удалось идентифицировать различные его формы, включая

репликативную, стресс-индуцированную и онкоген-индуцированную (Huang et al., 2022). Однако и по сей день появляются экспериментальные свидетельства существования новых индукторов и форм клеточного старения. Так, сравнительно недавно было обнаружено, что потеря экспрессии онкосупрессоров, в частности белка *PTEN*, может приводить к запуску старения в различных типах клеток (Alimonti et al., 2010; Parisotto et al., 2018a; Jung et al., 2019).

PTEN представляет собой фосфатазу с двойной субстратной специфичностью, основные биологические эффекты которой определяются способностью дефосфорилировать липидный субстрат – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат

(PIP₃). Результатом дефосфорилирования PIP₃ является ингибирование сигнального пути PI3K/АКТ — основного пути роста и выживания клеток, что и опосредует онкосупрессорную активность PTEN (Chen Z. et al., 2005; Chen C. et al., 2018; Jung et al., 2019). Установлено, что мутации, приводящие к потере (снижению) экспрессии PTEN и соответственно к конститутивной гиперактивации сигнального пути PI3K/АКТ, способствуют онкогенезу и часто встречаются при различных видах рака (Li et al., 1997; Alimonti et al., 2010). Так, снижение экспрессии PTEN в результате мутаций обнаруживается в более чем половине случаев эндометриальных карцином (Karpes et al., 2001; Steelman et al., 2011).

Наряду с данными о последствиях сниженного уровня PTEN в прогрессии рака появляется все больше свидетельств того, что потеря экспрессии PTEN может приводить к преждевременному клеточному старению (Kim et al., 2007; Alimonti et al., 2010; Jung et al., 2019). Такой тип старения был выделен в отдельную форму и получил название клеточного старения, индуцированного потерей PTEN (PICS) (Chen et al., 2005; Alimonti et al., 2010). Считается, что PICS реализуется через p53-зависимый молекулярный механизм, но может возникать в клетках в отсутствие повреждений ДНК, что отличает эту форму старения от его классических форм (Alimonti et al., 2010). Сегодня индукцию старения в результате потери экспрессии PTEN рассматривают как один из важнейших противораковых механизмов, реализующихся на самых ранних этапах формирования опухоли (Bousset, Gil, 2022).

Как сказано ранее, мутации, приводящие к потере экспрессии PTEN, играют важную роль в патогенезе эндометриальных карцином, однако практически не встречаются в случаях эндометриальных сарком (рака стромального компартмента эндометрия) (Karpes et al., 2001; Lancaster et al., 2001; Steelman et al., 2011). Кроме того, согласно нашим предыдущим данным, преимущественным ответом эндометриальных стромальных клеток (эСК), являющихся основным структурным компонентом стромы эндометрия, на различные стрессы и экспрессию онкогена HRAS^{G12V} является индукция старения (Borodkina et al., 2014; Тогоров et al., 2023). Совместно эти наблюдения позволяют предположить, что потеря экспрессии PTEN может приводить к запуску преждевременного старения в эСК и препятствовать онкогенезу, что, в свою очередь, может обуславливать отсут-

ствие связи между прогрессией эндометриальных сарком и мутациями в гене PTEN (Lancaster et al., 2001; Steelman et al., 2011). Таким образом, в рамках нашей работы мы исследовали возможность индукции преждевременного старения эСК в результате нокаута гена PTEN.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование и обработка клеток. В нашей работе использовали эСК человека (линия 2804), полученные и охарактеризованные сотрудниками Института цитологии ранее (Земелько и др., 2011). ЭСК культивировали в питательной среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1% раствора пенициллина и стрептомицина (Gibco, США) и 1% глутамакса (Gibco, США), в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. Использовали эСК на ранних пассажах (с 6-го по 9-й). В экспериментах с использованием ингибитора киназы АКТ полную ростовую среду эСК дополняли веществом LY294002 (LY) в концентрации 5, 10 или 20 мкМ (Sigma, США). Ингибитор LY добавляли через 10 сут после трансдукции эСК; схема обработки описана нами ранее (Грюкова и др., 2017).

Для продукции рекомбинантных лентивирусных частиц использовали клетки НЕК293Т. Их культивировали на среде DMEM (“Биолот”, Россия) с 10% эмбриональной сыворотки (HyClone, США) в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С.

Для наработки плазмид использовали бактерии *Escherichia coli* штамма Stbl3. Бактерии культивировали при 37 °С в питательной среде 2-УТ следующего состава: 1.6% триптона (Amresco, США), 1% дрожжевого экстракта (Amresco, США), 0.5% NaCl при pH 7.0; для подготовки агаризованных чашек Петри питательную среду дополняли 2.5%-ным агаром (Amresco, США).

Все клеточные линии были получены из коллекций клеточных культур Института цитологии РАН. Все клетки рутинно проверяли на протяжении исследования на заражение микоплазмой при помощи ПЦР.

Разработка и клонирование генетически кодируемой системы для CRISPR/Cas9-опосредованного нокаута PTEN. 1. Дизайн последовательностей гидРНК. Последовательности гидРНК были разработаны при помощи веб-приложений CCTop-CRISPR/Cas9 и CRISPR-ERA в соответствии с общепринятыми рекомендациями, а именно: выбором кандидатных вариантов гидРНК, наиболее

Таблица 1. Олигонуклеотидные последовательности гидРНК

№ гидРНК	Олигонуклеотидная последовательность	Состав последовательности
1	Прямая	caccgAAACAAAAGGAGATATCAAG
	Обратная	aaacCTTGATATCTCCTTTTGTTC
2	Прямая	caacgGCTAACGATCTCTTTGATGA
	Обратная	aaacTCATCAAAGAGATCGTTAGCc
3	Прямая	caccgAGATCGTTAGCAGAAACAAAAGG
	Обратная	caccgAGATCGTTAGCAGAAACAAAAGG

эффективно отжигающихся на целевую последовательность; выбором кандидатных вариантов гидРНК, обладающих минимальными нецелевыми эффектами (off-target активность); проектированием последовательностей гидРНК из 20 нуклеотидов соответственно структуре 5'-GN₁₈G-3' при РАМ-мотиве NGG. Последовательности гидРНК подбирали к региону первого конститутивного экзона гена *PTEN*. Всего было подобрано три последовательности гидРНК. Последовательности олигонуклеотидов для клонирования гидРНК кодирующих фрагментов приведены в табл. 1. Синтез олигонуклеотидов был осуществлен в компании “Евроген” (Россия). В качестве контроля был использован исходный лентивектор, несущий бессмысловую гидРНК.

2. Молекулярное клонирование. Последовательности, кодирующие гидРНК, были клонированы в шаблонный лентивектор pCC_01-hU6-BsmBI-sgRNA(E+F)-barcode-EFS-Cas9-NLS-2A-Puro-WPRE (139086; Addgene, США; с любезного позволения Dr. Neville, Sanjana, США) (Legut et al., 2020). Стратегия клонирования последовательностей, кодирующих гидРНК, в лентивирусную конструкцию, заключалась в выполнении следующих операций: рестрикции лентивектора; сборки фрагментов ДНК, кодирующих последовательности гидРНК; вставки собранных фрагментов в разрезанный лентивектор посредством лигирования.

Реакционная смесь для рестрикции содержала 2 мкл раствора лентивектора (1 мкг/мкл), 3 мкл 10-кратного буферного раствора, 0,4 мкл раствора DDT (100 мМ; Fermentas, США), 21,6 мкл ddH₂O (“Евроген”, Россия), и по 1,5 мкл растворов рестриктазы BsmBI (Fermentas, США) и фосфатазы FastAP (Fermentas, США). Рестрикцию проводили при 37 °С в течение 1 ч. Полученные фрагменты ДНК очищали с помощью электрофореза в агарозном геле и последующей очистки из геля при помощи набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Нидерланды) по протоколу производителя.

Сборку фрагментов ДНК, кодирующих последовательности гидРНК, осуществляли путем

попарного отжига комплементарных олигонуклеотидов друг на друга и фосфорилирования их свободных липких концов. Реакции проводили в течение 30 мин при 37 °С с последующей инактивацией ферментов при 95 °С в течение 5 мин. Реакционные смеси готовили следующим образом: 1 мкл 100 мкМ прямого олигонуклеотида, 1 мкл 100 мкМ обратного олигонуклеотида, 1 мкл 10-кратного буфера T4 (Ligation Buffer; NEB, США), 0,5 мкл 10 ед/мкл полинуклеотидкиназы T4 PNK (NEB, США) и 6,5 мкл ddH₂O.

Лигирование фрагментов шаблонного лентивектора и фрагментов, кодирующих последовательности гидРНК, производили непосредственно перед трансформацией бактерий при комнатной температуре в течение 10 мин. Реакционные смеси готовили следующим образом: 50 нг фрагмента BsmBI-разрезанного лентивектора, 1 мкл разведенных в 200 раз дуплексов олигонуклеотидов, 5 мкл 2-кратного буфера Quick Ligase Buffer (NEB, США), 1 мкл смеси лигаз Quick Ligase (NEB, США) и ddH₂O (“Евроген”, Россия) до общего объема 10 мкл.

3. Амплификация лентивекторов в бактериях. Амплификацию лентивирусных конструкций проводили в бактериях *E. coli* штамма Stbl3. Трансформацию бактерий проводили классическим методом теплового шока, используя 5 мкл лигазных смесей. Для селекции трансформированных бактерий использовали ампициллин (“Биолот”, Россия) в рабочей концентрации 100 мкг/мл. Амплифицированные плазмидные конструкции выделяли из биомассы бактерий, выращенной классическим щелочным методом, с последующей очисткой стандартной фенол-хлороформной экстракцией. Чистоту и концентрацию препаратов плазмидных конструкций определяли спектрофотометрически при помощи Thermo Scientific NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) и гель-электрофореза ДНК. В качестве маркера длин ДНК использовали молекулярную лестницу GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, США). Для визуализации плазмидных конструкций агарозные

гели окрашивали 0.5 мкг/мл бромистого этидия в трис-ацетатном буфере и далее анализировали при помощи гель-документирующей системы Chemidock Touch BioRad (BioRad, США).

Лентивирусная трансдукция эСК. Доставку генетически-кодированной системы для нокаута *PTEN* в эСК производили путем лентивирусной трансдукции при нагрузке 20 частиц на клетку в присутствии 20 мкг/мл протаминсульфата (Sigma-Aldrich, США). Сборку лентивирусных частиц проводили посредством ко-трансфекции продуцирующей линии клеток НЕК293Т пакующим вектором psPAX2 (12260; Addgene, США), оболочечным вектором pMD2.G (12259; Addgene, США: оба вектора – с любезного позволения Dr. Didier, Trono, Италия) и смысловым вектором. Все операции культивирования и ко-трансфекции НЕК293Т, а также сборку, фильтрацию, концентрирование, подготовку стоков и флуоресцентного титрования вирусов проводили в соответствии с подробным описанием в нашей предыдущей работе (Deryabin et al., 2019). Селекцию клеток проводили спустя 5 сут после трансдукции добавлением в культуральную среду 2 мкг/мл пурамицина (Invitrogen, США) на 5 сут. Таким образом, анализ влияния нокаута *PTEN* на свойства эСК проводили через 10 сут после трансдукции.

Проточная цитофлуориметрия. Прикрепленные клетки промывали раствором PBS (“Биолот”, Россия), снимали смесью трипсин-Версена (0.05%; “Биолот”, Россия) и ресуспендировали в PBS. Для анализа жизнеспособных клеток образцы окрашивали йодистым пропидием (PI; 50 мкг/мл) и анализировали на цитофлуориметре CytoFlex или CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Данные собирали и обрабатывали с помощью программы CytExpert (versions 1.2; 2.0).

1. Анализ пролиферативной активности, размера и автофлуоресценции клеток. Данные о количестве клеток собирали для жизнеспособных (PI-негативных) клеток. Изменение размера клеток оценивали по изменению прямого светорассеяния (FS) живых клеток. Накопление липофусцина оценивали по среднему значению его автофлуоресценции в зеленом канале (лазер 488 нм, фильтр 525/40 нм).

2. Оценка уровня внутриклеточных активных форм кислорода (АФК), уровня митохондриальных АФК и митохондриального мембранного потенциала. Для детекции внутриклеточных АФК прикрепленные клетки промывали PBS и обрабатывали PBS с 5 мкМ цитоплазматического красителя диацетата 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (H₂DCF-DA

(Invitrogen, США) в течение 20 мин в темноте при 37 °С. Для измерения уровня митохондриальных АФК прикрепленные клетки промывали PBS и окрашивали в PBS, содержащем 30 мкМ митохондриального красителя дигидрородамина 123 (DHR123) (Invitrogen, США) в течение 30 мин в темноте при 37 °С. Флуоресценцию окисленных продуктов дихлорофлуоресцеина (DCF) и родамина 123 (Rho123) соответственно фиксировали в зеленом канале (лазер 488 нм, фильтр 525/40 нм). Для измерения мембранного потенциала митохондрий прикрепленные клетки промывали PBS и инкубировали в PBS с 5 мкМ красителя JC-1 (Thermo Scientific, США) в течение 30 мин при 37 °С. Потенциал-зависимое накопление агрегированного красителя в митохондриях регистрировали по радиометрическому показателю смещения эмиссии мономерной формы красителя в зеленой области спектра в пользу эмиссии агрегатов JC-1 в красной области (лазер 488 нм, фильтры 525/40 и 585/42 нм).

Оценка активности β-галактозидазы (SA-β-Gal).

Активность SA-β-Gal, ассоциированную со старением, выявляли с помощью фирменного набора Senescence-galactosidase staining kit (Cell Signaling, США). Все процедуры осуществляли в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Клетки на чашках промывали PBS, фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре 1-кратным фиксирующим раствором, после чего дважды промывали PBS и окрашивали в β-галактозидазном растворе при 37 °С в течение ночи.

Об активности SA-β-Gal судили по появлению синих гранул в цитоплазме клеток. Количественный анализ изображений проводили с использованием среды MatLab, согласно алгоритму, описанному в методологической статье (Shlush et al., 2011). Для каждой экспериментальной точки вручную отмечали и анализировали минимум 100 случайно выбранных клеток.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Пробоподготовка, электрофорез и иммуноблоттинг проводили в соответствии с процедурой, подробно описанной в нашей предыдущей работе (Deryabin et al., 2019). Для специфического выявления белков использовали антитела против глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы GAPDH (clone 14C10, #2118, Cell Signaling, США); pp53 (Ser15) (клон 16G8) (#9286, Cell Signaling, США); p21^{Waf1/Cip1} (клон 12D1) (#2947, Cell Signaling, США); pRb (Ser807/811) (#8516, Cell Signaling, США); pAKT (Thr308) (#4056, Cell Signaling, США); pAKT (Ser473) (#4060, Cell

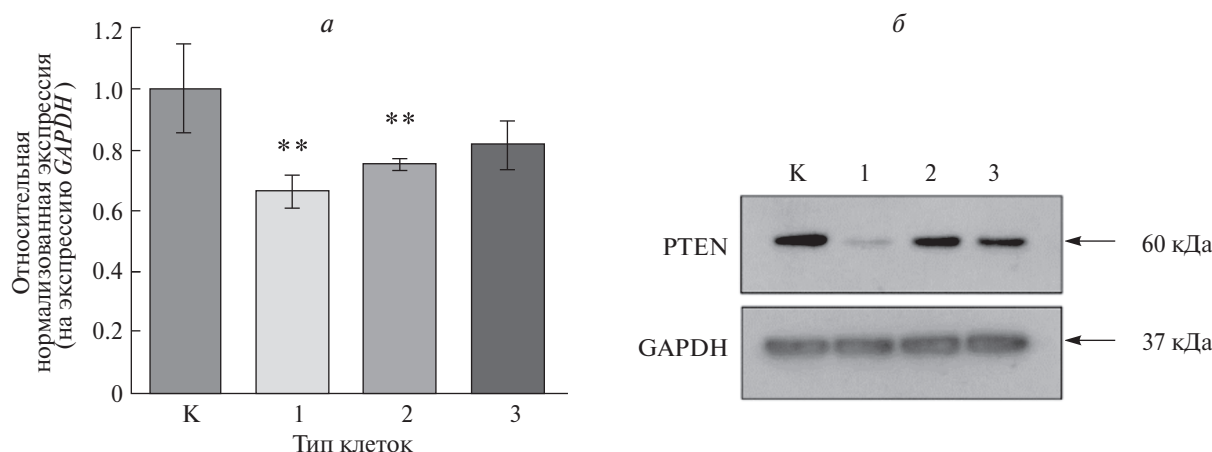


Рис. 1. Подтверждение эффективности работы системы нокаута гена *PTEN*. К — контрольные эСК с несмысловой гидРНК; 1–3 — эСК, несущие систему нокаута с тремя различными гидРНК; а — экспрессия мРНК гена *PTEN*; значения экспрессии *PTEN* нормированы на уровень экспрессии референсного гена *GAPDH*. Представлены средние значения и их стандартные отклонения ($n=3$, n — число повторов реакции); ** — отличия от контроля достоверны при $p < 0.01$ по сравнению с контролем, тест ANOVA с поправкой по Тьюки; б — уровни экспрессии белка *PTEN*, выявленные с помощью специфических антител; справа указаны мол. массы; в качестве контроля нагрузки использовали *GAPDH*.

Signaling, США). В качестве вторичных антител применяли козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика или мыши. Антитела были приобретены в фирме Cell Signaling (США). В работе использовали неорганические соли производства фирмы Sigma (США).

Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени. Выделение РНК, обратную транскрипцию и ПЦР в реальном времени проводили в соответствии с процедурой, подробно описанной в нашей предыдущей работе (Тогоров et al., 2023). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали специфические олигонуклеотидные праймеры для *PTEN*: прямой 5'-TTGAAGACCATAACCCACCA-3' и обратный 5'-CACATAGCGCCTCTGACTG-3', температура отжига 58°C; в качестве референсного гена использовали *GAPDH* с праймерами: прямым 5'-GAGGTCAATGAAGGGGTCAT-3' и обратным 5'-AGTCAACGGATTTGGTCGTA-3', температура отжига 57°C. Все праймеры получены из фирмы "Евроген" (Россия).

Статистическая обработка данных. Анализ выполняли с использованием программных пакетов R-Studio (R-версия 4.2.0) и GraphPad Prism (версия 6.0). Данные представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений ($n=3$). При установлении достоверности различий между двумя группами использовали *t*-тест Уэлча, для множественных сравнений между группами применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Создание линии эСК с нокаутом *PTEN*. Для подавления экспрессии гена *PTEN* в эСК мы воспользовались модифицированной версией системы CRISPR/Cas9, которая была разработана в 2020 г. (Legut et al., 2020). Основу этой версии составил классический лентивектор lentiCRISPR v2, несущий кодон-оптимизированный для человека Cas9 от *Streptococcus pyogenes*. Преимуществом модифицированной системы является наличие нуклеотидных замен в последовательности скаффолда для гидРНК, которые улучшают стабильность самого скаффолда и положительно влияют на его связывание с Cas9.

Три разработанные последовательности гидРНК, которые должны наводить Cas9 на область первого экзона гена *PTEN* и, таким образом, нарушать транскрипцию гена и последующее образование белкового продукта, были клонированы в шаблонный лентивектор. В качестве контроля был использован исходный лентивектор, несущий несмысловую гидРНК. Полученные в ходе молекулярного клонирования варианты лентивекторов использовали для получения вирусных частиц и последующей трансдукции эСК. Согласно результатам, представленным на рис. 1а, б, использование первой гидРНК приводило к наибольшему снижению уровня мРНК *PTEN* и практически полному отсутствию соответствующего белкового продукта. Таким образом, нам удалось получить линию эСК с нокаутом *PTEN*, которую мы использовали в дальнейших экспериментах.

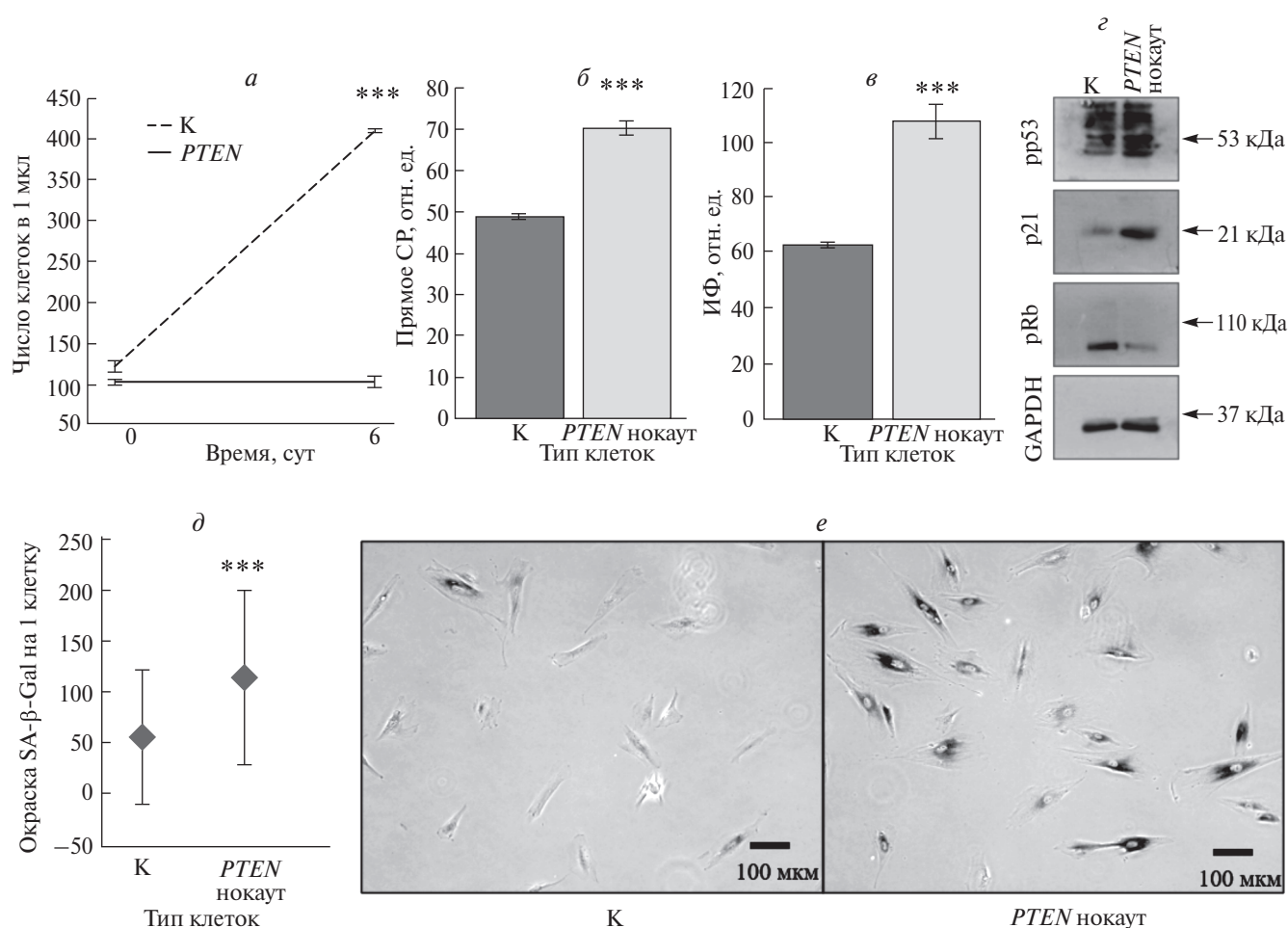


Рис. 2. Снижение экспрессии *PTEN* приводит к запуску преждевременного старения в ЭСК. К – контрольные ЭСК с несмысловой гидРНК; а – кривые роста; б – средний размер клеток, определенный по прямому светорассеянию (СР); в – интенсивность автофлуоресценции (ИФ) клеток, отражающей накопление липофусциновых гранул; г – уровни фосфорилирования белков p53 (pp53) и Rb (pRb), а также экспрессии белка p21Waf1/Cip1 (p21), выявленные с помощью специфических антител; справа указаны молекулярные массы; в качестве контроля нагрузки использовали GAPDH; д, е – соответственно количественная оценка цитохимической окраски SA-β-Gal и микрофотографии; а–в – представлены средние значения и стандартные отклонения из трех повторов измерения; д – оценивали окраску 100 клеток; *** – отличия от контроля достоверны при $p < 0.001$ (t -тест Уэлча).

Анализ маркеров преждевременного старения в линии ЭСК с нокаутом *PTEN*. Получив линию ЭСК со сниженной экспрессией *PTEN*, мы далее проверили наше предположение о развитии преждевременного старения в модифицированных ЭСК. Одним из ключевых признаков клеточного старения является остановка пролиферации (Campisi et al., 1996; Huang et al., 2022). Действительно, ЭСК со сниженной экспрессией *PTEN* демонстрировали практически полное отсутствие пролиферативной активности (рис. 2а). На молекулярном уровне остановка пролиферации в стареющих клетках в большинстве случаев реализуется через сигнальный путь p53/p21^{Waf1/Cip1}/Rb (Campisi et al., 1996; Huang et al., 2022). Подавление экспрессии *PTEN* в ЭСК ожидаемо приводило к фосфорили-

рованию p53, повышению экспрессии p21^{Waf1/Cip1} и гипофосфорилированию Rb (рис. 2г).

Помимо необратимого блока цикла клеточное старение характеризуется рядом других типичных признаков, включая гипертрофию, накопление поврежденных белков и других макромолекул, повышение активности SA-β-Gal и нарушения функционирования митохондрий (Campisi et al., 1996; Borodkina et al., 2014; Huang et al., 2022). Анализ размера клеток, проведенный при помощи проточной цитофлуориметрии, выявил стабильное увеличение размера ЭСК, нокаутных по *PTEN*, по сравнению с контрольными клетками (рис. 2б). Обнаружено также заметное повышение автофлуоресценции модифицированных клеток, что отражает накопление липофусциновых агрегатов, состоящих из

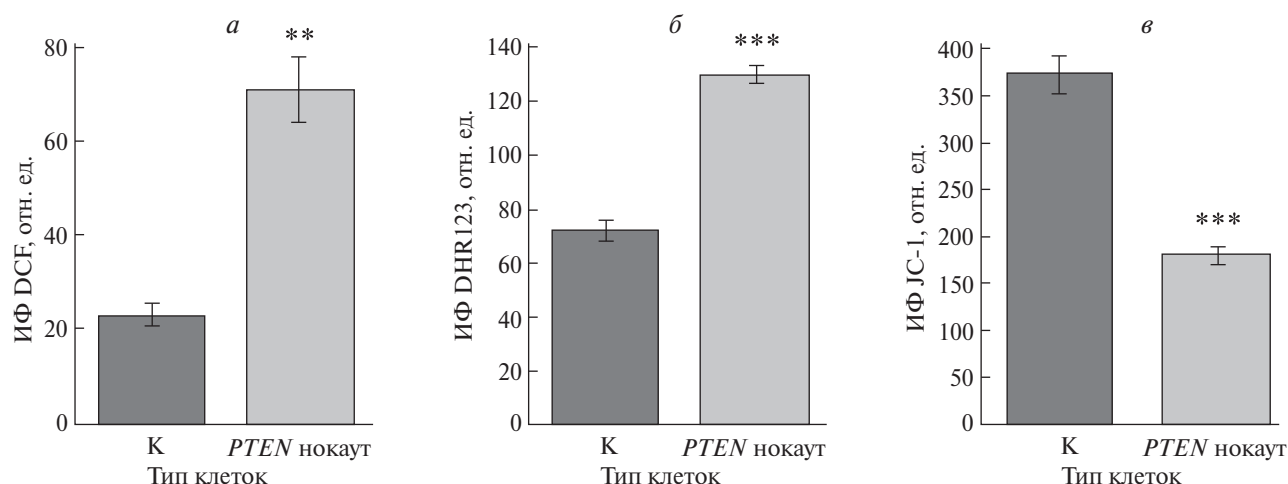


Рис. 3. Изменения редокс-баланса и функционирования митохондрий в контрольных эСК с несмысловой гид-РНК (К) и в эСК при нокауте гена *PTEN*; *а* – уровни внутриклеточных АФК, определенные по интенсивности флуоресценции (ИФ) красителя DCF; *б* – уровни митохондриальных АФК, установленные по ИФ красителя DHR123; *в* – изменение митохондриального мембранного потенциала, определенное по ИФ красителя JC-1. Представлены средние значения и их стандартные отклонения из трех повторов измерения; отличия от контроля достоверны при $p < 0.001$ (***) или $p < 0.01$ (**); *t*-тест Уэлча.

поврежденных макромолекул (рис. 2*в*). Кроме того, эСК с нокаутом по гену *PTEN* характеризовались существенным увеличением активности SA- β -Gal (рис. 2*д*, *е*). Наконец, с помощью набора флуоресцентных красителей в эСК с нокаутом *PTEN* был детектирован рост уровней внутриклеточных и митохондриальных АФК и одновременное снижение мембранного потенциала митохондрий (рис. 3*а–в*). Эти результаты свидетельствуют о нарушениях в работе митохондрий в эСК в условиях пониженной экспрессии *PTEN*.

Суммируя данные, представленные в этом разделе, можно заключить, что снижение экспрессии *PTEN* приводит к запуску преждевременного старения в эСК.

Молекулярный механизм PICS в эСК. Согласно данным литературы, функциональная активность *PTEN* реализуется преимущественно за счет ингибирования сигнального пути PI3K/AKT (Chen et al., 2005; Chen et al., 2018; Jung et al., 2019). Логично предположить, что нокаут гена *PTEN* должен приводить к активации участников этого сигнального каскада. Было предсказуемо, что эСК, нокаутные по *PTEN*, характеризовались усилением фосфорилирования киназы АКТ по обоим активационным сайтам (Ser308 и Ser473) (рис. 4*а*). Эти данные свидетельствуют в пользу вовлеченности сигнального каскада PI3K/AKT в реализацию программы старения в эСК в условиях сниженной экспрессии *PTEN*.

В большинстве случаев стабильность состояния клеточного старения поддерживается сразу

несколькими дублирующими молекулярными механизмами. Зачастую подавление активности одного из сигнальных путей является недостаточным для преодоления старения (Грюкова и др., 2017). В связи с этим для подтверждения роли сигнального каскада PI3K/AKT в реализации PICS в эСК далее мы использовали специфический ингибитор киназы АКТ (LY). Интересно, что подавление активности АКТ в *PTEN*-нокаутных клетках приводило к снижению экспрессии p21^{Waf1/Cip1} и восстановлению фосфорилирования Rb (рис. 4*а*). Принимая во внимание эти результаты, а также учитывая ключевую роль сигнального пути p21^{Waf1/Cip1}/Rb в установлении ареста клеточного цикла в стареющих клетках, можно было ожидать, что ингибирование АКТ будет способствовать восстановлению пролиферации *PTEN*-нокаутных эСК. Действительно, *PTEN*-нокаутные эСК характеризовались заметным улучшением пролиферации в присутствии ингибитора LY (рис. 4*б*). Более того, добавление ингибитора позволило предотвратить увеличение размера, автофлуоресценции и активности SA- β -Gal (рис. 4*в*, *г*, рис. 5). Полученные результаты демонстрируют ключевую роль киназы АКТ в инициации и прогрессии PICS в эСК.

Согласно полученным в нашей работе данным, можно заключить, что в эСК подавление экспрессии онкосупрессора *PTEN* приводит к запуску преждевременного старения через активацию АКТ-зависимого сигнального пути.

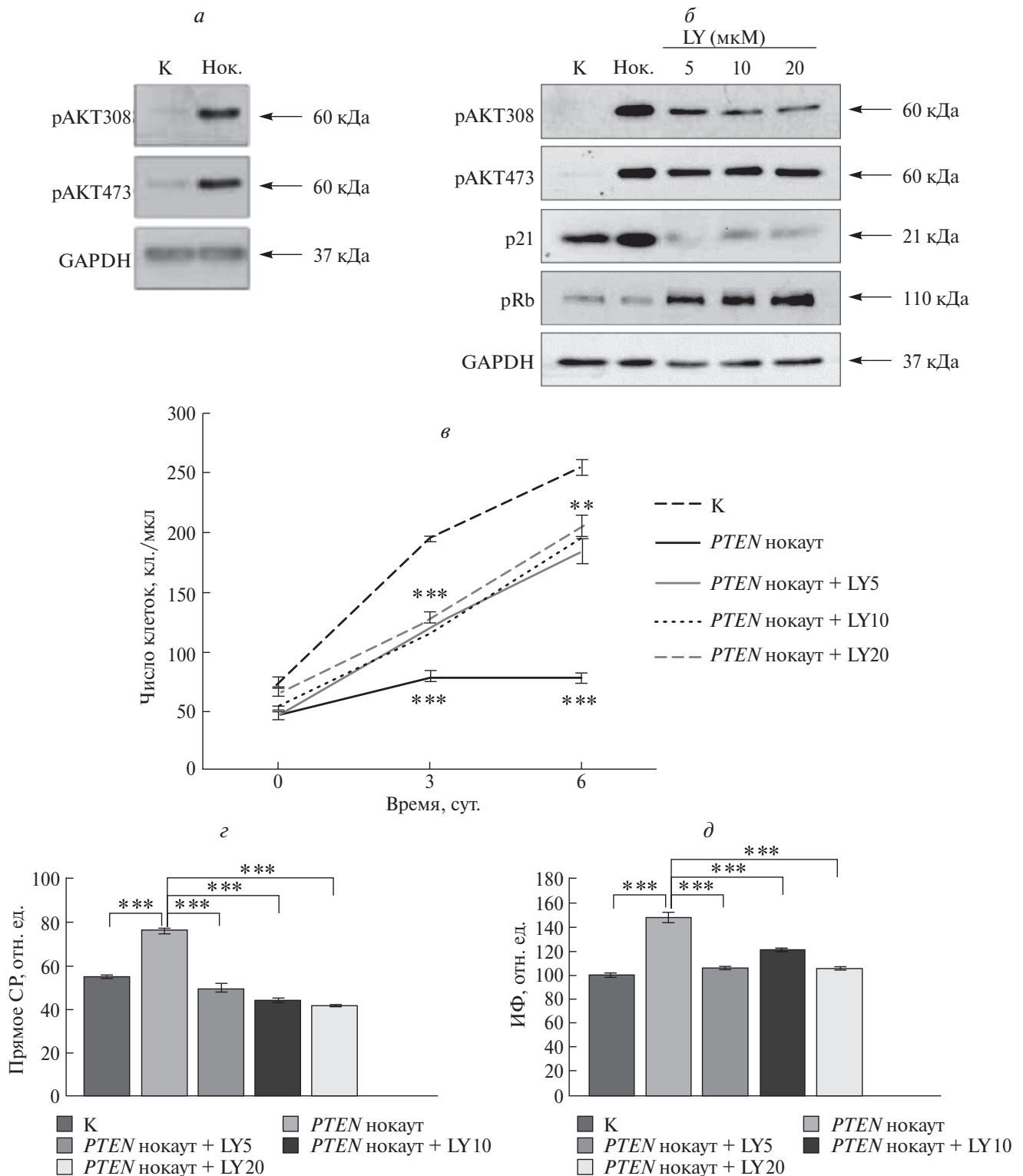


Рис. 4. Активность сигнального пути PI3K/AKT в PTEN-регулируемой индукции старения ЭСК и его модуляция ингибитором LY в контрольных ЭСК с несмысловой гидРНК (К) и в ЭСК с нокаутом гена *PTEN* (Нок.). Клетки с нокаутом гена *PTEN* обрабатывали LY в концентрациях 5 мкМ (LY 5), 10 мкМ (LY 10) или 20 мкМ (LY 20) в течение 6 сут; **а** – уровни фосфорилирования AKT и Rb, а также и экспрессии белка p21^{Waf1/Cip1} (p21), выявленные с помощью специфических антител; справа указаны молекулярные массы; в качестве контроля нагрузки использовали GAPDH; **б** – кривые роста; **в** – средний размер клеток, определенный по прямому светорассеянию (СР); **г** – интенсивность автофлуоресценции (ИФ) клеток, отражающая накопление липофусциновых гранул. Представлены средние значения и их стандартные отклонения из трех повторов измерения; отличия от контроля достоверны при $p < 0.001$ (***) или $p < 0.01$ (**), тест ANOVA с поправкой на множественные сравнения по Тьюки.

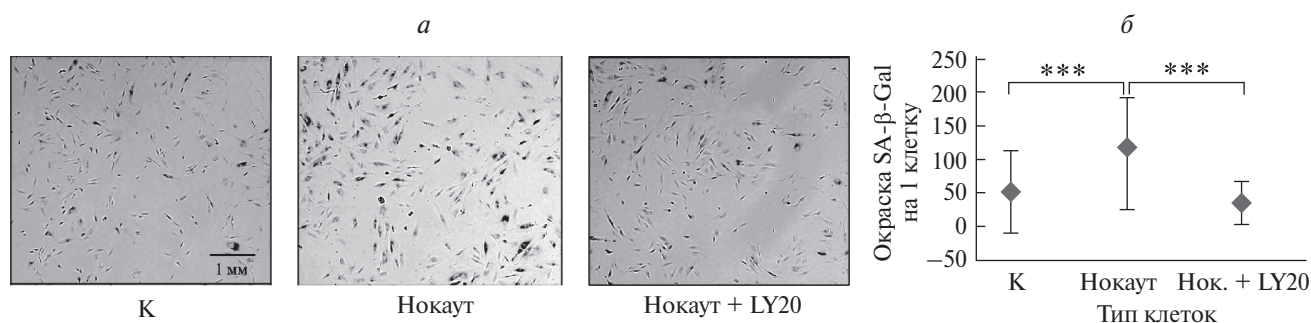


Рис. 5. Ингибирование АКТ предотвращает повышение активности SA-β-Gal в эСК нокаутом гена *PTEN*. Показаны контрольные эСК с несмысловой гидРНК (К), эСК с нокаутом гена *PTEN* (Нок.) и эСК с нокаутом гена *PTEN*, обработанные 20 мкМ LY (Нок. + LY20); а, б – соответственно микрофотографии эСК и количественная оценка цитохимической окраски SA-β-Gal; 6 сут после добавления ингибитора. Представлены средние значения и их стандартные отклонения (оценивали окраску 100 клеток); отличия от контроля достоверны при $p < 0.001$ (***); тест ANOVA с поправкой на множественные сравнения по Тьюки.

ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя термин PICS впервые упоминался в литературе только в 2010 г., наблюдения о взаимосвязи сниженной экспрессии *PTEN* с клеточным старением появились значительно раньше. Так, в одной из ранних работ было установлено, что инактивация *PTEN* вызывает p53-зависимый арест цикла и старение в клетках рака простаты (Chen et al., 2005). Чуть позже появились данные о том, что стабильное подавление экспрессии *PTEN* приводит к повышению экспрессии p53 и аресту пролиферации в нормальных нетрансформированных фибробластах и эпителиальных клетках человека (Kim et al., 2007). Стоит отметить, что вплоть до 2010 г. считалось, что старение, развивающееся в ответ на подавление экспрессии *PTEN*, можно классифицировать как один из частных случаев онкоген-индуцированного старения. Однако в работе 2010 г. на мышинных эмбриональных фибробластах было экспериментально установлено, что старение в результате потери *PTEN* не сопровождается гиперрепликацией и повреждениями ДНК в отличие от онкоген-индуцированной формы старения, в соответствии с чем его стали классифицировать как отдельный независимый тип, получивший название PICS (Alimonti et al., 2010).

С того времени количество публикаций, освещающих феномен PICS и молекулярные механизмы его развития в различных типах клеток, значительно увеличилось. Так, установлено, что индукция клеточного старения в результате утраты экспрессии *PTEN* характерна для клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7, мезенхимных клеток человека и клеток рака простаты (Alimonti et al., 2010; Duan et al., 2015; Parisotto et al., 2018a, 2018b; Jung et al., 2019). Одновременно с этим

индукцию преждевременного старения в ответ на инактивацию *PTEN* все же нельзя рассматривать как универсальную защитную реакцию, присущую всем клеточным типам. Например, нокаут *PTEN* в культуре нервных стволовых клеток приводит к их ускоренному росту, морфологическим изменениям, усилению миграционной активности и устойчивости к апоптозу, что свидетельствует о развитии неопластического потенциала (Duan et al., 2015). Более того, введение таких клеток в полостное тело мозга мыши приводит к образованию внутричерепных опухолей (Duan et al., 2015).

Мы обнаружили, что эСК в ответ на потерю *PTEN* развивают фенотип старения со всеми характерными признаками, включая потерю пролиферации, увеличение размера, автофлуоресценции и активности SA-β-Gal, а также нарушения работы митохондрий. Аналогично другим клеточным типам, для которых показана индукция старения в ответ на подавление экспрессии *PTEN*, в случае эСК с нокаутом *PTEN* старение развивалось преимущественно через сигнальный путь PI3K/АКТ (Alimonti et al., 2010; Duan et al., 2015; Parisotto et al., 2018a, 2018b; Jung et al., 2019).

Важно, что подавление активности этого молекулярного пути практически полностью предотвращало развитие преждевременного старения в эСК. В отличие от этих данных, в наших предыдущих исследованиях, посвященных изучению механизмов преждевременного старения эСК, индуцированного окислительным стрессом, ингибирование пути PI3K/АКТ не приводило к восстановлению пролиферации клеток, а лишь предотвращало фенотипические проявления старения (Грюкова и др., 2017).

Выявленная разница свидетельствует об отличиях в сигнальной регуляции программ стресс-

индуцированного старения и PICS в эСК, которая может заключаться в наличии или отсутствии повреждений ДНК. Действительно, в случае старения эСК, индуцированного окислительным стрессом, мы наблюдали персистентные фокусы повреждения ДНК и постоянную активность киназы ATM, что обуславливало конститутивную активацию сигнального пути p53/p21^{Waf1/Cip1}/Rb и стабильность ареста клеточного цикла (Borodkina et al., 2014). В случае PICS, согласно данным литературы, не детектируются ни фокусы повреждения ДНК, ни повышенная активность ATM (Alimonti et al., 2010). Более того, нокдаун ATM при помощи малой интерферирующей РНК не влияет на развитие PICS (Alimonti et al., 2010). Отсутствие конститутивного сигналинга от повреждений ДНК в случае PICS может обуславливать меньшую стабильность блока цикла и возможность его отменить.

Совершенно другие результаты описаны для линий эндометриальной карциномы с инактивированным *PTEN* — RL 95-2 и Ishikawa (St-Germain et al., 2004a, 2004b). Во-первых, в этих клеточных типах сниженная экспрессия *PTEN* и, как следствие, повышенная активность АКТ не сказываются на их пролиферативной активности и не вызывают преждевременного старения. Более того, ингибирование активности АКТ приводит к индукции апоптоза в этих клетках (St-Germain et al., 2004a, 2004b).

Существует несколько возможных объяснений того, как сниженная экспрессия *PTEN* может, с одной стороны, приводить к индукции преждевременного старения, а с другой стороны, способствовать неопластической трансформации клеток. Так, авторы одной из работ продемонстрировали, что инактивация *PTEN in vitro* и *in vivo* приводит к аресту клеточного цикла и старению (Chen et al., 2005). Однако в случае одновременного снижения экспрессии p53 авторы наблюдали трансформацию клеток и развитие высокоинвазивной летальной формы рака при трансплантации этих клеток животным. На основании этих результатов исследователи заключили, что для злокачественной трансформации *PTEN*-дефицитных клеток необходимо дополнительное подавление экспрессии опухолевого супрессора p53. Авторы другого изыскания нашли иное объяснение роли *PTEN* в индукции старения и канцерогенезе (Alimonti et al., 2010). Согласно их наблюдениям, полная потеря *PTEN* может приводить к запуску преждевременного старения в клетках, тогда как

гаплонедостаточность этого гена будет способствовать их трансформации.

Наши результаты хорошо согласуются с этим предположением. Использование системы CRISPR/Cas9 для нокаута приводит к полной потере *PTEN* в эСК, стабильно экспрессирующих Cas9, и, как видно из наших результатов, такие клетки демонтируют все признаки клеточного старения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансирована Российским научным фондом (проект 19-74-10038).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Грюкова А.А., Шатрова А.Н., Дерябин П.И., Бородинкина А.В., Князев Н.А., Никольский Н.Н., Бурова Е.Б. 2017. Модуляция фенотипических признаков старения стволовых эндометриальных клеток в условиях ингибирования mTOR и MAP-киназных сигнальных путей. Цитология. Т. 59. № 6. С. 410. (Grukova A.A., Shatrova A.N., Deryabin P.I., Borodkina A.V., Knyazev N.A., Nikolsky N.N., Burova E.B. 2017. Modulation of senescence phenotype of human endometrial stem cells under inhibition of mtor and mapkinase signaling pathways. Tsitologiya. V. 59. P. 410.)
- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. № 12. С. 919. (Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artzibasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Bichevaia N.K., Korsak V.S., Nikolsky N.N. 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: Isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. Tsitologiya. V. 53. P. 919.)
- Alimonti A., Nardella C., Chen Z., Clohessy J.G., Carracedo A., Trotman L.C., Cheng K., Varmeh S., Kozma S.C., Thomas G., Rosivatz E., Woscholski R., Cognetti F., Scher H.I., Pandolfi P.P. 2010. A novel type of cellular

- senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* V. 120. P. 681.
- Borodkina A., Shatrova A., Abushik P., Nikolsky N., Burova E.* 2014. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging.* V. 6. P. 481.
- Bousset L., Gil J.* 2022. Targeting senescence as an anticancer therapy. *Mol. Oncol.* V. 16. P. 3855.
- Campisi J., Dimri G., Hara E.* 1996. Handbook of the biology of aging. N.-Y., USA: Academic Press.
- Chen C.-Y., Chen J., He L., Stiles B.L.* 2018. PTEN: tumor suppressor and metabolic regulator. *Front. Endocrinol.* V. 9. P. 338.
- Chen Z., Trotman L.C., Shaffer D., Lin H.-K., Dotan Z.A., Niki M., Koutcher J.A., Scher H.I., Ludwig T., Gerald W., Cordon-Cardo C., Pandolfi P.P.* 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of PTEN-deficient tumorigenesis. *Nature.* V. 436. P. 725.
- Deryabin P., Griukova A., Shatrova A., Petukhov A., Nikolsky N., Borodkina A.* 2019. Optimization of lentiviral transduction parameters and its application for CRISPR-based secretome modification of human endometrial mesenchymal stem cells. *Cell Cycle.* V. 18. P. 742.
- Duan S., Yuan G., Liu X., Ren R., Li J., Zhang W., Wu J., Xu X., Fu L., Li Y., Yang J., Zhang W., Bai R., Yi F., Suzuki K., et al.* 2015. PTEN deficiency reprogrammes human neural stem cells towards a glioblastoma stem cell-like phenotype. *Nature Commun.* V. 6. P. 10068.
- Huang W., Hickson L.J., Eirin A., Kirkland J.L., Lerman L.O.* 2022. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nat. Rev. Nephrol.* V. 18. P. 611.
- Jung S.H., Hwang H.J., Kang D., Park H.A., Lee H.C., Jeong D., Lee K., Park H.J., Ko Y.G., Lee J.S.* 2019. mTOR kinase leads to PTEN-loss-induced cellular senescence by phosphorylating p53. *Oncogene.* V. 38. P. 1639.
- Kappes H., Goemann C., Bamberger A.M., Löning T., Milde-Langosch K.* 2001. PTEN expression in breast and endometrial cancer: correlation with steroid hormone receptor status. *Pathobiology.* V. 69. P. 136.
- Kim J.S., Lee C., Bonifant C.L., Ransom H., Waldman T.* 2007. Activation of p53-dependent growth suppression in human cells by mutations in PTEN or PIK3CA. *Mol. Cell Biol.* V. 27. P. 662.
- Lancaster J.M., Risinger J.I., Carney M.E., Barrett J.C., Berchuck A.* 2001. Mutational analysis of the PTEN gene in human uterine sarcomas. *Am. J. Obstet. Gynecol.* V. 184. P. 1051.
- Legut M., Daniloski Z., Xue X., McKenzie D., Guo X., Wesels H.-H., Sanjana N.E.* 2020. High-Throughput Screens of PAM-Flexible Cas9 Variants for Gene Knockout and Transcriptional Modulation. *Cell reports.* V. 30. P. 2859.
- Li J., Yen C., Liaw D., Podsypanina K., Bose S., Wang S.I., Puc J., Miliareis C., Rodgers L., McCombie R., Bigner S.H., Giovanella B.C., Ittmann M., Tycko B., Hibshoosh H., Wigler M.H., Parsons R.* 1997. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* V. 275. P. 1943.
- Parisotto M., Grelet E., El Bizri R., Metzger D.* 2018a. Senescence controls prostatic neoplasia driven by PTEN loss. *Mol. Cell Oncol.* V. 6. P. 1511205.
- Parisotto M., Grelet E., El Bizri R., Dai Y., Terzic J., Eckert D., Gargowitsch L., Bornert J.-M., Metzger D.* 2018b. PTEN deletion in luminal cells of mature prostate induces replication stress and senescence in vivo. *J. Exper. Med.* V. 215. P. 1749.
- Shlush L., Itzkovitz S., Cohen A., Rutenberg A., Berkovitz R., Yehezkel S., Shahar H., Selig S., Skorecki K.* 2011. Quantitative digital in situ senescence-associated β -galactosidase assay. *BMC Cell Biol.* V. 12. P. 16.
- St-Germain M.E., Gagnon V., Mathieu I., Parent S., Asselin E.* 2004a. Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells. *Int. J. Oncol.* V. 24. P. 1311.
- St-Germain M.E., Gagnon V., Parent S., Asselin E.* 2004b. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway. *Mol. Cancer.* V. 3. P. 7.
- Steelman L.S., Chappell W.H., Abrams S.L., Kempf R.C., Long J., Laidler P., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Stivala F., Mazarino M.C., Donia M., Fagone P., Malaponte G., Nicoletti F., Libra M., et al.* 2011. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY).* V. 3. P. 192.
- Toropov A.L., Deryabin P.I., Shatrova A.N., Borodkina A.V.* 2023. Oncogene-induced senescence is crucial antitumor defense mechanism of human endometrial stromal cells. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24. P. 14089.

***PTEN* KNOCKOUT LEADS TO PREMATURE SENESENCE OF HUMAN ENDOMETRIAL STROMAL CELLS**

P. S. Parfenova¹, P. I. Deryabin¹, D. Y. Pozdnyakov¹, A. V. Borodkina^{1, *}

¹*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, Russia*

^{*}*e-mail: borodkina618@gmail.com*

One of the defense mechanisms against neoplastic transformation of cells in response to oncogenic stimuli is cellular senescence. However, the ability of cells to activate this defense reaction depends on their nature and is not inherent in all cell types. Within the present study, we investigated reaction of human endometrial stromal cells (EnSC) towards classical oncogenic stimulus – *PTEN* inactivation. By using CRISPR/Cas9 genome editing technology, we generated EnSC line with *PTEN* knockout. We showed that reduced *PTEN* expression results in proliferation loss, cell hypertrophy, accumulation of lipofuscin and disturbed redox balance. Together these data favors senescence induction in *PTEN*-knockout EnSC. While studying the molecular mechanisms, we established the key role of the PI3K/AKT signaling pathway in the implementation of the EnSC senescence program under conditions of *PTEN* knockout. Inhibiting this signaling pathway by LY294002 prevented both the phenotypic manifestations of premature senescence and cell cycle arrest in *PTEN*-knockout EnSC. Thus, the development of premature senescence in response to reduced expression of the oncosuppressor *PTEN* can be considered as a protective mechanism that prevents malignant transformation of EnSC.

Keywords: cell senescence, human endometrial stromal cells, tumor suppressor, *PTEN*, PICS

УДК 57.085.23:616-006.5

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА АКТИВНОСТИ HSF1 ИЗ СЕМЕЙСТВА КАРДЕНОЛИДОВ (CL-43) НА ОПУХОЛЕВЫЕ И НЕТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ

© 2024 г. С. А. Владимирова¹, Б. А. Маргулис¹, И. В. Гужова¹, А. Д. Никотина^{1, *}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

* E-mail: nikotina.ad@gmail.com

Поступила в редакцию 17.11.2023 г.

После доработки 30.11.2023 г.

Принята к публикации 04.12.2023 г.

Возникновение непереносимых побочных эффектов у пациентов, проходящих химиотерапию, по-прежнему остается серьезным клиническим препятствием. В связи с этим поиск опухолеспецифичной терапии, не оказывающей токсичного воздействия на здоровые ткани, остается актуальной задачей. Известно, что фактор белков теплового шока HSF1 является важным маркером онкологической прогрессии, а продукты его транскрипционной активности позволяют опухолевым клеткам успешно избегать негативных эффектов противоопухолевой терапии. В связи с этим использование препаратов, ингибирующих активность HSF1, является перспективной стратегией. В настоящей работе мы обнаружили, что применение ингибитора активности HSF1 из группы карденолидов CL-43 оказывает цитопротекторное действие на первичные нетрансформированные клетки дермальных фибробластах (DF-2) и делает их менее чувствительными к этопозиду, в то время как в опухолевых клетках линии DLD1, наоборот, мы наблюдали увеличение этой чувствительности. Помимо этого, мы установили, что CL-43 влияет на внутриядерный транспорт активной формы HSF1, а также увеличивает его активность и, соответственно, синтез HSP70 в фибробластах человека, тогда как в опухолевых клетках CL-43 подавляет эту активность дозозависимым образом. Наши результаты свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале CL-43 и его уникальности как опухолеспецифического соединения.

Ключевые слова: HSF1, комбинированная терапия, CL-43, клетка DF-2

Принятые сокращения: HSF1 и pHSF1 – фактор белков теплового шока и его фосфорилированная форма по Ser326 соответственно; ДМСО – диметилсульфоксид.

DOI: 10.31857/S0041377124020049, **EDN:** RKHDEK

Химиотерапия является одним из наиболее простых и эффективных способов борьбы с онкологическими заболеваниями. В большинстве случаев она способствует продлению жизни, но не гарантирует полного излечения. Химиотерапия использует препараты, уменьшающие вероятность возвращения опухоли и облегчающие симптомы заболевания (боль и прочие тяжелые последствия) (Ajmeer, Ajmeer 2023). Химиотерапия останавливает или замедляет рост быстрорастущих трансформированных клеток, но может оказывать токсическое воздействие и на нормальные клетки. Повреждение и гибель нормальных клеток, окружающих злокачественные клетки, является ключевым побочным эффектом, связанным с текущими стратегиями лечения (Gao et al., 2019). В связи с этим существует необходимость в поиске новых противоопухолевых соединений и стратегий лечения.

Сердечные гликозиды являются ингибиторами Na^+/K^+ -АТФазы и в течение продолжительного

времени используются в медицине для лечения некоторых сердечно-сосудистых заболеваний (Cerella et al., 2013). Однако они являются кандидатами на репрофилирование, поскольку около 50 лет назад был обнаружен их противоопухолевый потенциал, который активно исследуют до сих пор. Несмотря на это, одним из серьезных ограничений работы с сердечными гликозидами как с противоопухолевыми препаратами является их высокая токсичность по отношению к здоровым тканям (Botelho et al., 2019).

В 2018 г. обнаружили сердечный гликозид из семейства карденолидов, который был назван CL-43 (Nikotina et al., 2018). Мишенью этого соединения является фактор теплового шока 1 (HSF1), уровень которого повышен у раковых клеток (Richard, Carpenter, 2019). Активный HSF1 совместно со своими мишенями поддерживает биосинтетические потребности раковой клетки, а также регулирует ответ на стресс, что в итоге

приводит к поддержанию пролиферации, а затем инвазии и метастазированию (Carpenter et al., 2015). Во время исследования противоопухолевых способностей CL-43 было обнаружено, что эта молекула нетоксична в отношении опухолевых клеток, однако за счет подавления активности HSF1 и синтеза некоторых из ее мишеней (молекулярных шаперонов) молекулы CL-43 способствуют увеличению чувствительности опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам (позволяя применять более низкие дозы), что в перспективе снизит негативное воздействие химиотерапии на организм (Nikotina et al., 2018). Однако для более качественной оценки потенциала этого соединения необходимо выяснить его влияние в отношении здоровой ткани.

В нашей работе мы сравнили влияние CL-43 на статус HSF1 в нетрансформированных клетках DF-2 и колоректальной карциномы DLD1, а также эффективность комбинированного воздействия CL-43 и этопозиды на клетки этих линий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Клетки колоректальной карциномы человека DLD1 были любезно предоставлены д-ром Н. А. Барлевым (ИНЦ РАН), линия нормальных фибробластов человека DF-2 была получена из ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных” Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки линии DLD1 культивировали в среде DMEM (“БиолоТ”, Россия), DF-2 культивировали в среде DMEM F-12 (“БиолоТ”, Россия) при 37 °C и 5% CO₂. В среду для культивирования дополнительно вносили 10% фетальной эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ед/мл пенициллина G и 0.1 мг/мл стрептомицина (“БиолоТ”, Россия).

Соединение CL-43 получали из коллекции InterBioScreen, растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) до финальной концентрации 20 мМ и хранили при –20 °C. В текущем исследовании CL-43 использовали в следующих рабочих концентрациях: 0.125, 0.25 и 0.5 мМ. В качестве противоопухолевого препарата мы использовали этопозид (SigmaAldrich, США) в концентрации 10 мМ.

Анализ цитотоксичности в системе xCELLigence. Для сравнения чувствительности опухолевых и нетрансформированных клеток к комбинации препаратов CL-43 и этопозиды использовали прибор xCELLigence (Agilent Technologies, США), который позволяет измерить в режиме реального времени клеточный индекс — безразмерный параметр, от-

ражающий изменение сопротивления клеток (импеданс) в определенный момент, который коррелирует с количеством живых клеток на дне лунки.

Для анализа клеточного индекса в лунки 16-луночной Е-платы, на дне которой вмонтированы золотые микроэлектроды, рассеивали клетки DLD1 (8 тыс./лунка) и DF-2 (2 тыс./лунка). На следующий день меняли среду и одновременно вносили противоопухолевый препарат этопозид (10 мМ) и/или CL-43 (0.25 мМ) и далее на протяжении 40 ч каждые 10 мин оценивали клеточный индекс. Контролем служили клетки, в среду которых добавляли только ДМСО в концентрации, соответствующей таковой в среде с внесенным CL-43. Результаты обрабатывали в программе RTCA Data Analysis Software 2.0 (Acea Bio, США).

Иммуноблоттинг. Для определения количества активного HSF1, фосфорилированного по Ser326, клетки линии DLD1 и DF-2 культивировали в присутствии 0.125, 0.25 или 0.5 мМ CL-43 в течение 18 ч, затем их центрифугировали и трижды отмывали в фосфатно-солевом буферном растворе. Далее к клеточному осадку добавляли лизирующий буфер High RIPA (20 мМ Tris-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 0.1% Тритона X-100, 0.5% SDS, 1% дезоксихолата натрия, 2 мМ EDTA) и ингибитор протеаз PMSF. После этого пробы подвергали сонификации, центрифугировали при 13400 об/мин и определяли концентрацию белка по методу Брэдфорд. Лизаты клеток (30 мкг на дорожку) использовали для проведения электрофореза и иммуноблоттинга.

В работе использовали следующие первичные антитела: ранее полученные в лаборатории клоны 3B5 и 2H9 антител к HSP70, а к фосфорилированной по Ser326 форме HSF1 (SU31-03, ThermoFisher, США) антитела к тубулину (MA1-80017, ThermoFisher, США). Для визуализации белков готовили раствор для проявления (2 мМ TrisHCl pH 8.5, 1.25 мМ люминола, 68 мМ кумаровой кислоты, 0.1% H₂O₂) или раствор Femto-ECL (ThermoFisher, США), съемку мембраны проводили на приборе ChemiDoc (Bio-Rad, США).

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Клетки DLD1 и DF-2 рассеивали в лунки 24-луночного планшета, в которые предварительно помещали покровные стекла. На следующий день в среду добавляли 0.25 мМ CL-43. После этого клетки промывали в PBS, фиксировали в 4%-ном растворе формалина и пермеабелизировали с помощью 0.1%-ного Тритона X100. Далее проводили иммунологическое окрашивание во влажной камере

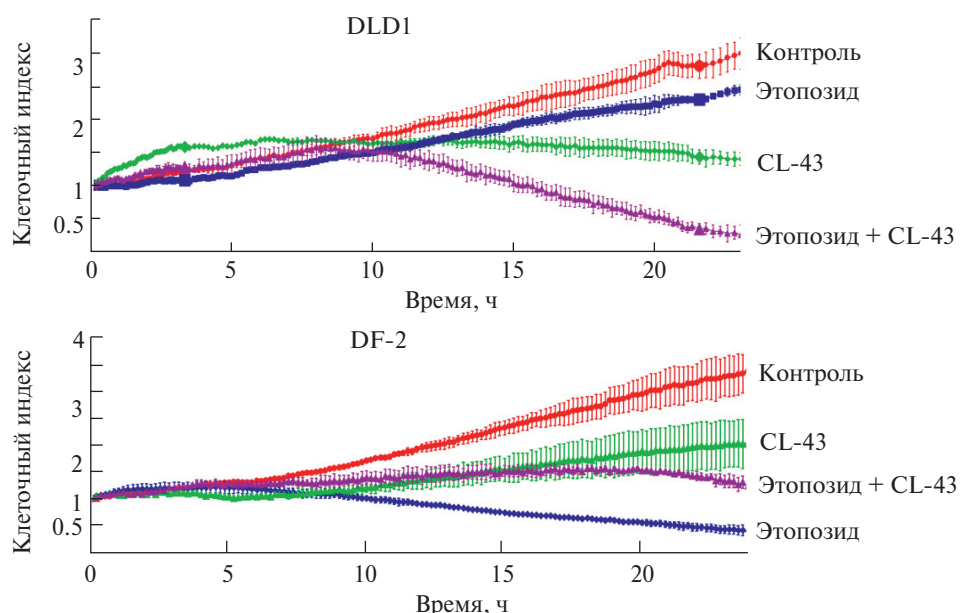


Рис. 1. Изменения клеточного индекса клеток DLD1 и DF-2 в присутствии этопозид и/или CL-43. Клетки высевали в 16-луночные Е-платы и культивировали в присутствии 10 мкМ этопозид и/или 0.25 мкМ CL-43 в течение 20 ч; съемку проводили с регистрацией клеточного индекса каждые 10 мин.

с антителами к фосфорилированной форме pHSF1 (по Ser326) (Abcam, Великобритания), в качестве вторичных антител использовали флуоресцентные антитела с меткой GAR Alexa 488 (ThermoFisher, США). После этого трижды промывали PBS, далее окрашивали ядра флуоресцентным красителем DAPI (Sigma Aldrich, США). Для заключения препаратов использовали DAKO fluorescent mounting medium (DAKO corporation, США). Препараты исследовали с помощью конфокального микроскопа (OLYMPUS FV3000, Германия). Обработку результатов проводили с помощью программы Image J.

Статистический анализ. Использовали программу GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Для оценки различий между группами использовали t-тест Стьюдента, а также однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA) с апостериорными сравнениями по критерию Тьюки. Статистически значимыми считались различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отличительной чертой карденолида CL-43 является его низкая способность влиять на жизне-способность трансформированных клеток. Другие соединения из этой группы, оубаин или дигитоксин, показывают противоопухолевые эффекты, но при более высоких концентрациях и обладают значительной токсичностью в отношении нор-

мальных клеток, что затрудняет их применение в клинике (Kim et al., 2016; Shen et al., 2020).

В нашей работе мы решили более подробно осветить влияние CL-43 на опухолевые клетки, сравнив его с действием CL-43 на нормальные нетрансформированные клетки. В качестве модели последних мы выбрали дермальные фибробласты, полученные от здорового донора мужского пола (DF-2). Для этого мы использовали систему xCELLigence, которая позволяет наблюдать за пролиферативной активностью в режиме реального времени. Мы установили, что культивирование клеток DLD1 после добавления CL-43 (0.25 мкМ) и этопозид (10 мкМ) приводит через 24 ч к снижению клеточного индекса в 10 раз (2.46 ± 0.034) по сравнению с вариантом, когда вносится только этопозид (0.28 ± 0.15), что свидетельствует об усилении цитотоксического эффекта этопозид при его совместном использовании с CL-43 (рис. 1, *верхняя панель*). Аналогичный эксперимент, проведенный с клетками DF-2, показал, что внесение в среду только этопозид в той же концентрации приводит к снижению клеточного индекса до значения 0.3 ± 0.34 , в то время как внесение комбинации препаратов этопозид и CL-43 приводило к росту клеточного индекса до 1.1 ± 0.1 . Эти данные свидетельствуют о возможных цитопротекторных свойствах CL-43 (рис. 1, *нижняя панель*).

Так как CL-43 был обнаружен нами как ингибитор синтеза белка теплового шока HSP70, мы предположили, что различное влияние на чув-

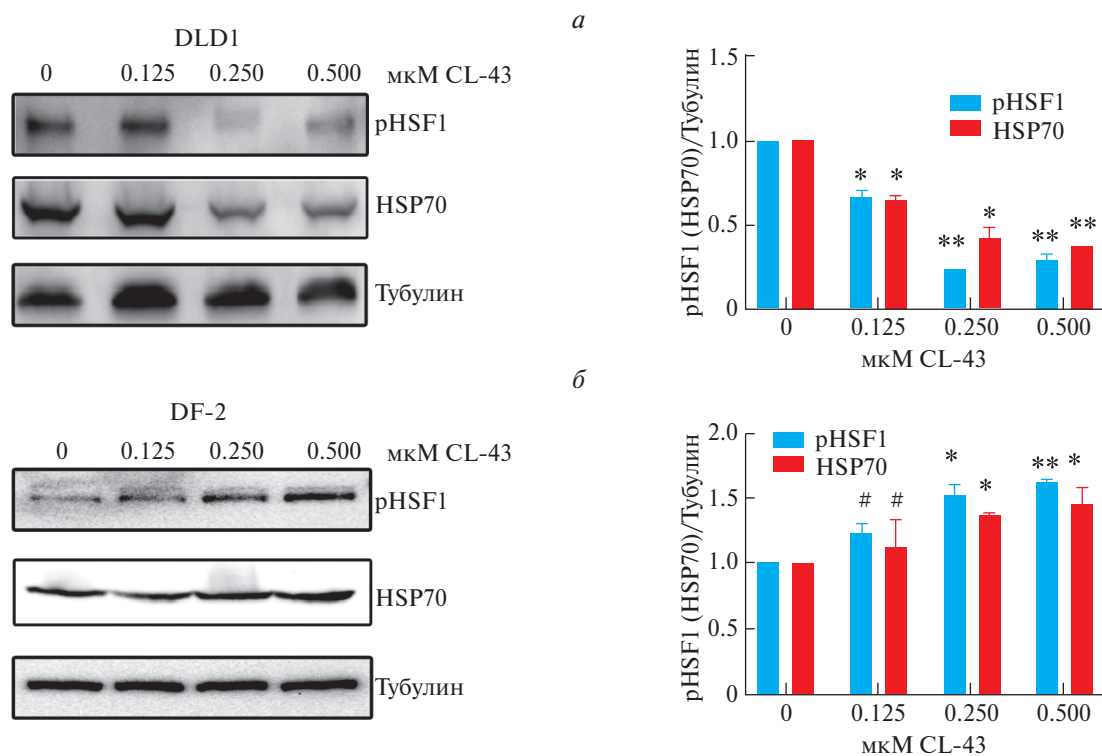


Рис. 2. Изменение количества pHSF1 и его мишени HSP70 в клетках DLD1 (а) и DF-2 (б) под действием CL-43. Слева — иммуноблоты лизатов клеток после их культивирования в течение 20 ч в присутствии 0.125, 0.25 и 0.5 мкМ CL-43. Справа — графическое представление изменения интенсивности полос на блотах; интенсивность каждой зоны нормировали на тубулин, который использовали как контроль нагрузки. Интенсивность зон оценивали с помощью программы ImageLab.

ствительность опухолевых и нормальных клеток может быть связано с разницей во влиянии на транскрипционный фактор белков теплового шока HSF1 и сам HSP70. Для проверки этой гипотезы мы культивировали клетки обеих линий в присутствии 0.125, 0.25 или 0.5 мкМ CL-43 в течение 20 ч, после чего их лизировали и подвергали электрофору и последующему иммуноблотингу.

Мы заметили, что CL-43 имеет разнонаправленный эффект в нетрансформированных фибробlastах человека и опухолевых клетках. В клетках линии DLD1 наблюдали снижение количества HSP70 (на $65 \pm 2\%$) и количества активной формы его транскрипционного фактора HSF1 (pHSF1, фосфорилированного по Ser326) на $53 \pm 1.4\%$ при использовании рабочей концентрации CL-43 250 нМ (рис. 2а). В то же время действие CL-43 в такой же концентрации на клетки фибробlastов человека DF-2 приводило к активации HSF1 и синтезу HSP70, о чем свидетельствовало возрастание их количества на 43 ± 1.7 и $37 \pm 2.1\%$ соответственно (рис. 2б).

Известно, что активация транскрипционного фактора белков теплового шока — это сложный и многоступенчатый процесс, включающий несколько

стадий: 1) под действием высоких температур или других стрессовых воздействий, нарушающих нативную конформацию белков, шапероны рекрутируются для выполнения своих фолдирующих функций, высвобождая тем самым мономеры HSF1 (Guo et al., 2001; Neef et al., 2014); 2) HSF1 подвергается пост-трансляционным модификациям (в основном фосфорилированию), тримеризуется и транслоцируется в ядро (Dai, 2016); 3) в ядре проходят связывание с промоторной областью HSE (heat shock elements) благодаря ДНК-связывающему домену и гидрофобным повторам и активация транскрипции благодаря трансактивирующему домену (Neudegger et al., 2016). Как результат, проходит активация транскрипции ряда генов белков, задействованных в ответе на тепловой шок, и к ним относятся не только белки семейства HSP70.

Поскольку изложенные результаты обнаружили разницу количества активной формы pHSF1 после обработки CL-43 трансформированных и нетрансформированных клеток, мы предположили, что наше соединение может также влиять на транспорт pHSF1 в ядро клетки. Для проверки этого предположения мы использовали иммунофлу-

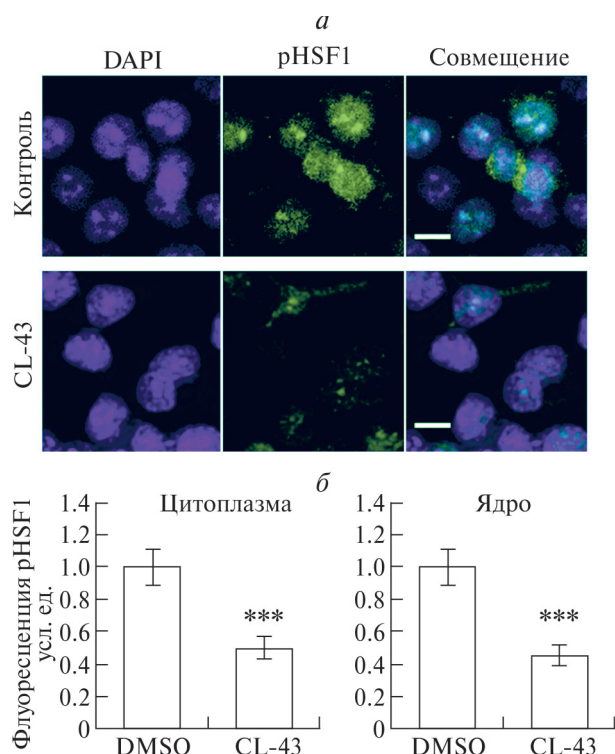


Рис. 3. Локализация активного HSF1(pHSF1) в клетках DLD1 (а) и его количественное распределение (б) после обработки CL-43 в концентрации 250 нм; а – конфокальная микроскопия; после фиксации клетки взаимодействовали с первичными антителами к pHSF1 и вторичными, конъюгированными с меткой Alexa 488. Ядра дополнительно окрашивали DAPI (синий цвет). Контролем служили клетки, в среду которых добавляли ДМСО в концентрации, соответствующей варианту с добавлением раствора CL-43; масштабная линейка: 5 мкм; б – гистограммы показывают средние значения и среднеквадратичные отклонения (из 100 клеток) интенсивности флуоресценции (усл. ед.) pHSF1 в цитоплазме и ядре; (***) – различие достоверно при $p < 0.005$.

оресцентное окрашивание: клетки DF-2 и DLD1 культивировали при 250 нМ CL-43 в течение 20 ч, после чего окрашивали флуоресцентно меченными антителами к pHSF1. Мы установили, что обработка клеток DLD1 карденолидом CL-43 приводит к снижению количества активного pHSF1 (Ser326) как в цитоплазме, так и в ядре клетки на $49 \pm 2.4\%$ и $42 \pm 2.2\%$ соответственно (рис. 3а, б).

Аналогичные исследования на линии клеток дермальных фибробластов вновь продемонстрировали отличные от опухолевых клеток результаты, а именно: после обработки клеток CL-43 не было значимых изменений уровня pHSF1 в цитоплазме, однако в ядре сигнал возрастал в 1.4 раза (рис. 4а, б).

Таким образом, мы установили, что найденное вещество по-разному действует на активность

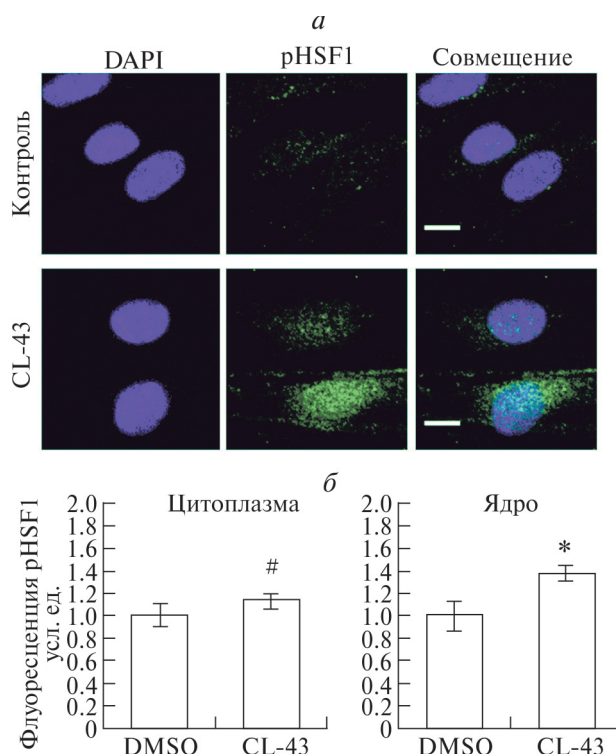


Рис. 4. Локализация активного HSF1 (pHSF1) и его количественное распределение (б) в клетках DF-2 (а) после обработки CL-43 в концентрации 250 нм. Объяснения те же, что и к рис. 3. (*) – различие достоверно при $p < 0.05$; # – отсутствие достоверных различий.

HSF1, активируя реакцию на стресс в нормальных и подавляя ее в раковых клетках. Существенным ограничением работы является то, что мы использовали клеточные линии разного происхождения, но сам факт ее выявления говорит, что нам удалось найти агент с двойным действием и с возможным перспективным применением в терапии сложных онкологических заболеваний. Механизм действия CL-43 на фактор стрессовой реакции до сих пор неизвестен, но несмотря на это, мы можем предполагать, что основной его мишенью, как представителя группы карденолидов, являются Na^+/K^+ -АТФаза и связанная с ней Src-киназа (Banerjee et al., 2018), которая является важнейшим центром *up*-регуляции многих каскадов, в том числе и MEK/ERK (Wang et al., 2015). Помимо этого известно, что Src-киназа является важнейшим онкогеном и сверхэкспрессирована во многих опухолях, в отличие от не-трансформированных клеток (Irby, Yeatman, 2000). В то же время в литературе есть данные об участии MEK/ERK сигнального каскада в регуляции активности HSF1 как транскрипционного фактора, которые в числе прочего могут обеспечивать его фосфорилирование по Ser326 (Dai, 2018).

Таким образом, CL-43 является своего рода уникальным веществом, так как способен не только ингибировать главный активатор защитных механизмов в опухолевых клетках, но и повышать его уровень в здоровых клетках, что важно в контексте борьбы с побочными эффектами терапии. Несмотря на это, механизмы его работы все еще неизвестны и остаются предметом наших дальнейших исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д-ру Н.А. Барлеву за предоставление клеточной линии DLD1. Фибробласты линии DF-2 получены из ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных” Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), которая поддержана Министерством науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-683).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансирована за счет средств Российского научного фонда (проект № 23-24-00538).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ajmeera D., Ajmeera R.* 2023. Drug repurposing: A novel strategy to target cancer stem cells and therapeutic resistance. *Genes Dis.* V. 11. P. 148. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.12.013>
- Banerjee M., Cui X., Li Z., Yu H., Cai L., Jia X., Daheng H., Wang C., Gao T., Xie Z.* 2018. Na/K-ATPase Y260 phosphorylation-mediated Src regulation in control of aerobic glycolysis and tumor growth. *Sci. Rep.* V. 8. P. 1. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-29995-2>
- Botelho A.F.M., Pierezan F., Soto-Blanco B., Melo M.M.* 2019. A review of cardiac glycosides: structure, toxicokinetics, clinical signs, diagnosis and antineoplastic potential. *Toxicon.* V. 158. P. 63. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.429>
- Carpenter R.L., Paw I., Dewhirst M.W. and Lo H-W.* 2015. Akt phosphorylates and activates HSF-1 independent of heat shock, leading to Slug overexpression and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of HER2-overexpressing breast cancer cells. *Oncogene.* V. 34. P. 546.
- Carpenter R.L., Yesim G-P.* 2019. HSF1 as a cancer biomarker and therapeutic target. *Curr. Cancer Drug Targets.* V. 19. P. 515.
- Cerella C., Dicato M., Diederich M.* 2013. Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides. *Mitochondrion.* V. 13. P. 225. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2012.06.003>
- Dai C., Sampson S.B.* 2016. HSF1: guardian of proteostasis in cancer. *Trends Cell Biol.* V. 26. P. 17.
- Dai C.* 2018. The heat-shock, or HSF1-mediated proteotoxic stress, response in cancer: from proteomic stability to oncogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* V. 373. P. 20160525.
- Gao Q.X., Zhou G.X., Lin S.J., Paus R., Yue Z.C.* 2019. How chemotherapy and radiotherapy damage the tissue: comparative biology lessons from feather and hair models. *Exper. Dermatol.* V. 28. P. 413.
- Guo Y., Guettouche T., Fenna M., Boellmann F., Pratt W.B., Toft D.O., Smith D.F., Voellmy R.* 2001. Evidence for a mechanism of repression of Heat Shock Factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. *J. Biol. Chem.* V. 276. P. 45791. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M105931200>
- Irby R.B., Yeatman T.J.* 2000. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene.* V. 19. P. 5636. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1203912>
- Kim N., Yim H.Y., He N., Lee C.J., Kim J.H., Choi J.S., Lee H.S., Kim S., Jeong E., Song M., Jeon S-M., Kim W-Y., Mills G.B., Cho Y-Y., Yoon S.* 2016. Cardiac glycosides display selective efficacy for STK11 mutant lung cancer. *Sci. Rep.* V. 6. P. 29721.
- Neef D.W., Jaeger A., Gomez-Pastor R., Willmund F., Frydman J., Thiele D.J.* 2014. A direct regulatory interaction between chaperonin TRiC and stress responsive transcription factor HSF1. *Cell Rep.* V. 9. P. 955.
- Neudegger T., Verghese J., Hayer-Hartl M., Hartl F.U., Bracher A.* 2016. Structure of human heat-shock transcription factor 1 in complex with DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* V. 23. P. 140.
- Nikotina A.D., Koludanova L., Komarova E.Y., Mikhaylova E.R., Aksenov N.D., Suezov R., Kartzev V.G., Margulis B.A., Guzhova I.V.* 2018. Discovery and optimization of cardenolides inhibiting HSF1 activation in human colon HCT-116 cancer cells. *Oncotarget.* V. 9. P. 27268.
- Shen J., Zhan Y., Li H., Wang Z.* 2020. Ouabain impairs cancer metabolism and activates AMPK-Src signaling pathway in human cancer cell lines. *Acta Pharmacol. Sin.* V. 41. P. 110. <http://dx.doi.org/10.1038/s41401-019-0290-0>
- Wang Y., Zhan Y., Xu R., Shao R., Jiang J., Wang Z.* 2015. Src mediates extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and autophagic cell death induced by cardiac glycosides in human non-small cell lung cancer cell lines. *Mol. Carcinog.* V. 54. P. 26.

EFFECT OF THE HSF1 INHIBITOR CL-43 ON TUMORS AND NON-TRANSFORMED CELLS

S. A. Vladimirova^a, B. A. Margulis^a, I. V. Guzhova^a, A. D. Nikotina^{a, *}

^a *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064, Russia*

^{*} *e-mail: nikotina.ad@gmail.com*

The occurrence of severe side effects in patients undergoing chemotherapy remains a significant clinical challenge. Therefore, the urgent task is to search for tumor-specific therapies that target opposing responses in non-transformed and tumorigenic cells. HSF1 is known to be an important marker of cancer progression and its transcriptional activity products allow tumor cells to escape the adverse effects of anticancer therapies. Thus, drugs inhibiting HSF1 activity hold promise as a therapeutic strategy. Our study shows that using the cardenolide group's HSF1 activity inhibitor, CL-43, provides cytoprotective effects on primary, untransformed dermal fibroblast (DF-2) cells, making them less sensitive to etoposide, whereas we observed an increase in sensitivity in the DLD1 tumor cell line. Furthermore, our results show that CL-43 interferes with the intranuclear transport of the active form of HSF1, increasing its activity and consequently the synthesis of HSP70 in human fibroblasts, while suppressing this activity in tumor cells in a dose-dependent manner. Our findings demonstrate the unique potential of CL-43 as a tumor-specific compound with high therapeutic value.

Keywords: HSF1, combination therapy, CL-43, dermal fibroblast

УДК 576.08:577.352.45

РОЛЬ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ В РЕГУЛЯЦИИ ПОГЛОЩЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КЛЕТОЧНОЙ *IN VITRO* МОДЕЛИ ПОЛЯРИЗОВАННОГО КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ

© 2024 г. Д. Е. Бобков¹, А. В. Лукачева¹, Л. В. Кевер¹, В. В. Фурман¹, С. Б. Семенова¹, *¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

* E-mail: svsem@incras.ru

Поступила в редакцию 29.09.2023 г.

После доработки 25.10.2023 г.

Принята к публикации 27.10.2023 г.

Глюкоза является основным энергетическим субстратом, обеспечивающим метаболические процессы в организме человека и животных. Нарушение метаболизма углеводов часто ассоциировано с ожирением и сопутствующими заболеваниями, такими как сердечно-сосудистые заболевания, артериальная гипертензия, инсулинорезистентность и др. Современные данные указывают на сопряжение всасывания глюкозы в кишечнике со входом Ca^{2+} , однако для подтверждения такого взаимодействия необходимы дополнительные исследования. Мы использовали клеточную *in vitro* модель кишечного эпителия человека для выяснения роли Ca^{2+} -каналов в регуляции всасывания глюкозы. Результаты иммунофлуоресцентной и иммуноэлектронной микроскопии показали, что высокая нагрузка клеток глюкозой (50 мМ) приводит к увеличению плотности кальциевых каналов TRPV6 на апикальной мембране кишечного эпителия. Уровень кальциевого сенсора STIM1, ответственного за депо-зависимый вход кальция (SOCE), напротив, демонстрировал снижение при избыточной нагрузке клеток эпителия глюкозой, которое сопровождалось уменьшением SOCE. Кроме того, инкубация клеток кишечного эпителия в растворе с высокой концентрацией глюкозы приводила к подавлению образования субъединицы p65 транскрипционного фактора NF- κ B, ответственной за экспрессию STIM1. Полученные данные показали, что Ca^{2+} -каналы не только участвуют в регуляции поглощения глюкозы, но и сами могут находиться под контролем глюкозы.

Ключевые слова: клетка, кишечный эпителий, вход кальция, кальциевый канал TRPV6, глюкоза, транспортер GLUT2

Принятые сокращения: $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – внутриклеточная концентрация кальция; FID – FITC-dextran (fluorescein isothiocyanate dextran); ORAI1 – каналы депо-зависимого входа кальция; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор; SGLT1 и GLUT2 – транспортеры глюкозы; SOCE – депо-управляемый вход кальция (store-operated calcium entry); STIM1 – сенсор кальция в ЭПР; TEER – трансэпителиальное/трансэндотелиальное электрическое сопротивление.

DOI: 10.31857/S0041377124020051, EDN: RKFSBW

Кишечный эпителий выполняет множество функций в организме: он служит барьером на пути различных факторов из окружающей среды, обеспечивает транспорт воды и электролитов, а также осуществляет всасывание и переваривание питательных веществ. Сложные углеводы, попадая в тонкий кишечник, сперва гидролизуются до моносахаридов, таких как глюкоза или галактоза, а затем транспортируются через слизистую оболочку кишечника. Поглощение избыточного количества глюкозы в тонком кишечнике сопряжено с развитием ожирения, диабета и сопутствующих тяжелых заболеваний. Терапевтические подходы к лечению таких заболеваний требуют определения четких механизмов регуляции абсорбции глюкозы, которые пока не установлены.

Классический путь абсорбции глюкозы проходит через щеточную мембрану кишечника и преимущественно опосредован мембранным белком-транспортером глюкозы SGLT1, который связывает две молекулы Na^+ вместе с одной молекулой глюкозы (Alexander, Carey, 2001; Gorboulev et al., 2012). Выход глюкозы с базолатеральной поверхности энтероцитов осуществляется транспортером глюкозы GLUT2, который помогает глюкозе перемещаться из энтероцитов во внеклеточную среду возле кровеносных капилляров (Röder et al., 2014). Любой фактор, меняющий активность SGLT1 и GLUT2, также влияет на абсорбцию и метаболизм глюкозы.

В настоящее время предложена модель регуляции кишечной абсорбции глюкозы, в основе

модели лежит изменение уровня внутриклеточной концентрацией кальция $[Ca^{2+}]_i$. Согласно этой модели, при низкой концентрации глюкозы в просвете кишечника всасывание глюкозы осуществляется с помощью SGLT1. Однако когда уровень глюкозы в просвете кишечника становится выше, чем транспортная способность SGLT1, другой переносчик GLUT2, находящийся на базальной мембране клеток, перемещается и встраивается в апикальную мембрану, где начинает участвовать в транспорте глюкозы (Helliwell et al., 2003).

Эти процессы регулируются $[Ca^{2+}]_i$, который модулирует также и экспрессию GLUT2 в энтероцитах (Tharabenjasin et al., 2014; Kuhre et al., 2017). Предварительные результаты свидетельствуют, что транслокация GLUT2 из внутриклеточного пула запускается SGLT1-зависимой активацией протеинкиназы C и MAP-киназы, от которых зависит рост $[Ca^{2+}]_i$ (Helliwell et al., 2003). Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ активирует кальмодулин-зависимую киназу легкой цепи миозина (MLCK), дополнительно активируя миозин II путем фосфорилирования регуляторной легкой цепи (RLC20) по Ser19. Эти процессы приводят к перестройке актинового цитоскелета и в итоге — к транслокации GLUT2 к апикальной мембране клетки (Mace, 2007; Bourzac, 2013). Таким образом, транслокация GLUT2 из цитоплазматических пузырьков в апикальную мембрану существенно увеличивает способность энтероцита поглощать глюкозу (Affleck et al., 2003; Zheng et al., 2012; Грефнер, 2014).

Вход Ca^{2+} через мембраны щеточной каймы энтероцитов в основном осуществляется с помощью эпителиальных Ca^{2+} -каналов TRPV6 (transient receptor potential channels vanilloid type 6), которые были впервые клонированы из эпителиальных клеток тонкого кишечника крысы (Peng et al., 1999). Позднее эти каналы были идентифицированы в клетках других млекопитающих и человека (Nijenhuis et al., 2003).

Каналы TRPV6 могут обеспечивать строго дозированное поступление Ca^{2+} и участвовать в активной (ре)абсорбции Ca^{2+} в эпителиальных клетках почек, тонкого кишечника и плаценты (Hoenderop 2002; Nijenhuis et al., 2003). Согласно ряду сообщений, рост $[Ca^{2+}]_i$ в энтероцитах может также контролироваться потенциал-управляемыми Ca^{2+} -каналами L-типа (например, Cav1.3) (Mace et al., 2007) и депо-активируемыми каналами SOCE (Chung et al., 2015). Немаловажную

роль в кальциевом гомеостазе кишечника играет также Ca^{2+} -чувствительный рецептор (Brown, 2013), который является членом суперсемейства G-белок-сопряженных рецепторов (GPCR) и экспрессируется во всей пищеварительной системе (Diaz et al., 1997).

Следует особо отметить, что, хотя спектр Ca^{2+} -проводящих каналов в энтероцитах довольно хорошо охарактеризован, какие именно каналы участвуют в регуляции всасывания глюкозы в кишечнике, до сих пор не установлено.

Задача нашей работы заключалась в определении роли Ca^{2+} -каналов в регуляции всасывания глюкозы. Для этого мы использовали поляризованный монослой клеток Caco-2 в качестве модели кишечного эпителия. С помощью этого подхода было показано увеличение уровня TRPV6 и снижение уровня STIM1, а также уменьшение депо-зависимого входа кальция в энтероциты в условиях высокой нагрузки клеток глюкозой. Полученные данные указывают на сложное реципрокное взаимодействие двух различных кальциевых путей при поглощении глюкозы клетками кишечного эпителия и на важную роль глюкозы в регуляции этого взаимодействия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Использовали клетки аденокарциномы толстой кишки человека (линия Caco-2), полученные из ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных” Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали при 37 °C и 5% CO_2 в среде DMEM, содержащей 4,5 г/л глюкозы, 15% эмбриональной телячьей сыворотки и 0.008% гентамицина. Для спонтанной дифференцировки в энтероцитоподобный монослой клетки Caco-2 снимали с подложки путем добавления раствора трипсина-версена (0.25 и 0.75% соответственно) и высевали на специальные вставки с полупроницаемой мембраной (размер пор 0.4 мкм), помещенные в многолуночные планшеты (Cell culture insert system; Biofil, Китай). Монослой выращивали в течение 18–21 сут в культуральной среде, при 37 °C и 5% CO_2 . Культуральную среду при выращивании клеток меняли через день. Такой подход позволил создать клеточную объемную (3D) модель поляризованного кишечного эпителия.

Для выяснения влияния уровня глюкозы клетки инкубировали в течение 60 мин в солевой среде, содержащей (мМ): 137 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH_2PO_4 , 1.2 $MgSO_4$, 2.5 $CaCl_2$, 10 HEPES (pH 7.2),

в которую добавляли глюкозу в низкой (2.5, 5 мМ) или высокой концентрации (25, 50 мМ).

Трансэпителиальное/трансэндотелиальное электрическое сопротивление (TEER) измеряли с использованием эпителиального вольтметра EVOM² (WPI Inc., США), снабженного двумя электродами Ag-AgCl. Для этого один электрод погружали в культуральную среду внутри вставки с клеточным монослоем, а другой размещали в среде снаружи от фильтра (в лунке планшета). Держатель электрода позволял контролировать одинаковый уровень погружения пары электродов. Сопротивление слоя клеток TEER рассчитывали по формуле $TEER = RM$, где R — измеренное сопротивление, из которого вычли сопротивление пустой вставки; M — площадь полупроницаемой мембраны (см²).

Измерение проницаемости слоя с использованием FID (FITC-dextran). Клетки во вставках дважды отмывали раствором Хенкса с 10 мМ HEPES (HBSS-H), далее в базолатеральный отсек вносили 700 мкл HBSS-H, а в апикальный отсек к клеткам вносили 125 мкл раствора FID в концентрации 1 мг/мл в HBSS-H. Затем планшеты помещали в CO₂-инкубатор при 37 °С и каждые 30 мин из нижнего отсека забирали по 100 мкл раствора, восстанавливая прежний объем добавлением 100 мкл свежего HBSS-H.

Образцы собирали и измеряли флуоресцентный сигнал отобранных аликвот с использованием планшетного мультимодального ридера Varioskan LUX (Thermo Scientific, США) при длинах волн возбуждения и испускания соответственно 490 и 520 нм. Коэффициент проницаемости Papp рассчитывали по формуле $Papp = dQ/dt/C_0A$, где dQ/dt — поток вещества, мкг/с; C_0 — начальная концентрация в донорном отсеке, мкг/мл; A — площадь пористой поверхности вставки, см² (Westerhout et al., 2014).

Для вычисления значений dQ/dt измеряли концентрацию FID в базолатеральном отсеке через 30, 90 и 150 мин после добавления FID в апикальный отсек, а затем строили линейную регрессию концентрации в зависимости от времени. Если полученное уравнение линейной регрессии было статистически значимым ($P < 0.1$), коэффициент наклона Slope считали равным dQ/dt .

Иммуноэлектронная микроскопия выполнена на участках поляризованного эпителия, которые фиксировали в растворе 2%-ного параформальдегида и 0.5%-ного глутаральдегида в PBS в течение 1 ч, затем обезвоживали в спиртах и заливали в акриловую смолу LR-White (Merck, Германия). Потом

участки эпителия изолировали из культуральных вставок и использовали для приготовления ультратонких срезов, которые помещали на никелевые сетки, покрытые формваровой пленкой. Для иммуноокрашивания сетки выдерживали 20 мин в 1%-ном бычьем сывороточном альбумине, а затем инкубировали 1 ч с первичными анти-TRPV6 антителами (в разведении 1:100) и вторичными антителами, конъюгированными с коллоидным золотом размером 10 нм (1:50).

Контролем служили срезы без обработки первыми антителами. Ультратонкие срезы клеток после обработки контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и анализировали на электронном микроскопе Libra-120 (Carl Zeiss, Германия).

Иммунофлуоресцентный анализ. Изолированные из культуральных вставок участки кишечного эпителия фиксировали в 3.7%-ном параформальдегиде, пермеабилizовали в присутствии 0.25%-ного Tween 20 и инкубировали с первичными антителами при 4 °С в течение ночи. После отмывки клетки инкубировали с вторичными антителами (1:200) в течение 40 мин при 37 °С.

Для визуализации актинового цитоскелета и клеточных ядер клетки окрашивали родамин-фаллоидином и красителем DAPI соответственно. Далее участки эпителия помещали апикальной стороной на покровные стекла, добавляли среду Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, США) и исследовали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Olympus Corporation, Япония), используя масляный объектив 40×. Интенсивность флуоресценции оценивали с помощью ImageJ (NIH, США) и усредняли по меньшей мере для 5–10 образцов в каждом эксперименте.

Интенсивность флуоресценции в клетках после их инкубации в растворах с глюкозой сравнивали с помощью t -критерия Стьюдента. Данные представлены как среднее значение и его ошибка (SEM). Для определения различий использовали U -критерий Манна–Уитни, различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

Вестерн-блот-анализ. Клетки промывали теплым раствором PBS и лизировали в лизирующем буфере (100 мМ NaF, 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 1 М сахарозы, 1% Triton X-100, 100 мкМ PMSF, 10 мМ К-фосфатного буфера pH 7.0) 10 мин на льду. Полученные лизаты клеток центрифугировали при 2000 g, супернатант собирали и определяли концентрацию белка по методу Бредфорда с помощью прибора NanoDrop One (Thermo Scientific, США).

Электрофоретическое разделение белков проводили методом диск-электрофореза с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Ее инкубировали с первичными антителами против исследуемых белков, а затем — с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP). Визуализацию конъюгированных с HRP антител осуществляли путем усиленной хемилюминесценции. Хемилюминесцентное свечение регистрировали с помощью системы SuperSignal Substrate (Thermo Fisher Scientific, США).

Измерение $[Ca^{2+}]_i$. Использовали флуоресцентный кальций-чувствительный зонд Fluo-4 (Molecular Probes, США). Изображения клеток получали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Olympus Corporation, Япония), используя объектив 40× с масляной иммерсией. Интенсивность флуоресценции оценивали с помощью программы ImageJ (NIH, США).

Визуализация актинового цитоскелета. Клетки окрашивали родамин-фаллоидином (Invitrogen, США) в течение 20 мин, ядра окрашивали красителями DAPI (0.05 мкг/мл) или Hoechst 33342 (1.5 мкг/мл).

Антитела. Использовали коммерческие антитела различных производителей: кроличьи, выработанные против TRPV6 (Santa Cruz Biotech, США, или Alomone, Израиль) в разведении 1:100; против STIM1 (Alomone, Израиль) в разведении 1:1000; против ORAI1 (Alomone, Израиль) в разведении 1:200; против p65 (Thermo Fisher Scientific, Великобритания) в разведении 1:1000 и против GLUT2 (Thermo Fisher Scientific, Великобритания) в разведении 1:200. В качестве вторичных антител использовали конъюгаты Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США), GAR-FITC (Jackson, США) и GAM-Cy3 (Jackson, США) в разведении 1:200. Для иммуноэлектронной микроскопии в качестве вторичных антител использовали антикроличьи иммуноглобулины (Sigma, США), конъюгированные с коллоидным золотом (размер частиц 10 нм). Для иммуноблота использовали антикроличьи или антимышинные вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США). Антитела разводили в PBS, pH 7.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На протяжении многих лет трансмембранный перенос веществ изучали, как правило, на изолированных препаратах тонкой кишки или в усло-

виях острого (или хронического) опыта на анестезированных животных. Однако такие условия часто вносили изменения в процессы всасывания веществ и работу различных транспортеров. Более того, поглощение веществ в кишечнике грызунов и человека сильно различается. Поэтому в последнее время в качестве модели для изучения процессов всасывания в тонком кишечнике используют клетки аденокарциномы человека линии Caco-2, которые при длительном культивировании могут поляризоваться и формировать микроворсинки на апикальной поверхности эпителия (Blais et al., 1987).

Мы исследовали роль кальциевых каналов в поглощении глюкозы, используя дифференцированный монослой клеток Caco-2 как клеточную модель кишечного эпителия. После 18–21 сут культивирования клеток Caco-2 на полупроницаемых мембранах (метод transwell assay) исследовали степень дифференцировки и поляризованности монослоя эпителия. Целостность плотных соединений в модели клеточной культуры эпителиального монослоя оценивали путем измерения сопротивления TEER. Этот метод оценки целостности и проницаемости монослоя использовали для мониторинга живых клеток на различных стадиях их роста и дифференцировки (рис. 1). Клетки использовали для проведения эксперимента при достижении значений сопротивления монослоя 400–600 Ом·см².

С помощью электронного микроскопа оценивали фенотип клеток эпителия для проверки их морфологического и функционального соответствия энтероцитам, выстилающим тонкий кишечник. Рис. 2 демонстрирует изображения клеток эпителиального монослоя, на апикальной поверхности которого присутствуют микроворсинки, а

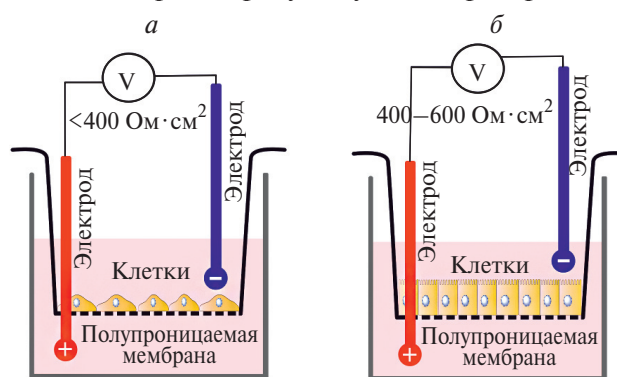


Рис. 1. Схема, демонстрирующая культуральную вставку с клетками на полупроницаемой мембране. Вставка расположена в лунке пластикового планшета для культивирования клеток.

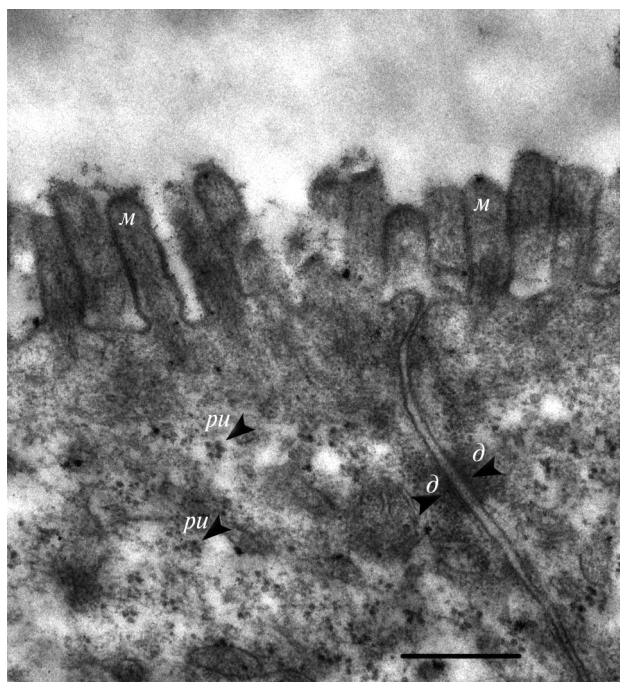


Рис. 2. Ультратонкий срез двух соседних клеток эпителия в области межклеточных контактов. Видны корневые нити микроворсинок, межклеточные контакты, митохондрии и мембраны эндоплазматического ретикулума. Контрольный препарат. Стрелками указаны микроворсинки (*м*), десмосомы (*д*) в местах межклеточных контактов и рибосомы (*ри*) на поверхности эндоплазматического ретикулума. Масштабная линейка: 400 нм.

между клетками видны хорошо сформированные щелевые контакты, что в целом отражает степень поляризации кишечного эпителия. В цитоплазме клеток выявлены все присущие большинству энтероцитов органоиды, включая митохондрии, элементы цитоскелета, эндоплазматический ретикулум с рибосомами и др. По всей длине микроворсинок присутствуют пучки микрофиламентов, переходящие в области терминальной сети в корневые нити.

Присутствие хорошо сформированного актинового цитоскелета в микроворсинках на апикальной поверхности клеток было подтверждено также флуоресцентным окрашиванием с помощью родамин-фаллоидина (рис. 3). Анализ 3D-изображений, реконструированных из серии оптических срезов X–Y, полученных с помощью сканирующего лазерного конфокального микроскопа, подтвердил формирование поляризованного эпителия с присутствием микроворсинок и формированием сверхплотных контактов между клетками кишечного эпителия.

Способность монослоя поглощать глюкозу оценивали с помощью полисахарида декстрана,

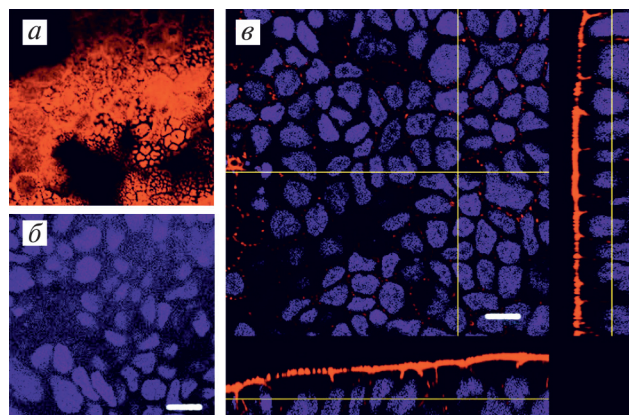


Рис. 3. Модель поляризованного эпителия кишечника, сформированная клетками Сасо-2 на полупроницаемых мембранах в культуральной среде. Срезы в направлении X–Y (*а*, *б*) и Y–Z (*в*). Окраска родамин-фаллоидином (красный) демонстрирует богатые актином микроворсинки на апикальной поверхности клеток, окраска ядер DAPI (синий) свидетельствует о разделении клеток на апикальную и базальную области. Контрольный препарат. Масштабная линейка: 10 мкм.

конъюгированного с флуоресцентным зондом FID. Оценку проводили с помощью планшетного полимодального ридера в двух независимых экспериментах, в каждом из которых определяли коэффициент проницаемости *P_{app}*.

Проведенный анализ показал постепенное нарастание флуоресцентного сигнала с течением времени. Полученный коэффициент проницаемости, равный $(76 \pm 19) \cdot 10^{-6}$ см/с, соответствует высокой предсказанной гастроинтестинальной абсорбции *in vivo* (Yee, 1997) и согласуется со значением *P_{app}* для D-глюкозы, равным $(17–20) \cdot 10^{-6}$ см/с для клеток Сасо-2 (Westerhout et al., 2014).

Для оценки роли кальциевых каналов в транспорте глюкозы мы провели иммунофлуоресцентный анализ пространственного распределения кальциевых каналов TRPV6 и глюкозного транспортера GLUT2 в условиях низкой (5 мМ) и высокой (50 мМ) нагрузки клеток глюкозой. Значения концентраций и время инкубации с глюкозой были выбраны согласно данным работы (Грефнер и др., 2010), в которой концентрация глюкозы в клетках Сасо-2 измерена глюкозооксидазным методом.

Интенсивность флуоресценции GLUT2 анализировали в апикальных и базальных областях с помощью сканирования в направлении осей X–Y и Y–Z. Было установлено, что глюкозный транспортер GLUT2 (рис. 4*а*, *б*) локализуется в цитоплазме клеток кишечного эпителия. Численное значение средней интенсивности флуоресценции

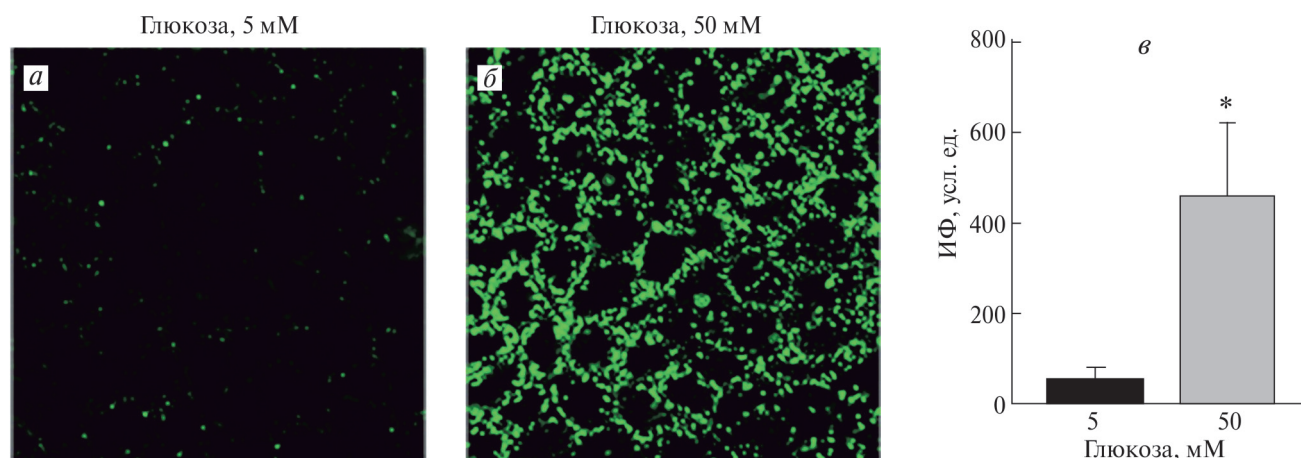


Рис. 4. Поляризованный эпителий кишечника, сформированный клетками Сасо-2 в условиях 3D-культивирования. Срез на уровне середины клетки в направлении X–Y (а, б). Окраска антителами против транспортера глюкозы GLUT2 (зеленый цвет) демонстрирует более высокую его концентрацию при нагрузке клеток 50 мМ глюкозы; масштабная линейка: 10 мкм; в – интенсивность флуоресценции (ИФ) GLUT2 в клетках, инкубированных в присутствии 5 мМ или 50 мМ глюкозы. Вертикальные отрезки – ошибки среднего значения, различия достоверны (*) при $P < 0.05$.

клеток на каждом выбранном уровне сканирования получали с помощью программы ImageJ.

Показано, что иммунореактивность, выявленная с помощью FITC-конъюгированных вторичных антител, существенно увеличивалась при нагрузке клеток 50 мМ глюкозы. Результаты, представленные на рис. 4, демонстрируют, что после инкубации клеток как с 50 мМ, так и с 5 мМ глюкозы распределение сигнала от глюкозного транспортера GLUT2 находится ближе к центральной области поляризованных клеток, а не в ее апикальной или базальной части. Соответственно, у нас нет оснований полагать, что избыточная нагрузка клеток углеводами приводит к перемещению GLUT2 с базальной мембраны и встраиванию в апикальную мембрану (Kellett, 2001).

Анализ иммунофлуоресцентных изображений эпителия, окрашенного антителами против TRPV6, выявил, что уровень сигнала гораздо выше в клетках эпителия, которые испытывали нагрузку 50 мМ глюкозы, чем в клетках с нагрузкой 5 мМ глюкозы. Было замечено, что увеличение флуоресцентного сигнала (и соответственно присутствие каналов TRPV6) наблюдали только на апикальной поверхности мембраны. На уровне базальной мембраны уровень флуоресценции не отличался в клетках, предварительно инкубированных с разными концентрациями глюкозы (рис. 5).

Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания получили подтверждение также в экспериментах с использованием иммуоэлектронной микроскопии. Для электронно-микроскопического анализа предварительно инкубированные в соле-

вом растворе клетки (с концентрациями глюкозы 5 или 50 мМ) обрабатывали специфическими антителами против TRPV6 и вторичными антителами, конъюгированными с золотом. Анализ ультратонких срезов эпителия показал значимо большее количество золотых частиц (10 нм), маркирующих каналы TRPV6, на апикальной мембране энтероцито-подобных клеток после их нагрузки 50 мМ, чем после нагрузки 5 мМ глюкозы (рис. 6б).

С помощью вестерн-блот-анализа в Тритон X-100-растворимых фракциях лизатов клеток Сасо-2 обнаружено присутствие белков ORAI1 и STIM1, ответственных за депо-зависимый вход кальция в клетки (рис. 7а). Более того, показано, что уровень кальциевого сенсора, белка STIM1, существенно снижается при нагрузке клеток 25 мМ глюкозы, в то время как белок Orail, формирующий поры, по-видимому, не чувствителен к нагрузке клеток глюкозой. Кроме того, вестерн-блот-анализ выявил, что уровень субъединицы р65 транскрипционного фактора NF-κB, ответственного за экспрессию STIM1 (Eylensstein et al., 2012; DebRoy et al., 2014), также падает при увеличении нагрузки клеток 25 мМ глюкозы (рис. 7а).

Измерение уровня внутриклеточного кальция с использованием флуоресцентного кальций-чувствительного зонда Fluo-4 показало увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на действие активатора опустошения кальциевых депо-тапсигаргина, подтверждая тем самым активацию депо-зависимого входа кальция в клетки Сасо-2 (рис. 7б). Важно, что кальциевый ответ на действие тапсигаргина в клетках, инкубированных с 2.5 мМ глюкозы,

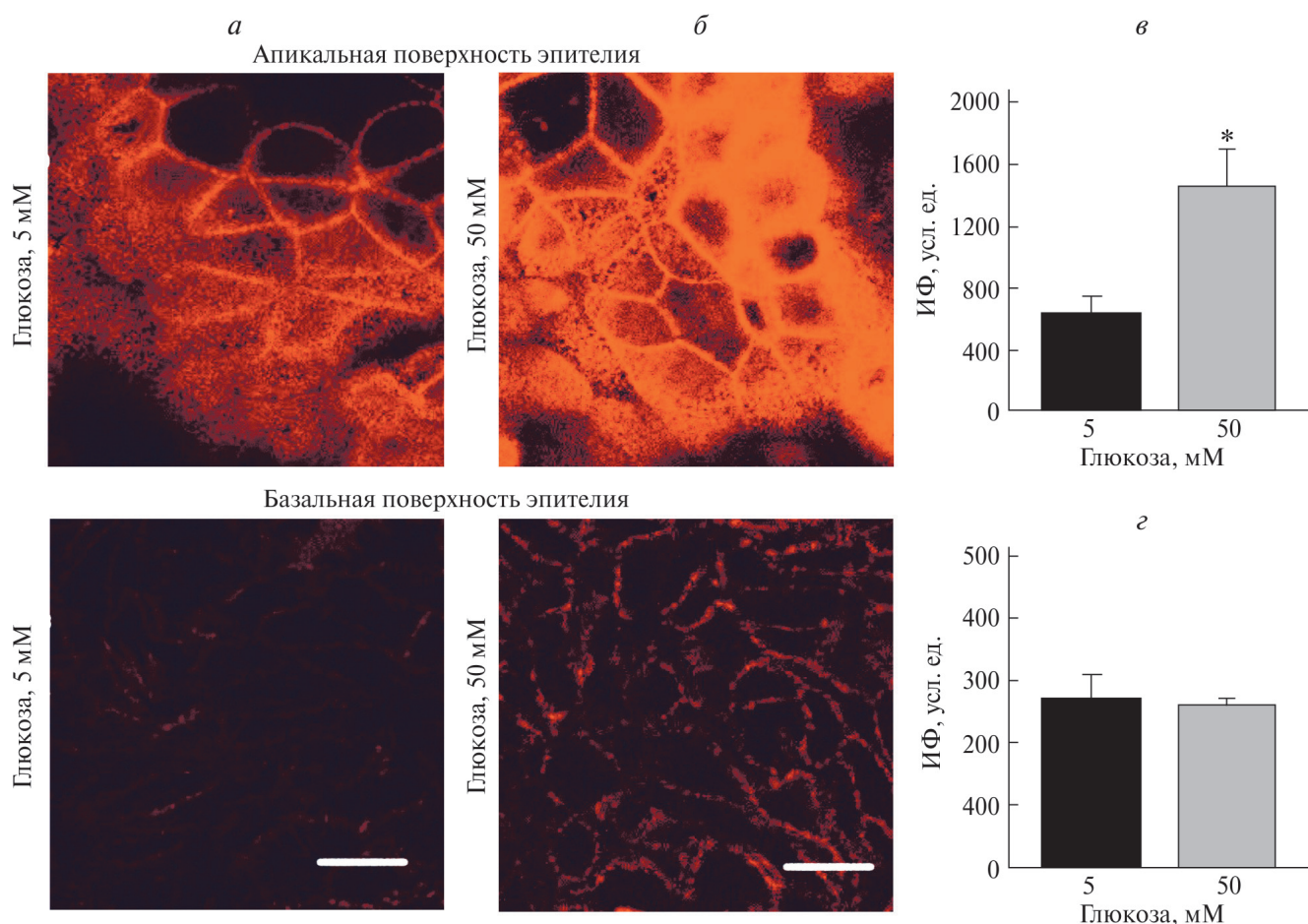


Рис. 5. Поляризованный эпителий кишечника, сформированный клетками Сасо-2. Срез на уровне апикальной (а) и базальной (б) мембраны клеток в направлении X–Y. Окраска антителами против TRPV6 (красный цвет) демонстрирует более высокую концентрацию TRPV6 на апикальной поверхности при нагрузке клеток 50 мМ глюкозы; в, з – интенсивность флуоресценции (ИФ) TRPV6; масштабная линейка: 10 мкм. Вертикальные отрезки – стандартные ошибки среднего значения, различия достоверны (*) при $P < 0.05$.

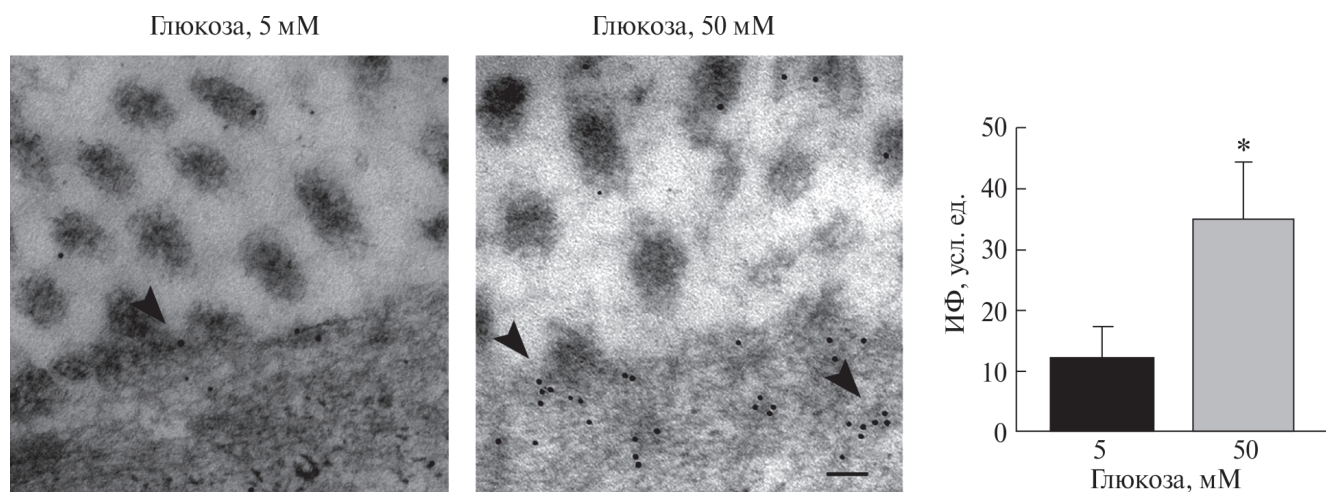


Рис. 6. Локализации каналов TRPV6 в клетках кишечного эпителия в зависимости от нагрузки глюкозой. Иммуноэлектронная микроскопия. Микрофотографии распределения частиц коллоидного золота (10 нм, стрелки), соответствующих каналам TRPV6 в клетках, нагруженных 5 мМ и 50 мМ глюкозы; масштабная линейка: 100 нм; гистограмма показывает численное распределение частиц золота в клетках, инкубированных в присутствии 5 и 50 мМ глюкозы. Показаны средние значения и их ошибки, различия достоверны (*) при $P < 0.05$.

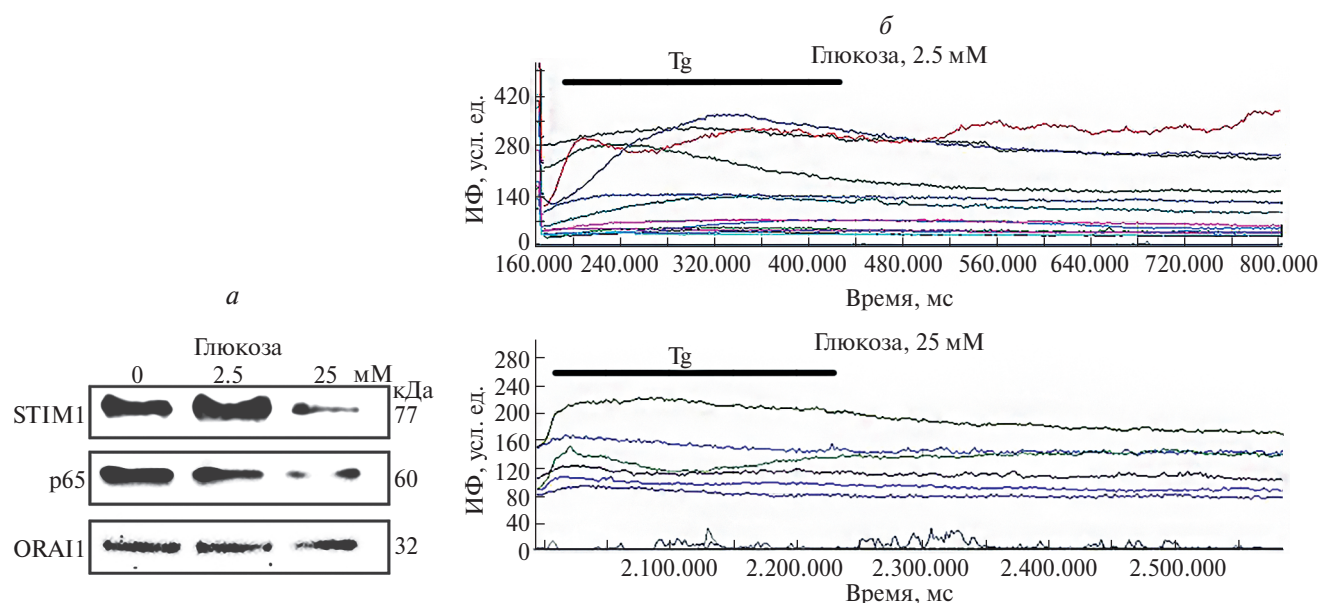


Рис. 7. Влияние глюкозы на депо-зависимый вход кальция в клетки Сасо-2: *а* — Вестерн-блоттинг: влияние различных концентраций глюкозы на содержание белков STIM1, ORAI1 и субъединицы p65 фактора NF-κB в клетках Сасо-2; *б* — более низкий депо-зависимый вход кальция (в ответ на действие тапсигаргина Tg) в клетки Сасо-2 после нагрузки их 25 мМ глюкозы (по сравнению с таковым после нагрузки клеток 2.5 мМ глюкозы). Показана зависимость интенсивности флуоресценции (ИФ) кальций-чувствительного зонда Fluo-4 (ось ОУ) от времени (ось ОХ) по данным прижизненной конфокальной микроскопии. Цветные линии на графиках показывают сигнал от разных клеток, находящихся в одном поле зрения.

был существенно выше, чем в клетках, насыщенных 25 мМ глюкозы (рис. 7б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что проблеме транспорта глюкозы в кишечном эпителии посвящено много работ, концепции функционального взаимодействия транспортеров глюкозы с катионными каналами только начинают формироваться в научном мире. Так, было показано, что при исключении Ca^{2+} из люминального перфузата при высоких концентрациях глюкозы всасывание глюкозы прекращается (Morgan et al., 2007). Поступающие данные указывают на участие $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и кальциевых каналов в работе транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2, однако детали такого взаимодействия остаются неясными. Отчасти это связано с трудностями проведения экспериментальных измерений в просвете кишечника и капиллярах крови.

Для выяснения роли кальциевых каналов в абсорбции глюкозы мы использовали клеточную *in vitro* модель кишечного эпителия человека, чтобы иметь возможность менять экспериментальные условия и изучать механизмы поглощения глюкозы на участке живой эпителиальной ткани человека (или органа), а не на одиночной клетке.

Наши результаты показали, что количество высокоселективных эпителиальных Ca^{2+} -каналов TRPV6 существенно увеличивается при увеличении нагрузки эпителиальных клеток глюкозой. Следует особенно отметить, что присутствие каналов наблюдается в основном на апикальной поверхности мембраны и не меняется на базальной мембране, что указывает на необходимость присутствия каналов на участке, где происходит абсорбция глюкозы.

В работе было обнаружено, что количество кальциевых сенсоров эндоплазматического ретикула STIM1, отвечающих за другой — депо-зависимый — вход кальция в клетки, напротив, существенно снижался. Эти результаты согласуются с уменьшением входа SOCE в условиях с избыточной нагрузкой глюкозой и указывают на реципрокные взаимодействия между двумя путями входа кальция: через кальциевые каналы TRPV6 и через кальциевый комплекс ORAI1/STIM1. Такой кальциевый баланс критически необходим для нормального функционирования клетки, поскольку избыток кальция, как и его недостаток, может быть губительным для клеток.

Известно, что NF-κB рекрутируется в сайты связывания в промоторах STIM1 и ORAI1 (DebRoy et al., 2014). Полученные результаты вестерн-блот-анализа продемонстрировали, что уровень

p65, который был достаточно высок в клетках Caco-2, существенно снижается при увеличении концентрации глюкозы в среде. Это может свидетельствовать о вероятном влиянии глюкозы на экспрессию STIM1 через регулирование экспрессии транскрипционного фактора NF-κB.

Из литературных источников известно влияние глюкозы на экспрессию многих генов. Например, в ответ на высокий уровень глюкозы изменяется экспрессия генов *RASD1*, *GLRA1*, *VAC14*, *SLCO5A1*, *TMED3*, *SYT16*, *LEPREL2* и *CHRNA5* (Hall et al., 2018), подтверждая тем самым вероятность влияния высокой концентрации глюкозы на прямую или опосредованную экспрессию генов, кодирующих кальциевые каналы.

Фактически глюкоза регулирует пути поступления Ca^{2+} , а Ca^{2+} регулирует всасывание глюкозы. Считается, что высокая концентрация глюкозы деполяризует апикальную мембрану энтероцита в результате активации натрий-глюкозного котранспортера, что приводит к увеличению абсорбции Ca^{2+} . Связывание Ca^{2+} с белком кальбиндином-D9K предотвращает увеличение поглощения Ca^{2+} и стимулирует трансклеточный транспорт, который в принципе направлен на ослабление потенциального увеличения цитозольного Ca^{2+} (Morgan et al., 2007).

Однако исследования поглощения кальция в клетках почек показали, что кинетика связывания Ca^{2+} с кальбиндином-D28K достаточно медленная относительно повышения цитозольного Ca^{2+} (Koster et al., 1995). Поэтому вполне логично предположить, что снижение кальция в клетке при высокой концентрации глюкозы происходит за счет ограничения других путей поступления Ca^{2+} в клетку, например снижения входа SOCE.

В целом интеграция абсорбции глюкозы и поступления Ca^{2+} через кальциевые каналы представляет собой сложную систему реципрокных взаимодействий, которая позволяет быстро и точно сбалансировать пути поступления необходимых ионов и молекул при потреблении пищи.

Следует отметить, что мы не получили данных в пользу гипотезы, предполагающей всасывание глюкозы (особенно в диапазоне ее высоких концентраций) с помощью механизма облегченной диффузии с участием глюкозных транспортеров GLUT2 (Kellett, 2001; Kellett, Helliwell, 2000), которые при высоких углеводных нагрузках могут встраиваться в апикальную мембрану клеток кишечника и транспортировать глюкозу. Для понимания полной картины этого сложного процесса необходимы дополнительные исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Клеточная линия Caco-2 получена из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), которая поддерживается Министерством науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-683).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансирована Российским научным фондом (проект № 22-25-00365).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Грефнер Н.М., Громова Л.В., Груздков А.А., Комиссарчик Я.Ю. 2010. Сравнительный анализ распределения переносчиков SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах тонкой кишки крысы и клетках Caco2 при всасывании гексоз. Цитология. Т. 52. С. 580. (Grefner N.M., Gromova L.V., Gruzdkov A.A., Komissarchik Ya.Yu. 2010. Comparative analysis of SGLT1 and GLUT2 transporter distribution in rat small intestine enterocytes and Caco2 cells during hexose absorption. Tsitologiya. V. 52. P. 580.)
- Грефнер Н.М., Громова Л.В., Груздков А.А., Комиссарчик Я.Ю. 2014. Взаимодействие транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 и цитоскелета в энтероцитах и клетках Caco2 при транспорте сахаров. Цитология. Т. 56. С. 749–757. (Grefner L.V., Gromova A.A., Gruzdkov, Komissarchik Ya.Yu. 2014. The interaction between SGLT1 or GLUT2 glucose transporter and the cytoskeleton in the enterocyte as well as Caco2 cell during hexose absorption. V. 56. P. 749.)
- Affleck J.A., Helliwell P.A., Kellett G.L. 2003. Immunocytochemical detection of GLUT2 at the rat intestinal brush-border membrane. J. Histochem. Cytochem. V. 51. P. 1567.
<https://doi.org/10.1177/002215540305101116>
- Alexander A.N., Carey H.V. 2001. Involvement of PI 3-kinase in IGF-I stimulation of jejunal Na^{+} - K^{+} -ATPase activity and nutrient absorption. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. V. 280. P. G222.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.2.G222>
- Blais A., Bissonnette P., Berteloot A. Common characteristics for Na^{+} -dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon. 1987. J. Membr. Biol. V. 99. P. 113.
- Bourzac J.F., L'eriger K., Larrivée J.F., Arguin G., Bilodeau M.S., Stankova J., Gendron F.P. 2013. Glucose

- transporter 2 expression is down regulated following P2X7 activation in enterocytes. *J. Cell. Physiol.* V. 228. P. 120. <https://doi.org/10.1002/jcp.24111>
- Brown E.M. 2013. Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* V. 27. P. 333. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.02.006>
- Chung H.K., Rathor N., Wang S.R., Wang J.Y., Rao J.N. 2015. RhoA enhances store-operated Ca^{2+} entry and intestinal epithelial restitution by interacting with TRPC1 after wounding. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* V. 309. P. G759. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00185.2015>
- DebRoy A., Vogel S.M., Soni D., Sundivakkam P.C., Malik A.B., Tiruppathi C. 2014. Cooperative signaling via transcription factors NF- κ B and AP1/c-Fos mediates endothelial cell STIM1 expression and hyperpermeability in response to endotoxin. *J. Biol. Chem.* V. 289. P. 24188. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.570051>
- Diaz R., Hurwitz S., Chattopadhyay N., Pines M., Yan, Y., Kifor O., Brown E.M. 1997. Cloning, expression, and tissue localization of the calcium-sensing receptor in chicken (*Gallus domesticus*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* V. 273. P. R1008. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.3.R1008>
- Eylenstein A., Schmidt S., Gu S., Yang W., Schmid E., Schmidt E.M., Alesutan I., Szteyn K., Regel I., Shumilina E., Lang F. 2012. Transcription factor NF- κ B regulates expression of pore-forming Ca^{2+} channel unit, Orail1, and its activator, STIM1, to control Ca^{2+} entry and affect cellular functions. *J. Biol. Chem.* V. 287. P. 2719. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.275925>
- Gorboulev V., Schürmann A., Vallon V., Kipp H., Jaschke A., Klessen D., Friedrich A., Scherneck S., Rieg T., Cunard R., Veyhl-Wichmann M., Srinivasan A., Balen D., Breljak D., Rexhepaj R., et al. 2012. Na^{+} -D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes.* V. 61. P. 187. <https://doi.org/10.2337/db11-1029>
- Hall E., Nitert M.D., Volkov P., Malmgren S., Mulder H., Bacos K., Ling C. 2018. The effects of high glucose exposure on global gene expression and DNA methylation in human pancreatic islets. *Mol. Cell. Endocrinol.* V. 472. P. 67. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.11.019>
- Helliwell P.A., Rumsby M.G., Kellett G.L. 2003. Intestinal sugar absorption is regulated by phosphorylation and turnover of protein kinase C β II mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-and mammalian target of rapamycin-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* V. 278. P. 28644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301479200>
- Hoenderop J.G., Nilius B., Bindels R.J. 2002. ECaC: the gatekeeper of transepithelial Ca^{2+} transport. *Biochim. Biophys. Acta—Proteins Proteom.* V. 1600. P. 6. [https://doi.org/10.1016/s1570-9639\(02\)00438-7](https://doi.org/10.1016/s1570-9639(02)00438-7)
- Kellett G.L. 2001. The facilitated component of intestinal glucose absorption. *Physiol. J.* V. 531. P. 585. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0585h.x>
- Kellett G.L., Helliwell P.A. 2000. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem. J.* V. 350. P. 155.
- Koster H.P.G., Hartog A., Bindels R.J.M. 1995. Calbindin-D28K facilitates cytosolic calcium diffusion without interfering with calcium signaling. *Cell Calcium.* V. 18. P. 187. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(95\)90063-2](https://doi.org/10.1016/0143-4160(95)90063-2)
- Kuhre R.E., Christiansen C.B., Saltiel M.Y., Wewer Albrechtsen N.J., Holst J.J. 2017. On the relationship between glucose absorption and glucose-stimulated secretion of GLP-1, neurotensin, and PYY from different intestinal segments in the rat. *Physiol. Rep.* V. 5. P. e13507. <https://doi.org/10.14814/phy2.13507>
- Mace O.J., Morgan E.L., Affleck J.A., Lister N., Kellett G.L. 2007. Calcium absorption by Cav1.3 induces terminal web myosin II phosphorylation and apical GLUT2 insertion in rat intestine. *Physiol. J.* V. 580. P. 605. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.124784>
- Mace O.J., Morgan E.L., Affleck J.A., Lister N., Kellett G.L. 2007. Calcium absorption by Cav1.3 induces terminal web myosin II phosphorylation and apical GLUT2 insertion in rat intestine. *Physiol. J.* V. 580. P. 605. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.124784>
- Morgan E.L., Mace O.J., Affleck J., Kellett G.L. 2007. Apical GLUT2 and Cav1.3: regulation of rat intestinal glucose and calcium absorption. *Physiol. J.* V. 580. P. 593. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.124768>
- Nijenhuis T., Hoenderop J.G., Nilius B., Bindels R.J. 2003. (Patho) physiological implications of the novel epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6. *Pflügers Arch.* V. 446. P. 401. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1038-7>
- Peng J.B., Chen X.Z., Berger U.V., Vassilev P.M., Tsukaguchi H., Brown E.M., Hediger M.A. 1999. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J. Biol. Chem.* V. 274. P. 22739. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22739>
- Röder P.V., Geillinger K.E., Zietek T.S., Thorens B., Koepsell H., Daniel H. 2014. The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PloS one.* V. 9. P. e89977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089977>
- Tharabenjasin P., Douard V., Patel C., Krishnamra N., Johnson R.J., Zuo J., Ferraris R.P. 2014. Acute interactions between intestinal sugar and calcium transport *in vitro*. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* V. 306. P. G1–G12.
- Westerhout J., van de Steeg E., Grossouw D., Zeijdner E.E., Krul C.A.M., Verwei M., Wortelboer H.M. 2014. A new approach to predict human intestinal absorption using porcine intestinal tissue and biorelevant matrices. *Eur. J. Pharm. Sci.* V. 63. P. 167. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.07.003>
- Yee S. 1997. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man—fact or myth. *Pharm. Res.* V. 14. P. 763. <https://doi.org/10.1023/a:1012102522787>
- Zheng Y., Scow J.S., Duenes J.A., Sarr M.G. 2012. Mechanisms of glucose uptake in intestinal cell lines: role of GLUT2. *Surgery.* V. 151. P. 13. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2011.07.010>

ROLE OF CALCIUM CHANNELS IN GLUCOSE UPTAKE REGULATION IN THE *IN VITRO* MODEL OF POLARIZED INTESTINAL EPITHELIUM

D. E. Bobkov^a, A. V. Lukacheva^a, L. V. Kever^a, V. V. Furman^a, S. B. Semenova^{a, *}

^a *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064, Russia*

* *E-mail: svsem@incras.ru*

Glucose is the main energy substrate that ensures metabolic processes in the human and animal bodies. Impaired carbohydrate metabolism is often associated with obesity and concomitant diseases, such as cardiovascular diseases, arterial hypertension, insulin resistance, etc. Current data indicate that intestinal glucose absorption is coupled with Ca^{2+} influx, but additional research is needed to confirm this interaction. We used a cellular model of human intestinal epithelium to elucidate the role of Ca^{2+} channels in the regulation of glucose absorption. The results of immunofluorescence and immunoelectron microscopy showed that high cellular glucose loading (50 mM) leads to an increase in the density of TRPV6 calcium channels on the apical membrane of the intestinal epithelium. The level of the calcium sensor STIM1, responsible for store-dependent calcium entry (SOCE), on the contrary, showed a decrease when Caco-2 cells were overloaded with glucose, which was accompanied by a decrease in SOCE. Excessive saturation of Caco-2 cells with glucose also led to a decrease in the expression level of the NF- κ B transcription factor p65 subunit responsible for the expression of STIM1. The results showed that Ca^{2+} channels are not only involved in the regulation of glucose uptake, but may themselves be under the control of glucose.

Keywords: cell, intestinal epithelial, calcium entry, TRPV6 calcium channel, glucose, GLUT2 transporter

УДК 576.32/.36

ТРИЦИКЛИЧЕСКИЙ АНТИДЕПРЕССАНТ АМИТРИПТИЛИН ПОДАВЛЯЕТ Ca^{2+} -ОТВЕТЫ В ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГАХ КРЫСЫ

© 2024 г. Л. С. Миленина^{1, *}, З. И. Крутецкая^{1, **}, В. Г. Антонов², Н. И. Крутецкая¹¹Кафедра биофизики Санкт-Петербургского государственного университета,
Санкт-Петербург, 199034, Россия²Кафедра биохимии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета,
Санкт-Петербург, 194100, Россия

* E-mail: l.milenina@spbu.ru

** E-mail: z.krutetskaya@spbu.ru

Поступила в редакцию 11.10.2023 г.

После доработки 01.11.2023 г.

Принято к публикации 07.11.2023 г.

Амитриптилин относится к трициклическим антидепрессантам, широко используемым в клинической практике для терапии тревожно-депрессивных состояний и хронической боли. Эти препараты оказывают многогранное влияние на клеточные процессы. Одной из их мишеней служат рецепторы сигма-1 — молекулярные шапероны, расположенные в мембране эндоплазматического ретикулума. Им свойственны уникальная структура и фармакологический профиль. Рецепторы сигма-1 регулируют многие клеточные процессы в норме и патологии, в том числе процессы Ca^{2+} -сигнализации. С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM впервые показано, что агонист рецепторов сигма-1 антидепрессант амитриптилин существенно подавляет как мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо, так и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в клетки, вызываемые ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопязоникой кислотой, а также дисульфидсодержащими иммуномодуляторами глутоксимом и моликсаном, в перитонеальных макрофагах крысы. Результаты указывают на участие рецепторов сигма-1 в вызываемом глутоксимом или моликсаном комплексном сигнальном каскаде, приводящем к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в макрофагах. Данные свидетельствуют также об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

Ключевые слова: амитриптилин, рецептор сигма-1, перитонеальные макрофаги, внутриклеточная концентрация Ca^{2+}

Принятые сокращения: $[\text{Ca}^{2+}]_i$ — внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , ЦПК — циклопязониковая кислота.

DOI: 10.31857/S0041377124020069, EDN: RJYORG

Амитриптилин — (5-(3-диметиламинопропилиден)-10,11-дигидродибензоциклопентен) — один из основных представителей трициклических антидепрессантов, широко используемых в клинической практике для терапии тревожно-депрессивных состояний (Gillman, 2007; Данилов, 2019) и различных видов хронической боли (невралгии, диабетические нейропатии и др.) (Rico-Villademoros et al., 2015; Lawson, 2017; Belinskaia et al., 2019; Cardoso et al., 2022). Известно многогранное влияние этих антидепрессантов на клеточные процессы.

Разнообразие эффектов амитриптилина, как и других трициклических антидепрессантов, может быть обусловлено его амфифильными свойствами. Подобно другим амфифильным веществам, он эффективно проникает через мембраны, при этом

может встраиваться в обогащенный анионными липидами (в первую очередь, фосфоинозитидами) внутренний монослой мембраны (Oruch et al., 2010). Поэтому амитриптилин может участвовать в регуляции процессов сигнализации и внутриклеточного транспорта. Так, выявлено сродство антидепрессантов к рецепторам сигма-1 (Weber et al., 1986; Narita et al., 1996; Fishback et al., 2010; Hayashi et al., 2011; Wang et al., 2016, 2022).

Рецепторы сигма-1, имеющие уникальную историю, структуру и фармакологию, регулируют множество клеточных процессов, как в норме, так и при патологии (Rousseaux, Greene, 2016; Su et al., 2016; Schmidt, Kruse, 2019; Pergolizzi et al., 2023). Эти рецепторы — многофункциональные молекулярные шапероны, располагающиеся в мембране

эндоплазматического ретикулума в участках, граничащих с митохондриями (Su et al., 2010; Delprat et al., 2020; Aishwarya et al., 2021; Munguia-Galaviz et al., 2023). Кроме того, они могут транслоцироваться к плазмалемме и взаимодействовать с другими рецепторами и ионными каналами, а также встречаются в ядерной оболочке, где участвуют в регуляции транскрипции (Su et al., 2016). Рецепторы сигма-1 экспрессируются в широком спектре клеток, в том числе иммунных (Penke et al., 2018; Pergolizzi et al., 2023).

Одним из уникальных свойств рецепторов сигма-1 является их чрезвычайно широкий фармакологический профиль. К числу лигандов этих рецепторов относятся соединения, различающиеся и по химической структуре, и по механизму действия на клетки: антидепрессанты (флувоксамин, флуоксетин, сертралин, имипрамин, amitриптилин), нейролептики (галоперидол, хлорпромазин), анальгетики (пентазоцин), анксиолитики (афобазол), противосудорожные (фенитоин), противокашлевые (декстрометорфан, карбетапентан) и антигистаминные (хлорфенамин) препараты, наркотические средства (метамфетамин и кокаин) и препараты, применяемые при лечении нейродегенеративных заболеваний (амантадин, мемантин, донепезил) (Werling et al., 2007; Cobos et al., 2008; Chu, Ruoho, 2016; Voronin et al., 2020).

Взаимодействуя с белками-мишенями, рецепторы сигма-1 регулируют многие клеточные процессы в норме и патологии, в том числе процессы Ca^{2+} -сигнализации (Schmidt, Kruse, 2019; Pontisso, Combettes, 2021). В плазмалемме рецепторы сигма-1 взаимодействуют с потенциалзависимыми Ca^{2+} -, Na^{+} - и K^{+} -каналами, протон-активируемыми ионными каналами (ASICs), Ca^{2+} -проницаемыми каналами TRPA1, TRPV1 и TRPM8, NMDA-рецепторами, рецепторами, связанными с G-белками (мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами, μ -опиоидными и D1- и D2-дофаминовыми рецепторами), рецепторными тирозинкиназами и другими белками-мишенями (Su et al., 2010, 2016; Ortiz-Renteria et al., 2018; Cortés-Montero et al., 2019; Morales-Lázaro et al., 2019; Schmidt, Kruse, 2019; Munguia-Galaviz et al., 2023).

В мембране эндоплазматического ретикулума рецептор сигма-1 взаимодействует с рецептором инозитол-1,4,5-трифосфата 3-го типа, другим молекулярным шапероном белком BiP (binding immunoglobulin protein) (Hayashi, Su, 2007) и Ca^{2+} -сенсором белком STIM1 (Srivats et al., 2016). Известно, что взаимодействие рецепторов сигма-1

с рецепторами инозитол-1,4,5-трифосфата регулирует обе фазы Ca^{2+} -ответа: мобилизацию Ca^{2+} из депо (Hayashi et al., 2000; Wu, Bowen, 2008) и вход Ca^{2+} из наружной среды (Hayashi, Su, 2007; Pontisso, Combettes, 2021). Показано также, что рецепторы сигма-1 задействованы и в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в клетки различных типов (Brailoiu et al., 2016; Srivats et al., 2016).

Ранее нами было впервые показано, что лиганды сигма-1 рецепторов типичные нейролептики первого поколения галоперидол (производное бутирофенона) (Крутецкая и др., 2017, 2018) и производные фенотиазина хлорпромазин и трифлуоперазин (Миленина и др., 2022) существенно подавляют в перитонеальных макрофагах крысы обе фазы Ca^{2+} -ответов, вызываемых двумя типами агентов: дисульфидсодержащими иммуномодуляторами глутоксимом® (динатриевая соль окисленного глутатиона с d-металлом в наноконцентрации) и моликсаном® (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина), а также ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопязониковой кислотой (ЦПК).

Для подтверждения участия рецепторов сигма-1 в регуляции процессов Ca^{2+} сигнализации в макрофагах, а также с учетом важной роли рецепторов сигма-1 в патогенезе депрессивных состояний (Voronin et al., 2020; Wang et al., 2022) представлялось целесообразным исследовать влияние агониста сигма-1 рецепторов — трициклического антидепрессанта amitриптилина (Villard et al., 2011; Rousseaux, Greene, 2016; Wang et al., 2016; Penke et al., 2018) — на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые глутоксимом и моликсаном, а также тапсигаргином и ЦПК в перитонеальных макрофагах крысы. Это и стало предметом нашего исследования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделение и культивирование перитонеальных макрофагов крыс. Эксперименты выполнены на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar. Содержание животных и все манипуляции выполняли в соответствии с нормативными документами и требованиями приказа Минздрава России от 19.06.2003 № 267 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”. Макрофаги выделяли из перитонеальной полости крыс по традиционному методу (Conrad, 1981). Масса крыс составляла 180–250 г. Непосредственно после выделения клетки имели сферическую форму (диаметр

10–20 мкм). Суспензию макрофагов помещали в бакпечатки с кварцевыми стеклами размером 10×10 мм и культивировали 1–3 сут при температуре 37 °С в среде 199 (рН 7.2). Среда содержала 20% сыворотки крови быка, глутамин (3%), пенициллин (100 ед/мл) и стрептомицин (100 мг/мл). Тест на α -нафтилэстеразу показывал, что как минимум 96% клеток в монослоях являются макрофагами (Monahan et al., 1981).

Эксперименты проводили через 1–2 сут после начала культивирования клеток при температуре (22–24 °С). Экспериментальную камеру заполняли физиологическим раствором следующего ионного состава (мМ): 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂ и 5 HEPES-NaOH, рН 7.3–7.4. В случае использования бескальциевой среды раствор содержал 0 мМ CaCl₂ и 1 мМ ЭГТА. Кварцевые стекла с клетками размещали в экспериментальной камере.

Измерение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Клетки помещали в физиологический раствор, содержащий 2 мМ Fura-2AM и инкубировали в течение 45 мин при 22–24 °С. Затем стекла с окрашенными клетками переносили в экспериментальную камеру флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Флуоресценцию объекта возбуждали через объектив микроскопа при длинах волн 340 и 380 нм. Соответствующие участки спектра выделяли при помощи узкополосных оптических фильтров. Эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм при помощи специализированной видеокамеры Leica DFC340FX. Управление экспериментом проводили с применением системы обработки изображений ImageJ (плагин Micro-Manager 1.4).

Результатом измерений служило отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при облучении светом с длиной волны 340 нм к интенсивности флуоресценции при облучении светом с длиной волны 380 нм (F_{340}/F_{380}), отражающее изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках во время измерений (Xie et al., 2002). Измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с, чтобы избежать фотовыгорания. Использовали объектив 10× с апертурой 8 мм. Значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича (Gryniewicz et al., 1985).

Для статистического анализа применяли *t*-критерий Стьюдента. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Каждая регистрация получена для группы 40–50

клеток. На рисунках приведены результаты однотипных экспериментов из 6–8 независимых. Достоверными считали различия при $P \leq 0.05$.

Использованы реактивы производства фирмы Sigma-Aldrich (США). Маточные растворы Fura-2AM (1 мМ), ЦПК (10 мМ) и тапсигаргина (0.5 мМ) готовили в диметилсульфоксиде. Препараты глутоксим и моликсан предоставлены фирмой “ФАРМА-ВАМ” (Санкт-Петербург). Маточные растворы глутоксима (50 мг/мл), амитриптилина (20 мг/мл) и моликсана (50 мг/мл) готовили в воде.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние амитриптилина на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые дисульфидсодержащими иммуномодуляторами. Глутоксим и моликсан — фармакологические аналоги окисленного глутатиона — применяются как цитопротекторы и иммуномодуляторы при лечении вирусных, бактериальных, а также онкологических заболеваний (Борисов и др., 2001; Антушевич и др., 2013; Толстой и др., 2019). Известно, что они влияют на процессы редокс-регуляции в клетках, однако биофизический механизм их действия выяснен не полностью. Исследования минувших лет показали, что моликсан может быть полезен при лечении или профилактике коронавирусной инфекции COVID-19, поскольку ускоряет переход заболевания в более легкую форму (Dubina et al., 2021). Ранее (Курилова и др., 2008, 2012) мы впервые обнаружили, что глутоксим и моликсан вызывают в перитонеальных макрофагах крыс двухфазный Ca^{2+} -ответ — мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+} -депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} .

В контрольных экспериментах было обнаружено, что 20-минутная инкубация макрофагов в бескальциевой среде со 100 мкг/мл глутоксима (рис. 1а) или 100 мкг/мл моликсана (рис. 2а) сопровождается медленно нарастающим увеличением $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающим мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо. В среднем через 20 мин после введения глутоксима или моликсана $[\text{Ca}^{2+}]_i$ возрастала от базального уровня 90 ± 18 нМ до 150 ± 19 нМ ($n=6$; $P<0.05$) для глутоксима и 158 ± 20 нМ ($n=6$; $P<0.05$) для моликсана. При последующем добавлении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдали дальнейшее повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, соответствующее депо-зависимому входу Ca^{2+} в макрофаги (рис. 1, 2). Повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$

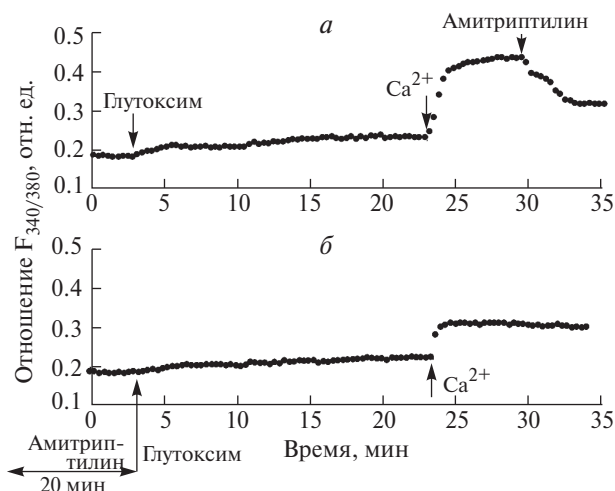


Рис. 1. Влияние амитриптилина на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое глутоксимом в перитонеальных макрофагах крысы. Здесь и на рис. 2–4 по оси ординат — отношение интенсивностей флуоресценции F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (F_{340}/F_{380}); *a* — макрофаги инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 40 мкг/мл амитриптилина; *б* — макрофаги, находящиеся в бескальциевой среде, инкубировали в течение 20 мин с 20 мкг/мл амитриптилина, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . Здесь и на рис. 2–4 каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант из 6–8 независимых экспериментов.

во время входа Ca^{2+} составило в среднем 382 ± 32 ($n = 6$; $P < 0.05$) для глутоксима и 394 ± 34 нМ ($n = 6$; $P < 0.05$) для моликсана.

Впервые показано, что 20-минутная преинкубация макрофагов с 20 мкг/мл амитриптилина вызвала существенное подавление индуцированных 100 мкг/мл глутоксима мобилизации Ca^{2+} из депо (на $39.6 \pm 9.2\%$, $n = 7$; $P < 0.05$) и депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги (на $46.3 \pm 10.1\%$, $n = 7$; $P < 0.05$) (см. рис. 1б). Аналогичные результаты получены в экспериментах по влиянию 20 мкг/мл амитриптилина на Ca^{2+} -ответы, индуцированные 100 мкг/мл моликсана (см. рис. 2б). Так, амитриптилин вызывал подавление мобилизации Ca^{2+} из депо на $46.8 \pm 8.2\%$ ($n = 7$; $P < 0.05$) и подавление депозависимого входа Ca^{2+} в клетки на $55.4 \pm 9.0\%$ ($n = 7$; $P < 0.05$), индуцированных моликсаном.

Кроме того, нами было показано, что добавление 40 мкг/мл амитриптилина во время индуцированного глутоксимом (рис. 1а) или моликсаном (рис. 2а) развившегося входа Ca^{2+} , существенно

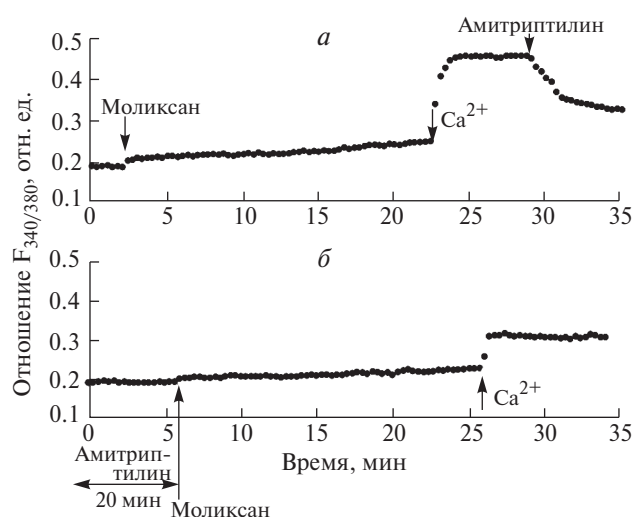


Рис. 2. Влияние амитриптилина на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы: *a* — макрофаги инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл моликсана в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 40 мкг/мл амитриптилина; *б* — макрофаги, находящиеся в бескальциевой среде, инкубировали в течение 20 мин с 20 мкг/мл амитриптилина, затем добавляли 100 мкг/мл моликсана, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

(на $67.8 \pm 15.0\%$, $n = 12$; $P < 0.05$) подавляет депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги.

Влияние амитриптилина на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз. В контрольных экспериментах было показано, что 0.5 мкМ тапсигаргина, добавленного к макрофагам в бескальциевой среде, вызывает небольшое повышение $[Ca^{2+}]_i$ относительно базального уровня (в среднем на 35 ± 9 нМ, $n = 10$; $P < 0.05$). Это повышение опосредовано мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо (рис. 3а). При дальнейшем добавлении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдался депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги (рис. 3а). Повышение $[Ca^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило в среднем 175.1 ± 23.2 нМ ($n = 10$; $P < 0.05$). При использовании 10 мкМ ЦПК (рис. 4а) получены аналогичные результаты: мобилизация Ca^{2+} из депо составила в среднем 29.8 ± 9.2 нМ ($n = 7$; $P < 0.05$), а вход Ca^{2+} в макрофаги — 143.3 ± 21.4 нМ ($n = 7$; $P < 0.05$) (рис. 4а).

Впервые обнаружено, что преинкубация клеток с 20 мкг/мл амитриптилина в бескальциевой в течение 20 мин среде приводит к подавлению обеих фаз Ca^{2+} -ответов, индуцированных 0.5 мкМ тапсигаргина (см. рис. 3б). Подавление мобилизации Ca^{2+} из депо было $21.3 \pm 5.1\%$ ($n = 7$; $P < 0.05$),

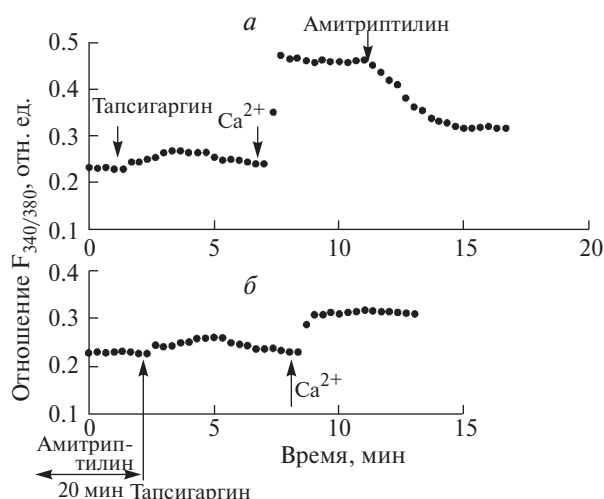


Рис. 3. Влияние амитриптилина на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые тапсигаргином в перитонеальных макрофагах крысы: *а* – макрофаги стимулировали 0.5 мкМ тапсигаргина в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 40 мкг/мл амитриптилина; *б* – макрофаги предварительно инкубировали в течение 20 мин с 20 мкг/мл амитриптилина в бескальциевой среде, затем добавляли 0.5 мкМ тапсигаргина, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

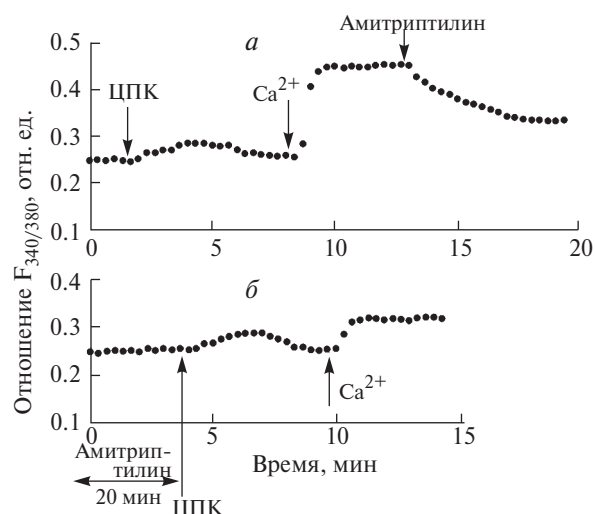


Рис. 4. Влияние амитриптилина на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые циклопязоникой кислотой (ЦПК) в перитонеальных макрофагах крысы: *а* – макрофаги стимулировали 10 мкМ ЦПК в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 40 мкг/мл амитриптилина; *б* – макрофаги предварительно инкубировали в течение 20 мин с 20 мкг/мл амитриптилина в бескальциевой среде, затем добавляли 10 мкМ ЦПК, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

а депозависимого входа Ca^{2+} – $47.9 \pm 11.4\%$ ($n=7$; $P<0.05$). При использовании 10 мкМ ЦПК были получены аналогичные результаты (рис. 4б). Амитриптилин вызывал подавление мобилизации Ca^{2+} из депо на $20.6 \pm 6.2\%$ ($n=7$; $P<0.05$) и депо-зависимого входа Ca^{2+} – на $42.9 \pm 10.4\%$ ($n=7$; $P<0.05$). Это указывает на участие рецепторов сигма-1 в активации индуцируемого ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз депо-зависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

Показано также, что введение 40 мкг/мл амитриптилина во время индуцированного тапсигаргином (см. рис. 3а) или ЦПК (см. рис. 4а) развившегося входа Ca^{2+} значительно (на $50.5 \pm 14.3\%$, $n=12$; $P<0.05$) подавляет депо-зависимый вход Ca^{2+} в макрофаги. Это свидетельствовало об участии рецепторов сигма-1 в поддержании депо-зависимого входа Ca^{2+} в макрофаги.

Таким образом, нами впервые показано, что агонист рецепторов сигма-1, трициклический антидепрессант амитриптилин, подавляет в перитонеальных макрофагах обе фазы Ca^{2+} -ответов, индуцируемых глутоксимом или моликсаном, а также тапсигаргином и ЦПК. Полученные данные соотносятся с результатами других исследователей.

Так, было обнаружено, что амитриптилин ингибирует мобилизацию Ca^{2+} из депо и депо-зависимый вход Ca^{2+} , индуцируемые АТФ или тапсигаргином, в клетках лейкоза человека (линия HL-60) (Harper, Daly, 1999). Показано также, что агонист рецепторов сигма-1 кокаин подавляет вызываемый тапсигаргином депо-зависимый вход Ca^{2+} в эндотелиальных клетках сосудов мозга крыс (Brailoiu et al., 2016), а соединение (+)-SKF-10047 – также агонист сигма-1 рецепторов – ингибирует индуцируемые тапсигаргином мобилизацию Ca^{2+} из депо и депо-зависимый вход Ca^{2+} в ооцитах китайского хомячка и клетках эмбриональной почки человека (линия HEK 293) (Srivats et al., 2016).

Известно также, что амитриптилин ингибирует потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы в клетках различных типов. Так, он делает это в синапсомах мозга крысы (Lavoie et al., 1990), обратимо и дозозависимо блокирует потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы L-типа (Cav1.2) в миоцитах желудочка сердца крысы (Zahradnik et al., 2008), нейронах переднего мозга крысы (Bang et al., 2021) и нейронах тройничного ганглия мыши (Wu et al., 2012), а также Ca^{2+} -каналы N-типа (Cav2.2) в клетках нейробластомы (линия SH-SY5Y) (Cardoso et al., 2022).

Другой агонист рецепторов сигма-1 — соединение (+)-SKF-10047 — подавляет вход Ca^{2+} , вызываемый KCl, и дозозависимо блокирует Ca^{2+} -каналы L-типа (Cav1.2) в ганглиозных клетках сетчатки крысы (линия RGC-5) (Tchedre et al., 2008). Агонисты рецепторов сигма-1 (соединения SKF-10047 и Pre-084) ингибируют также Ca^{2+} -каналы N-типа (Cav2.2) в нейронах стриатума крысы (Zhang et al., 2017). Кроме того, специфический агонист рецепторов сигма-1 — наркотический анальгетик (+)-пентазоцин — модулирует все биофизические характеристики потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов N-, L-, P/Q- и R-типов в симпатических и парасимпатических нейронах крысы: обратимо и дозозависимо уменьшает пиковую амплитуду токов, ускоряет кинетику инактивации и сдвигает потенциал-зависимость активации и инактивации в сторону отрицательных потенциалов (Zhang, Cuevas, 2002).

Амитриптилин также блокирует вход Ca^{2+} по каналам NMDA-рецептора (Stepanenko et al., 2019, 2022) и каналам TRPC4 в клетках эмбриональной почки человека (линия HEK 293) и миоцитах толстой кишки мыши (Jeong et al., 2022).

Результаты нынешней и более ранних работ (Крутецкая и др., 2017, 2018; Миленина и др., 2022) о подавлении лигандами сигма-1 рецепторов Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксимом и моликсаном в макрофагах, свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в индуцированном глутоксимом или моликсаном сигнальном каскаде, приводящем к увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крыс. Итоги указывают также, что использование в клинической практике препаратов глутоксим или моликсан совместно с амитриптилином нежелательно.

Кроме того, полученные данные свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депо-зависимого входа Ca^{2+} , вызываемого как дисульфидсодержащими иммуномодуляторами, так и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз в перитонеальных макрофагах крыс, что позволяет рассматривать рецепторы сигма-1 как новый регуляторный компонент сигнального комплекса депо-зависимого входа Ca^{2+} в макрофагах. Рецепторы сигма-1 могут оказывать влияние на депо-зависимый вход Ca^{2+} , регулируя связывание основных компонентов комплекса депо-зависимого входа Ca^{2+} — белков STIM1 в мембране эндоплазматического ретикулума и Orai1 в плазмалемме (Srivats et al., 2016).

Результаты могут также способствовать более детальному пониманию молекулярных механизмов

фармакологического действия трициклических антидепрессантов. Кроме того, полученные данные могут быть полезны для терапии заболеваний, связанных с нарушением функционирования рецепторов сигма-1. Так, известно, что изменения субклеточной локализации, экспрессии и сигнальных функций таких рецепторов приводят к развитию широкого ряда заболеваний человека (Aishwarya et al., 2021; Pergolizzi et al., 2023). Выявлено участие этих рецепторов в патофизиологии заболеваний нейropsychиатрических (шизофрении, тревожных расстройств, депрессивных состояний и деменции) (Tsai et al., 2014; Ren et al., 2022; Salaciak, Pytko, 2022), нейродегенеративных (болезней Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона, бокового амиотрофического склероза) (Ryskamp et al., 2019; Penke et al., 2018; Yang et al., 2019; Herrando-Grabulosa et al., 2020; Zhemkov et al., 2021; Bogár et al., 2022; Lachance et al., 2023; Malar et al., 2023), онкологических (Kim, Maher, 2017; Pontisso, Combettes, 2021), сердечно-сосудистых (Munguia-Galaviz et al., 2023), а также болевых синдромов (Merlos et al., 2017a, 2017b) и ретинопатий (Smith et al., 2018). Это позволило рассматривать рецепторы сигма-1 как перспективные фармакологические мишени для терапии этих заболеваний.

В последнее время изучается также возможная роль сигма-1 рецепторов в патофизиологии коронавирусной инфекции (COVID-19). Присутствуют данные, указывающие на то, что рецепторы сигма-1 могут стать одной из терапевтических мишеней при лечении коронавирусной инфекции (Vela, 2020; Hashimoto, 2021). Предполагают, что эти рецепторы модулируют механизмы адаптивного стрессового ответа клеток-хозяев и участвуют в ранних стадиях репликации вируса. Так, показано, что белок NSP6 вируса SARS-CoV-2 взаимодействует с рецепторами сигма-1, играющими важную роль в регуляции стресса эндоплазматического ретикулума (Gordon et al., 2020).

Многие лекарства, перепрофилированные для лечения пациентов с COVID-19, являются лигандами рецепторов сигма-1. К их числу относятся амитриптилин и другие антидепрессанты (Vela, 2020; Hashimoto, 2021). Есть данные, что катионные амфифильные соединения, к которым относят трициклические антидепрессанты, имеют противовирусную активность и подавляют вход и репликацию РНК вирусов (Gitahy Falcao Faria et al., 2021). Так, показано, что трициклические антидепрессанты амитриптилин и имипрамин имеют значительную антивирусную активность, сильно

связываются с S-белком вирусов SARS-CoV-2 и MERS-CoV и ингибируют репликацию SARS-CoV-2 и MERS-CoV в клетках обезьяны (линия VeroE6) (Kutkat et al., 2022). Другой агонист сигма-1 рецепторов, антидепрессант флувоксамин, модулирует эндоцитоз S-белка вируса SARS-CoV-2 в клетках эмбриональной почки человека (линии HEK 293) (Glebov, 2021).

Клинические испытания показали, что использование антидепрессантов на ранних стадиях заболевания COVID-19 значительно снижает смертность и уменьшает риск необходимости искусственной вентиляции легких у пациентов с COVID-19 (Hashimoto et al., 2022; Mahdi et al., 2022; Mas et al., 2022; Zheng et al., 2022). Полагают, что наиболее перспективным препаратом среди антидепрессантов является агонист рецепторов сигма-1 флувоксамин (Hashimoto et al., 2021, 2022; Sukhatme et al., 2021).

Обнаружено также, что другой агонист рецепторов сигма-1 антидепрессант флуоксетин ингибирует SARS-CoV-2 (Zimniak et al., 2021; Fred et al., 2022) и прошел клинические испытания в качестве препарата для терапии пациентов с COVID-19, снижает смертность и уменьшает риск необходимости искусственной вентиляции легких у пациентов с COVID-19 (Hoertel et al., 2021).

Одним из основных симптомов при тяжелом респираторном синдроме у пациентов, перенесших COVID-19, является головная боль. Клинические исследования 905 пациентов с COVID-19 показали эффективность амитриптилина в терапии пациентов с постковидными головными болями, включая мигрень (Gonzalez-Martinez et al., 2022).

Кроме того, показано, что амитриптилин предотвращал заражение вирусом SARS-CoV-2 клеток аденокарциномы человека (линия Caco-2), а лечение добровольцев амитриптилином в низкой концентрации предотвращало заражение S-белком вируса SARS-CoV-2 свежевыделенных назальных эпителиальных клеток человека (Carpinteiro et al., 2020).

Известно также, что вирусы, включая SARS-CoV-2, выработали механизмы нарушения Ca^{2+} гомеостаза клеток-хозяев и увеличивают $[\text{Ca}^{2+}]_i$, поскольку Ca^{2+} необходим для проникновения вируса в клетку, для его репликации, созревания и освобождения (Zhou et al., 2009; Chen et al., 2019; Jamison et al., 2022). В связи с этим предотвращение вызванного вирусом увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ путем ингибирования каналов кальциевого выброса в мембране эндоплазматического ретикула (рецепторов инозитол-1,4,5-трифосфата и риано-

диноновых рецепторов) или каналов входа Ca^{2+} в плазмалемму (потенциалзависимых и депо-зависимых Ca^{2+} -каналов) является одним из подходов в терапии вирусных инфекций (Chen et al., 2019).

Так, обнаружено, что блокаторы потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов нифедипин и амлодипин снижают смертность и уменьшают риск необходимости искусственной вентиляции легких у пожилых пациентов с COVID-19 и гипертензией (Solaimanzadeh, 2020; Zhang et al., 2020). Показано также, что внутривенное введение пациентам с тяжелой пневмонией при COVID-19 блокатора депо-зависимых Ca^{2+} -каналов соединения Аухора стабилизирует эндотелий легких и ингибирует выделение провоспалительных цитокинов, тем самым существенно облегчая и ускоряя выздоровление пациентов (Miller et al., 2020; Berlansky et al., 2022).

Таким образом, результаты нашей работы о подавлении агонистом рецепторов сигма-1 амитриптилином обеих фаз Ca^{2+} -ответов, индуцируемых дисульфидсодержащими иммуномодуляторами и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз в перитонеальных макрофагах крысы, дополнительно подтверждают многогранность эффектов трициклических антидепрессантов и свидетельствуют в пользу их терапевтического потенциала, как лигандов рецепторов сигма-1.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансирована за счет средств бюджета Санкт-Петербургского государственного университета и Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, а также договора СПбГУ на выполнение научно-исследовательских работ № 05/03-20 от 12.03.2020. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антушевич А.А., Антонов В.Г., Гребенюк А.Н., Антушевич А.Е., Ладанова Т.В., Бурова Е.Б. 2013. Патофизиологические основы эффективности глутоксима как средства сопровождения лучевой терапии рака ротоглотки. Вестник Рос. военно-мед. акад. Т. 3. № 43. С. 32. (Antushevich A.A., Antonov V.G., Grebenyuk A.N., Antushevich A.E., Ladanova T.V., Burova E.B. 2013. Pathophysiologic rationale of effectiveness of glutoxim supportive therapy add-on to radiotherapy management of oropharyngeal cancer. Vestnik Rossiiskoi Voenno-meditsinskoi akademii. V. 3. № 43. P. 32.)
- Борисов А.Е., Кожмякин Л.А., Антушевич А.Е., Кетлицкая О.С., Кащенко В.А., Чепур С.В., Кацалуха В.В., Васюкова Е.Л., Новиченков А.О., Мотушук И.Е. 2001. Клинико-экспериментальное обоснование регионального и системного введения препаратов группы тиопозитинов при циррозе печени. Вестник хирургии им. И.И. Грекова. Т. 4. № 2. С. 32. (Borisov A.E., Kozhemyakin L.A., Antushevich A.E., Ketliskaya O.S., Kashchenko V.A., Chepur S.V., Katsalucha V.V., Vasyukova E.L., Novichenkov A.O., Motushchuk I.E. 2001. Clinical and experimental grounds of the regional and systemic administration of the thiopoetin group medicines for cirrhosis of the liver. First communication. Vestnik hirurgii im. I.I. Grekova. V. 4. № 2. P. 32.)
- Данилов Д.С. 2019. 70-летняя история трициклических антидепрессантов. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Т. 119. № 12. С. 115. (Danilov D.S. 2019. 70-year history of tricyclic antidepressants. S.S. Korsakov. J. Neurol. Psychiatry. V. 119. № 12. P. 115.)
- Крутецкая З.И., Миленина Л.С., Наумова А.А., Бутов С.Н., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д. 2017. Антагонист рецепторов сигма-1 галоперидол подавляет Ca^{2+} -ответы в макрофагах, вызываемые глутоксимом и моликсаном. Доклады Академии наук. Т. 472. № 6. С. 723. (Krutetskaya Z.I., Milenina L.S., Naumova A.A., Butov S.N., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. 2017. Sigma-1 receptor antagonist haloperidol attenuates Ca^{2+} responses induced by glutoxim and molixan in macrophages. Doklady Biochem. Biophys. V. 472. P. 74.)
- Крутецкая З.И., Миленина Л.С., Наумова А.А., Бутов С.Н., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д. 2018. Антагонист рецепторов сигма-1 галоперидол подавляет депо-зависимый вход Ca^{2+} в макрофагах. Доклады Академии наук. Т. 480. № 5. С. 613. (Krutetskaya Z.I., Milenina L.S., Naumova A.A., Butov S.N., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. 2018. Sigma-1 receptor antagonist haloperidol attenuates store-dependent Ca^{2+} entry in macrophages. Doklady Biochem. Biophys. V. 480. P. 162.)
- Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Антонов В.Г. 2008. Влияние окисленного глутатиона и его фармакологического аналога препарата глутоксим на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. Цитология. Т. 50. № 5. С. 452. (Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. 2008. The effect of oxidized glutathione and its pharmacological analogue glutoxim on intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 2. P. 322.)
- Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. 2012. Участие актинового цитоскелета в действии препаратов глутоксим и моликсан на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. Цитология. Т. 54. № 2. С. 135. (Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. 2012. The involvement of actin cytoskeleton in glutoxim and molixan effect on intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 6. № 3. P. 240.)
- Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И. 2022. Лиганды рецепторов сигма-1 хлорпромазин и трифлуоперазин подавляют Ca^{2+} -ответы в перитонеальных макрофагах крысы. Цитология. Т. 64. № 1. С. 58. (Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Antonov V.G., Krutetskaya N.I. 2022. Sigma-1 receptor ligands chlorpromazine and trifluoperazine attenuate Ca^{2+} responses in rat peritoneal macrophages. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 16. № 3. P. 233.)
- Толстой О.А., Цыган В.Н., Климов А.Г., Степанов А.В., Антушевич А.Е. 2019. Экспериментальная оценка эффективности препарата моликсан по восстановлению работоспособности вирусинфицированных лабораторных животных. Известия Рос. военно-мед. акад. Т. 38. № 1. С. 271. (Tolstoy O.A., Tsygan V.N., Klimov A.G., Stepanov A.V., Antushevich A.E. 2019. Experimental evaluation of the efficiency of the drug molixan on restoring the operation of virus-infected laboratory animals. Bull. Russ. Military Med. Acad. V. 38. № 1. P. 271.)
- Aishwarya R., Abdullah C.S., Morshed M., Remex N.S., Bhuiyan M.S. 2021. Sigmar1's molecular, cellular, and biological functions in regulating cellular pathophysiology. Front. Physiol. V. 12. P. 705575. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.705575>
- Bang E., Tobery A., Montgomery K.S., Fincher A.S., Earnest D.J., Murchison D.A., Griffith W.H. 2021. Amitriptyline decreases GABAergic transmission in basal forebrain neurons using an optogenetic model of aging. Front. Aging Neurosci. V. 13. P. 673155. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.673155>
- Belinskaia D.A., Belinskaia M.A., Barygin O.I., Vanchakova N.P., Shestakova N.N. 2019. Psychotropic drugs for the management of chronic pain and itch. Pharmaceuticals. V. 12. P. 99. <https://doi.org/10.3390/ph12020099>
- Berlinsky S., Sallinger M., Grabmayr H., Humer C., Bernhard A., Fahrner M., Frischauf I. 2022. Calcium signals during SARS-CoV-2 infection: assessing the potential of emerging therapies. Cells. V. 11. P. 253. <https://doi.org/10.3390/cells11020253>
- Bogár F., Fülöp L., Penke B. 2022. Novel therapeutic target for prevention of neurodegenerative diseases: modulation of neuroinflammation with Sig-1R ligands. Biomolecules. V. 12. P. 363. <https://doi.org/10.3390/biom12030363>
- Brailoiu G.C., Deliu E., Console-Bram L.M., Soboloff J., Abood M.E., Unterwald E.M., Brailoiu E. 2016. Cocaine inhibits store-operated Ca^{2+} entry in brain microvascular endothelial cells: critical role for sigma-1 receptors. Biochem. J. V. 473. P. 1.

- Cardoso F.C., Schmit M., Kuiper M.J., Lewi R.J., Tuck K.L., Duggan P.J. 2022. Inhibition of N-type calcium ion channels by tricyclic antidepressants – experimental and theoretical justification for their use for neuropathic pain. *RSC Med. Chem.* V. 13. P. 183.
- Carpinteiro A., Edwards M.J., Hoffmann M., Kochs G., Gripp B., Weigang S., Adams C., Carpinteiro E., Gulbins A., Keitsch S., Sehl C., Soddemann M., Wilker B., Kamler M., Bertsch T. et al. 2020. Pharmacological inhibition of acid sphingomyelinase prevents uptake of SARS-CoV-2 by epithelial cells. *Cell Rep. Med.* V. 1. P. 100142. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100142>
- Chen X., Cao R., Zhong W. 2019. Host calcium channels and pumps in viral infections. *Cells.* V. 9. P. 94. <https://doi.org/10.3390/cells9010094>
- Chu U.B., Ruoho A.E. 2016. Biochemical pharmacology of the sigma-1 receptor. *Mol. Pharmacol.* V. 89. P. 142.
- Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., Cendán C.M., Del Pozo E. 2008. Pharmacology and therapeutic potential of sigma (1) receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.* V. 6. P. 344.
- Conrad R. E. 1981. Induction and collection of peritoneal exudate macrophages. In: *Manual of macrophages methodology*. New York: Marcell Dekker. P. 5.
- Cortés-Montero E., Sánchez-Blázquez P., Onetti Y., Merlos M., Garzón J. 2019. Ligands exert biased activity to regulate sigma 1 receptor interactions with cationic TRPA1, TRPV1 and TRPM8 channels. *Front. Pharmacol.* V. 10. P. 634. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00634>
- Delprat B., Crouzier L., Su T.-P., Maurice T. 2020. At the crossing of ER stress and MAMs: A key role of sigma-1 receptor? *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 1131. P. 699.
- Dubina M.V., Gomonoova V.V., Taraskina A.E., Vasilyeva N.V., Sayganov S.A. 2021. Pathogenesis-based pre-exposure prophylaxis associated with low risk of SARS-CoV-2 infection in healthcare workers at a designated COVID-19 hospital: a pilot study. *BMC Infect. Dis.* V. 21. P. 536. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06241-1>
- Fishback J.A., Robson M.J., Xu Y.-T., Matsumoto R.R. 2010. Sigma receptors: potential targets for a new class of antidepressant drugs. *Pharmacol. Ther.* V. 127. P. 271.
- Fred S.M., Kuivanen S., Ugurlu H., Casarotto P.C., Levanov L., Saksela K., Vapalahti O., Castrén E. 2022. Antidepressant and antipsychotic drugs reduce viral infection by SARS-CoV-2 and fluoxetine shows antiviral activity against the novel variants in vitro. *Front. Pharmacol.* V. 12. P. 755600. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.755600>
- Gillman P.K. 2007. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *Br. J. Pharmacol.* V. 151. P. 737.
- Gitahy Falcao Faria C., Weiner L., Petignat J., Hingray C., Ruiz De Pellon Santamaria A., Villoutreix B.O., Beaune P., Leboyer M., Javelot H. 2021. Antihistamine and cationic amphiphilic drugs, old molecules as new tools against the COVID-19? *Med. Hypotheses.* V. 148. P. 110508. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2021.110508>
- Glebov O.O. 2021. Low-dose fluvoxamine modulates endocytic trafficking of SARS-CoV-2 spike protein: A potential mechanism for anti-COVID-19 protection by antidepressants. *Front. Pharmacol.* V. 12. P. 787261. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.787261>
- Gonzalez-Martinez A., Guerrero-Peral A.L., Arias-Rivas S., Silva L., Sierra A., Gago-Veiga A.B., Garcia-Azorin D. 2022. Amitriptyline for post-COVID headache: effectiveness, tolerability, and response predictors. *J. Neurol.* V. 269. P. 5702.
- Gordon D.E., Jang G.M., Bouhaddou M., Xu J., Obernier K., White K. M., O'Meara M.J., Rezeli V.V., Guo J.Z., Swaney D.L., Tummino T.A., Hüttenhain R., Kaake R.M., Richards A.L., Tutuncuoglu B., Foussard H. et al. 2020. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature.* V. 583. P. 459.
- Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* V. 260. P. 3440.
- Harper J.L., Daly J.W. 1999. Inhibitors of store-operated calcium channels: imidazoles, phenothiazines, and other tricyclics. *Drug Dev. Res.* V. 47. P. 107.
- Hashimoto K. 2021. Repurposing of CNS drugs to treat COVID-19 infection: targeting the sigma-1 receptor. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* V. 271. P. 249.
- Hashimoto Y., Suzuki T., Hashimoto K. 2021. Old drug fluvoxamine, new hope for COVID-19. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* V. 272. P. 161.
- Hashimoto Y., Suzuki T., Hashimoto K. 2022. Mechanisms of action of fluvoxamine for COVID-19: a historical review. *Mol. Psychiatry.* V. 27. P. 1898.
- Hayashi T., Maurice T., Su T.-P. 2000. Ca²⁺ signaling via σ 1-receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca²⁺ concentration. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* V. 293. P. 788.
- Hayashi T., Su T.-P. 2007. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell.* V. 131. P. 596.
- Hayashi T., Tsai S.-Y., Mori T., Fujimoto M., Su T.-P. 2011. Targeting ligand-operated chaperone sigma-1 receptors in the treatment of neuropsychiatric disorders. *Expert Opin. Ther. Targets.* V. 15. P. 557.
- Herrando-Grabulosa M., Gaja-Capdevila N., Vela J.M., Navarro X. 2020. Sigma 1 receptor as a therapeutic target for amyotrophic lateral sclerosis. *Br. J. Pharmacol.* V. 178. P. 1336.
- Hoertel N., Sánchez-Rico M., Vernet R., Beeker N., Jannot A.-S., Neuraz A., Salamanca E., Paris N., Daniel C., Gramfort A., Lemaitre G., Bernaux M., Bellamine A., Lemogne C., Airagnes G., et al. 2021. Association between antidepressant use and reduced risk of intubation or death in hospitalized patients with COVID-19: results from an observational study. *Mol. Psychiatry.* V. 26. P. 5199.
- Jamison D.A., Narayanan S.A., Trovão N.S., Guarnieri J.W., Topper M.J., Moraes-Vieira P.M., Zaksas V., Singh K.K., Wurtele E.S., Beheshti A. 2022. A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, part 1: intracellular overdrive for SARS-CoV-2 infection. *Eur. J. Human Genetics.* V. 30. P. 889.
- Jeong B., Sung T.S., Jeon D., Park K.J., Jun J.Y., So I., Hong Ch. 2022. Inhibition of TRPC4 channel activity in colonic myocytes by tricyclic antidepressants disrupts

- colonic motility causing constipation. *J. Cell Mol. Med.* V. 26. P. 4911.
- Kim F.J., Maher C.M. 2017. Sigma1 pharmacology in the context of cancer. *Handb. Exp. Pharmacol.* V. 244. P. 237.
- Kutkat O., Moatasim Y., Al-Karmalawy A.A., Abulkhair H.S., Gomaa M.R., El-Taweel A.N., Abo Shama N.M., GabAllah M., Mahmoud D.B., Kayali G., Ali M.A., Kandeil A., Mostafa A. 2022. Robust antiviral activity of commonly prescribed antidepressants against emerging coronaviruses: in vitro and in silico drug repurposing studies. *Sci. Rep.* V. 12. P. 12920. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17082-6>
- Lachance V., Bélanger S.-M., Hay C., Le Corvec V., Banouvang V., Lapalme M., Tarmoun K., Beaucaire G., Lussier M.P., Kourrich S. 2023. Overview of sigma-1R subcellular specific biological functions and role in neuroprotection. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24. P. 1971.
- Lavoie P.A., Beauchamp G., Elie R. 1990. Tricyclic antidepressants inhibit voltage-dependent calcium channels and Na^+ – Ca^{2+} exchange in rat brain cortex synaptosomes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* V. 68. P. 1414.
- Lawson K. 2017. A brief review of the pharmacology of amitriptyline and clinical outcomes in treating fibromyalgia. *Biomedicines.* V. 5. P. 24.
- Mahdi M., Hermán L., Réthelyi J.M., Bálint B.L. 2022. Potential role of the antidepressant's fluoxetine and fluvoxamine in the treatment of COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. P. 3812.
- Malar D.S., Thitilerdecha P., Ruckvongacheep K.S., Brimson S., Tencomnao T., Brimson J.M. 2023. Targeting sigma receptors for the treatment of neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. *CNS Drugs.* V. 37. P. 399.
- Mas M., García-Vicente J.A., Estrada-Gelonch A., Pérez-Mañá C., Papaseit E., Torrens M., Farré M. 2022. Antidepressant drugs and COVID-19: a review of basic and clinical evidence. *J. Clin. Med.* V. 11. P. 4038.
- Merlos M., Burqueño J., Portillo-Salido E., Plata-Salamán C.R., Vela J.M. 2017a. Pharmacological modulation of the sigma 1 receptor and the treatment of pain. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 964. P. 85.
- Merlos M., Romero L., Zamanillo D., Plata-Salamán C., Vela J.M. 2017b. Sigma-1 receptor and pain. *Handb. Exp. Pharmacol.* V. 244. P. 131.
- Miller J., Bruen C., Schnaus M., Zhang J., Ali S., Lind A., Stoecker Z., Stauderman K., Hebbat S. 2020. Auxora versus standard of care for the treatment of severe or critical COVID-19 pneumonia: results from a randomized controlled trial. *Crit. Care.* V. 24. P. 502. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03220-x>
- Monahan R.A., Dvorak H.F., Dvorak A.M. 1981. Ultrastructural localization of nonspecific esterase activity in guinea pig and human monocytes, macrophages and lymphocytes. *Blood.* V. 58. P. 1089.
- Morales-Lázaro S.L., González-Ramírez R., Rosenbaum T. 2019. Molecular interplay between the sigma-1 receptor, steroids, and ion channels. *Front. Pharmacol.* V. 10. P. 419. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00419>
- Munguia-Galaviz F.J., Miranda-Diaz A.G., Cardenas-Sosa M.A., Echavarria R. 2023. Sigma-1 receptor signaling: in search of new therapeutic alternatives for cardiovascular and renal diseases. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24. P. 1997.
- Narita N., Hashimoto K., Tomitaka S.-I., Minabe Y. 1996. Interactions of selective serotonin reuptake inhibitors with subtypes of σ receptors in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* V. 307. P. 117.
- Ortiz-Renteria M., Juarez-Contreras R., Gonzalez-Ramirez R., Islas L.D., Sierra-Ramirez F., Llorente I., Simon S.A., Hiriart M., Rosenbaum T., Morales-Lázaro S.L. 2018. TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 115. P. E1657.
- Oruch R., Lund A., Pryme I.F., Holmsen H. 2010. An internalization mechanism as a mode of action exerted by psychotropic drugs: results of altered phospholipid substrate availabilities in membranes? *J. Chem. Biol.* V. 3. P. 67.
- Penke B., Fulop L., Szucs M., Frecska E. 2018. The role of sigma-1 receptor, an intracellular chaperone in neurodegenerative diseases. *Curr. Neuropharmacol.* V. 16. P. 97.
- Pergolizzi J., Varrassi G., Coleman M., Frank Breve F., Christo D.K., Christo P.J., Moussa Ch. 2023. The sigma enigma: a narrative review of sigma receptors. *Cureus.* V. 15. P. e35756.
- Pontisso I., Combettes L. 2021. Role of sigma-1 receptor in calcium modulation: possible involvement in cancer. *Genes.* V. 12. P. 139.
- Ren P., Wang J., Li N., Li G., Ma H., Zhao Y., Li Y. 2022. Sigma-1 receptors in depression: mechanism and therapeutic development. *Front. Pharmacol.* V. 13. P. 925879. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.925879>
- Rico-Villademoros F., Slim M., Calandre E.P. 2015. Amitriptyline for the treatment of fibromyalgia: a comprehensive review. *Expert. Rev. Neurother.* V. 15. P. 1123.
- Rousseaux C.G., Greene S.F. 2016. Sigma receptors (σ R): biology in normal and diseased states. *J. Recept. Signal Transduct.* V. 36. P. 327.
- Ryskamp D.A., Korban S., Zhemkov V., Kraskovskaya N., Bezprozvanny I. 2019. Neuronal sigma-1 receptors: signaling functions and protective roles in neurodegenerative diseases. *Front. Neurosci.* V. 13. P. 862.
- Sałaciak K., Pytka K. 2022. Revisiting the sigma-1 receptor as a biological target to treat affective and cognitive disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* V. 132. P. 1114.
- Schmidt H.R., Kruse A.C. 2019. The molecular function of σ receptors: past, present, and future. *Trends Pharmacol. Sci.* V. 40. P. 636.
- Smith S. B., Wang J., Cui X., Mysona B.A., Zhao J., Bollinger K.E. 2018. Sigma 1 receptor: a novel therapeutic target in retinal disease. *Prog. Retin Eye Res.* V. 67. P. 130.
- Solaimanzadeh I. 2020. Nifedipine and amlodipine are associated with improved mortality and decreased risk for intubation and mechanical ventilation in elderly patients hospitalized for COVID-19. *Cureus.* V. 12. P. e8069.
- Srivats S., Balasuriya D., Pasche M., Vistal G., Edwardson J.M., Taylor C.W., Murrell-Lagnado R.D. 2016. Sigma 1 receptors inhibit store-operated Ca^{2+} entry by attenuating coupling of STIM1 to Orai1. *J. Cell Biol.* V. 213. P. 65.

- Stepanenko Y.D., Boikov S.I., Sibarov D.A., Abushik P.A., Vanchakova N.P., Belinskaia D., Shestakova N.N., Antonov S.M. 2019. Dual action of amitriptyline on NMDA receptors: enhancement of Ca-dependent desensitization and trapping channel block. *Sci. Reports*. V. 9. P. 19454. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56072-z>
- Stepanenko Y.D., Sibarov D.A., Shestakova N.N., Antonov S.M. 2022. Tricyclic antidepressant structure-related alterations in calcium-dependent inhibition and open-channel block of NMDA receptors. *Front. Pharmacol.* V. 12. P. 815368. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.815368>
- Su T.-P., Hayashi T., Maurice T., Buch S., Ruoho A.E. 2010. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.* V. 31. P. 557.
- Su T.-P., Su T.-C., Nakamura Y., Tsai S.-Y. 2016. The sigma-1 receptor as a pluripotent modulator in living systems. *Trends Pharmacol. Sci.* V. 37. P. 262.
- Sukhatme V.P., Reiersen A.M., Vayttaden S.J., Sukhatme V.V. 2021. Fluvoxamine: a review of its mechanism of action and its role in COVID-19. *Front. Pharmacol.* V. 12. P. 652688. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.652688>
- Tchedre K.T., Huang R.Q., Dibas A., Krishnamoorthy R.R., Dillon G.H., Yorio T. 2008. Sigma-1 receptor regulation of voltage-gated calcium channels involves a direct interaction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* V. 49. P. 4993.
- Tsai S.-Y., Pokrass M.J., Klauer N.R., De Credico N.E., Su T.-P. 2014. Sigma-1 receptor chaperones in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Expert Opin. Ther. Targets*. V. 18. P. 1461.
- Vela J.M. 2020. Repurposing sigma-1 receptor ligands for COVID-19 therapy? *Front. Pharmacol.* V. 11. P. 582310. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.582310>
- Villard V., Meunier J., Chevallier N., Maurice T. 2011. Pharmacological interaction with the sigma (σ 1)-receptor in the acute behavioral effects of antidepressants. *J. Pharmacol. Sci.* V. 115. P. 279.
- Voronin M.V., Vakhitova Y.V., Seredenin S.B. 2020. Chaperone Sigma1R and antidepressant effect. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 7088. <https://doi.org/10.3390/ijms21197088>
- Wang Y., Guo L., Jiang H.-F., Zheng L.-T., Zhang A., Zhen X.-C. 2016. Allosteric modulation of sigma-1 receptors elicits rapid antidepressant activity. *CNS Neurosci. Therap.* V. 22. P. 368.
- Wang Y.-M., Xia C.-Y., Jia H.-M., He J., Lian W.-W., Yan Y., Wang W.-P., Zhang W.-K., Xu J.-K. 2022. Sigma-1 receptor: a potential target for the development of antidepressants. *Neurochem. International*. V. 159. P. 105390. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105390>
- Weber E., Sonders M., Quarum M., McLean S., Pou S., Keana J.F.W. 1986. 1,3-Di(2-[5-3H]tolyl)guanidine: a selective ligand that labels sigma-type receptors for psychotomimetic opiates and antipsychotic drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 83. P. 8784.
- Werling L.L., Keller A., Frank J.G., Nuwayhid S.J. 2007. A comparison of the binding profiles of dextromethorphan, memantine, fluoxetine and amitriptyline: treatment of involuntary emotional expression disorder. *Exp. Neurol.* V. 207. P. 248.
- Wu Z., Bowen W.D. 2008. Role of sigma-1 receptor c-terminal segment in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor activation. Constitutive enhancement of calcium signaling in mcf-7 tumor cells. *J. Biol. Chem.* V. 283. P. 28198.
- Wu W., Ye Q., Wang W., Yan L., Wang Q., Xiao H., Wan Q. 2012. Amitriptyline modulates calcium currents and intracellular calcium concentration in mouse trigeminal ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* V. 506. P. 307.
- Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J.A. 2002. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.* V. 277. P. 16559.
- Yang K., Wang C., Sun T. 2019. The roles of intracellular chaperone proteins, sigma receptors, in Parkinson's disease (PD) and major depressive disorder (MDD). *Front. Pharmacol.* V. 10. P. 528.
- Zahradník I., Minarovič I., Zahradníková A. 2008. Inhibition of the cardiac L-Type calcium channel current by antidepressant drugs. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* V. 324. P. 977.
- Zhang H., Cuevas J. 2002. Sigma receptors inhibit high-voltage-activated calcium channels in rat sympathetic and parasympathetic neurons. *J. Neurophysiol.* V. 87. P. 2867.
- Zhang L.-K., Sun Y., Zeng H., Wang Q., Jiang X., Shang W.-J., Wu Y., Li Sh., Zhang Y.-L., Hao Z.-N., Chen H., Jin R., Liu W., Li H., Peng K., Xiao G. 2020. Calcium channel blocker amlodipine besylate therapy is associated with reduced case fatality rate of COVID-19 patients with hypertension. *Cell Discovery*. V. 6. P. 96.
- Zhang K., Zhao Z., Lan L., Wei X., Wang L., Liu X., Yan H., Zheng J. 2017. Sigma-1 receptor plays a negative modulation on N-type calcium channel. *Front. Pharmacol.* V. 8. P. 302.
- Zhemkov V., Geva M., Hayden M.R., Bezprozvanny I. 2021. Sigma-1 receptor (S1R) interaction with cholesterol: mechanisms of S1R activation and its role in neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 4082.
- Zheng W., Sun H.-L., Cai H., Zhang Q., Ng C.H., Xiang Y.-T. 2022. Antidepressants for COVID-19: a systematic review. *J. Affective Disorders*. V. 307. P. 108.
- Zhou Y., Freyb T.K., Yanga J.J. 2009. Viral calciomics: interplays between Ca^{2+} and virus. *Cell Calcium*. V. 46. P. 1.
- Zimniak M., Kirschner L., Hilpert H., Geiger N., Danov O., Oberwinkler H., Steinke M., Sewald K., Seibel J., Bodem J. 2021. The serotonin reuptake inhibitor fluoxetine inhibits SARS-CoV-2 in human lung tissue. *Sci. Rep.* V. 11. P. 5890. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85049-0>

TRICYCLIC ANTIDEPRESSANT AMITRIPTYLINE ATTENUATES Ca^{2+} RESPONSES IN RAT PERITONEAL MACROPHAGES

L. S. Milenina^{a, *}, Z. I. Krutetskaya^{a, **}, V. G. Antonov^b, N. I. Krutetskaya^a

^aChair of Biophysics, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, Russia

^bChair of Biochemistry, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, 194100, Russia

*e-mail: l.milenina@spbu.ru

**e-mail: z.krutetskaya@spbu.ru

Amitriptyline is a tricyclic antidepressant widely used in clinical practice for the treatment of anxiety, depression and chronic pain. These drugs have a multifaceted effect on cellular processes. One of their targets is sigma-1 receptors. Sigma-1 receptors are molecular chaperones located in endoplasmic reticulum membrane; they are characterized by a unique structure and pharmacological profile. Sigma-1 receptors regulate many cellular processes in health and disease, including Ca^{2+} signaling. Using Fura-2AM microfluorimetry, it was shown for the first time that sigma-1 receptor agonist, antidepressant amitriptyline, significantly suppresses both Ca^{2+} mobilization from intracellular Ca^{2+} -stores and subsequent store-dependent Ca^{2+} entry into cells, induced by endoplasmic Ca^{2+} -ATPase inhibitors thapsigargin and cyclopiazonic acid, as well as disulfide-containing immunomodulators glutoxim and molixan, in rat peritoneal macrophages. The results suggest the involvement of sigma-1 receptors in a complex signaling cascade induced by glutoxim or molixan, leading to an increase of intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages. The results also indicate the participation of sigma-1 receptors in the regulation of store-dependent Ca^{2+} entry in macrophages.

Keywords: amitriptyline, sigma-1 receptor, peritoneal macrophage, intracellular Ca^{2+} concentration

УДК 576.5:576.311:576.31

АЛЬФА-ТОКОФЕРИЛСУКЦИНАТ ИНДУЦИРУЕТ СТРЕСС ЭПР, НАРУШЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ И АПОПТОЗ В КУЛЬТУРЕ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© 2024 г. М. А. Савицкая¹, И. И. Захаров¹, А. А. Саидова¹,
Е. А. Смирнова¹, Г. Е. Онищенко¹, *

¹ Кафедра клеточной биологии и гистологии Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

* E-mail: nakomis@mail.ru

Поступила в редакцию 13.09.2023 г.

После доработки 10.11.2023 г.

Принята к публикации 27.11.2023 г.

Сукцинат витамина Е (СВЕ) – потенциальный противоопухолевый агент, известный своим направленным воздействием на митохондрии опухолевых клеток. Однако данные о проапоптозном механизме действия СВЕ неоднозначны, а воздействие СВЕ на нормальные нетуморогенные клетки изучено недостаточно полно. Ранее удалось показать индукцию апоптоза по митохондриальному механизму при действии СВЕ на клетки эпидермоидной карциномы человека А431. Цель нашей работы – исследовать влияние СВЕ на нетуморогенные клетки и выявить общие механизмы, которые характерны как для нормальных, так и для опухолевых клеток, и механизмы, проявляющиеся только в одной из категорий клеток. Для достижения этой цели изучали действие СВЕ на такие органеллы, как эндоплазматический ретикулум (ЭПР) и аппарат Гольджи, анализировали экспрессию генов, связанных со стрессом ЭПР, а также оценивали содержание АФК и накопление липидных капелек в цитоплазме в клетках эпидермоидной карциномы человека А431 и иммortalизованных кератиноцитах человека HaCaT. Показано, что в клетках обеих линий присутствуют признаки стресса ЭПР, возрастает содержание АФК и липидных включений, увеличивается число апоптотических клеток. При этом ключевое различие механизмов индукции апоптотической гибели клеток А431 и HaCaT при действии СВЕ лежит в реакции митохондрий: в клетках А431 запуск апоптотической гибели осуществляется по митохондриальному механизму, в то время как клетки линии HaCaT вступают в апоптоз без участия митохондрий. Таким образом, мишени воздействия СВЕ на нормальные и опухолевые клетки могут различаться и, возможно, способны дополнять друг друга при индукции апоптоза.

Ключевые слова: α-токоферилсукцинат, стресс ЭПР, апоптоз, липидные включения, АФК

Принятые сокращения: АИ – апоптотический индекс; АФК – активные формы кислорода; СВЕ – сукцинат витамина Е; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; грЭПР – гранулярный ЭПР.

DOI: 10.31857/S0041377124020071, **EDN:** RJVGQV

Ежегодно у огромного числа людей во всем мире развиваются злокачественные новообразования; в результате таким лицам приходится подвергаться порой изнурительному лечению, которое далеко не всегда бывает эффективным. Часто злокачественные опухоли приводят к смерти, являясь одной из самых распространённых ее причин. Поэтому необходимо разрабатывать новые противоопухолевые соединения, которые бы обладали селективностью по отношению к опухолевым клеткам, не затрагивая в значительной степени жизнедеятельность нормальных клеток и тканей. В качестве таких агентов можно рассматривать низкомолекулярные вещества с селективным противоопухолевым эффектом, воздействующие

в первую очередь на митохондрии злокачественных клеток, которые получили название митоканы (Bjelakovic et al., 2004, Rodriguez-Enriquez et al., 2009; Dong et al., 2011). Среди них наиболее известны производные антиоксиданта витамина Е, в том числе α-токоферилсукцинат (или сукцинат витамина Е – СВЕ), который представляет собой сложный эфир α-токоферола и янтарной кислоты. Изначально он был выделен из зеленых листьев ячменя и описан как соединение, стимулирующее выделение гормона роста клетками передней доли гипофиза (Badamchian et al., 1994).

Биологические эффекты СВЕ разнообразны. Так, он способен подавлять активность холинэстераз, ингибировать активность NF-κB, а также

обладает широким спектром противоопухолевых эффектов (Савицкая и др., 2016; Majima et al., 2019).

Противоопухолевую активность СВЕ чаще всего связывают с его воздействием на митохондрии и индукцией апоптоза по митохондриальному механизму (Weber et al., 2003; Yu et al., 2003; Wang et al., 2005; Neuzil et al., 2007; Dong et al., 2008; Zhao et al., 2009; Prochazka et al., 2010; Савицкая и др., 2012; dos Santos et al., 2012; Gruber et al., 2014; Rauchová et al., 2014). Однако такой митохондриальный путь может быть не единственным. Например, известно, что в апоптозе, индуцированном воздействием СВЕ, может участвовать и стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) (Huang et al., 2010, 2013).

Стресс ЭПР — клеточное состояние, наступающее в случае накопления неправильно свернутых белков. Он может быть вызван недостатком питательных веществ, изменениями статуса гликозилирования, гипоксией, нарушениями гомеостаза кальция и воздействием разнообразных агентов (Huang et al., 2010). В ответ на стресс ЭПР активируются высокоспецифичные сигнальные пути, направленные на устранение белковой нагрузки и восстановление гомеостаза. В таком ответе на несвернутые белки (unfolded protein response, UPR) участвуют шапероны, например, BiP (GRP78), сенсоры (IRE1, PERK, ATF6) и транскрипционные факторы (например, ATF6, ATF4 и CHOP). Если восстановить гомеостаз не удастся, UPR также может индуцировать апоптотическую клеточную гибель. В предыдущем исследовании нами подробно описана индукция митохондриального механизма апоптоза под действием СВЕ в клетках эпидермоидной карциномы A431 (Савицкая и др., 2012).

В нынешней работе охарактеризована гибель иммортализованных кератиноцитов HaCaT при воздействии СВЕ, а также исследовано участие ЭПР и аппарата Гольджи в апоптотической гибели клеток A431 при воздействии этого соединения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Биологический материал. Работа проведена на культурах клеток эпидермоидной карциномы человека A431 (из Коллекции культур клеток позвоночных; ЦКП Института цитологии РАН, Санкт-Петербург) и иммортализованных кератиноцитов человека HaCaT (УНУ: Коллекция клеточных культур; ЦКП Института биологии развития

им. Н. К. Кольцова РАН, Москва; любезно предоставлены Е. А. Воротеляк). Для культивирования клеток использовали среду DMEM (“ПанЭко”, Россия), содержащую 10% фетальной сыворотки теленка (“ПанЭко”, Россия), 2 мМ L-глутамин (“ПанЭко”, Россия), 80 мкг/мл гентамицина (“ПанЭко”, Россия) и 100 мкг/мл амфотерицина В (“Синтез”, Россия). Культуру клеток поддерживали при 37 °C и 5% CO₂. Пассирование проводили смесью раствора Версена и 0.25% трипсина (7:3) (“ПанЭко”, Россия).

Постановка эксперимента. Клетки высаживали на стекла в чашки Петри в концентрации 200–300 тыс./мл. Необходимые концентрации α-токоферил-сукцината СВЕ (Sigma, США) получали из маточного спиртового (96% этанол) раствора (100 мМ) и хранили при –20 °C. Агент вносили в среду культивирования через 24 ч после посадки в концентрации 20, 40, 60 или 100 мкМ. Так как в качестве растворителя для СВЕ применяли этанол, в каждом эксперименте использовали два контроля: без добавления каких-либо растворов и с добавлением спирта в объеме, соответствующем максимальному вносимому объему СВЕ. Далее клетки фиксировали или окрашивали прижизненно через 24, 48 или 72 ч после добавления СВЕ в соответствии с поставленной задачей. Каждый эксперимент имел не менее трех биологических повторов.

Оценка жизнеспособности клеток. Использовали МТТ-тест. Для этого клетки высаживали в 96-луночный планшет, при этом в каждую лунку вносили 90 мкл среды с суспензией клеток. Через 24 ч культивирования в каждую лунку добавляли по 10 мкл 96%-ного этилового спирта или 10 мкл спиртового раствора СВЕ в необходимой концентрации и культивировали далее на протяжении 48 ч. Затем реактив МТТ разводили культуральной средой до концентрации 1.5 мг/мл и в каждую лунку добавляли по 20 мкл полученного раствора (конечная концентрация составляла 0.25 мг/мл). Через 1–2 ч отбирали среду и на 15–30 мин добавляли в лунку по 60 мкл DMSO для растворения образовавшихся гранул формазана. Оптическую плотность полученного раствора определяли на спектрофотометре Униплан (“Пикон”, Россия).

Световая микроскопия в светлом поле. Клетки фиксировали через 24, 48 и 72 ч после внесения в среду культивирования раствора СВЕ в концентрациях 20, 40, 60 или 100 мкМ. Для этого стекла с клетками промывали 0.1 М раствором PBS pH 6.9 (Sigma, США) и фиксировали в течение 30 мин фиксатором Буэна (15 частей насыщенного

раствора пикриновой кислоты, 5 частей 40%-ного раствора формальдегида, 1 часть ледяной уксусной кислоты), после чего трижды промывали PBS, окрашивали гематоксилином в течение 2–3 мин, промывали проточной водой и докрашивали эозином в течение 30 с. Далее клетки обезвоживали в спиртах (70, 96%) и двух сменах толуола и заключали в канадский бальзам. На готовых препаратах подсчитывали число апоптотических клеток на 1000–1500 клеток (апоптотический индекс). Идентификацию апоптотических клеток проводили по морфологическим признакам, таким как уплотнение цитоплазмы, конденсация хроматина, блеббинг и распад на апоптотические тельца.

Оценка уровня активных форм кислорода (АФК).

Для оценки доли клеток с избытком АФК использовали прижизненное наблюдение. В среду культивирования вносили 2',7'-дихлорофлуоресцеиндиацетат (DCFH-DA) (BioChemika, США; рабочая концентрация 10 мкМ), который служит маркером присутствия пероксида водорода и других перекисных соединений, а также гидроксильного аниона. В присутствии активных форм кислорода (пероксида) в клетке образуется флуоресцирующий продукт окисления 2',7'-дихлорофлуоресцеиндиацетата — дихлорофлуоресцеин. Клетки прижизненно исследовали на люминесцентном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc., Германия) при увеличении объектива 63× с масляной иммерсией (PlanApo 63×/1.4) (Carl Zeiss Inc., Германия), снабженном черно-белой цифровой камерой Carl Zeiss AxioCam (Carl Zeiss Inc., Германия) и программным обеспечением AxioVision 3.1.

Цитохимическое и иммуноцитохимическое окрашивание фиксированных клеток. Для визуализации митохондрий использовали флуоресцентный краситель MitoTracker Orange CMTMRos (Thermo Fischer Scientific, США). Красители вносили в среду культивирования в концентрации 100 нМ на 30 мин, после чего клетки отмывали в среде DMEM, не содержащей сыворотки, помещали в PBS и далее фиксировали 4%-ным формальдегидом на PBS. Полученные препараты заключали в смесь PBS с глицерином (1:1).

Для иммуноцитохимического окрашивания клетки фиксировали 4%-ным формалином на 0.1 М PBS в течение 20 мин и трижды промывали 0.1 М PBS. Для пермеабилзации мембран фиксированные клетки на 3–5 мин помещали в 1%-ный раствор Triton X100 при комнатной температуре.

При иммуноцитохимическом окрашивании клетки помещали в раствор бычьего сывороточно-

го альбумина на PBS и далее последовательно инкубировали с первыми и вторыми антителами. В качестве первых антител использовали моноклональные антитела мыши к активной форме каспазы 3 (1:100, клон 84803.111, C5737; Sigma, США), моноклональные антитела мыши к белку аппарата Гольджи 58K (1:50, клон 58K-9, G2404; Sigma, США) и поликлональные антитела овцы к цитохрому c (1:100, C5723; Sigma, США). В качестве вторых антител использовали моноклональные антитела к IgG мыши, конъюгированные с FITC (F9006, Sigma, США) или Alexa-488 (A11001; Invitrogen, США) и антитела к IgG овцы, конъюгированные с Alexa Fluor-546 (A21098; Invitrogen, США).

Полученные препараты заключали в смесь глицерина и PBS (1:1), смесь глицерина и PBS (1:1), содержащую 100 нМ DAPI (Merck, Германия) или Мовиол 4-88 (Hoechst, Германия), и исследовали на люминесцентном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc., Германия) при увеличении объектива 63× с масляной иммерсией (PlanApo 63×/1.4) (Carl Zeiss Inc., Германия), снабженном черно-белой цифровой камерой Carl Zeiss AxioCam (Carl Zeiss Inc., Германия) и программным обеспечением AxioVision 3.1 (Германия).

Трансмиссионная электронная микроскопия.

Клетки фиксировали 2.5%-ным глутаровым альдегидом с добавлением 2%-ного формалина на 0.1 М PBS pH 7.2 (Sigma, США), дважды промывали PBS и дофиксировали 1%-ным OsO₄. Далее проводили стандартную процедуру проводки для трансмиссионной электронной микроскопии и заключали материал в Epon 812 (Fluka, Швейцария). Срезы толщиной 60–80 нм изготавливали на ультрамикротоме Ultratom-5 (LKB, Германия) и окрашивали 1.5%-ным раствором уранилацетата 30 мин в темноте и 5 мин цитратом свинца по Рейнольдсу в наличии гидроксида натрия.

Готовые препараты анализировали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL, Япония) с цифровой фотокамерой GATAN ES500W, работающей под управлением программы Digital Micrograph фирмы GATAN (Япония), и трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100B (JEOL, Япония) с цифровой фотокамерой OLYMPUS C-770 под управлением программы ImageScope (Великобритания).

Выявление нейтрального жира. Клетки фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине на проточной воде 24 ч, промывали проточной водой 2 ч. Затем материал переносили в 50%-ный

этиловый спирт и сразу помещали в раствор судана III (70%-ный раствор на 96%-ном этаноле (“ХимПром”, Россия) на 25 мин. Далее препарат помещали в 50%-ный спирт, промывали в дистиллированной воде и заключали в смесь PBS (Sigma, США) с глицерином (CDH, Индия).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ). Чтобы оценить влияние СВЕ на экспрессию генов, участвующих в стрессе ЭПР, использовали количественную ПЦР-РВ. Для анализа были выбраны ген *CHOP*, продукт которого представляет собой транскрипционный фактор, участвующий в индукции апоптоза при стрессе ЭПР, *GRP78*, кодирующий шаперон, и *ATF4*, продукт которого также является транскрипционным фактором и контролирует экспрессию ряда генов стресса ЭПР, в том числе *CHOP*. Реакцию проводили, как описано в работе (Potashnikova et al., 2015), с использованием следующих праймеров (Sintol, Россия): для гена *CHOP* –

5'-AGTCTAAGGCACTGAGCGTATC-3'/5'-TCTGTTTCCGTTTCCTGGTT-3' (Fu et al., 2015); для гена *GRP78* – 5'-TCTGCTTGATGTGTGTCCTCTT-3'/5'-GTCGTTACCTTCGTAAGACCT-3' (Murugan et al., 2015); для гена *ATF4* – 5'-TGGCTGGCTGTGGATGG-3'/5'-TCCCGGAGAAGGCATCCT-3' (Plaisance et al., 2016). Для амплификации референсных генов были использованы следующие праймеры (Vandesompele et al., 2002): для гена убиквитина (*ubiquitin*) – 5'-ATTTGGGTCGCGGTTCTTG-3'/5'-TGCCTTGACATTCTCGATGGT-3'; для гена *HPRT* – 5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3'/5'-GGTCCTTTTACCAGCAAGCT-3'; для гена *GAPDH* – 5'-TGCACCACAAGCTTATG-3'/5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'; для гена *YWHAZ* – 5'-ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA-3'/5'-CCGCCAGGACAAACCAGTAT-3'. *UBC* – 5'-ATTTGGGTCGCGAGTTCTTG-3'/5'-TGCCTTGACATTCTCGATGGT-3'. Все образцы были обработаны трижды. Один образец кДНК, введенный в каждый цикл ПЦР, служил межсерийным калибратором для объединения данных в один эксперимент. Специфичность праймеров подтверждали анализом кривой плавления и обнаружением продуктов с предсказанной длиной с использованием электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле. Эффективность амплификации E рассчитывали как $[10(-1/\text{наклон}) - 1]$, используя наклон графика полулогарифмической регрессии S_q в зависимости от логарифмического входа

кДНК. Каждую реакцию проводили в трехкратной повторности. Подбор референсных генов и нормализации результатов был проведен согласно Vandesompele et al. (2002), а также на основании меры стабильности (наименьшего коэффициента вариации) M в программе *geNorm* (<https://genorm.cmgg.be/>). Для нормализации полученных результатов ПЦР во всех экспериментах использовали геометрическое среднее трех референсных генов: *UBC*, *GAPDH* и *YWHAZ*. Результаты анализировали согласно Vandesompele et al. (2002).

Обработка и анализ результатов. Обработку фотографий проводили в программе Adobe Photoshop CS3. Обработка количественных данных, построение гистограмм и вычисление величин стандартного отклонения проводили с использованием языка программирования R (пакеты *tidyverse*, *rstatix* и *ggpubr*) и программы RStudio. Данные на гистограммах представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Каждый эксперимент имел не менее трех независимых биологических повторов на отдельных пассажах клеток. Значение P вычисляли по непараметрическому критерию Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга на множественные сравнения там, где это применимо. Значение $P < 0.05$ использовали как статистически значимое. Статистические значимые отличия обозначены на гистограммах звездочкой (*).

РЕЗУЛЬТАТЫ

СВЕ снижает жизнеспособность клеток эпидермоидной карциномы A431 и иммортализованных кератиноцитов HaCaT. Жизнеспособность клеток при воздействии СВЕ оценивали с помощью МТТ-теста. Важно отметить, что для использования в экспериментах СВЕ растворяли в 96%-ном этаноле, а культивирование клеток культуры HaCaT в присутствии спирта, объем которого соответствует максимальному объему вносимого раствора СВЕ (0.57%), вызывает статистически значимое снижение жизнеспособности клеток. В связи с этим за контроль (100%-ную жизнеспособность) принимали вариант культивирования клеток в среде, содержащей этанол.

Показано, что спустя 48 ч культивирования клеток A431 в присутствии СВЕ жизнеспособность клеток статистически значимо снижается при концентрации СВЕ 40 мкМ и выше. Так, после воздействия 40 мкМ СВЕ жизнеспособность уменьшается на 8.6%, 60 мкМ – на 58.2, 100 мкМ – на

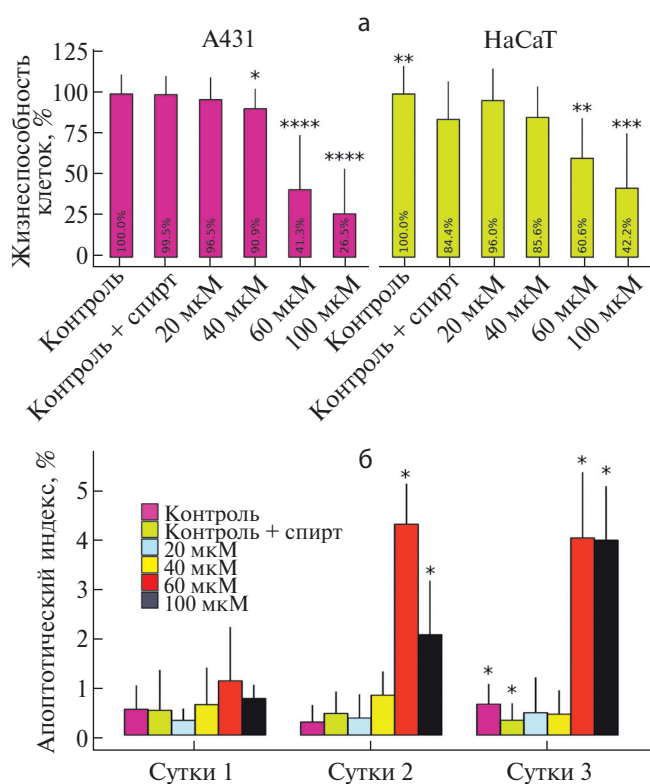


Рис. 1. Реакция культивируемых клеток линий A431 и HaCaT на воздействие сукцината витамина E (СВЕ): *а* – жизнеспособность клеток после культивирования в присутствии СВЕ в течение 48 ч; *б* – величина апоптотического индекса клеток HaCaT при различных концентрациях и времени воздействия СВЕ. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения; тест Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга на множественные сравнения; различия с контролем с добавлением спирта достоверны при (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$ или (****) $P < 0.0001$; $n = 3-4$ (*а*) и $n = 3$ (*б*).

73% (рис. 1*а*). Концентрация 40 мкМ была выбрана для дальнейших исследований, поскольку она оказывает статистически значимое влияние на жизнеспособность клеток, но массовой гибели еще не вызывает.

В клетках линии HaCaT продемонстрировано, что (в отличие от клеток A431) спустя 48 ч после добавления СВЕ значимое снижение жизнеспособности вызывают концентрации агента 60 и 100 мкМ: при действии 60 мкМ – на 23.8%, при действии 100 мкМ – на 42.2%; при этом воздействие 40 мкМ СВЕ не приводит к снижению жизнеспособности клеток. Таким образом, клетки HaCaT более устойчивы к воздействию СВЕ по сравнению с A431, поскольку значимое снижение их жизнеспособности проходит при более высоких концентрациях агента.

СВЕ вызывает апоптоз в клетках HaCaT. Более раннее исследование, проведенное на клетках A431, показало, что СВЕ вызывает дозозависимую апоптотическую гибель этих клеток при концентрациях 40, 60 и 100 мкМ и культивировании в течение 48 и 72 ч (Савицкая и др., 2012). Анализ клеток HaCaT после воздействия СВЕ показал, как и в случае клеток A431, наличие только апоптотического типа клеточной гибели. В пользу этого говорят морфологические признаки (конденсация хроматина, блеббинг, уплотнение цитоплазмы, распад клетки на апоптотические тельца) и результат иммуноцитохимического выявления активной формы каспазы 3 (рис. 2).

По результатам количественной оценки уровня гибели клеток HaCaT на основе морфологических признаков после окрашивания препаратов

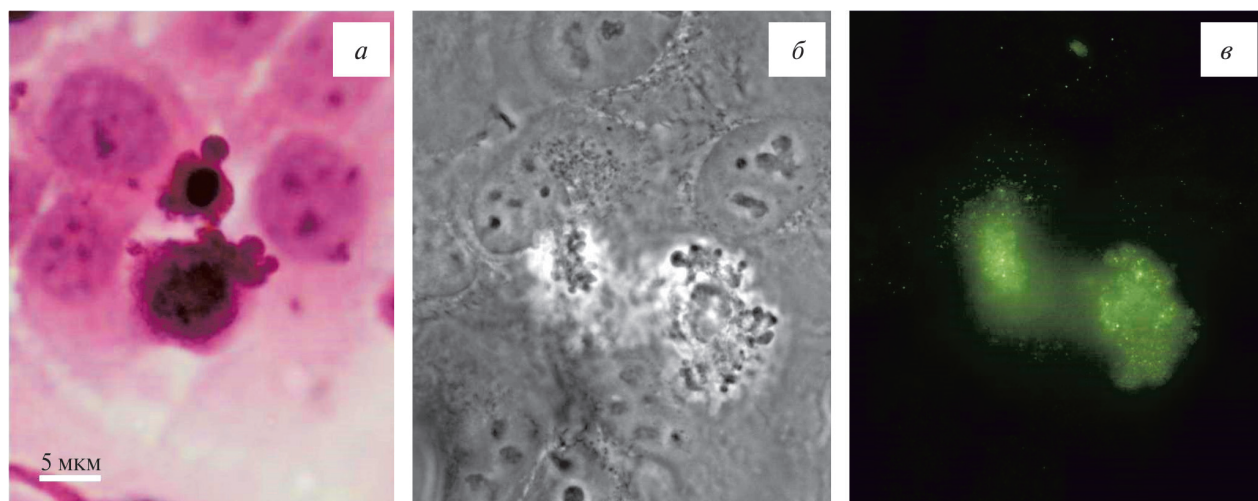


Рис. 2. Апоптоз в клетках HaCaT при действии 60 мкМ СВЕ: *а* – окрашивание гематоксилином и эозином; *б, в* – соответственно фазовый контраст и иммуноцитохимическое выявление каспазы 3 в одной и той же клетке. Показан репрезентативный результат из трех независимых экспериментов.

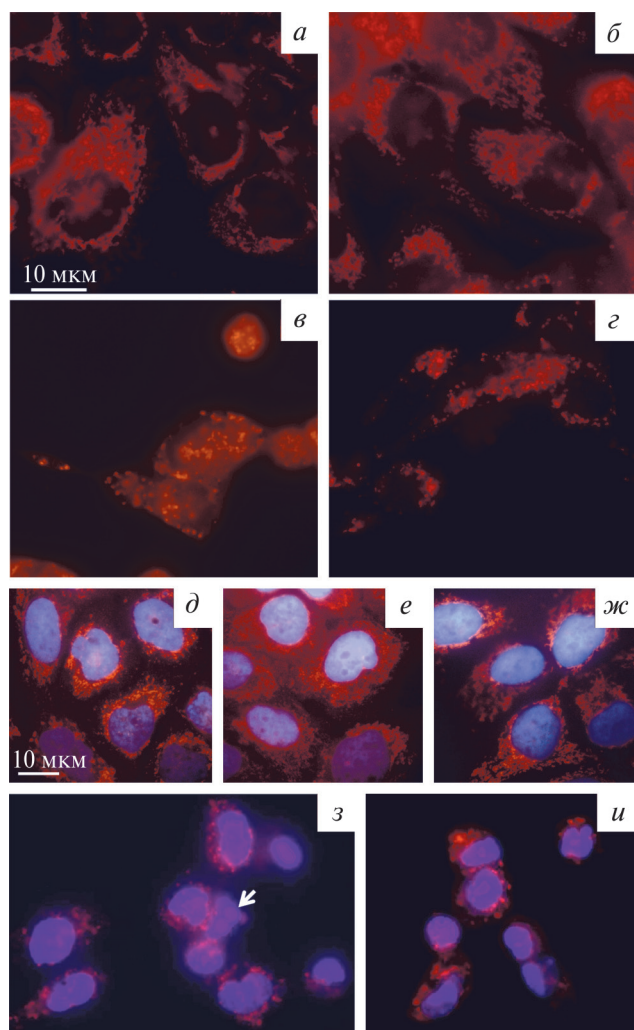


Рис. 3. Митохондрии в клетках линии HaCaT после воздействия СВЕ в течение 48 ч: *а–г* – митохондрии в клетках HaCaT, окрашенные MitoTracker Orange в контроле (*а*) и после действия СВЕ в концентрации 40 (*б*), 60 (*в*) и 100 (*г*) мкМ; *д–и* – иммуноцитохимическое выявление цитохрома *с* в клетках HaCaT в контроле без спирта (*д*) и с добавлением его (*е*), а также после действия СВЕ в концентрации 40 (*ж*), 60 (*з*) и 100 (*и*) мкМ. Показан репрезентативный результат из трех независимых экспериментов.

гематоксилином и эозином значимое увеличение количества апоптотических клеток (значения АИ) выявляется только на вторые и третьи сутки при концентрациях 60 и 100 мкМ, однако и в этом случае величина апоптотического индекса остается на уровне не более 4% (см. рис. 1б).

СВЕ не вызывает изменений структуры митохондрий в клетках HaCaT. В более ранней работе показано, что СВЕ в концентрации 40 мкМ вызывает в клетках A431 изменение структуры митохондрий, заметное как на световом, так и на электронно-микроскопическом уровне, выход цитохрома *с* из митохондрий в цитозоль, усиление

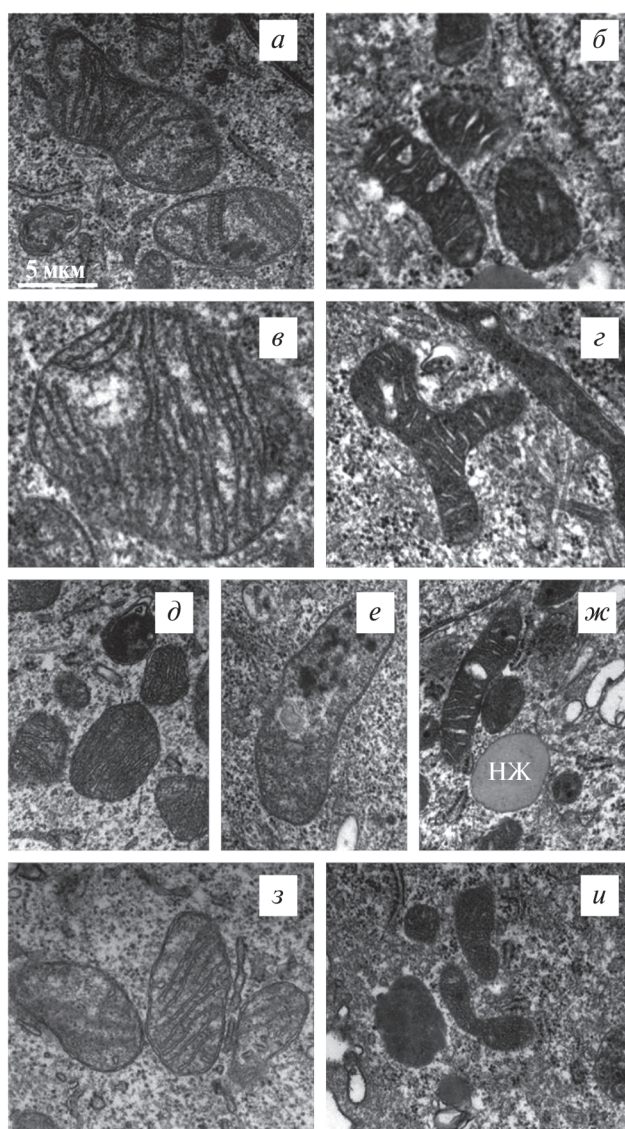


Рис. 4. Ультраструктура митохондрий в клетках HaCaT в контроле (*а, б*) и после действия СВЕ в течение 48 ч в концентрации 40 (*в, г*), 60 (*д–ж*) и 100 (*з–и*) мкМ; нж – липидные включения (нейтральный жир).

образования АФК и апоптоз по митохондриальному механизму (Савицкая и др., 2012). В нынешней работе исследовано влияние СВЕ на митохондрии в клеточной линии HaCaT.

В клетках HaCaT митохондрии визуализировали с помощью прижизненного окрашивания потенциал-зависимым красителем Mitotracker Orange. Оказалось, что клетки в контроле имеют многочисленные мелкие митохондрии, форма которых чаще всего удлинённая (рис. 3а). После воздействия 40 мкМ СВЕ в течение 48 ч значительных изменений морфологии митохондрий не выявляли (рис. 3б). Примечательно, что более

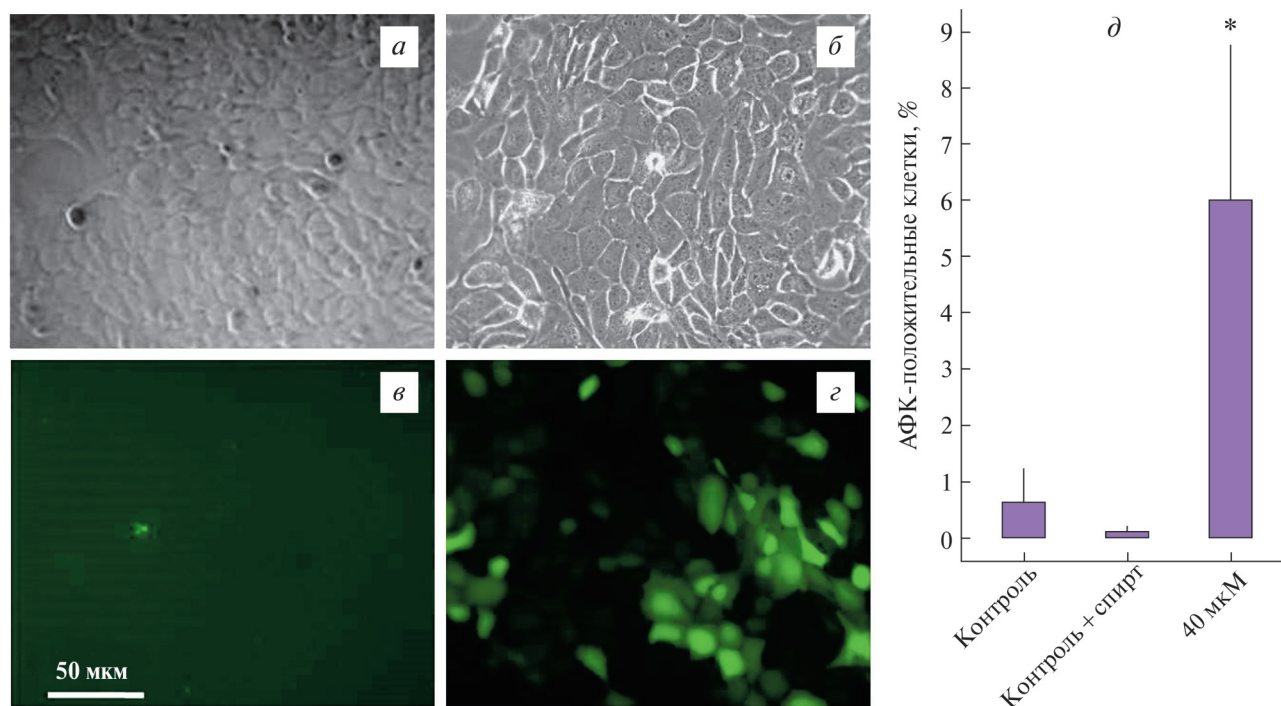


Рис. 5. Прижизненное выявление пероксида водорода в клетках HaCaT в контроле (*а, в*) и после действия 40 мкМ СВЕ в течение 48 ч (*б, з*); фазовый контраст (*а, б*) и окрашивание с помощью зонда DCFH-DA (*в, з*); *д* — доля АФК-положительных клеток после культивирования при наличии СВЕ. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения; тест Манна—Уитни, различие с контролем с добавлением спирта, достоверно при (*) $P < 0.05$ ($n = 3$).

высокие концентрации СВЕ, а именно 60 мкМ (рис. 3в) и 100 мкМ (рис. 3г) также не оказывают существенного влияния на морфологию и распределение митохондрий в клетке.

Иммуноцитохимическое выявление белка цитохрома *с* (рис. 3д–и) демонстрирует, что в результате инкубации клеток HaCaT в присутствии 40 мкМ СВЕ не происходит выход цитохрома *с* из митохондрий в цитозоль (рис. 3ж). В пользу этого говорит также отсутствие изменения формы и размера митохондрий, выявляемых при окрашивании митотрекером. Таким образом, воздействие 40 мкМ СВЕ на протяжении 48 ч не приводит к изменениям структуры хондриома и выходу цитохрома *с*. Более высокие концентрации СВЕ — 60 и 100 мкМ — также не индуцируют выход цитохрома *с* из митохондрий в цитозоль клеток HaCaT (рис. 3з, и).

Для оценки влияния СВЕ на изменения ультраструктуры митохондрий, которые не выявляются на световом уровне, использовали трансмиссионную электронную микроскопию. На ультратонких срезах митохондрии клеток в контроле обычно выглядят как небольшие овальные структуры со светлым матриксом и тонкими кристами. У некоторых митохондрий в матриксе

могут встречаться отдельные электронно-плотные области (рис. 4а). Иногда встречаются митохондрии с уплотненным матриксом; у них может быть расширено внутреннее пространство крист (рис. 4б). При воздействии СВЕ во всех изученных концентрациях наблюдается похожая картина (рис. 4в–и).

Стоит отметить гетерогенность популяции митохондрий как в контроле, так и при всех изученных воздействиях: в одной и той же клетке могли встречаться митохондрии с немного различной ультраструктурой; при этом значительных ультраструктурных изменений митохондрий в клетках после действия СВЕ по сравнению с контрольными клетками не выявили.

СВЕ вызывает усиление продукции АФК в клетках HaCaT. Чтобы выяснить, вызывает ли СВЕ повышение уровня кислородных радикалов, прижизненно окрашивали клетки красителем DCFH-DA. Оказалось, что количество окрашенных клеток после воздействия СВЕ значительно превышает таковое в контроле (рис. 5). Согласно результатам подсчета, доля клеток HaCaT с гиперпродукцией АФК существенно возрастает, подобно тому, что было показано для клеток A431 (Савицкая и др., 2012).

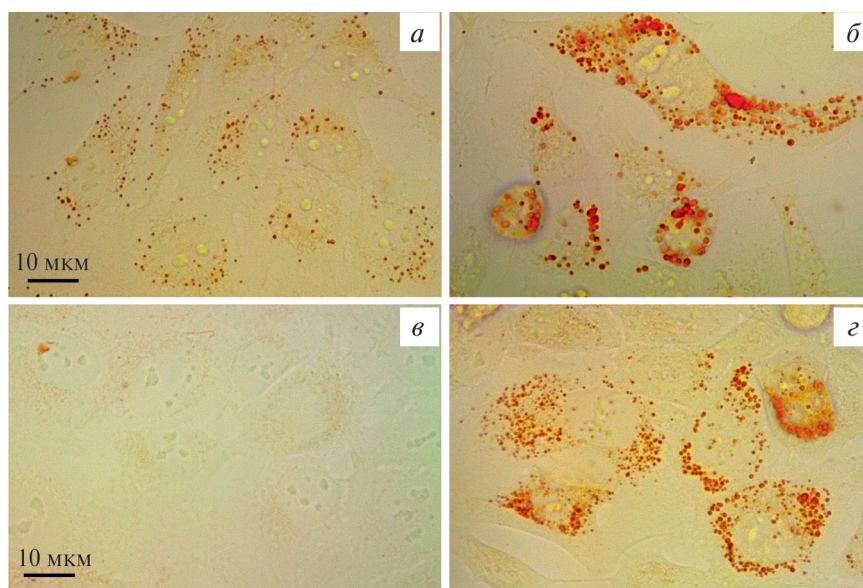


Рис. 6. Выявление нейтрального жира в клетках A431 (а, б) и HaCaT (в, г) после культивирования в контроле (а, в) и в присутствии 40 мкМ СВЕ (б, г).

СВЕ вызывает накопление липидных включений в цитоплазме. Известно, что при ряде стрессовых воздействий в цитоплазме клеток увеличивается содержание жировых включений; так, накопление липидных капель показано при индукции апоптоза, в частности по митохондриальному механизму (Boren, Brindle, 2012). Для их выявления при действии СВЕ проводили окрашивание суданом III.

В клетках A431 при действии 40 мкМ СВЕ количество жировых капель в цитоплазме заметно возрастало по сравнению с контролем, часто наблюдали и увеличение размера отдельных включений (рис. 6а, б).

Подобную картину наблюдали и для клеток линии HaCaT. Тем не менее стоит отметить, что в контроле в клетках HaCaT липидных капель гораздо меньше, чем в клетках A431, и они практически незаметны (см. рис. 5в, г). Жировые капли в цитоплазме клеток, подвергавшихся воздействию СВЕ, видны и на ультраструктурном уровне (рис. 7к–м).

СВЕ вызывает изменение структуры гранулярного ЭПР и аппарата Гольджи в клетках A431 и HaCaT. Гранулярный ЭПР (грЭПР) в клетках A431 в контроле на ультраструктурном уровне представляет собой удлинённые каналы, на мембранах которых расположены полирибосомы (рис. 7а–в). В клетках, подвергавшихся воздействию СВЕ, встречаются как каналы грЭПР, по ультраструктуре сходные с таковыми в контроле (рис. 7г), так и значительно отличающиеся от контрольных (рис. 7д–е). Так, могут появляться протяжённые участки, на мембранах которых отсутствуют ри-

босомы; встречаются и локальные расширения каналов ЭПР (рис. 7, показаны стрелками).

Обнаруженные изменения состояния ЭПР могут служить признаками его стресса (Sriburi et al., 2004; Vommiasamy et al., 2009). Известно, что стресс грЭПР может сопровождаться стрессом аппарата Гольджи (Wlodkowic et al., 2009). На световом уровне аппарат Гольджи выявляли методом иммуноцитохимического окрашивания антителами к матриксному белку p58K (рис. 8). Оказалось, что в контроле аппарат Гольджи лежит вблизи ядра клетки в виде протяжённых областей. В клетках A431 после действия СВЕ аппарат Гольджи образует достаточно мелкие компактные кластеры, которые также располагаются около ядра.

Изменения аппарата Гольджи в клетках A431 выявляются не только на световом, но и на ультраструктурном уровне. Так, в контроле (рис. 9а) аппарат Гольджи имеет типичный вид стопки плоских цистерн с ампулярными расширениями на краях. В клетках, культивированных в присутствии СВЕ (рис. 9б, г, д), цистерны аппарата Гольджи значительно расширяются; такое расширение затрагивает как цис-, так и медиальные и транс-части. Форма цистерн может становиться овальной, а окружающие их везикулы — увеличиваться в размерах.

В клетках линии HaCaT в контроле грЭПР выглядит практически так же, как в клетках A431, но в отличие от них, такая морфология сохраняется и при воздействии 40 мкМ СВЕ; изредка встречаются расширенные цистерны.

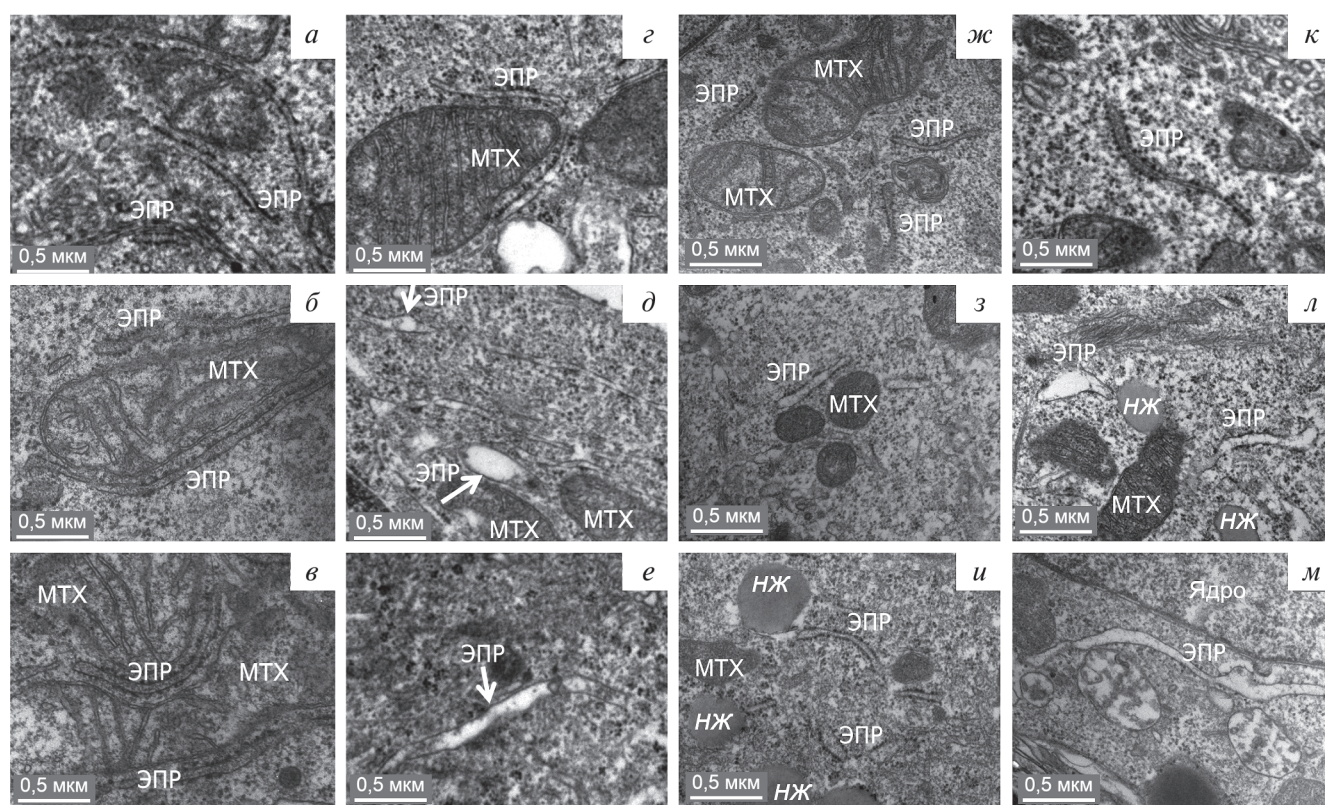


Рис. 7. Ультраструктура гранулярного ЭПР в клетках A431 (а–е) и HaCaT (ж–м) в контроле и после 48-часового воздействия СВЕ. Клетки A431: а – контроль; б, в – контроль с добавлением спирта; г–е – 40 мкМ СВЕ. Клетки HaCaT: ж – контроль, з – 40 мкМ СВЕ, и, к – 60 мкМ СВЕ, л, м – 100 мкМ СВЕ. Обозначения: ЭПР – эндоплазматический ретикулум, МТХ – митохондрии, НЖ – липидные капли (нейтральный жир).

При действии 60 или 100 мкМ СВЕ в клетках HaCaT появляются участки гранулярного ЭПР со значительными расширениями (см. рис. 7к, м). Наиболее выражено расширение каналов ЭПР в клетках после культивирования в присутствии 100 мкМ СВЕ (см. рис. 7м).

Визуализация аппарата Гольджи в клетках HaCaT с помощью иммуноцитохимического выявления белка р58К (см. рис. 8в–е) показала, что в контроле и после воздействия 40 мкМ СВЕ картина практически одинакова и соответствует той, которая наблюдается в контроле в культуре клеток A431. В результате культивирования клеток в присутствии 60 или 100 мкМ СВЕ аппарат Гольджи становится более компактным и формирует кластеры вблизи ядра подобно тем, которые появляются в клетках A431 уже при действии 40 мкМ СВЕ. Таким образом, в клетках линии HaCaT изменения формы аппарата Гольджи при действии СВЕ сходны с таковыми в линии A431, но требуют более высоких концентраций агента (см. рис. 8д, е).

Ультраструктура аппарата Гольджи в клетках HaCaT может различаться как внутри од-

ной клетки, так и между различными клетками при одних и тех же условиях культивирования. Так, в контроле наряду со стопками плоских цистерн (см. рис. 9з) встречаются стопки, в которых расширены некоторые (см. рис. 9и) или практически все (см. рис. 9к) цистерны. Последние два варианта ультраструктуры встречаются на срезах относительно редко. После воздействия СВЕ на клетки HaCaT в целом обнаруживается сходная картина. При более высоких концентрациях агента расширенные цистерны аппарата Гольджи присутствуют практически во всех стопках (рис. 9н, о).

СВЕ повышает уровни экспрессии маркеров стресса ЭПР. Для того, чтобы выяснить, оказывает ли СВЕ влияние на уровень экспрессии генов маркеров стресса ЭПР, была проведена ПЦР-РВ. В обеих исследуемых линиях оценивали экспрессию маркеров стресса ЭПР GRP78, ATF4 и CHOP. Было обнаружено, что при действии 40 мкМ СВЕ в клетках линии A431 происходит статистически значимое повышение уровня экспрессии мРНК GRP78 и ATF4 в 51 и 28 раз соответственно, а в клетках линии HaCaT – повышение уровня экспрессии ATF4 и CHOP в 10 и

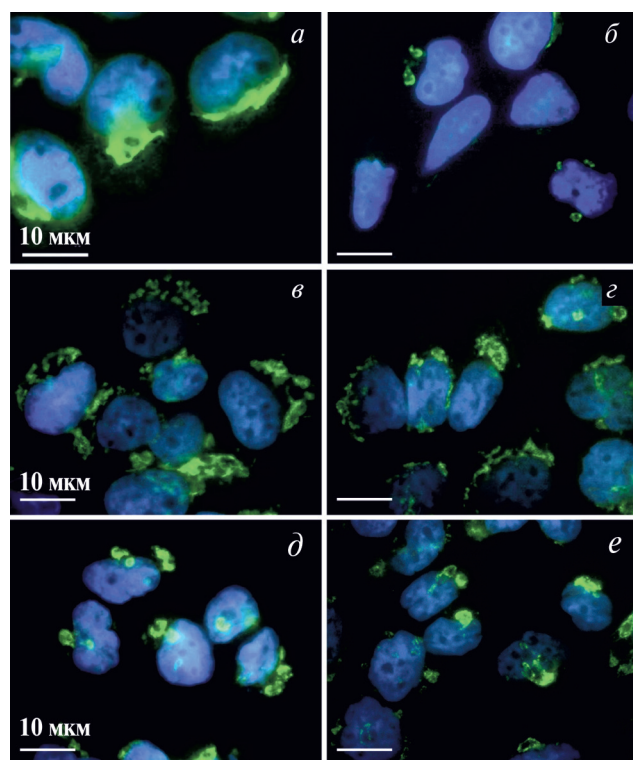


Рис. 8. Иммуноцитохимическое выявление белка p58k в составе аппарата Гольджи в клетках A431 (а, б) и HaCaT (в–е) в контроле и после 48-часового действия СВЕ. Клетки A431: а – контроль, б – 40 мкМ СВЕ. Клетки HaCaT: в – контроль, г – 40 мкМ СВЕ, д – 60 мкМ СВЕ, е – 100 мкМ СВЕ.

22 раза соответственно. Наблюдается тенденция к повышению уровня экспрессии GRP78 в клетках HaCaT и CHOP в клетках A431, однако оно не является статистически значимым (рис. 10).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сукцинат витамина Е способен избирательно вызывать апоптоз в опухолевых клетках, вследствие чего его можно рассматривать в качестве потенциального противоопухолевого агента. Тем не менее данных о механизме его действия на клетки в настоящее время недостаточно; при этом обычно каждое отдельно взятое исследование посвящено лишь одному или небольшому числу реакций клетки (Weber et al., 2003; Yu et al., 2003; Wang et al., 2005; Neuzil et al., 2007; Dong et al., 2008; Zhao et al., 2009; Prochazka et al., 2010; dos Santos et al., 2012; Савицкая и др., 2012; Gruber et al., 2014).

Одни авторы демонстрируют, что клеточная гибель сопровождается нарушением проницаемости мембран лизосом (Neuzil et al., 2002), другие описывают запуск апоптоза по митохондриальному механизму (Dong et al., 2008; Zhao et al.,

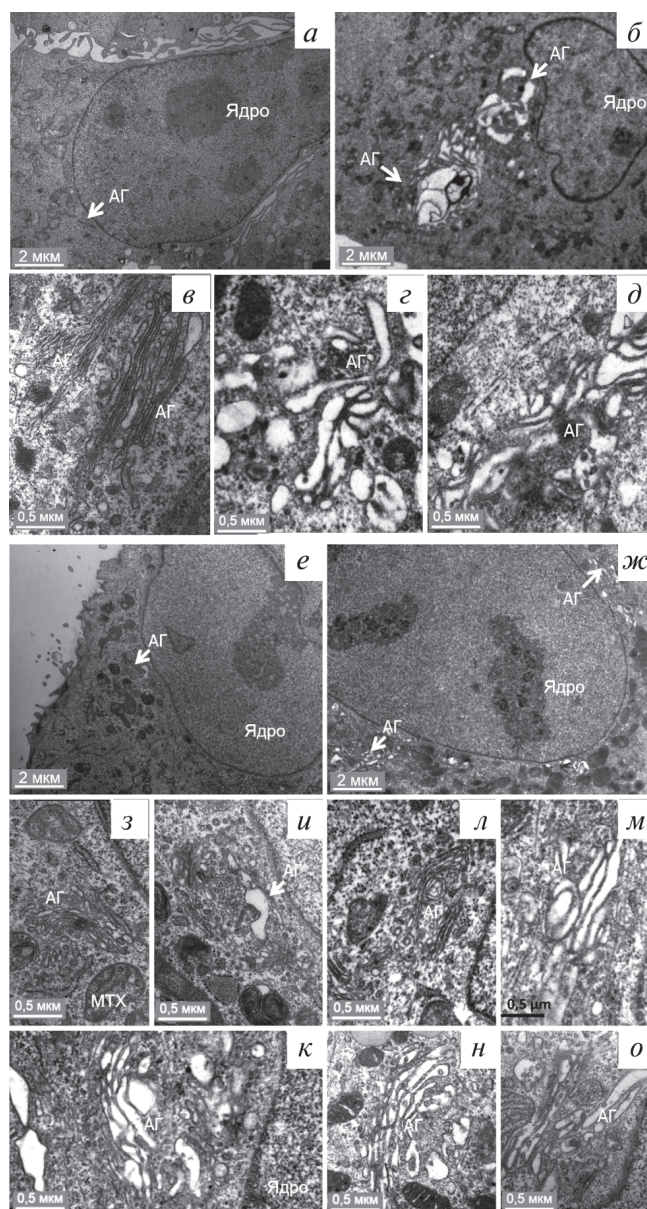


Рис. 9. Ультраструктура аппарата Гольджи в клетках A431 (а–д) и HaCaT (е–о) в контроле и после 48-часового действия СВЕ. Клетки A431: а, в – контроль; б, г, д – 40 мкМ СВЕ. Клетки HaCaT: е, з, и, к – контроль; ж, н – 60 мкМ СВЕ; л, м – 40 мкМ СВЕ; о – 100 мкМ СВЕ. Обозначения: АГ – аппарат Гольджи, МТХ – митохондрии.

2009; Prochazka et al., 2010; dos Santos et al., 2012; Gruber et al., 2014). Также стоит отметить, что лишь немногочисленные данные литературы посвящены действию СВЕ на нормальные/нетуморогенные клетки, которые в большинстве случаев демонстрируют селективность эффекта СВЕ (Israel et al., 2000; Neuzil et al., 2001; Zhao et al., 2009; Majima et al., 2019).

Таким образом, в настоящее время нет полной картины влияния СВЕ на нормальные/нетуморо-

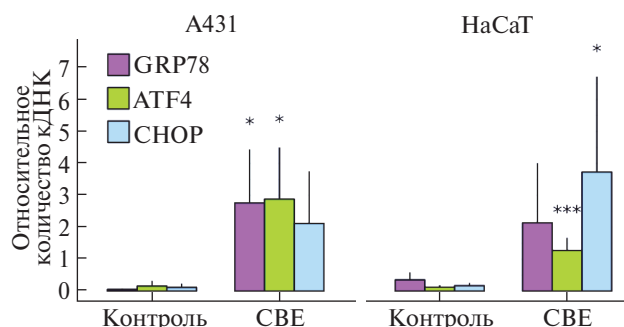


Рис. 10. Относительная экспрессия генов-маркеров стресса ЭПР: *GRP78*, *ATF4* и *CHOP* в клетках линий A431 и HaCaT при воздействии 40 мкМ СВЕ. ПЦР в реальном времени. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения; тест Манна–Уитни; различия с контролем достоверны при (*) $P < 0.05$ или (***) $P < 0.001$ ($n = 3$).

генные клетки и не изучены механизмы, общие для нормальных и опухолевых клеток. Отсутствует также подробное исследование особенностей гибели клеток разного происхождения, в частности клеток многослойных плоских эпителиев, образующих кожные покровы и эпителиальные выстилки ряда слизистых оболочек.

В более ранней работе (Савицкая и др., 2012) показано, что СВЕ вызывает снижение жизнеспособности и апоптотическую гибель клеток эпидермоидной карциномы A431 по сравнению с контролем; при этом эффект зависит от концентрации агента и времени воздействия. В иммортализованных нетуморогенных кератиноцитах HaCaT СВЕ также вызывает снижение жизнеспособности клеток, и выраженность эффекта зависит от времени воздействия и концентрации вещества. Индукция апоптоза в клетках HaCaT показана с помощью подсчета АИ на препаратах клеток, окрашенных гематоксилином и эозином. Примечательно, что хотя СВЕ, как и в клетках A431, вызывает значимое повышение АИ через 48 ч после внесения агента, даже при 60 и 100 мкМ СВЕ величина АИ не превышает 4%.

При использовании метода МТТ значимые различия жизнеспособности клеток выявляются при культивировании в присутствии 40, 60 и 100 мкМ СВЕ. Клетки HaCaT более устойчивы к снижению жизнеспособности при действии СВЕ в концентрации 60 и 100 мкМ по сравнению с клетками эпидермоидной карциномы A431. Такие данные согласуются с результатами исследований, свидетельствующих о селективном действии СВЕ по отношению к опухолевым клеткам (Israel et al., 2000; Neuzil et al., 2001; Zhao et al., 2009).

Ранее было показано, что в клетках A431 СВЕ способствует запуску апоптоза по митохондриальному пути (Савицкая и др., 2012). Поэтому в настоящей работе клетки линии HaCaT исследовали по тем же параметрам, что и A431. Выявление АФК продемонстрировало, что даже при действии 40 мкМ СВЕ доля окрашенных на АФК клеток значительно возрастает, как и в клетках A431. Однако АИ в линии клеток HaCaT значительно ниже, чем в линии A431 при таком же воздействии. В качестве объяснения этого наблюдения можно предположить активацию характерной для нормальных клеток мощной системы антиоксидантной защиты (Kogure et al., 2002; Neuzil et al., 2007).

Далее в клетках HaCaT, подвергнутых действию СВЕ в концентрации 40, 60 и 100 мкМ, прижизненно окрашивали митохондрии клеток, выявляли цитохром с методом иммуноцитохимии, а также исследовали состояние митохондрий на ультраструктурном уровне. Было обнаружено, что по сравнению с контролем СВЕ в концентрации до 100 мкМ включительно существенно не влияет ни на форму, ни на размер митохондрий как на светомикроскопическом, так и на ультраструктурном уровне. Оказалось также, что цитохром с сохраняется в составе митохондрий даже в тех клетках, у которых присутствуют морфологические признаки апоптоза, такие как блеббинг.

Таким образом, клетки HaCaT проявляют устойчивость к СВЕ в концентрации 40 мкМ; более высокие концентрации хоть и вызывают апоптотическую гибель, но происходит она по механизму, отличному от митохондриального. Чтобы оценить вклад других органелл и компонентов клетки в развитие гибели, мы изучали ЭПР, аппарат Гольджи и накопление липидных капель.

С помощью окрашивания, позволяющего на световом уровне визуализировать нейтральный жир, нами было показано, что при действии СВЕ в клетках как линии A431, так и HaCaT, увеличиваются количество и размеры липидных капель в цитоплазме. Накопление липидных капель в целом характерно для апоптоза (Boren, Brindle, 2012). Оно может быть связано с усилением синтеза липидов *de novo*, которое происходит вследствие подавления β -окисления жирных кислот в митохондриях, в результате чего жирные кислоты используются для синтеза липидов.

В свою очередь, ингибирование β -окисления может быть следствием повышения уровня АФК, поскольку кислородные радикалы инактивируют соответствующие ферменты, реагируя с их тиоль-

ными группами (Boren, Brindle, 2012). В литературе можно встретить и другие объяснения накопления липидных капель в апоптотических клетках: перераспределение различных видов липидов между разными компартментами клетки (Quintero et al., 2010), повышение количества липидов вследствие деградации органелл и аутофагии (Delikatny et al., 2002) или усиления активности фосфолипазы A2 (Nakumaki et al., 1999).

Известно, что накопление липидных капель может происходить вследствие стресса ЭПР, и наоборот – стресс ЭПР способен возникать в результате накопления липидов в цитоплазме. Нарушение обновления липидных капель также может вызвать стресс ЭПР (Napala et al., 2011; Jarc, Petan, 2019). Для объяснения роли воздействия СВЕ в увеличении количества липидных включений необходимо более детальное изучение нарушения метаболизма липидов при стрессе ЭПР в нормальных и опухолевых клетках разного происхождения.

Поскольку разные пути апоптоза нередко могут пересекаться, затрагивая различные органеллы (Yang et al., 2018; Gao et al., 2021; Qiu et al., 2021), мы также исследовали состояние органелл синтетического компартмента, чтобы оценить их участие и изменение в процессе индукции клеточной гибели как в клетках A431, так и HaCaT.

Анализ аппарата Гольджи на светомикроскопическом и ультраструктурном уровнях показал, что в клетках A431 при концентрации СВЕ 40 мкМ аппарат Гольджи кластеризуется на световом уровне, а на ультраструктурном может наблюдаться расширение цистерн. При этом с помощью трансмиссионной электронной микроскопии мы также выявили расширение каналов ЭПР. В клетках линии HaCaT эффекты сходны с таковыми для A431, но встречаются при концентрациях СВЕ 60 и 100 мкМ. Интересно отметить, что повышенная устойчивость клеток HaCaT к структурным изменениям их синтетического компартмента под воздействием СВЕ сопровождается меньшим снижением жизнеспособности клеток.

Известно, что расширение каналов грЭПР может сопровождать состояние его стресса (Sriburi et al., 2004; Vommiasamy et al., 2009). Стресс ЭПР был подтвержден с помощью ПЦР-РВ, которая показала усиление экспрессии по крайней мере двух молекулярных маркеров стресса ЭПР из трех, проанализированных для каждой культуры клеток.

Апоптоз, вызываемый стрессом ЭПР, чаще всего реализуется по митохондриальному механиз-

му (Gorman et al., 2012). В частности, большую роль при этом может играть концентрация свободного Ca^{2+} в цитозоле. После выхода из ЭПР в результате стресса Ca^{2+} поступает в митохондрии, где может нарушать работу комплексов дыхательной цепи и приводить к гиперпродукции АФК (Napala et al., 2011).

Однако есть отдельные редкие данные, указывающие на то, что переключение на митохондриальный механизм происходит не всегда, и в этом случае в процессе апоптоза могут участвовать не только каспаза 9, но и каспазы 4 и 12 (у мышей) и даже 8, однако эти данные скудны и неоднозначны (Hitomi et al., 2004; Gorman et al., 2012). Тем не менее можно предположить, что в клетках HaCaT апоптоз индуцируется при участии стресса ЭПР, не затрагивая митохондрии, поскольку мы не обнаружили ни морфологических изменений митохондрий, ни, что более важно, выхода в цитозоль цитохрома *c*.

О различиях механизмов индукции апоптоза при действии СВЕ на нормальные и опухолевые клетки могут говорить и данные о тех сигнальных путях, которые активируются стрессом ЭПР в этих клеточных линиях. Поскольку мы показали, что именно в клетках HaCaT уровень экспрессии СНОР статистически значимо повышается, можно предположить, что этот белок вовлечен в индукцию программы апоптоза. Роль этого транскрипционного фактора в индукции апоптоза хорошо известна. СНОР опосредует клеточную гибель с помощью индукции экспрессии различных генов, включая *GADD34* и *ERO1 α* , которые могут способствовать апоптозу в условиях продолжительного стресса ЭПР (Verfaillie et al., 2013).

В настоящее время в литературе не описаны эффекты СВЕ или его аналогов по отношению к аппарату Гольджи. Выявленное в настоящей работе расширение его цистерн, возможно, представляет собой следствие индукции стресса ЭПР и активации программы апоптоза.

Таким образом, нами показано, что как в клетках A431, так и в клетках HaCaT при действии СВЕ индуцируется стресс ЭПР, происходят морфологические изменения структуры ЭПР и аппарата Гольджи, а также накапливаются липидные капли в цитоплазме, однако ключевое различие механизмов индукции апоптотической гибели в клетках A431 и HaCaT при действии СВЕ лежит в реакции митохондрий: в клетках A431 запуск апоптоза осуществляется по митохондриальному механизму, в то время как в линии HaCaT этого

не происходит, и клетки вступают в апоптоз без участия митохондрий. Поскольку СВЕ, как правило, в первую очередь направленно действует на митохондрии (Савицкая и др., 2016), можно предположить, что митохондриальный путь апоптоза в клетках A431 является основным и дополнительно усиливается стрессом ЭПР. Возможно, такое различие лежит в основе разной чувствительности клеток A431 и HaCaT к воздействию СВЕ.

Исследование воздействия СВЕ на нормальные и опухолевые клетки актуально как с теоретической, так и практической точки зрения. Изучение эффектов СВЕ по отношению к клеткам опухолей поможет лучше понять механизмы лежащих в их основе процессов, а в перспективе — разработать противоопухолевый препарат с селективным действием и минимальным количеством побочных эффектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансирована за счет средств бюджета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (госзадание № 121032300098-5). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Савицкая М.А., Вильданова М.С., Кисурина-Евгеньева О.П., Смирнова Е.А., Онищенко Г.Е. 2012. Митохондриальный путь апоптоза в клетках эпидермоидной карциномы человека A431 при действии α-токоферилсукцината. *Acta Naturae*. Т. 4. С. 93. (Savitskaya M.A., Vildanova M.S., Kisurina-Evgeniev O.P., Smirnova E.A., Onischenko G.E. 2012. Mitochondrial pathway of α-tocopheryl succinate-induced apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Acta Naturae*. V. 4. P. 88.)
- Савицкая М.А., Онищенко Г.Е. 2016. α-Токоферилсукцинат влияет на жизнеспособность, пролиферацию и дифференцировку опухолевых клеток. *Биохимия*. Т. 81. № 8. С. 1036. (Savitskaya M.A., Onischenko G.E. 2016. α-Tocopherylsuccinate affects malignant cell viability, proliferation, and differentiation. *Biochemistry (Moscow)*. V. 8. P. 806.)
- Badamchian M., Spangelo B.L., Bao Y., Hagiwara Y., Hagiwara H., Ueyama H., Goldstein A.L. 1994. Isolation of a vitamin E analog from a green barley leaf extract that stimulates release of prolactin and growth hormone from rat anterior pituitary cells in vitro. *J. NutrBiochem*. V. 5. P. 145. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(94\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0955-2863(94)90086-8)
- Bjelakovic G., Nikolova D., Simonetti R.G., Gluud C. 2004. Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. V. 364. P. 1219.
- Bommiasamy H., Back S.H., Fagone P., Lee K., Meshinchi S., Vink E., Sriburi R., Frank M., Jackowski S., Kaufman R.J., Brewer J.W. 2009. ATF6-α induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci*. V. 122. Pt. 10. P. 1626. <https://doi.org/10.1242/jcs.045625>
- Boren J., Brindle K.M. 2012. Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. *Cell Death Differ*. V. 19. P. 1561. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.34>
- Delikatny E.J., Cooper W.A., Brammah S., Sathasivam N., Rideout D.C. 2002. Nuclear magnetic resonance-visible lipids induced by cationic lipophilic chemotherapeutic agents are accompanied by increased lipid droplet formation and damaged mitochondria. *Cancer Res*. V. 62. P. 1394.
- Dong L.F., Jameson V.J., Tilly D., Cerny J., Mahdavian E. 2011. Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II. *J. Biol. Chem*. V. 286. P. 3717.
- Dong L.F., Low P., Dyason J.C., Wang X.F., Prochazka L., Witting P.K., Freeman R., Swettenham E., Valis K., Liu J., Zabalova R., Turanek J., Spitz D.R., Domann F.E., Scheffler I.E., Ralph S.J., Neuzil J. 2008. Alpha-tocopheryl succinate induces apoptosis by targeting ubiquinone-binding sites in mitochondrial respiratory complex II. *Oncogene*. V. 27. P. 4324.
- Dos Santos G.A., Abreu e Lima R.S., Pestana C.R., Lima A.S., Scheucher P.S., Thomé C.H., Gímenes-Teixeira H.L., Santana-Lemos B.A., Lucena-Araujo A.R., Rodrigues F.P., Nasr R., Uyemura S.A., Falcão R.P., de Thé H., Pandolfi P.P. et al. 2012. (±)α-Tocopheryl succinate inhibits the mitochondrial respiratory chain complex I and is as effective as arsenic trioxide or ATRA against acute promyelocytic leukemia in vivo. *Leukemia*. V. 26. P. 451.
- Gao F.F., Quan J.H., Lee M.A., Ye W., Yuk J.M., Cha G.H., Choi I.W., Lee Y.H. 2021. Trichomonas vaginalis induces apoptosis via ROS and ER stress response through ER-mitochondria crosstalk in SiHa cells. *Parasit. Vectors*. V. 14. P. 603. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05098-2>
- Gorman A.M., Healy S.J., Jäger R., Samali A. 2012. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol. Ther*. V. 134. P. 306. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.02.003>
- Gruber J., Staniek K., Krewenka C., Moldzio R., Patel A., Böhmendorfer S., Rosenau T., Gille L. 2014. Tocopheramine succinate and tocopheryl succinate: mechanism of

- mitochondrial inhibition and superoxide radical production. *Bioorg. Med. Chem.* V. 22. P. 684.
- Hakumäki J.M., Poptani H., Sandmair A.M., Ylä-Herttuala S., Kauppinen R.A. 1999. ¹H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the in vivo detection of apoptosis. *Nat. Med.* V. 5. P. 1323.
<https://doi.org/10.1038/15279>. PMID: 10546002
- Hapala I., Marza E., Ferreira T. 2011. Is fat so bad? Modulation of endoplasmic reticulum stress by lipid droplet formation. *Biol. Cell.* V. 103. P. 271.
<https://doi.org/10.1042/BC20100144>. PMID: 21729000
- Hitomi J., Katayama T., Eguchi Y., Kudo T., Taniguchi M., Koyama Y., Manabe T., Yamagishi S., Bando Y., Imai-zumi K., Tsujimoto Y., Tohyama M. 2004. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J. Cell Biol.* V. 165. P. 347. <https://doi.org/10.1083/jcb.200310015>
- Huang X., Li L., Zhang L., Zhang Z., Wang X., Zhang X., Hou L., Wu K. 2013. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in apoptosis induced by α -tocopheryl succinate in human gastric carcinoma cells. *Br. J. Nutr.* V. 109. P. 727.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512001882>.
- Huang X., Zhang Z., Jia L., Zhao Y., Zhang X., Wu K. 2010. Endoplasmic reticulum stress contributes to vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. *Cancer Lett.* V. 296. P. 123.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.04.002>
- Israel K., Yu W., Sanders B.G., Kline K. 2000. Vitamin E succinate induces apoptosis in human prostate cancer cells: role for Fas in vitamin E succinate-triggered apoptosis. *Nutr. Cancer.* V. 36. P. 90.
- Jarc E., Petan T. 2019. Lipid droplets and the management of cellular stress. *Yale J. Biol. Med.* V. 92. P. 435.
- Kogure K., Hama S., Manabe S., Tokumura A., Fukuzawa K. 2002. High cytotoxicity of alphasuccinylsuccinate to cancer cells is due to failure of their antioxidative defense systems. *Cancer Lett.* V. 186. P. 151.
- Majima D., Mitsuhashi R., Fukuta T., Tanaka T., Kogure K. 2019. Biological functions of α -tocopheryl succinate. *J. Nutr. Sci Vitaminol.* V. 65. P. S104.
<https://doi.org/10.3177/jnsv.65.S104>. PMID: 31619606
- Neuzil J., Dyason J.C., Freeman R., Dong L.F., Prochazka L., Wang X.F., Scheffler I., Ralph S.J. 2007. Mitocans as anti-cancer agents targeting mitochondria: lessons from studies with vitamin E analogues, inhibitors of complex II. *J. Bioenerg. Biomembr.* V. 39. P. 65.
- Neuzil J., Weber T., Gellert N., Weber C. 2001. Selective cancer cell killing by alpha-tocopheryl succinate. *Br. J. Cancer.* V. 84. P. 87.
- Neuzil J., Zhao M., Ostermann G., Sticha M., Gellert N., Weber C., Eaton J.W., Brunk U.T. 2002. Alpha-tocopheryl succinate, an agent with in vivo anti-tumour activity, induces apoptosis by causing lysosomal instability. *Biochem. J.* V. 362. Pt. 3. P. 709.
<https://doi.org/10.1042/0264-6021:3620709>
- Potashnikova D., Gladkikh A., Vorobjev I.A. 2015. Selection of superior reference genes' combination for quantitative real-time PCR in B-cell lymphomas. *Ann. Clin. Lab. V.* 45. P. 64.
- Prochazka L., Dong L.F., Valis K., Freeman R., Ralph S.J., Turanek J., Neuzil J. 2010. α -Tocopheryl succinate causes mitochondrial permeabilization by preferential formation of Bak channels. *Apoptosis.* V. 15. P. 782.
- Qiu L.Z., Yue L.X., Ni Y.H., Zhou W., Huang C.S., Deng H.F., Wang N.N., Liu H., Liu X., Zhou Y.Q., Xiao C.R., Wang Y.G., Gao Y. 2021. Emodin-induced oxidative inhibition of mitochondrial function assists BiP/IRE1 α /CHOP signaling-mediated ER-related apoptosis. *Oxid. Med. Cell Longev.* V. 2021. P. 8865813.
<https://doi.org/10.1155/2021/8865813>
- Quintero M., Cabañas M.E., Arús C. 2010. ¹³C-labelling studies indicate compartmentalized synthesis of triacylglycerols in C6 rat glioma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1801. P. 693. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2010.03.013>
- Rauchová H., Vokurková M., Drahotka Z. 2014. Inhibition of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase by α -tocopheryl succinate. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* V. 53. P. 409.
- Rodriguez-Enriquez S., Marin-Hernandez A., Gallardo-Perez J.C., Carreno-Fuentes L., Moreno-Sanchez R. 2009. Targeting of cancer energy metabolism. *Mol. Nutr. Food Res.* V. 53. P. 29.
- Sriburi R., Jackowski S., Mori K., Brewer J.W. 2004. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* V. 167. P. 35.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200406136>
- Verfaillie T., Garg A.D., Agostinis P. 2013. Targeting ER stress induced apoptosis and inflammation in cancer. *Cancer Letters.* V. 332. P. 249.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.07.016>
- Wang X.F., Witting P.K., Salvatore B.A., Neuzil J. 2005. Vitamin E analogs trigger apoptosis in HER2/erbB2-overexpressing breast cancer cells by signaling via the mitochondrial pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 326. P. 282.
- Weber T., Dalen H., Andera L., Nègre-Salvayre A., Augé N., Sticha M., Lloret A., Terman A., Witting P.K., Higuchi M., Plasilova M., Zivny J., Gellert N., Weber C., Neuzil J. 2003. Mitochondria play a central role in apoptosis induced by alpha-tocopheryl succinate, an agent with antineoplastic activity: comparison with receptor-mediated proapoptotic signaling. *Biochemistry.* V. 42. P. 4277.
- Wlodkowic D., Skommer J., McGuinness D., Hillier C., Darzynkiewicz Z. 2009. ER-Golgi network – a future target for anti-cancer therapy. *Leuk Res.* V. 33. P. 1440.
<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2009.05.025>
- Yang Y., Wang G., Wu W., Yao S., Han X., He D., He J., Zheng G., Zhao Y., Cai Z., Yu R. 2018. Camalexin Induces apoptosis via the ROS-ER stress-mitochondrial apoptosis pathway in AML Cells. *Oxid. Med. Cell Longev.* V. 2018: 7426950. <https://doi.org/10.1155/2018/7426950>
- Yu W., Sanders B.G., Kline K. 2003. RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells involves Bax translocation to mitochondria. *Cancer Res.* V. 63. P. 2483.
- Zhao Y., Neuzil J., Wu K. 2009. Vitamin E analogues as mitochondria-targeting compounds: from the bench to the bedside? *Mol. Nutr. Food Res.* V. 53. P. 129.

ALPHA-TOCOPHERYL SUCCINATE INDUCES ER STRESS, DISREGULATES LIPID METABOLISM AND LEADS TO APOPTOSIS IN NORMAL AND TUMOROUS CELL LINES OF EPIDERMAL ORIGIN

M. A. Savitskaya^a, I. I. Zakharov^a, A. A. Saidova^a, E. A. Smirnova^a, G. E. Onishchenko^{a, *}

^a *Lomonosov Moscow State University, Department of Cell Biology and Histology, Moscow, 119234, Russia *e-mail: galina22@mail.ru*

Vitamin E succinate (VES, α -tocopheryl succinate), is a potential antitumor agent known to selectively affect the mitochondria of tumor cells. However, the data on the proapoptotic mechanism of action of VES are unclear, and the effect of VES on normal, non-tumorigenic cells has not been fully investigated. Previously, we showed that VES induces apoptosis via the mitochondrial pathway in A431 human epidermoid carcinoma cells. The goal of this work is to investigate the effect of VES on non-tumorigenic cells and to reveal commonalities and differences in pathways activated in normal and tumorous cells. To achieve this, we studied how VES affects such organelles as the ER and the Golgi apparatus, analyzed the expression of ER stress-associated genes, and also assessed the ROS content and the accumulation of lipid droplets in A431 human epidermoid carcinoma cells and HaCaT immortalized human keratinocytes. We show that in both cell lines there are signs of ER stress, the amount of ROS and lipid droplets increases, as does the number of apoptotic cells. At the same time, the key difference in the mechanisms apoptotic cell death induction in A431 and HaCaT cells treated with VES lies in the reaction of mitochondria: in A431 cells, apoptotic cell death is triggered via the mitochondrial pathway, while HaCaT cells initiate apoptosis without involving mitochondria. Thus, the targets of VES in normal and tumor cells may differ and can possibly complement each other during apoptosis induction.

Keywords: α -tocopheryl succinate, ER stress, apoptosis, lipid inclusions, ROS

УДК 57.084:571.27:612.1/.8

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ ДИНАМИКИ РАЗВИТИЯ И ХАРАКТЕРА ХИМЕРИЗМА С ПРОЯВЛЕНИЯМИ РТПХ В ОРГАНАХ МЫШЕЙ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЦЕЛЬНОГО КОСТНОГО МОЗГА

© 2024 г. Е. В. Богданенко¹, *, Л. А. Сергеевич², А. В. Карнаухова²,
Н. А. Карнаухова², И. А. Лизунова²

¹ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315, Россия

² Институт биофизики клетки РАН, Пущино Московской области, 142290, Россия

* E-mail: lenabogdval@mail.ru

Поступила в редакцию 20.09.2023 г.

После доработки 19.10.2023 г.

Принята к публикации 20.10.2023 г.

В клинике аллогенная трансплантация костного мозга (ТКМ) часто вызывает реакцию “трансплантат против хозяина” (РТПХ). РТПХ объясняют тем, что Т-лимфоциты, которые вводятся одновременно с кроветворными клетками при трансплантации, а затем вновь образуются и созревают в тимусе реципиента из донорских клеток-предшественников, распознают и атакуют клетки хозяина. Однако полного объяснения феномена РТПХ не существует, а химеризация организма реципиента как возможная причина поражения его органов в расчет не принимается. Поэтому целью нашей работы было моделирование аллогенной трансплантации цельного костного мозга (КМ, эксперимент) и сравнение ее результатов с сингенной трансплантацией (контроль) на основе исследования заселения клетками донорского происхождения основных органов-мишеней РТПХ. Донорами КМ являлись мыши Tg(ACVB-EGFP)1Os/J, несущие ген зеленого флуоресцентного белка (EGFP), реципиентами — животные инбредных линий CBA и C57Bl/6 в возрасте 2–10 мес. За 1 сут до ТКМ ($1.5 \cdot 10^7$ кл./мышь) всех реципиентов облучали в дозе 6.5 Гр (LD 50/30). Через 1, 3, 5, 7, 11, 14, 21, 28, 35 и 55 сут с помощью флуоресцентного микроскопа исследовали развитие химеризма в печени, коже и прямой кишке животных. Уже через 1 сут отдельные фибробластоподобные донорские клетки встречали в прямой кишке, через 7 сут — в коже и печени. Через 14–28 сут после ТКМ донорские клетки формировали в печени в основном строму, в коже — фибробласты и кератиноциты, а в прямой кишке они замещали погибшие после облучения клетки ворсин, стромы и паренхимы Пейеровых бляшек. В отличие от контроля, в опыте в строме печени, в коже и в прямой кишке были найдены гигантские GFP⁺-фибробласты около 30 мкм в длину; в печени — множество GFP⁺-перемычек и фибробластоподобных клеток Ито очень сложной конфигурации. Через 35–55 сут после аллогенной ТКМ донорские клетки в печени и в ворсинах прямой кишки начинали разрушаться, ворсины обрастали слоями соединительнотканых GFP⁺-клеток и деформировались, стенка кишки истончалась, а кожа полностью заменялась на новую (чего никогда не наблюдали в контроле). Нами выдвинуто предположение, что наряду с признаками РТПХ (истончением стенки кишки и множеством округлых GFP⁺-клеток с внутренней стороны кожи) остальные признаки разрушения исследованных органов после аллогенной ТКМ говорят о том, что образовавшиеся из мезенхимных стволовых клеток цельного донорского КМ клетки органов становятся мишенью для Т-клеток реципиента, т.е. о реакции “хозяин против трансплантата” (РХПТ). Явное проявление иммунных реакций напрямую совпадает со временем массового заселения исследованных органов клетками донорского происхождения и восстановления собственной иммунной системы хозяина, т.е. развитие химеризма определяет развитие поражения органов. Это объясняет картину РТПХ из медицинской практики (атрофию слизистых, избыточную продукцию коллагена, склерозирование желчных протоков, повреждение кожи, колит) и сроки ее проявления.

Ключевые слова: РТПХ, РХПТ, цельный костный мозг, МСК, мышь, GFP, флуоресцентная микроскопия, аллогенная трансплантация

Принятые сокращения: КМ — костный мозг; МСК — мезенхимные стволовые клетки; РТПХ — реакция “трансплантат против хозяина”; РХПТ — реакция “хозяин против трансплантата”; ТКМ — трансплантация костного мозга; GFP и EGFP — зеленый флуоресцентный белок (fluorescent protein) и усиленный GFP (enhanced GFP) соответственно; PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

DOI: 10.31857/S0041377124020085, EDN: RJUJHW

Трансплантация костного мозга (КМ) часто используется в онкогематологии. Трансплантация называется сингенной, если донор и реципиент являются однойцевыми близнецами (Gorin et al., 2006). В том случае, когда донор и реципиент отличаются генетически, даже если у них наблюдается полное совпадение по всем аллелям главного комплекса гистосовместимости (HLA), трансплантация КМ (ТКМ) называется аллогенной (Chao, Blume, 1989). Несмотря на то, что протоколы трансплантации высоко оптимизированы и могут быть точно подстроены под каждого человека, ТКМ остается терапией высокого риска с потенциально опасными для жизни осложнениями и смертностью более 30% (Blazar et al., 2012).

Одним из основных осложнений ТКМ является реакция “трансплантат против хозяина” (РТПХ). Текущая догма гласит, что при ней донорские Т-лимфоциты чрезмерно активируются, и происходит нарушение регуляции выработки цитокинов (Ferrara et al., 2009; Divito et al., 2020). Эти иммунокомпетентные клетки распознают чужеродные антигены минорного локуса на клетках реципиента и атакуют их.

Острая РТПХ в типичных случаях развивается на 7–10-е сутки после введения КМ и сопровождается поражением эпидермиса, желчных протоков и слизистой оболочки пищеварительного тракта, а также легких (Müskens et al., 2021). Она индуцируется, как считается, теми Т-лимфоцитами, которые вводят одновременно с кроветворными клетками при трансплантации, а их концентрация определяет сроки развития и интенсивность реакции (Moreno, Cid, 2019).

Несмотря на процедуры очистки от этих клеток трансплантата, их полное удаление невозможно, поскольку они участвуют в защите организма реципиента, которого обычно подвергают миелоаблативному лечению с помощью лучевой или химиотерапии, чтобы разрушить его больной костный мозг и ослабить его иммунную систему (Chao, Blume, 1989; Vossen, 1998). Хроническая РТПХ индуцируется вновь образованными из кроветворных клеток Т-лимфоцитами (Щуцаева и др., 1988).

Другой причиной РТПХ называют несоответствие по Н-У антигенам, кодируемым на Y-хромосоме. Оно приводит к более низкой и безрецидивной выживаемости, более высокой частоте как тяжелой острой РТПХ, так и обширного поражения органов при хронической РТПХ (Dzierzak-Mietla et al., 2012), поскольку Н-У антигены

являются минорными антигенами гистосовместимости, высокоиммуногенными и ни с чем не схожими (Popli et al., 2014).

Однако есть факты, не укладывающиеся в общепринятую теорию РТПХ. Так, на мышах получены доказательства, что после ТКМ во время острой РТПХ собственные функциональные, а вовсе не донорского происхождения Т-лимфоциты всегда присутствуют в коже и толстой кишке (Divito et al., 2020). Кроме того, при контактном использовании МСК (мезенхимных стволовых клеток) свиньи для лечения дефекта нижней челюстной кости у бестимусных крыс (у которых отсутствовали Т-лимфоциты) наблюдали сильную инфильтрацию нейтрофилов и макрофагов в область раны, хотя это и происходило позже, чем у иммунокомпетентных крыс. И, значит, по крайней мере при ксеногенной трансплантации, чужеродные МСК определяются врожденным иммунитетом хозяина (Tee, Sun, 2020). Есть ряд работ, в которых показано, что после ТКМ при РТПХ повреждаются гематопозитические стволовые и прогениторные клетки донора, а не хозяина, а их не должны атаковать Т-лимфоциты донорского же происхождения (Van Dijken et al., 1991; Garvy et al., 1993; Shono et al., 2010).

Одним из способов лечения РТПХ является трансплантация культивированных МСК как противовоспалительного средства (Dubnyak et al., 2016; Lohan et al., 2017). Большинство исследователей считают, что при ТКМ они неиммуногенны и не способны навредить пациенту (Liu et al., 2006). Однако трансплантируемый КМ и так, помимо гематопозитических клеток, содержит в себе МСК.

Уже давно показано, что при ТКМ и у животных, и у людей при использовании как цельного, так и обработанного КМ наблюдается химеризация не только КМ, лимфоузлов, тимуса и селезенки, но и кожи, кишечника, печени и легких (Körbling et al., 2002; Krause, 2002; Suratt et al., 2003; Tran et al., 2003) и, как оказалось позже — именно за счет МСК. Степень трансдифференцировки этих клеток в специализированные клетки органов и тканей реципиентов после аллогенной ТКМ с тех пор вызывает разногласия у исследователей (Kanazawa, Verma, 2003; Tolar et al., 2013; Egawa, Kabashima, 2018; Hünefeld et al., 2018), однако после облучения и сингенной ТКМ их участие в заживлении ран с превращением практически во все элементы кожи уже доказано (Fujita et al., 2010; Богданенко и др., 2020).

Некоторые исследования показывают, что после дифференцировки аллогенные МСК демонстрируют повышенную иммуногенность (Chen et al., 2007; Lohan et al., 2014, 2017). Таким образом, аллогенный иммунный ответ может быть неизбежен в случае некоторых линий клеток, дифференцированных от МСК (Mohammadi et al., 2020), и, следовательно, избавление от РТПХ может быть нерешаемой задачей, поскольку химеризация создает для этого непреодолимое препятствие.

Прежде чем сделать окончательный вывод по этой проблеме, необходимо провести дополнительные работы по химеризму на животных-биодепозиторах, поскольку из-за отсутствия легко детектируемых маркеров, позволяющих отслеживать клетки донора в крови реципиентов, и невозможности прижизненного определения химеризма внутренних органов достоверно определять это явление у людей сложно и дорого (Waterhouse et al., 2021).

Таким образом, несмотря на большой перечень осложнений РТПХ, недостаточно работ по развитию химеризма и исследованию поведения донорских клеток в организме реципиента после ТКМ. При этом возможность взаимосвязи между выраженностью РТПХ и степенью химеризации органов практически не рассматривается. Но, возможно, именно потерей химеризма объясняется отсутствие выраженной РТПХ у реципиента и, в конечном счете, его выживаемость (Богданенко и др., 2021). Интересно, что при РТПХ в наибольшей степени поражаются органы, имеющие максимальное количество соединительной ткани, а именно кожа, кишечник, легкие и желчные протоки печени. Поскольку соединительная ткань образуется фибробластоподобными клетками, у нас возникло предположение, что химеризм этой ткани у реципиентов после ТКМ выражен сильнее.

В связи с указанными проблемами, не исследуемыми в достаточной мере, целью работы был поиск различий динамики развития химеризма между аллогенной и сингенной трансплантацией после облучения реципиентов и его связи с проявлениями РТПХ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. Их содержали в виварии ИБК РАН на рационе из гранулированного корма. В качестве доноров использовали мышей Tg(ACTB-EGFP)10sb/J в возрасте 2–10 мес (чистопородные, разводимые на основе инбредной линии C57BL/6), несущих ген зеленого флуоресцентного

белка EGFP (enhanced green fluorescent protein). В случае аллогенной трансплантации реципиентами были мыши CBA, сингенной — животные линии C57BL/6 GFP⁻. При всех типах подсадки учитывали пол донора и реципиента; подсадка КМ от самцов самкам не допускалась, так как на успешность трансплантации органов влияет H-Y антиген, и несоответствие пола донора и реципиента может приводить к отторжению трансплантата (Eichwald et al., 1958). Трансгенный белок EGFP в клетках донора (GFP⁺-мышь) использовали как витальную метку для определения их приживаемости в организме реципиента, не несущего этот трансген (GFP⁻-мышь). При освещении светом с длиной волны в диапазоне 395–488 нм GFP флуоресцирует в зеленой области спектра с максимумом флуоресценции с длиной волны 508 нм. Всего в работе было использовано 56 животных.

Получение КМ. Бедренные кости донора очищали от мягких тканей и растирали в фарфоровой ступке в 600 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS). Полученную массу фильтровали через капроновое сито с размером пор 70 мкм. Образовавшуюся суспензию доводили до объема 500 мкл. КМ, полученный из двух бедренных костей одного донора, использовали для 3–4 реципиентов. Клетки донора (1.5×10^7 в объеме 100 мкл) вводили в хвостовую вену реципиенту, находящемуся в сознании, инсулиновым шприцем.

Облучение мышей. За 1 сут до трансплантации КМ проводили тотальное однократное облучение всех мышей-реципиентов на рентгеновской установке РУТ-250-15-2 для подавления иммунной реакции. Доза облучения составляла 6.5 Гр, что соответствует дозе ЛД_{50/30} для данных линий мышей, мощность излучения — 1 Гр/мин. Для определения характера распределения и приживания клеток донора в организме реципиента животных после аллогенной и сингенной трансплантации забивали дислокацией шейных позвонков в соответствии с инструкцией American Physiological Society (1995).

Исследование флуоресценции GFP в тканях. Участок прямой кишки реципиента длиной около 1.5 см промывали от содержимого и разрезали вдоль. Из правой доли печени нарезали лезвием слайсы, начиная приблизительно в 3 мм от края доли. Для исследования кожи вырезали ее участок из поясничной области после частичного удаления шерсти пинцетом или бритвенным станком так, чтобы она не мешала рассматривать поверхность органа.

Образцы помещали на предметное стекло, наносили на них PBS во избежание высыхания и исследовали с двух сторон. Селезенку и кусочек доли печени протирали с помощью скальпеля через капроновый фильтр с размером пор 70 мкм, который затем промывали PBS в объеме 2 мл. Строму и паренхиму помещали отдельно на предметное стекло, наносили на них PBS и накрывали покровным стеклом. Никакой предварительной или последующей фиксации образцы не подвергались. В работе использовали флуоресцентный микроскоп Axio-Imager Z1 с цветной цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия).

Образцы органов исследовали при общем увеличении 50, 100, 200 и 400× через 1, 3, 5, 7, 11, 14, 21, 28, 35 и 55 суток после трансплантации. В таблицах отражены результаты заселения органов 2–4 мышей-реципиентов донорскими клетками на каждый срок исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для обнаружения различий между аллогенной и сингенной трансплантациями КМ на клеточном уровне нами были исследованы динамика и особенности заселения органов мышей донорскими клетками.

Кожа. В коже с 1-х по 5-е сут после обоих видов ТКМ у части животных GFP⁺-клетки отсутствовали, а у части наблюдали только единичные округлые или неправильной формы недифференцированные GFP⁺-клетки, а после аллогенной ТКМ – также единичные флуоресцирующие макрофаги. На 7-е сут уже у всех животных изнутри детектировали мелкие округлые клетки и фибробласты донорского происхождения, до 10–15 в

поле зрения в общей сложности после сингенной и единичные в некоторых полях зрения – после аллогенной ТКМ при увеличении объектива 20×(табл. 1).

На 11–21-е сут после сингенной ТКМ у всех животных в коже изнутри наблюдали стабильно большое количество округлых клеток, но с 28-х сут оно снижалось и до 55-х сут не превышало 10 в поле зрения. При такой ТКМ, с 21-х и по 55-е сут, концентрация фибробластов донорского происхождения, наоборот, всегда на порядок превосходила исходную. В то же время после аллогенной ТКМ у всех животных на 14–21-е сут происходило резкое увеличение количества GFP⁺-округлых клеток, которое оставалось очень значительным до конца наблюдения. При этом концентрация GFP⁺-фибробластов с 21-х по 28-е сут в коже по-прежнему оставалась невысокой.

По форме фибробласты донорского происхождения варьировали от обычных веретенообразных в начальные сроки до изогнутых и паучообразных, начиная с 14-х сут после обоих видов ТКМ. В то же время на 21-е сут после аллогенной ТКМ у одного из животных их размер составил 25–30 против обычных 10–15 мкм. Округлые клетки наблюдали в основном с внутренней стороны кожи, а фибробласты – снаружи.

У мышей СВА наблюдали большую задержку появления кератиноцитов – на 28-е сут после ТКМ против 14 сут у животных линии C57BL/6. Из-за свечения кератина кератиноциты были видны в основном в виде теней, но у отдельных животных они определялись совершенно четко и однозначно.

В некоторых случаях после обоих видов ТКМ наблюдали паракератоз (сохранение ядер в ро-

Таблица 1. Результаты детекции клеток, несущих маркерный ген зеленого флуоресцентного белка EGFP, в коже мышей – реципиентов линий C57Bl/6 и СВА

Тип клеток	Линия	Время после трансплантации, сут						
		7	11	14	21	28	35	55
Округлые недифференцированные	C57Bl/6	+	++	++	++	+	+	+
	СВА	+	+	+++	+++	++	++/++/++	++
Фибробласты	C57Bl/6	+	+	+	++	++	++	+++
	СВА	+	+	+	++	++	++/+++/++	++
Кератиноциты	C57Bl/6	–	–	+	+	+	++	–
	СВА	–	–	–	–	+	++/++/–	±
Скопления округлых, овальных, угловатых клеток и фибробластов на месте повреждения	C57Bl/6	++	–	++	+	++	+++	–
	СВА	+	–	++	–	++	++/+++/–	+++

Условные обозначения в табл. 1–3 (при увел. об.: 20×): (–) – отсутствие клеток в препарате; (±) – единичные клетки на весь препарат; (+) – единичные клетки в каждом поле зрения; (++) – десятки клеток в поле зрения; (+++) – сотни клеток в поле зрения.

говом слое — рис. 1а) или дискератоз (хаотичное расположение в эпидермисе) кератиноцитов (рис. 1б). К 35-м сут мыши СВА значительно различались по состоянию кожи.

У одного животного обнаружили мощное диффузное свечение кератина, в котором находились кератиноциты донорского происхождения разных форм и размеров. В толще — множество GFP^+ -фибробластов, изнутри — GFP^+ -клетки округлые и фибробласты, но в меньших количествах, чем в предыдущие сроки (21-е и 28-е сут). Шерсть не выпадала, выглядела здоровой.

У второго животного шерстный покров выглядел изреженным, на мордочке почти отсутствовал, верхний слой кожи снимался чешуями. При этом снаружи наблюдали сплошное заселение кожи GFP^+ -фибробластами, а изнутри — множество округлых GFP^+ -клеток.

У третьего животного кожа снималась отсохшими пластами вместе с шерстью, но под ней находилась новая целая безволосая розовая кожа без признаков зачесов или кровотечения. С внешней стороны в этой новой коже наблюдали множество флуоресцирующих фибробластов и кератиноцитов (рис. 1в). В то же время изнутри в образце была обнаружена всего одна, хотя и крупная, колония круглых GFP^+ -клеток, а фибробласты донорского происхождения отсутствовали. В мертвой коже изнутри обнаруживали флуоресцирующие коллагеновые тяжи и кератиноциты с ядрами (рис. 1з).

К 55-м сут после аллогенной ТКМ у еще одного экспериментального животного произошла полная замена кожного покрова, и новая шерсть отросла приблизительно до 0.5 см в длину, была очень мягкой и шелковистой. Кожа была очень нежной и тонкой, но целой и здоровой на вид. Под волосками наблюдали десятки очень мелких GFP^+ -фибробластов и единичные флуоресцирующие кератиноциты. С внутренней стороны кожи обнаружили десятки GFP^+ -фибробластов, в основном очень тонких и длинных, флуоресцирующих округлых и угловатых клеток. После сингенной ТКМ на 35-е и 55-е сут мощное диффузное свечение мешало рассматривать отдельные клетки. При этом снаружи наблюдали множество GFP^+ -фибробластов и кератиноцитов (рис. 1д), в толще кожи и с ее внутренней стороны — GFP^+ -фибробласты разных форм и размеров, только изнутри — десятки округлых GFP^+ -клеток (рис. 1е).

На 14-е сут после аллогенной ТКМ у одного из животных был обнаружен участок кожи с зачесом,

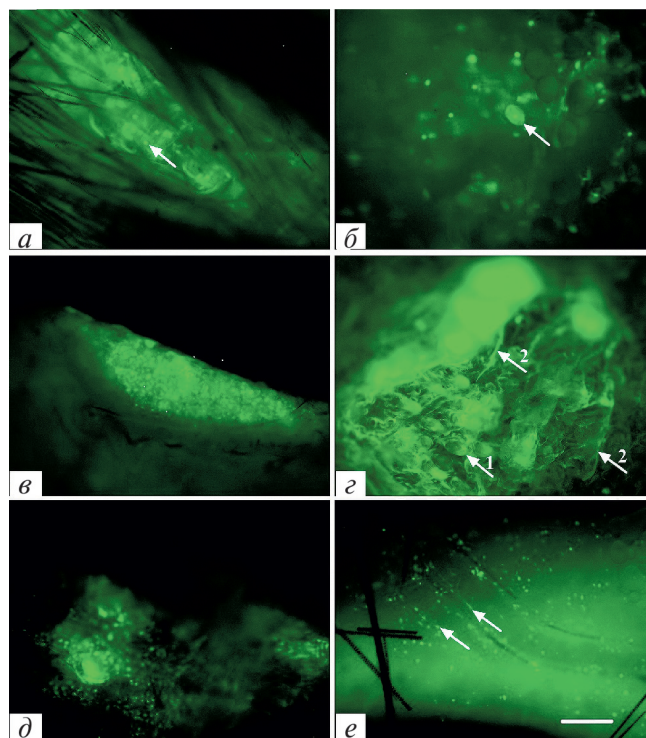


Рис. 1. Химеризация кожи с дифференцировкой донорских клеток: а — кератиноциты с ядрами (паракератоз) в роговом слое через 21 сут после сингенной трансплантации костного мозга (ТКМ); б — одиночный кератиноцит в глубине кожи с внутренней стороны (дискератоз) через 28 сут после аллогенной ТКМ (стрелка); в — внешняя сторона новой кожи с множеством флуоресцирующих клеток через 35 сут после аллогенной ТКМ; з — флуоресцирующие коллагеновые тяжи, бесклеточная масса и кератиноциты с ядрами в отслоившейся мертвой коже через 35 сут после аллогенной ТКМ изнутри. Стрелкой 1 указан кератиноцит, стрелкой 2 — коллагеновые тяжи; д — множество GFP^+ -фибробластов и кератиноцит через 55 сут после сингенной ТКМ снаружи; е — десятки округлых GFP^+ -клеток и единичные фибробласты изнутри через 35 сут после сингенной ТКМ. Стрелками указаны фибробласты. Масштабная линейка: 50 мкм. Ув. об.: 20×.

из которого был взят образец для сравнения с неповрежденной кожей с поясницы. Клетки донорского происхождения на этом участке отличались от всех других образцов тем, что были не округлыми среднего размера (около 5 мкм в диаметре), не веретенообразными и не кератиноцитами, а довольно крупными и овальными. В то же время как после сингенной ТКМ, так и после аллогенной у части реципиентов в коже с поясницы были обнаружены механические повреждения, похожие на покус, и в них находились плотные скопления GFP^+ -фибробластов и круглых клеток, одинаковых по своим показателям с аналогичными клетками реципиентов с неповрежденной кожей.

Таблица 2. Результаты детекции клеток, несущих маркерный ген белка EGFP, в печени мышей — реципиентов линий C57Bl/6 и CBA

Тип GFP ⁺ -клеток и структур	Линия	Время после трансплантации, сут						
		7	11	14	21	28	35	55
Фибробласты 5–15 мкм	C57Bl/6	±	±	±	±	±	±	±
	CBA	±	±	±	±	±	±	±
Фибробласты 16–30 мкм	C57Bl/6	±	±	±	±	±	±	+
	CBA	±	±	±	±	±	±	+
Округлые и овальные 5–10 мкм	C57Bl/6	±	±	+	+	±	+	±
	CBA	±	±	+	±	±	+	±
Мегакариоциты	C57Bl/6	—	—	—	±	±	—	±
	CBA	±	—	±	—	±	±	+
Перегородки	C57Bl/6	±	±	±	±	±	+	+
	CBA	±	±	+	+	+	++	++
Клетки Ито	C57Bl/6	±	+	+	+	++	++	+++
	CBA	+	++	++	++	++	+++	+++
Гепатоциты	C57Bl/6	±	±	±	±	±	±	±
	CBA	—	±	±	—	±	±	±

Эти различия наводят на мысль, что уровень специализации, которого могут достичь МСК КМ, зависит не только от типа трансплантации, но и от характера повреждения кожного покрова, поскольку в облученной, но неповрежденной коже поясничной области после обоих типов ТКМ нами обнаружена дифференцировка МСК и в фибробласты, и в кератиноциты, как и в случае с кусками.

Печень. Чтобы понять, являются ли гепатоцитами обнаруженные нами на слайсах крупные одно- и двоядерные структуры донорского происхождения, окруженные темной зоной (предположительно цитоплазмой) без видимой мембраны, и ответить на вопрос, существуют ли вообще экспрессирующие GFP гепатоциты, мы исследовали образцы печени у доноров — мышей Tg(ACTB-EGFP)1Osb/J, разводимых на основе инбредной линии C57BL/6, и гибридов самка Tg(ACTB-EGFP)1Osb/J × самец CBA. У доноров на слайсах в гепатоцитах флуоресцировали ядра, и цитоплазма, либо только ядра. Эти клетки были приурочены к строме органа, прикрепляясь к ней относительно небольшими группами (кластерами). У гибридов GFP⁺-гепатоциты наблюдали в очень крупных скоплениях и наряду с полностью флуоресцирующими клетками одновременно мы обнаруживали такие, у которых были темные ядра и светилась только цитоплазма, и такие, у которых одно или два очень ярких ядра были окружены темной цитоплазмой. Последняя разновидность гепатоцитов у обоих типов доноров морфологи-

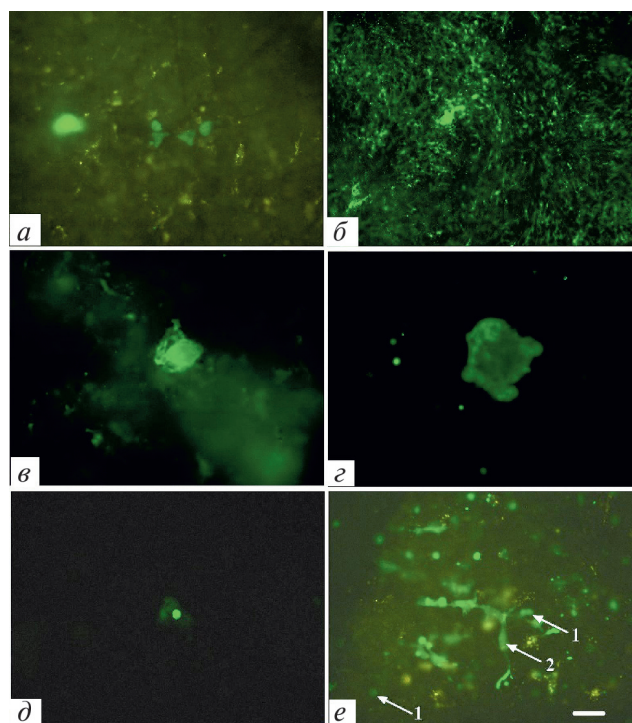


Рис. 2. Химеризация печени и селезенки с дифференцировкой донорских клеток: *a* — GFP⁺-клетки неправильной формы и треугольные в печени через 1 сут после аллогенной ТКМ; *б* — GFP⁺-структуры из клеток Ито в печени в виде вихрей, колец и лучей через 35 сут после аллогенной ТКМ; *в*, *г* — GFP⁺-мегакариоцит в печени и селезенке соответственно через 55 сут после аллогенной ТКМ; *д* — гепатоцит донорского происхождения через 35 сут после сингенной ТКМ; *е* — GFP⁺-гепатоциты (1) рядом с GFP⁺-клеткой Ито донорского происхождения (2) через 28 сут после аллогенной ТКМ. Масштабная линейка: 50 мкм. Ув. об.: 40× (*a*, *в*–*е*), 10× (*б*).

чески соответствовала тем структурам, которые наблюдали у животных в нашем эксперименте, что позволило нам утверждать, что мы наблюдаем у реципиентов именно гепатоциты.

Уже через 1 сут после ТКМ у реципиентов обеих линий в печени в образцах как стромы, так и паренхимы в некоторых полях зрения обнаруживали лежащие поодиночке флуоресцирующие перемычки, овальные и неправильной формы крупные клетки длиной 10–15 мкм, фибробласты (эпителиоциты) длиной 5–15 мкм, угловатые, округлые и овальные клетки длиной 5–10 мкм, единичные макрофаги и лейкоциты. Кроме того, детектировали еще и одиночные флуоресцирующие, неправильной формы и треугольные гигантские клетки до 30 мкм в диаметре — возможно, клетки Купфера или активированные клетки Ито (рис. 2а), а также единичные GFP⁺-гепатоциты. Подобную картину мы наблюдали до 7 сут после ТКМ. Затем, начиная с 11-х сут, в строме и паренхиме печени концентрация клеток Ито размером до 30 мкм донорского происхождения причудливых форм со всевозможными сложными отростками постоянно увеличивалась (табл. 2). Они формировали к поздним срокам наблюдения упорядоченные GFP⁺-структуры в виде вихрей, колец и лучей, пронизывающих весь орган (рис. 2б), однако после аллогенной ТКМ мембраны этих клеток выглядели полуразрушенными, чего никогда не наблюдали в контроле.

Кроме того, с 14-х сут у мышей линии СВА в паренхиме печени практически в каждом поле зрения обнаруживали флуоресцирующие перемычки и лейкоциты; количество последних к концу наблюдения возрастало. Что касается реципиентов линии С57В1/6, то в период 14–55 сут после ТКМ подобные элементы и клетки в печени присутствовали в намного меньших количествах, а представительство клеток донорского происхождения таких типов, как овальные клетки разных размеров (5–15 мкм), округлые и угловатые (5–10 мкм), фибробласты и клетки неправильной формы (10–15 мкм), было стабильно низким (1–5 в некоторых полях зрения). GFP⁺-мегакариоциты при этом встречались с частотой 1–2 на весь препарат или отсутствовали. Через 1–35 сут после аллогенной ТКМ эти клетки также были единичными. Однако на 55-е сут их концентрация становилась больше практически на порядок по сравнению с первоначальной как при исследовании слайсов, так и в паренхиме после перетирания кусочка печени.

Это позволило предположить, что данное явление было компенсаторной реакцией организ-

ма животного на недостаточное кроветворение в костном мозге, хотя дополнительное исследование мазка крови показало картину, типичную для успешного приживления донорского КМ: поля GFP⁺-тромбоцитов и лейкоциты до 10 клеток в поле зрения. Действительно, в диафизах бедренных костей мыши СВА на 55-е сут после ТКМ костный мозг отсутствовал.

Поскольку селезенка наряду с КМ также является органом кроветворения, мы предположили, что и в ней после аллогенной ТКМ могут происходить нетипичные гемопоэтические процессы. Действительно, в гомогенате селезенки было обнаружено значительное количество активно пролиферирующих GFP⁺-бластных клеток, GFP⁺-мегакариобласты и мегакариоциты. По всей вероятности, именно этим объяснялось длительное выживание животного после аллогенной ТКМ, несмотря на отторжение и полную замену кожного покрова. На рис. 2в, г представлены фото GFP⁺-мегакариоцитов GFP⁺ в печени и в селезенке мыши СВА соответственно. Гепатоциты донорского происхождения встречались поодиночке или небольшими группами после обоих видов ТКМ (рис. 2д, е) в некоторых полях зрения.

Прямая кишка. В прямой кишке с внешней стороны единичные округлые и овальные недифференцированные GFP⁺-клетки, а также небольшие фибробластоподобные клетки донорского происхождения появлялись у реципиентов линии С57В1/6 уже через 1 сут после трансплантации, а у мышей линии СВА значительно позже — через 3 и 7 сут после этой процедуры (табл. 3).

На 11-е сут недифференцированные GFP⁺-клетки с внешней стороны у реципиентов обеих линий замещались флуоресцирующими фибробластами, которых, начиная с 14-х сут, наблюдали уже десятками в поле зрения при увеличении объектива 20× (общем увеличении 200×). Однако если на 14-е сут после сингенной ТКМ они всегда имели размер 5–15 мкм и веретенообразную форму (рис. 3а), то после аллогенной ТКМ часть GFP⁺-фибробластов у одного животного была гигантского размера (до 30 мкм в длину) и с разветвлениями (рис. 3б).

Интересно, что ни до, ни после этого такую картину мы не наблюдали. В последующие сроки у животных в стенке кишки снаружи после обоих типов ТКМ появлялись расположенные между гладкомышечными волокнами в виде цепочек и прикрепленные к волокнам нитевидные и очень тонкие паукообразные клетки с длинными отростками.

Таблица 3. Результаты детекции клеток, несущих маркерный ген белка EGFP, в прямой кишке мышей – реципиентов линий C57Bl/6 и CBA

Тип клеток	Линия	Время после трансплантации, сут						
		7	11	14	21	28	35	55
Округлые и овальные недифференцированные	C57Bl/6	+	+	—	—	—	—	—
	CBA	—	±	—	—	—	—	±
Фибробласты	C57Bl/6	±	+	++	++	++	++	++
	CBA	±	±	++	++	++	++	++
Клетки Пейеровых бляшек	C57Bl/6	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	CBA	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Клетки ворсин	C57Bl/6	±	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	CBA	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Округлые и овальные Соединительнотканые	C57Bl/6	—	++	++	+++	+++	+++	+++
	CBA	—	—	++	+++	+++	+++	+++

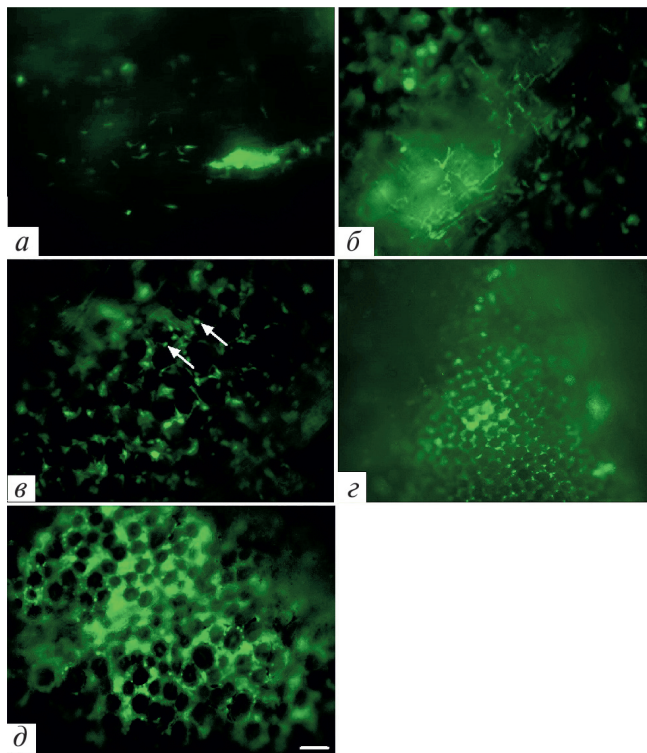


Рис. 3. Химеризация прямой кишки с дифференцированной донорских клеток: *а* — GFP⁺-фибробласты нормального размера через 14 сут с внешней стороны кишки (в мышечном слое) после сингенной ТКМ; *б* — GFP⁺-фибробласты гигантского размера с разветвлениями с внешней стороны кишки (в мышечном слое) через 14 сут после аллогенной ТКМ; *в* — GFP⁺-клетки, похожие на бокаловидные (стрелки), через 14 сут после аллогенной ТКМ; *г* — основания ворсин правильной 6-гранной формы в поперечном сечении через 35 сут после сингенной ТКМ; *д* — деформированные, разного размера ворсины, окруженные слоями соединительнотканых GFP⁺-клеток через 35 сут после аллогенной ТКМ. Масштабная линейка: 50 мкм. Ув. об.: 20× (*а, б, г, д*), 10× (*в*).

На 35-е сут у всех животных линии C57BL/6 стенка кишки имела нормальные толщину и цвет, а у животных линии CBA была гиперемированной. У одного из троих животных кишка была плотной со множеством ясно видимых фибробластов, узких прямых и разветвленных, идущих как в продольном, так и в поперечном направлениях, что было близко к картине 28-х сут. У других двух мышей стенка кишки была истончена до такой степени, что сквозь нее были ясно видны основания ворсин и GFP⁺-фибробласты едва просматривались; они имели нитевидную форму и были нормального размера. На 55-е сут у мыши линии CBA также детектировали GFP⁺-фибробласты, до 20 в поле зрения (при увеличении объектива 20× и общем увеличении 200×), но к ним добавились округлые GFP⁺-клетки, предположительно лейкоциты. Несмотря на отторжение кожи, произошедшее за 2–3 недели до забора органов, кишка не выглядела ни истонченной, ни воспаленной, что наблюдалось в более ранние сроки у других животных после аллогенной ТКМ. Это указывает на индивидуальность порядка развития РТПХ в разных органах и ее силу.

В Пейеровых бляшках флуоресцирующие клетки появлялись через 5 сут после обоих видов ТКМ и наблюдались до конца эксперимента. Однако у мышей CBA таких бляшек было мало по сравнению с мышами C57BL/6 или они не вообще не обнаруживались (21-е сут после ТКМ).

На 35-е сут в толще кишки одного из этих животных была найдена только одна бляшка, но гигантских размеров и оплетенная кровеносными сосудами, которые на более ранних сроках были малозаметными. Количество GFP⁺-клеток в стро-

ме и паренхиме бляшек было настолько большим, что нефлуоресцирующие клетки в них не просматривались.

Заселение ворсин прямой кишки после обоих типов ТКМ едва начиналось через 1 нед., но уже к 11-м сут практически во всех находилось от 1–2 до 5–15 GFP⁺-клеток (см. табл. 3). Некоторые ворсины к этому сроку замещались соединительнотканными структурами донорского происхождения после сингенной и через 14 сут – после аллогенной ТКМ.

Во втором случае в слизистой оболочке детектировали еще и круглые флуоресцирующие клетки, выступающие из стенок ворсин, похожие на бокаловидные, которые после этого ни разу не обнаруживались (см. рис. 3в). С 21-х сут и до конца наблюдения картина заселения и состояния слизистой оболочки кишки у мышей C57BL/6 практически не менялась: во всех ворсинах было множество GFP⁺-клеток, а сами основания ворсин имели правильную 6-гранную форму в поперечном сечении (см. рис. 3г).

У мышей линии СВА к 21-м сут картина заселения была иной. Многие ворсины были без GFP⁺-клеток, у многих донорские клетки были угловатыми и укороченными. К 28-м сут к этому добавилось изменение формы большинства ворсин кишки с 6-гранной на овальную, а к 35-м сут такими стали все ворсины. Они потеряли однородность по размеру, так что разница по толщине между некоторыми достигала двукратной. Местами между ворсинами были пустые промежутки, при этом практически каждая была окружена двойным или тройным слоем соединительнотканых клеток донорского происхождения (см. рис. 3д). У мыши, дожившей до 55 сут, состояние слизистой оболочки было таким же.

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие РТПХ-фенотипа у мышей характеризуется изменениями кожи и шерсти, потерей веса и диареей (Brubaker, 1993), склерозированием желчных протоков и колитом (Brandon et al., 2010), поэтому нами для исследования связи проявлений РТПХ со степенью химеризма были выбраны кожа, прямая кишка и печень. Аллогенная трансплантация КМ мышам СВА от мышей линии C57BL/6 моделировала неродственную аллогенную подсадку КМ у человека с неполным соответствием по HLA, так как известно, что ли-

нии СВА и C57BL/6 имеют несколько отличий по лейкоцитарным антигенам (Бландова и др., 1983).

Развитие РТПХ после подобной ТКМ исследовали и ранее, но невозможность дифференцировать клетки донора от клеток реципиента не позволяла отследить судьбу первых в организме хозяина (Цуцаева и др., 1988). Ген *GFP* был выделен из медузы *Aequorea victoria*. Поскольку для флуоресценции белка GFP не требуются экзогенные субстраты и кофакторы, он может быть использован как маркер экспрессии и локализации гена в живых организмах (Chalfie, 1995). Были созданы трансгенные линии мышей (Okabe et al., 1997), имеющие усиленный ген *GFP* (*EGFP*), находящийся под бета-актиновым промотором и цитомегаловирусным энхансером, и предложили использовать их в различных экспериментах по трансплантации.

Использование EGFP в нашем случае позволяло проводить визуализацию восстановления исследуемых органов реципиента после облучения за счет донорских клеток, а также однозначно связать с ними процессы гистогенеза. При этом было возможно исследовать большой объем органа (печени, кожи) или весь орган (прямая кишка) на наличие клеток донорского происхождения без какой-либо фиксации, ПЦР, FISH, окрашивания на Y-хромосому или гистохимии.

Данный метод исследования химеризма после ТКМ широко известен в экспериментальной биологии (Krause, 2002; Миллер и др., 2016; Egawa, Kabashima, 2018; Hünfeld et al., 2018). Он позволяет моделировать на животных-биомоделях процессы, которые очень сложно изучать на людях, перенесших ТКМ, в частности степень заселения донорскими клетками органов реципиента и РТПХ, для чего нужны сложные молекулярно-биологические методы или биопсия (Körbling, 2002; Tolar et al., 2013; van der Torren, 2015; Waterhouse et al., 2021).

Мы провели пошаговое исследование с забором у мышей-реципиентов органов-мишеней РТПХ на 10 сроках после аллогенной и сингенной трансплантации, чего не обнаружили в работах других авторов, которые изучали химеризм в течение одного или двух сроков после ТКМ без всякого объяснения выбора времени и при неясности того, какое время соответствует максимуму заселения донорскими клетками или началу гибели клеток.

В нашей работе после обоих видов ТКМ у реципиентов в коже наблюдали как округлые недифференцированные клетки, так и фибробласты и кератиноциты донорского происхождения.

Из дифференцированных клеток подавляющее большинство составляли клетки соединительной ткани (фибробласты). После аллогенной ТКМ GFP⁺-кератиноциты появлялись довольно поздно (28 сут) по сравнению с сингенной (14 сут). Накопление кератина в обоих случаях сопровождалось мощным свечением кожи.

Присутствие кератиноцитов донорского происхождения после сингенной ТКМ показано и в наших работах, и в работах других авторов (Fujita et al., 2010; Богданенко и др., 2020, 2022). Что касается аллогенной ТКМ, то есть работа, в которой показано, что ХУ-положительный сигнал определялся с частотой 6% через 867 сут после трансплантации в цитокератин-положительных клетках образцов кожи женщин-реципиентов, получивших КМ от доноров-мужчин. В эпидермисе клетки донорского происхождения располагались в глубине мальпигиевого слоя, близко к зернистому слою (Körbling et al., 2002).

В другой работе по аллогенной ТКМ биопсия кожи пациентов выявила наличие донорских CD45⁺-клеток, экспрессировавших коллаген VII типа (Tolar et al., 2013). Однако у мышей-биомоделей с эпидермальной буллезой через 10–12 недель после полулетальной и летальной дозы облучения и экспериментального лечения аллогенной ТКМ кератиноциты в коже отсутствовали при наличии только донорских недифференцированных клеток, которые авторы определяли как клетки лейкоцитарного происхождения, так как они несли на своих мембранах кластер дифференцировки CD45 (Egawa, Kabashima, 2018; Hünefeld et al., 2018).

Дифференцировка стволовых клеток КМ (СККМ) в кератиноциты была очень слабой у мышей даже после летального облучения и травмирования кожи, так как только 0.1% кератиноцитов в месте раны определялись как донорские, причем они не флуоресцировали, хотя несли ген *GFP*, и были выявлены иммунофлуоресцентным окрашиванием на цитокератин и Y-хромосому (Harris et al., 2004).

Возможно, что отличие наших результатов от указанных состоит в количестве трансплантированных клеток ($1.5 \cdot 10^7$ против $1 \cdot 10^6$), сроках детекции кератиноцитов (28–55 сут против 70–84 после ТКМ) и степени антигенных различий между донором и реципиентом. В нашем случае мы наблюдали полную замену кожи в период с 35-х по 45-е сут после аллогенной ТКМ, о чем ничего не сообщается у других авторов (Egawa, Kabashima, 2018; Hünefeld et al., 2018), но, возможно, была

ими не замечена, поскольку о наблюдениях за ее промежуточным состоянием не сообщалось.

Возможно, что на период замены кожи кератиноциты могут исчезать (что и наблюдалось нами у одного животного на 35-е сут) или присутствовать в ней в минимальных количествах (у животного на 55-е сут). Мы считаем, что в механизме замены кожи могут участвовать Т-клетки реципиента, поскольку есть работа, в которой острую кожную РТПХ наблюдали в присутствии 100% Т-клеток хозяина; при этом большинство антиген-представляющих клеток в коже было донорского происхождения и наблюдалось непосредственно рядом с Т-клетками хозяина (Divito et al., 2020). В пользу этой гипотезы говорит тот факт, что и в указанной, и в нашей работе наблюдали паракератоз и дискератоз кератиноцитов именно донорского происхождения, что свидетельствует о наличии иммунной атаки, причем со стороны Т-клеток хозяина, так как эти явления характерны для воспалительных заболеваний.

Наблюдаемые в нашей работе во внутреннем слое кожи округлые GFP⁺-клетки могут быть и лейкоцитами донорского происхождения, по крайней мере частично, поскольку после сингенной ТКМ их количество в этом слое существенно ниже по сравнению с аллогенной. Это явление, а также усиление химеризма кожи (в основном за счет фибробластов) вплоть до события ее отторжения, исчезновение с внутренней поверхности новой кожи большинства GFP⁺-клеток, а затем их новое размножение к 55-м сут после аллогенной ТКМ может обозначать наличие перекрестной иммунной реакции в этом органе, т.е. одновременно и РТПХ, и реакции “хозяин против трансплантата” (РХПТ).

Наличие фибробластов в коже поясницы, наблюдаемое нами не только после сингенной, но и после аллогенной ТКМ, указывает на возможность дифференцировки стволовых клеток КМ в этом органе при определенных условиях. Однако ясно, что одного облучения может быть недостаточно. Наличие довольно глубоких механических травм (покусов, порезов) вызывает усиление образования фибробластов.

Подобная реакция показана нами и другими авторами при использовании облучения и последующего нанесения травмы при сингенной ТКМ (Rea et al., 2009; Rodriguez-Menocal et al., 2015; Богданенко и др., 2020). Но поверхностное повреждение кожи перед аллогенной ТКМ приводило к появлению в ее толще только крупных донорских недифференцированных клеток, что совпада-

ет с данными других авторов (Egawa, Kabashima, 2018; Hünefeld et al., 2018).

Возможно, причиной нарушения дифференцировки донорских клеток в коже может быть не только работа иммунной системы хозяина, но и отсутствие необходимых для этого сигналов в нужной концентрации или нужного качества. Роль сигнальных молекул, необходимых для регуляции дифференцировки стволовых клеток, отводят, в частности, некодирующим кольцевым РНК. При культивировании стволовых клеток различного происхождения они способны либо усиливать, либо ослаблять данный процесс (Lin et al., 2021).

Как показывает наша работа, большинство GFP^+ -клеток в печени дифференцировались в клетки соединительной ткани — фибробласты, клетки Ито и клетки перемычек. Поскольку мы могли видеть клетки целиком и живыми, нельзя было принять один тип клеток за другой. Есть работа, в которой через 70 сут после сингенной трансплантации GFP^+ -клетки цельного КМ в печеночных долях дифференцировались в клетки, подобные купферовским, со звездчатой морфологией (Filip et al., 2014), т.е. в клетки Ито. Нам удалось обнаружить превращение донорских стволовых клеток КМ в гепатоциты, независимо от типа трансплантации, хотя их число не превышало 1–5 в некоторых полях зрения. Этот результат не противоречит данным о возникновении после ТКМ химеризма гепатоцитов у животных (Krause, 2001) и человека (Körbling et al., 2002).

Наличие гепатоцитов донорского происхождения при использовании в качестве метки Y-хромосомы (Körbling et al., 2002) можно считать спорным, поскольку увидеть всю клетку одновременно при нарезании срезов фиксированного органа невозможно без ее компьютерной реконструкции, которую обычно не делают. Чтобы избежать подобной ошибки, некоторые авторы используют методы окрашивания срезов печени реципиентов веществами, связывающимися с белками, вырабатываемыми гепатоцитами. Однако морфологически определить обнаруживаемые таким способом клетки, как гепатоциты в данном случае, обычно нельзя, и в ряде работ авторы употребляют термин “гепатоцитоподобные клетки” (Caplan, 2013).

В то же время есть работа, где обнаруженные клетки донорского происхождения действительно морфологически выглядят как гепатоциты. По крайней мере, так утверждают авторы (Francois et al., 2013). Неверие в возможность использования стволовых клеток КМ для терапии токсических повре-

ждений печени выразили другие авторы (Kanazawa, Verma, 2003): при использовании трех разных способов детекции гепатоцитов им удалось найти только пять гепатоцитов на множестве срезов препаратов, полученных от нескольких животных. Ничтожная доля гепатоцитов донорского происхождения, обнаруженных после летальной дозы облучения и аллогенной ТКМ и детектированных в печени по Y-хромосоме, подтверждает этот вывод (Harris et al., 2004).

При нашем методе исследования печени в большинстве GFP^+ -гепатоцитов подопытных животных флуоресцировали только ядра. Возможно, при этом способе подготовки ткани печени к исследованию повреждался актиновый цитоскелет GFP^+ -клеток, и этот белок, экспрессируемый под актиновым промотором, терял нативную структуру в первую очередь в цитоплазме клеток. В то же время GFP^- -клетки печени выглядели здоровыми во все сроки наблюдения после аллогенной ТКМ, что говорит об отсутствии иммунной реакции против них со стороны донорских Т-клеток.

Прогрессирующее заселение печени GFP^+ -клетками Ито и фибробластами и формирование ими стромы реципиента в нашей работе совпадают по времени с развитием холангитов и склерозированием желчных протоков после моделирования РТПХ (Brandon et al., 2010). Известно, что при хроническом повреждении печени происходит активация клеток Ито, что приводит к секреции матрикса, вследствие чего развивается фиброз или даже цирроз (Iredale, 2001). Из этого следует, что именно увеличение химеризма соединительной ткани с течением времени, наблюдаемое нами, должно усиливать иммунные реакции в печени.

Наличие там значительного количества GFP^+ -мегакариоцитов подтверждает возможность образования дополнительных центров кроветворения из донорских клеток у мышей после аллогенной трансплантации и развития РТПХ (Цуцаева и др., 1988). Поскольку показано, что РТПХ вызывает подавление недифференцированных гемопоэтических клеток и блокирует дифференцировку мегакариоцитов в костном мозге на мышинной модели (Lin et al., 2014), компенсация образования тромбоцитов выглядит целесообразной для организма в целом. Однако то, что она проходит за счет донорских клеток, вызывает вопрос о том, за счет каких сигналов это происходит. Засилье донорских клеток в селезенке на 55-е сут после аллогенной ТКМ и наличие там еще одного очага размножения GFP^+ -мегакариоцитов одновременно с большим количеством ярко флуоресцирующих бластов указывает на само-

организацию всей популяции донорских клеток для поддержания их нормального существования в организме реципиента.

По данным литературы, даже после видимого полного восстановления кишечника после острого радиационного поражения миофибробласты, эпителиальные и эндотелиальные клетки КМ-происхождения могут быть найдены в тканях этого органа (Brittan et al., 2002, 2005; Okamoto et al., 2002). Через 7 сут после сингенной ТКМ таких клеток в кишке еще совсем мало (Ch'ang et al., 2012), но уже через 11–14 сут происходит экспоненциальное заселение ими практически всех ворсин толстой кишки (Сергиевич и др., 2021). К 30 сут после такой трансплантации строма ворсинок кишечника обильно колонизирована клетками с GFP, а через 70 сут GFP⁺-клетки образуют рыхлую соединительную ткань ворсинок (Filip et al., 2014).

Эта картина не противоречит той, которую наблюдали в наших экспериментах. В то же время некоторая задержка заселения мышечного слоя прямой кишки фибробластами и отклонение их размеров от обычных после аллогенной ТКМ заставляет предположить, что, как и в случае с дифференцировкой клеток донорского происхождения в фибробласты печени или кератиноциты, после аллогенной трансплантации имеет место недостаток необходимых для этого сигналов в нужной концентрации или нужного качества.

Свидетельством РТПХ, вероятно, является истончение стенки кишки практически до ее полной прозрачности после аллогенной ТКМ, при том что GFP⁺-фибробласты до конца жизни мышей не повреждались. Однако деформация или отсутствие GFP⁺-клеток во многих ворсинах, а затем и деформация большинства ворсин кишки, потеря ими однородности по размеру позволяют предположить, что в данном случае имеет место иммунная атака со стороны клеток хозяина, а не донора. Это предположение подкрепляется тем фактом, что практически каждая ворсина к поздним срокам была окружена двойным или тройным слоем соединительнотканых клеток донорского происхождения, а, как известно, именно хроническая иммунная атака провоцирует разрастание соединительной ткани.

Отсутствие в бедренных костях костно-мозговых клеток не только реципиента, но и донора через 55 сут после аллогенной ТКМ подтверждает возможность существования перекрестной иммунной реакции. Поскольку при аллогенной ТКМ как Т-клетки, так и HSPCs (hematopoietic stem and

progenitor cells) являются донорскими, следовало бы ожидать, что эти клетки будут защищены от прямого повреждения при РТПХ после трансплантации (Müskens et al., 2021). Однако несколько исследований доказали, что РТПХ приводит к снижению количества и функции HSPC. Это позволило предположить, что они повреждаются при РТПХ (Martínez-Jaramillo et al., 2001; Shono et al., 2010).

Вопрос заключается в том, повреждаются ли донорские HSPCs непосредственно Т-клетками хозяина. В пользу этого предположения говорят факты, полученные на мышах: присутствие только собственных функциональных Т-лимфоцитов во всех исследованных образцах кожи и толстой кишки во время острой РТПХ при почти полном их отсутствии в крови и, наоборот, наличие в основном в ней Т-клеток донорского происхождения в отсутствие РТПХ (Divito et al., 2020). Как мы полагаем, это явление указывает на то, что после ТКМ, кроме РТПХ, имеет место и реакция РХПТ.

В практическом применении в медицине КМ считается субстанцией, состоящей из стволовых клеток, которые затем специализируются в клетки крови. Однако при этом упускают из виду, что в КМ содержится большое количество МСК. Хотя МСК считаются неуловимыми для иммунитета и даже иммуносупрессивными, свежие данные свидетельствуют о том, что после их дифференцировки при аллогенной ТКМ иммунный ответ хозяина может быть неизбежным (Mohammadi et al., 2020). В частности, кожно-резидентные Т-клетки реципиента выживают при “истощении лимфоцитов”, так как, несмотря на отсутствие циркулирующих лимфоцитов, у пациентов с глубокой лимфопенией после химиотерапии все еще может развиваться опосредованная Т-клетками лекарственная сыпь (Divito et al., 2020).

Как видно из нашей работы, стволовые клетки КМ превращаются в основном в клетки соединительной ткани. В то же время они оказываются способными дифференцироваться в специализированные клетки органов.

При этом, очевидно, они заселяют ниши, занимаемые до того клетками хозяина и погибшими при его облучении, необходимым для успеха трансплантации. Иммунная система реципиента может восстанавливаться после облучения, после чего, как мы предполагаем, клетки донорского происхождения становятся ее мишенью.

Однако РТПХ, согласно своему названию, подразумевает повреждение органов после алло-

генной ТКМ донорскими Т-клетками, которые вводятся одновременно с кроветворными клетками при трансплантации, а затем вновь образуются из гематopoэтических клеток. Из всех наблюдаемых нами признаков такой атаки выделяются массы недифференцированных округлых GFP⁺-клеток с внутренней поверхности кожи и истончение стенки прямой кишки, заселенной относительно небольшим количеством GFP⁺-фибробластов. Все остальные повреждения органов после аллогенной ТКМ — отторжение кожи, в которой находится множество клеток донорского происхождения (в основном GFP⁺-фибробластов), деформация ворсин в слизистой оболочке прямой кишки и частичная деформация и потеря ими GFP⁺-клеток, массово их заселивших, усиленное размножение соединительнотканых GFP⁺-клеток в печени и кишке, наличие полуразрушенных клеток Ито на поздних сроках, опустошение КМ реципиента — указывают на то, что атака на них в данном случае идет со стороны иммунной системы реципиента, а не донорских Т-лимфоцитов.

Поэтому мы предполагаем, что после аллогенной ТКМ, кроме РТПХ, имеет место и РХПТ. Это предположение подкрепляется данными клинической картины после аллогенной ТКМ из медицинской практики — повреждением кожи, эпителия желчных протоков, но не гепатоцитов, и слизистой оболочки пищеварительного тракта, избыточной продукцией коллагена — и согласуется с работами о наличии реципрокных иммунных реакций после аллогенной ТКМ (Vossen, 1998; Dzierzak-Mietla et al., 2012). Явное проявление иммунных реакций (21–35 сут после ТКМ) напрямую совпадает со временем массового заселения исследованных органов клетками донорского происхождения и их дифференцировки, т.е. развитие химеризма определяет развитие поражения органов.

Это наблюдение подтверждается тем фактом, что по результатам другой нашей работы потеря химеризма крови через 2–7 нед. после аллогенной (от мышей линии C57Bl/6) и полуаллогенной трансплантации (от гибридов ♀C57BL/6 GFP⁺ × ♂CBA) мышам CBA приводила к увеличению выживаемости реципиентов (до 9 мес. после облучения) по сравнению с теми животными, у которых химеризм наблюдали до конца жизни. При этом присмертное исследование животных с потерей химеризма крови показало полное или частичное отсутствие химеризма внутренних органов без видимых признаков РТПХ (Богданенко и др., 2021).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансирована за счет средств бюджета Института общей патологии и патофизиологии и Института биофизики клетки РАН. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>) и были одобрены этическим комитетом Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии (протокол № 4 от 12.09.2022 г.) в соответствии с инструкцией Американского физиологического общества (1995).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.В.Б.: идея, помощь при проведении инъекций и облучении, забой животных, анализ данных для таблиц, подбор фотографий и данных из литературы, трактовка результатов, написание текста.

Л.А.С.: извлечение КМ из бедренных костей, приготовление суспензии клеток, введение КМ в хвостовую вену, взятие образцов органов, работа на флуоресцентном микроскопе, ведение протоколов, подготовка фотографий для публикации.

А.В.К.: подбор дозы облучения, обсуждение результатов, подбор литературы, утверждение окончательной версии статьи.

Н.А.К.: анализ микрофотографий, написание резюме, утверждение окончательной версии статьи.

И.А.Л.: подготовка животных для эксперимента, ведение мышей после трансплантации, обсуждение результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бландова З.К., Душкин В.А., Малашенко А.М., Шмидт Е.Ф. 1983. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. М.: Наука. (Blandova Z.K., Dushkin V.A., Malashenko A.M., Shmidt Ye.F. 1983. Linii laboratornykh zhivotnykh dlya mediko-biologicheskikh issledovaniy. M.: Nauka.)

- Богданенко Е.В., Сергеевич Л.А., Карнаухов А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А. 2021. Выживаемость и устойчивость химеризма крови у мышей линии СВА после трансплантации костного мозга от доноров различного происхождения, несущих ген EGFP. Патогенез. Т. 19. № 4. С. 30 (Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova I.A. 2021. Survival and stability of blood chimerism in CBA mice after bone marrow transplantation from donors of various origin carrying the EGFP gene. Patogenez. V. 19. No. 4. P. 30.)
- Богданенко Е.В., Сергеевич Л.А., Карнаухов А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А. 2022. Исследование распределения донорских клеток при заживлении резаных ран после аллогенной и сингенной безоблучательной трансплантации цельного костного мозга с использованием мышей, несущих ген EGFP. Патогенез Т. 20. № 4. С. 69. (Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova I.A. 2022. The distribution of donor cells during healing of incised wounds after allogeneic and syngeneic transplantation of whole bone marrow without irradiation, using mice carrying the EGFP gene. Patogenez. V. 20. № 4. P. 69.)
- Богданенко Е.В., Сергеевич Л.А., Карнаухов А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А., Карнаухов В.Н. 2020. Изучение регенеративного потенциала стволовых клеток цельного костного мозга для лечения механических травм кожи в модельных экспериментах на мышах. Патол. физиол. и exper. терапия. Т. 64. № 1. С. 31. (Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova I.A., Karnaukhov V.N. 2020. The regenerative potential of stem cells from the whole bone marrow for the treatment of skin mechanical trauma in a murine model. Patol. fiziol. i eksper. terapiya (Pathol. Physiol. Exper. Ther.). V. 64. No. 1. P. 31.)
- Богданенко Е.В., Сергеевич Л.А., Карнаухов А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А. 2022. Исследование распределения донорских клеток при заживлении резаных ран после аллогенной и сингенной безоблучательной трансплантации цельного костного мозга с использованием мышей, несущих ген EGFP. Патогенез Т. 20. № 4. С. 69. (Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova I.A. 2022. The distribution of donor cells during healing of incised wounds after allogeneic and syngeneic transplantation of whole bone marrow without irradiation, using mice carrying the EGFP gene. Patogenez. V. 20. № 4. P. 69.)
- Миллер Т.В., Повещенко А.Ф., Лыков А.П., Повещенко О.В., Бондаренко Н.А., Петровская И.Ф., Завялов Е.Л., Деметьева Е.В., Захарова И.С., Грицык О.Б., Шурлыгина А.В., Коненков В.И. 2016. Сравнительный анализ миграционной активности популяций клеток костного мозга в лимфоидные и нелимфоидные органы в норме и на модели сахарного диабета. Современные проблемы науки и образования. № 2. С. 137. (Miller T.V., Poveshchenko A.F., Lykov A.P., Poveshchenko O.V., Bondarenko N.A., Petrovskaya I.F., Zavjalov E.L., Demytyeva E.V., Zakharova I.S., Gritsyk O.B., Shurlygina A.V., Konenkov V.I. 2016. Comparative analysis of the migratory activity of populations of bone marrow cells in lymphoid and non-lymphoid organs in norm and in experimental models of diabetes. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya. No. 2. P. 137.)
- Сергеевич Л.А., Богданенко Е.В., Карнаухов А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А. 2021. Флуоресцентная визуализация динамики распределения GFP⁺-клеток донора в органах мышей после трансплантации нативного или криоконсервированного костного мозга. Цитология. Т. 63. № 6. С. 568. (Sergievich L.A., Bogdanenko E.V., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova I.A. Fluorescent visualization of the dynamics of donor GFP⁺-cells distribution in mouse organs after native or cryopreserved bone marrow transplantation. Tsitologiya. V. 63. No. 6. P. 568.)
- Цуцаева А.А., Гольцев А.Н., Попов Н.Н., Останкова Л.В., Лобасенко Н.П., Микулинский Ю.Е. 1988. Кримоиммунология. Киев: Наукова думка. (Tsutsaeva A.A., Goltsev A.N., Popov N.N., Ostankova L.V., Lobasenko N.P., Mikulinsk Yu.E. 1988. Krioimmunologiya. Kiev: Naukova dumka.)
- Blazar B.R., Murphy W.J., Abedi M. 2012. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. Nat. Rev. Immunol. V. 12. P. 443.
- Brandon J.A., Perez J., Jennings C.D., Cohen D.A., Sindhava V.J., Bondada S., Kaplan A.M., Bryson J.S. 2010. Association between chronic liver and colon inflammation during the development of murine syngeneic graft-versus-host disease. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. V. 299. № 3. P. G602.
- Brittan M., Chance V., Elia G., Poulson R., Alison M.R., MacDonald T., Wright N.A. 2005. A regenerative role for bone marrow following experimental colitis: contribution to neovasculogenesis and myofibroblasts. Gastroenterol. V. 128. P. 1984.
- Brittan M., Hunt T., Jeffery R., Poulson R., Forbes S.J., Hodivala-Dilke K., Goldman J., Alison M.R., Wright N.A. 2002. Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. Gut. V. 50. P. 752. <https://doi.org/10.1136/gut.50.6.752>
- Brubaker D.B. 1993. Immunopathogenic mechanisms of posttransfusion graft-vs-host disease. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. V. 202. P. 122.
- Caplan A.I. 2013. Adult mesenchymal stem cells and the NO pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 110. P. 2695. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221406110>
- Chao N.J., Blume K.G. 1989. Bone marrow transplantation. Part I – Allogeneic. West J. Med. V. 151. P. 638.
- Chalfie M. 1995. Green fluorescent protein. Photochem. Photobiol. V. 62. P. 651.
- Ch'ang H.-J., Lin L.-M., Pu-Yuan C., Chi-Wen L., Ya-Hui C., Chou C.-K., Chen H.H. 2012. Bone marrow transplantation enhances trafficking of host-derived myelomonocytic cells that rescue intestinal mucosa after whole body radiation. Radiother. Oncol. V. 104. P. 401.
- Chen X., McClurg A., Zhou G.Q., McCaigue M., Armstrong M.A., Li G. 2007. Chondrogenic differentiation alters the immunosuppressive property of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, and the effect is partially

- due to the upregulated expression of B7 molecules. *Stem Cells*. V. 25. P. 364.
- Gorin N.-C., Labopin M., Boiron J.-M., Theorin N., Littlewood T., Slavin S., Greinix H., Cahn J.Y., Alessandrino E.P., Rambaldi A., Nagler A., Polge E., Rocha V. 2006. Results of genoidentical hemopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning for acute myelocytic leukemia: higher doses of stem cells infused benefit patients receiving transplants in second remission or beyond – the acute leukemia working party of the European cooperative group for blood and marrow transplantation. *Clin. Oncol.* V. 24. P. 3959.
- Divito S.J., Aasebo A.T., Matos T.R., Hsieh P.-C., Collin M., Elco C.P., O'Malley T., Bækkevold E.S., Reims H., Gedde-Dahl T., Hagerstrom M., Hilaire J., Lian J.W., Milford E.L., Pinkus G.S. et al. 2020. Peripheral host T cells survive hematopoietic stem cell transplantation and promote graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* V. 130. P. 4624.
- Dzierzak-Mietla M., Markiewicz M., Siekiera U., Mizia S., Koclega A., Zielinska P., Sobczyk-Kruszelnicka M., Kyrz-Krzemien S. 2012. Antigens' disparities on outcomes of hematopoietic stem cell. Transplantation from HLA-matched sibling donors. *Bone Marrow Res.* <https://doi.org/10.1155/2012/257086>
- Dubnyak D.S., Kuzmina L.A., Drovkov M.Y., Petinati N.A., Drize N.J., Vasilyeva V.V., Koroleva O.M., Mikhaltsova E.D., Popova N.N., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. 2016. Treatment of refractory intestinal acute GvHD using multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC). *Cell. Ther. Transplant.* V. 5. P. 34. <https://doi.org/10.18620/ctt-1866-8836-2016-5-3-34-36>
- Egawa G., Kabashima K. 2018. A study to detect bone marrow-derived keratinocyte: negative evidence of direct differentiation from bone-marrow cells to keratinocytes in normal and wounded skin using keratin 5-specific reporter mice. *J. Invest. Dermatol.* V. 138. P. 1228. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.12.032>
- Eichwald E.J., Lustgraaf E.C., Weissman I., Strainer M. 1958. Attempts to demonstrate sex-linked histocompatibility genes. *Transplant. Bull.* V. 5. P. 387. <https://doi.org/10.1097/00006534-195810000-00036>
- Ferrara J.L., Levine J.E., Reddy P., Holler E. 2009. Graft-versus-host disease. *Lancet*. V. 373. P. 1550.
- Filip S., Mokry J., Vavrová J., Sinkorová Z., Mičuda S., Šponer P., Filipová A., Hřebíková H., Dayanithin G. 2014. The peripheral chimerism of bone marrow-derived stem cells after transplantation: regeneration of gastrointestinal tissues in lethally irradiated mice. *J. Cell Mol. Med.* V. 18. № 5. P. 832. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12227>
- Francois S., Mouisseddine M., Allenet-Lepage B., Voswinkel J., Douay L., Benderitter M., Chapel A. 2013. Human mesenchymal stem cells provide protection against radiation-induced liver injury by antioxidative process, vasculature protection, hepatocyte differentiation, and trophic effects. *BioMed. Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2013/151679>
- Fujita Y., Abe R., Inokuma D., Sasaki M., Hoshina D., Natsuga K., Nishie W., McMillan J.R., Nakamura H., Shimizu T., Akiyama M., Sawamura D., Shimizu H. 2010. Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice. *PNAS*. V. 107. P. 14347. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000044107>
- Garvy B.A., Elia J.M., Hamilton B.L., Riley R.L. 1993. Suppression of B-cell development as a result of selective expansion of donor T cells during the minor H antigen graft-versus-host reaction. *Blood*. V. 82. P. 2758.
- Harris R.G., Herzog E.L., Bruscia E.M., Grove J.E., Van Arnam J.S., Krause D.S. 2004. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science*. V. 305. P. 90.
- Hünefeld C., Mezger M., Müller-Hermelink E., Schaller M., Müller I., Amagai M., Handgretinger R., Röcken M.J. 2018. Marrow-derived stem cells migrate into intraepidermal skin defects of a desmoglein-3 knockout mouse model but preserve their mesodermal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* V. 138. P. 1157. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.10.035>
- Iredale J.P. 2001. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin. Liver Dis.* V. 3. P. 427. <https://doi.org/10.1055/s-2001-17557>
- Kanazawa Y., Verma I. 2003. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *PNAS*. V. 100. Suppl. 1. P. 11850.
- Körbling M., Katz R.L., Khanna A., Ruirok A.C., Rondon G., Albitar M., Champlin R.E., Estrov Z. 2002. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral blood stem cells. *N. Engl. J. Med.* V. 346. P. 738. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa3461002>
- Krause D.S. 2002. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther.* V. 9. P. 754
- Lin Y., Hu X., Cheng H., Pang Y., Wang L., Zou L., Xu S., Zhuang X., Jiang C., Yuan W., Cheng T., Wang J. 2014. Graft-versus-host disease causes broad suppression of hematopoietic primitive cells and blocks megakaryocyte differentiation in a murine model. *Biol. Blood Marrow Transplant.* V. 20. P. 1290.
- Lin Z., Tang X., Wan J., Zhang X., Liu C., Liu T. 2021. Functions and mechanisms of circular RNAs in regulating stem cell differentiation. *RNA Biol.* V. 18. P. 2136.
- Liu H., Kemeny D.M., Heng B.C., Ouyang H.W., Melen-dez A.J., Cao T. 2006. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *J. Immunol.* V. 176. P. 2864.
- Lohan P., Coleman C.M., Murphy J.M., Griffin M.D., Ritter T., Ryan A.E. 2014. Changes in immunological profile of allogeneic mesenchymal stem cells after differentiation: should we be concerned? *Stem Cell Res. Ther.* V. 5. P. 99.
- Lohan P., Treacy O., Griffin M.D., Ritter T., Ryan A.E. 2017. Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells and their extracellular vesicles: are we still learning? *Front. Immunol.* V. 8. P. 1626.
- Martínez-Jaramillo G., Gómez-Morales E., Sánchez-Valle E., Mayani H. 2001. Severe hematopoietic alterations in vitro, in bone marrow transplant recipients who develop graft-

- versus-host disease. *J. Hematother. Stem Cell Res.* V. 10. P. 347.
- Mohammadi N., Mardomi A., Hassannia H., Enderami S.E., Ranjbaran H., Rafiei A., Abediankenari S. 2020. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells acquire immunogenicity concurrent with differentiation to insulin-producing cells. *Immunobiol.* V. 225. P. 157994. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151994>
- Moreno D.F., Cid J. 2019. Graft-versus-host disease. *Med. Clin. (Barc).* V. 152. P. 22. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2018.07.012>
- Müskens K.F., Lindemans C.A., Belderbos M.E. 2021. Hematopoietic dysfunction during graft-versus-host disease: a self-destructive process? *Cells.* V. 10. P. 2051.
- Okabe M., Ikawa M., Kominami K., Nakanishi T., Nishimune Y. 1997. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* V. 407. P. 313.
- Okamoto R., Yajima T., Yamazaki M., Kanai T., Mukai M., Okamoto S., Ikeda Y., Hibi T., Inazawa J., Watanabe M. 2002. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat. Med.* V. 8. P. 1011. <https://doi.org/10.1038/nm755>
- Popli R., Sahaf B., Nakasone H., Lee J.Y.Y., Miklos D.B. 2014. Clinical impact of H-Y alloimmunity. *Immunol. Res.* V. 58. P. 249. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8514-3>
- Rea S., Giles N.L., Webb S., Adcroft K.F., Evill L.M., Strickland D.H., Wood F.M., Fear M.W. 2009. Bone marrow-derived cells in the healing burn wound—More than just inflammation. *Burns.* V. 35. P. 356. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2008.07.011>
- Rodriguez-Menocal L., Shareef S., Salgado M., Shabbir A., Van Badiavas E. 2015. Role of whole bone marrow, whole bone marrow cultured cells, and mesenchymal stem cells in chronic wound healing. *Stem Cell Res. Ther.* V. 6. P. 24. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0001-9>
- Shono Y., Ueha S., Wang Y., Abe J., Kurachi M., Matsuno Y., Sugiyama T., Nagasawa T., Imamura M., Matsushima K. 2010. Bone marrow graft-versus-host disease: Early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* V. 115. P. 5401.
- Suratt B.T., Cool C.D., Serls A.E., Chen L., Varella-Garcia M., Shpall E.J., Brown K.K., Worthen G.S. 2003. Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* V. 168. P. 318. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200301-145OC>
- Tee B.C., Sun Z. 2020. Xenogeneic mesenchymal stem cell transplantation for mandibular defect regeneration. *Xenotransplantation.* V. 27. P. e12625. <https://doi.org/10.1111/xen.12625>
- Tolar J., Wagner J.E. 2013. Allogeneic blood and bone marrow cells for the treatment of severe epidermolysis bullosa: repair of the extracellular matrix. *Lancet.* V. 382. P. 1214. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61897-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61897-8)
- Tran S.D., Pillemer S.R., Dutra A., Barrett A.J., Brownstein M.J., Key S., Pak E., Leakan R.A., Kingman A., Yamada K.M., Baum B.J., Mezey E. 2003. Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells *in vivo*: a molecular analytical study. *Lancet.* V. 361. P. 1084. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12894-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12894-2)
- Van der Torren C.R., van Hensbergen Y., Luther S., Aghai Z., Stachová Rychnavská Z., Slot M., Scherjon S., Kröger N., Ganser A., Weissinger E.M., Goulmy E., Hambach L. 2015. Possible role of minor H antigens in the persistence of donor chimerism after stem cell transplantation; relevance for sustained leukemia remission. *PLoS One.* V. 10. P. e0119595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119595>
- Van Dijken P.J., Wimperis J., Crawford J.M., Ferrara J.L.M. 1991. Effect of graft-versus-host disease on hematopoiesis after bone marrow transplantation in mice. *Blood.* V. 78. P. 2773.
- Vossen J. 1998. Allogeneic bone marrow transplantation: relation between chimaerism and immunity. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.* V. 60. P. 111. Discussion 143.
- Waterhouse M., Pennisi S., Pfeifer D., Deuter M., von Bubnoff N., Scherer F., Strüssmann T., Wehr C., Duyster J., Bertz H., Finke J., Duque-Afonso J. 2021. Colon and liver tissue damage detection using methylated SESN3 and PTK2B genes in circulating cell-free DNA in patients with acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* V. 56. P. 327.

A STUDY OF THE RELATIONSHIP OF THE DYNAMICS OF DEVELOPMENT AND CHARACTERISTICS OF CHIMERISM WITH MANIFESTATIONS OF GRAFT-VS.-HOST DISEASE IN THE ORGANS OF MICE AFTER ALLOGENEIC TRANSPLANTATION OF WHOLE BONE MARROW

E. V. Bogdanenko^{a, *}, L. A. Sergievich^b, A. V. Karnaukhov^b, N. A. Karnaukhova^b, I. A. Lizunova^b

^a *Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315, Russia*

^b *Institute of Cell Biophysics Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow reg., 142290, Russia*

*e-mail: lenabogdval@mail.ru

In the clinical practice, allogeneic bone marrow transplantation (BMT) is often cause of the graft-versus-host disease (GvHD). GvHD is explained by the fact that T-lymphocytes, which are administered simultaneously with hematopoietic cells during transplantation and after then formed and matured in the timus of the recipient from donor progenitor cells, recognize and attack the cells of the host. However, a complete explanation of the phenomenon of the GvHD does not exists, and the chimerization of the recipient's organism as a possible cause of damage of its organs is not taken into account. Therefore, the aim of this work was the modeling of allogeneic transplantation of the whole bone marrow (BM, experiment) and comparing its results with syngeneic transplantation (control) basing on the investigation of engraftment of cells of donor origin in the main GvHD target organs. Bone marrow (BM) donors were Tg(ACTB-EGFP)10sb/J mice carrying a green fluorescent protein gene (EGFP), recipients were the animal of CBA and C57BL/6 inbred strains with age 2–10 months. 1 day before BMT (1.5×10^7 cells per mouse) all recipients were irradiated at a dose of 6.5 Gy (LD 50/30). After 1, 3, 5, 7, 11, 14, 21, 28, 35 and 55 days the development of chimerism in the liver, skin and colon of animals was examined using a fluorescent microscope. Already in 1 day, single fibroblast-like donor cells were found in the colon, in 7 days – in the skin and liver. 14–28 days after BMT, with donor cells mainly stroma in the liver, in the skin fibroblasts and keratinocytes were formed, in the colon villous cells and also stromal and parenchymal cells of Peyer's patches which were died off after irradiation were substituted. Unlike control, in the experimental groups GFP⁺ giant fibroblasts about 30 mkm in length were found in the stroma of the liver, in the skin and in the colon; in the liver there was a lot of GFP⁺-bulkheads and fibroblast-like Ito's cells of a very intricate configuration. To 35–55 days after allogeneic BMT cells of the donor origin in the liver and in the villi of the colon began to destroy, the villi became overgrown with GFP⁺-connective tissue cells and warped, wall of the colon became thin and the skin was fully substituted with a new one (all these things were never observed in the control groups). We propose a hypothesis that beside with GvHD traits like thinning of the colon wall and plenty of roundish GFP⁺-cells on inner surface of the skin, other signs of the studied after allogeneic BMT organs suggest that the cells of the organs which are formed from mesenchymal stem cells of the whole bone marrow become target for the recipient's T-cells, i.e. suggest existence of host-versus-graft (HVG) reaction. Obvious manifestation of immune reactions after BMT directly coincides with the term of massive engraftment of the studied organs with cells of donor origin and restoration of the host's own immune system, i.e. the development of chimerism determines the development of organ damage. This explains the events of GvHD from medical practice – atrophy of the mucous membranes, excess production of collagen, sclerosis of the bile ducts, skin damage, colitis – and the timing of its manifestation.

Keywords: GvHD, HVG reaction, whole bone marrow, MSC, mice, GFP, fluorescence microscopy, allogeneic transplantation