

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ISSN 0041-3771

ЦИТОЛОГИЯ

TSITOLOGIYA

2023. Том 1

2023. Vol. 1

1



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

СОДЕРЖАНИЕ

Том 65, номер 1, 2023

Роль сигнального пути Notch в патогенезе заболеваний легких неинфекционной этиологии <i>В. А. Серебрякова, А. Е. Санина, О. И. Уразова, А. А. Гаджиев, Е. П. Степанова</i>	3
Потенциал биомедицинского использования децеллюляризованных матриц культивируемых клеток <i>Р. Е. Ушаков</i>	11
Остеогенная дифференцировка остеобластов человека <i>in vitro</i> ассоциирована со слабым изменением их протеомного профиля <i>И. А. Хворова, Д. А. Костина, Б. Р. Зайнулина, Е. А. Фефилова, Е. С. Громова, Р. М. Тихилов, С. А. Божкова, А. П. Середа, В. В. Карелкин, А. Б. Малашичева, А. А. Лобов</i>	20
Изменение содержания малых некодирующих РНК в сперматозоидах как возможный механизм трансгенерационной передачи эффектов отцовского стресса: экспериментальное исследование <i>О. В. Малышева, С. Г. Пивина, Е. Н. Пономарева, Н. Э. Ордян</i>	28
Цитотоксическая активность атмосферной холодной плазменной струи в отношении 3D-клеточной модели рака молочной железы человека <i>Е. А. Патракова, М. М. Бирюков, О. С. Троицкая, Д. Д. Новак, Е. В. Милахина, П. П. Гугин, Д. Э. Закревский, И. В. Швейгерт, О. А. Коваль</i>	39
Роль MAP-киназ в индуцированном фосфорилировании гистона H2AX в трансформированных клетках <i>О. О. Гнедина, А. В. Моршнева, М. В. Иготти</i>	54
Нарушение уровня транспортеров лактата в клетках головного мозга при остром токсическом действии бета-амилоида <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> <i>Я. В. Горина, Е. В. Харитонова, Е. Д. Хилажева, А. А. Семенова, А. В. Моргун, Ю. К. Комлева, О. Л. Лопатина, А. Б. Салмина</i>	64
Влияние 2,3-бутандион-моноксима на взаимодействие миозина с актином в норме и при врожденной миопатии <i>Д. Д. Андреева, Н. А. Рысев, Ю. С. Боровиков, О. Е. Карпичева</i>	82
О вариативности клеточного адгезивного ответа под воздействием родственных коротких пептидов <i>В. П. Иванова</i>	92
Двойное ковалентное связывание биливердина в ближне-инфракрасных флуоресцентных белках предотвращает их протеолитическую деградацию <i>Ольга В. Степаненко, Олеся В. Степаненко</i>	102

Contents

Vol. 65, No. 1, 2023

The role of the Notch signaling pathway in the pathogenesis of lung diseases of noninfectious etiology	
<i>V. A. Serebryakova, A. E. Sanina, O. I. Urazova, A. A. Gadzhiev, E. P. Stepanova</i>	3
The potential of decellularized cell-derived matrices for biomedical applications	
<i>R. E. Ushakov</i>	11
Osteogenic differentiation <i>in vitro</i> of human osteoblasts is associated with only slight shift in their proteomics profile	
<i>I. A. Khvorova, D. A. Kostina, B. R. Zainullina, E. A. Fefilova, E. S. Gromova, R. M. Tikhilov, S. A. Bozhkova, A. P. Sereda, V. V. Karelkin, A. B. Malashicheva, A. A. Lobov</i>	20
Changes in the content of small non-coding RNAs in spermatozoa as a possible mechanism of transgenerational transmission of the effects of paternal stress: Experimental research	
<i>O. V. Malysheva, S. G. Pivina, E. N. Ponomareva, N. E. Ordyan</i>	28
Cytotoxic activity of atmospheric cold plasma jet towards 3D human breast cancer cell model	
<i>E. A. Patrakova, M. M. Birykov, O. S. Troitskaya, D. D. Novak, E. V. Milakhina, P. P. Gugin, D. E. Zakrevskiy, I. V. Schweigert, O. A. Koval</i>	39
The role of MAP kinases in the induced histone H2AX phosphorylation in transformed cells	
<i>O. O. Gnedina, A. V. Morshneva, M. V. Igotti</i>	54
Disturbance in expression of lactate transporters in brain cells under acute toxic effect of betaamyloid <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	
<i>Ya. V. Gorina, E. V. Kharitonova, E. D. Khilazheva, A. A. Semenova, A. V. Morgun, Yu. K. Komleva, O. L. Lopatina, A. B. Salmina</i>	64
Influence of 2,3-butanedione-monoxime on the interaction of myosin with actin in healthy and in congenital myopathy	
<i>D. D. Andreeva, N. A. Rysev, Y. S. Borovikov, O. E. Karpicheva</i>	82
On the variability of cell adhesive response under the action of related short peptides	
<i>V. P. Ivanova</i>	92
Double covalence bonding of biliverdin in near-infrared fluorescent protein prevents their proteolytic degradation	
<i>Olga V. Stepanenko, Olesya V. Stepanenko</i>	102

УДК 616.092

РОЛЬ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛЕГКИХ НЕИНФЕКЦИОННОЙ ЭТИОЛОГИИ

© 2023 г. В. А. Серебрякова^{1, *}, А. Е. Санина², О. И. Уразова^{2, 3}, А. А. Гаджиев², Е. П. Степанова⁴

¹Кафедра фармакологии Сибирского государственного медицинского университета, Томск, 634050 Россия

²Кафедра патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета, Томск, 634050 Россия

³Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники, Томск, 634050 Россия

⁴Томский фтизиопульмонологический медицинский центр, Томск, 634009 Россия

*E-mail: serebryakova-val@mail.ru

Поступила в редакцию 04.09.2022 г.

После доработки 26.09.2022 г.

Принята к публикации 03.10.2022 г.

Представлен обзор современных данных литературы о значении сигнального пути Notch в механизмах развития заболеваний респираторной системы — хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), бронхиальной астмы (БА) и рака легкого. В исследованиях образцов тканей легких больных с ХОБЛ и тканей легких мышей установлено, что активация сигнального пути Notch способствует метаплазии и повышению функциональной активности бокаловидных клеток, защищает эпителиальные клетки от апоптоза и окислительного стресса. Подавление пути Notch—Jagged1/Jagged2 ассоциировано с трансдифференцировкой булавовидных клеток в реснитчатые. У больных БА сигнальный путь Notch способствует дифференцировке Th2-лимфоцитов. В модели бронхиальной астмы, индуцированной овальбумином, каскад Notch увеличивает дисбаланс популяций лимфоцитов Th17/Treg, продукцию IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, образование аллерген-специфических IgE, эозинофильную инфильтрацию и метаплазию бокаловидных клеток эпителия дыхательных путей. Снижение концентрации IgE, цитокинов типа Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), увеличение числа Treg-клеток и уровня TGFβ в бронхоальвеолярном лаваже у мышей с астмой, опосредованное введением дендритных клеток, экспрессирующих лиганды DLL1 и Jagged1, свидетельствует о протективной роли сигнального пути Notch. На образцах опухолевой ткани и линии клеток немелкоклеточного рака легкого установлено, что увеличение экспрессии мРНК Notch-1 и Notch-3 связано с повышением пролиферативной активности, злокачественной трансформацией клеток, высоким риском метастазирования в лимфатические узлы и неблагоприятным прогнозом заболевания. В образцах опухолевой ткани мелкоклеточного рака легкого регистрируется повышение экспрессии гена ингибитора передачи сигналов Notch — лиганда DLK1, гена фактора транскрипции Ascl1 и лизин-специфической гистон-деметилазы 1 (LSD1). Подавление активности LSD1 сопровождается реактивацией передачи сигналов через Notch-1-рецептор и последующим угнетением фактора транскрипции Ascl1, индуцирующего начальные стадии опухолевой трансформации.

Ключевые слова: Notch, хроническая обструктивная болезнь легких, бронхиальная астма, рак легкого

DOI: 10.31857/S0041377123010091, **EDN:** GLDCGD

Сигнальный путь Notch играет фундаментальную роль в определении судьбы клеток во многих тканях. Уникальность пути Notch определяется юкстакринным механизмом передачи сигнала и плеiotропными эффектами в отношении регуляции дифференцировки, пролиферации клеток и апоптоза (Hua et al., 2019; Huang et al., 2019a; Lin et al., 2019; Katoh, Katoh, 2020; Kiyokawa, Morimoto, 2020; Yu, Li, 2022). Механизмы активации сигнального пути Notch в физиологических условиях достаточно хорошо изучены.

Существует четыре типа рецепторов Notch (Notch 1–4) и пять лигандов (Jagged-1, -2 и дельта-подобные лиганды (DLL) -1, -3 и -4) (Hua et al., 2019; Huang et al., 2019a; Lin et al., 2019; Katoh, Katoh, 2020; Kiyokawa, Morimoto, 2020; Zhou et al., 2022). Рецепторы Notch состоят из внеклеточного (Notch Extracellular Domain, NECD), трансмембранного (Notch Trans Membrane Domain, NTMD) и внутриклеточного (Notch Intracellular Domain, NICD) доменов (Huang et al., 2019a; Zhou et al., 2022). Согласно каноническому пути активации, лиганд-рецепторный комплекс подвергается эндоцитозу и последовательному протеолитическому отщеплению NECD (при участии металлопротеиназы ADAM) и NICD (под

Принятые сокращения: ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких; МКРЛ и НМКРЛ — соответственно мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легкого; Th-лимфоциты — Т-лимфоциты-хелперы; Treg — Т-регуляторные клетки.

действием γ -секретазы). Внутриклеточный домен NICD перемещается в ядро, связывается с фактором транскрипции RBPJk/CSL и семейством кофакторов MAML1–3 с образованием комплекса, активирующего экспрессию целевых генов-мишеней — *CCND1* (кодирует циклин D1), *CDKN1A* (кодирует ингибитор киназ белок P21), протоонкогенов *BMI1* и *MYC*, генов гликопротеина CD44 и факторов транскрипции HES1, HEY1, REST и TCF7 (Huang et al., 2019a; Katoh, Katoh, 2020; Kiyokawa, Morimoto, 2020; Zhou et al., 2022). В отсутствие NICD фактор транскрипции CSL связывается с корегуляторными белками и ингибирует транскрипцию генов-мишеней (Zhou et al., 2022).

Сигнальный путь Notch функционирует в процессе развития легких и восстановления повреждений (Zhou et al., 2022). В эмбриогенезе он контролирует баланс между базальными, реснитчатыми, нейроэндокринными и секреторными клетками в эпителии верхних отделов дыхательных путей. В постнатальном периоде ограничивает дифференцировку реснитчатых и способствует образованию секреторных клеток. В зрелом легком регулирует судьбу клеток, обновление базальных клеток и стимулирует дифференцировку стволовых клеток в слизистые (Sosa Iglesias et al., 2018). Ингибирование передачи сигналов Notch или дефицит транскрипционного фактора RBPJk/CSL сопровождается нарушением дифференцировки эпителиальных клеток проксимальных отделов дыхательных путей, подавляет секреторную функцию булавовидных клеток, ограничивает избыточную пролиферацию реснитчатых и нейроэндокринных клеток (Zhou et al., 2022). Нарушения функционирования сигнального пути Notch играют ключевую роль в патогенезе различных заболеваний легких — фиброза, рака легких, легочной артериальной гипертензии, хронической обструктивной болезни, бронхиальной астмы (Lin et al., 2019; Kiyokawa, Morimoto, 2020; Yu, Li, 2022).

РОЛЬ NOTCH В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) характеризуется прогрессирующим воспалительным процессом в бронхах с гиперплазией бокаловидных клеток и подслизистых желез, гиперсекрецией слизи, развитием эмфиземы легких, фиброзом и ограничением выдоха (Bagdonas et al., 2015; Wang et al., 2018; Agustí et al., 2020). Основной макромолекулярный компонент секрета бокаловидных клеток — гелеобразующий муцин 5AC, обеспечивающий мукоцилиарный клиренс и местную защиту дыхательных путей (Ostedgaard et al., 2017; Ma et al., 2018; Whitsett, 2018). Нарушение дифференцировки базальных клеток респираторного эпителия в бокаловидные, их метаплазия и избыточная функциональная активность приводят к обструкции дыхательных путей (Whitsett, 2018). Сигнальный путь

Notch имеет ключевое значение в регуляции дифференцировки и секреторной функции бокаловидных клеток. Установлено, что добавление лиганда Notch к эксплантированным легким эмбрионов мышей сопровождается увеличением числа клеток, секретирующих муцин 5AC, а в присутствии ингибитора γ -секретазы — их уменьшением (Ostedgaard et al., 2017; Ma et al., 2018).

Методами иммуногистохимического и иммунофлуоресцентного анализа серийных срезов образцов тканей легких курящих пациентов с ХОБЛ и тканей легких мышей *Ноха5*^{-/-} (с мутацией гена *Ноха5*), кодирующего дифференцировку эпителиальных клеток, продемонстрировано значительное увеличение экспрессии генов белков пути Notch — N1ICD и HEY2 в местах метаплазии бокаловидных клеток эпителия дыхательных путей (Boucherat et al., 2012). Введение ингибитора γ -секретазы ослабляет метаплазию бокаловидных клеток у мышей *Ноха5*^{-/-} (Tsao et al., 2011). Напротив, снижение уровня экспрессии рецептора Notch-3, его лиганда DLL1 и мРНК-регулируемых белков HES5 и HEY1/2 эпителиальными клетками бронхов указывает на подавление передачи сигналов Notch у курящих пациентов с ХОБЛ (Kiyokawa, Morimoto, 2020).

Существенную роль в нормальном функционировании эпителия дистальных воздухоносных путей играет полифункциональная популяция булавовидных клеток. Они продуцируют компоненты сурфактанта, вырабатывают гликопротеины и ферменты, принимающие участие в инактивации поступающих с воздухом токсинов, служат источником для пополнения собственной популяции и популяции реснитчатых клеток (Целуйко и др., 2014). Установлено, что индуцированная экспрессия белка пути Notch N1ICD в эпителиальных клетках легких способствует метаплазии слизистой и уменьшению числа реснитчатых клеток. Напротив, подавление передачи сигналов Notch-Jagged1 или Notch-Jagged2 сопровождается трансдифференцировкой булавовидных клеток в реснитчатые клетки (Kared et al., 2006; Morimoto et al., 2010). Таким образом, Notch может стать потенциальной мишенью регуляции функциональной активности и дифференцировки секреторных и реснитчатых клеток дыхательных путей при ХОБЛ.

Ведущую роль в патогенезе ХОБЛ играют воспаление, окислительный стресс и апоптоз клеток, индуцируемые в том числе сигаретным дымом. Установлено, что сигнальный путь, опосредованный Notch-1, защищает эпителиальные клетки от апоптоза (Luo et al., 2020). Так, в экспериментах на эмбрионах мышей с нокаутом гена рецептора Notch-1 регистрировали повышение опосредованного каспазой-3 апоптоза эндотелиальных клеток (Limbourg et al., 2005). Высокий уровень экспрессии Notch-1, напротив, защищал клетки от NF- κ B-индуцированной апоптотической гибели (Qin et al., 2011).

В модели ХОБЛ *in vitro*, представленной микросудистыми эндотелиальными клетками легких человека (Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells, HPMEC), обработанными 2.5%-ным экстрактом сигаретного дыма в течение 24 ч, продемонстрирована более низкая экспрессия рецептора Notch-1 и белков HES1 и HEY2. Корреляция высокого уровня экспрессии клетками HPMEC рецептора Notch-1 с устранением эффектов, индуцированных экстрактом сигаретного дыма, свидетельствует о значительной роли этого рецептора в регуляции апоптоза, воспаления и окислительного стресса (Luo et al., 2020).

Окислительный стресс способен инициировать механизм гибели клеток как по внешнему, так и по внутреннему пути (Sinha et al., 2013). В эксперименте на культуре первичных эндотелиальных клеток пупочной вены человека установлено, что подавление сигнального каскада Notch ингибитором γ -секретазы приводит к повышению образования активных форм кислорода (Cai et al., 2014). Восстановление активности γ -секретазы коррелирует с низким уровнем окислительного стресса (Small et al., 2014).

Большую роль в регенерации альвеолярной выстилки, синтезе и секреции сурфактанта играют пневмоциты 2-го типа. На долю этих клеток приходится не более 10% поверхности альвеол, они активно пролиферируют и трансформируются в пневмоциты 1-го типа, обеспечивающие диффузию газа между просветом альвеол и кровью в капиллярах (Ишутина, 2021). В эксперименте на трансгенных мышцах продемонстрировано, что конститутивная экспрессия рецептора Notch-3 в эпителиальных клетках легких сопровождается нарушением образования пневмоцитов 1-го типа (Zong et al., 2016).

РОЛЬ NOTCH В ПАТОГЕНЕЗЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Бронхиальная астма — хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, характеризующееся гиперреактивностью и ремоделированием бронхов (Huang et al., 2019b; Tindemans et al., 2020; Nie et al., 2021; Yu, Li, 2022). Центральную роль в развитии и прогрессировании астмы отводят IgE-зависимой активации тучных клеток, инфильтрации в слизистую оболочку дыхательных путей эозинофилов и активированных Т-лимфоцитов-хелперов типа 2 (Th2) (Huang et al., 2019a; Nie et al., 2021; Yu, Li, 2022). Результаты исследований указывают на определяющее значение сигнального пути Notch в направлении дифференцировки лимфоцитов Th2 при бронхиальной астме (Huang et al., 2019b; Nie et al., 2021; Yu, Li, 2022). У больных бронхиальной астмой регистрируется более высокий уровень экспрессии рецепторов Notch на CD4⁺ Т-клетках памяти и Th2-лимфоцитах, чем у здоровых доноров (Huang et al., 2019a; Tindemans et al., 2020). Установлено, что Jagged — лиганд Notch — и регулируемый им транскрипционный белок GATA3 являются основными факто-

рами Notch-опосредованного формирования популяции Th2-клеток (Tindemans et al., 2020; Yu, Li, 2022).

Участие сигнального пути Notch в патогенезе аллергического воспаления дыхательных путей доказано в экспериментах. Так, у мышей линий BALB/c и C57BL/6 в модели бронхиальной астмы, индуцированной овальбумином, регистрируется увеличение экспрессии в ткани легких рецепторов Notch (Huang et al., 2019b; Hua et al., 2019; Nie et al., 2021), а также мРНК фактора транскрипции HES1 и белка внутриклеточного домена NICD (Zeng et al., 2019). В жидкости бронхоальвеолярного лаважа экспериментальных животных отмечается увеличение доли Т-лимфоцитов-хелперов типа 17 (Th17) и снижение числа иммуносупрессорных Т-регуляторных клеток (Treg), в сыворотке крови регистрируется повышение концентрации интерлейкина (IL) 17 и снижение уровня IL-10, в ткани легких увеличивается экспрессия мРНК лигандов Notch — Jagged1 и Delta4 (He et al., 2021). Нарушение передачи сигналов Notch с помощью ингибитора γ -секретазы сопровождается уменьшением экспрессии мРНК Notch1, HES1, NICD и лиганда Jagged1, дисбаланса популяций лимфоцитов Th17/Treg, уровня IL-17 (Huang et al., 2019a; Zeng et al., 2019; He et al., 2021), продукции Th2-цитокинов (IL-4, IL-5, IL-13) и аллерген-специфических IgE, а также уменьшением эозинофильной инфильтрации, метаплазии бокаловидных клеток и гиперреактивности дыхательных путей (Huang et al., 2019a, 2019b; Kiyokawa, Morimoto, 2020; Tindemans et al., 2020).

Исследования роли дендритных клеток и популяции Treg в патогенезе бронхиальной астмы указывают на протективное значение сигнального пути Notch (Lee et al., 2018; Lin et al., 2019; Morianos, Semitekolou, 2020). Так, введение мышам линий BALB/c и C57BL/6 с овальбумин-индуцированной астмой дендритных клеток, экспрессирующих Notch-лиганд DLL1 или Jagged1, приводило к снижению продукции IgE, гиперреактивности дыхательных путей и секреции цитокинов Th2-типа (IL-4, IL-5, IL-13). Количество Th1-лимфоцитов и продукция интерферона- γ , напротив, увеличивались (Lee et al., 2018; Lin et al., 2019).

Критическая роль Treg-клеток в контроле иммунного гомеостаза в дыхательных путях при астме обусловлена их способностью ослаблять воспалительный процесс, опосредованный Th2-лимфоцитами. Значение сигнального пути Notch в определении направления дифференцировки пула Treg-лимфоцитов доказано в эксперименте, демонстрирующем увеличение числа CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-клеток в легких и концентрации трансформирующего фактора роста β (TGF β) в бронхоальвеолярном лаваже у мышей с астмой при введении дендритных клеток, экспрессирующих лиганд Jagged1 (Lin et al., 2019). Повышение экспрессии рецептора Notch-4 на Treg-клетках, регистрируемое при повторном воздей-

ствии аллергенов, сопровождается ослаблением их функциональной активности и способствует образованию популяций Th2- и Th17-лимфоцитов, поддерживающих аллергическое воспаление (Zhou et al., 2022).

РОЛЬ NOTCH В ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ЛЕГКИХ

Нарушения функционирования сигнального пути Notch активно обсуждаются в контексте одного из ключевых факторов онкогенеза основных гистологических типов рака легкого — немелкоклеточного и мелкоклеточного.

Сигнальный каскад Notch принимает участие в процессе эпителиально-мезенхимного перехода, который характеризуется утратой способности клеток к межклеточной адгезии, появлением миграционных свойств и, тем самым, способствует инициации опухоли, инвазии и метастазированию (Sparaneo et al., 2016; Sosa Iglesias et al., 2018). Однако роль молекулярных механизмов, опосредованных разными подтипами рецепторов Notch не однозначна.

Двойственная роль передачи сигналов Notch при мелкоклеточном раке легкого (МКРЛ) продемонстрирована в работе Лим с соавторами (Lim et al., 2017). Так, в модели на мышах и клетках МКРЛ человека установлена связь активации сигнального пути Notch с трансформацией нейроэндокринных клеток (источника всех нейроэндокринных новообразований легких) в клетки, лишенные секреторной функции и характеризующиеся медленным ростом. Вместе с тем, эти клетки резистентны к химиотерапии и обеспечивают трофическую поддержку опухолевых нейроэндокринных клеток. Блокада сигнального каскада Notch в комплексе с химиотерапией подавляет рост опухолевых клеток и задерживает развитие рецидива (Lim et al., 2017). Связь нарушений функционирования сигнального пути Notch с опухолевой трансформацией клеток доказана в эксперименте, демонстрирующем снижение способности клеток ксенотрансплантатов НМКРЛ к росту в присутствии ингибитора γ -секретазы (Sharif et al., 2020). В зарубежной литературе также представлены данные о том, что сигнальный путь Notch aberrантно активируется при НМКРЛ (Sharif et al., 2020) и, напротив, инактивируется при МКРЛ (Katoh, Katoh, 2020; Zhou et al., 2022).

В образцах тканей пациентов с НМКРЛ регистрируется более высокий уровень экспрессии мРНК Notch-1 (Sparaneo et al., 2016; Kiyokawa, Morimoto, 2020) и Notch-3 (Galluzzo, Bocchetta, 2011; Kiyokawa, Morimoto, 2020; Sharif et al., 2020) по сравнению с нормальной тканью легкого. Наиболее высокая частота экспрессии мРНК Notch-3 обнаружена в клетках плоскоклеточной карциномы и аденокарциномы (Galluzzo, Bocchetta, 2011; Zhou et al., 2022). Повышение экспрессии мРНК Notch-1 и Notch-3 связывают с высоким риском метастазиро-

вания в лимфатические узлы (Sparaneo et al., 2016; Kiyokawa, Morimoto, 2020) и неблагоприятным прогнозом заболевания (Chen et al., 2017; Sharif et al., 2020).

В настоящее время отсутствует единое мнение о значении в онкогенезе рецептора Notch-2 и опосредованного им сигнального каскада. Так, иммуногистохимический анализ образцов ткани опухоли пациентов с НМКРЛ показал снижение экспрессии Notch-2 по сравнению с нормальной тканью легкого (Sparaneo et al., 2016). В другом исследовании у пациентов с аденокарциномой, напротив, продемонстрировано увеличение экспрессии Notch-2 в сравнении с таковым у больных с плоскоклеточным раком. Также авторы указывают на ассоциацию высокого уровня экспрессии Notch-2 с более поздней стадией рака легкого и более высокой частотой рецидивов заболевания (Chen et al., 2017). Согласно результатам работы Мотоока с коллегами (Motooka et al., 2017), экспрессия рецептора Notch-2 в линии клеток НМКРЛ человека была аналогичной экспрессии Notch-1. При этом нокдаун гена рецептора Notch-2 в линии клеток НМКРЛ человека не сопровождался значимыми изменениями экспрессии молекул, определяющих дифференцировку, пролиферацию, миграцию и апоптоз клеток (Motooka et al., 2017).

Интересны результаты работ, оценивающих взаимосвязь нарушений сигнального пути Notch и функций белка P53, регулирующего клеточный цикл, пролиферацию и апоптоз трансформированных клеток. Так, на биоптатах опухолевой ткани пациентов с НМКРЛ без мутаций гена белка P53 установлено, что высокий уровень мРНК белка HES1 положительно коррелирует с экспрессией рецептора Notch-1 и плохим прогнозом заболевания (Kiyokawa, Morimoto, 2020). Сигнальный каскад, опосредованный рецептором Notch-1, способствует выходу клеток из апоптоза и росту клеток посредством негативной модуляции стабильности белка P53 (Sparaneo et al., 2016).

Отличительным признаком НМКРЛ является повышенная экспрессия и активация рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), связанная с плохим прогнозом и резистентностью к терапии (Baumgart et al., 2010; Pancevich-Wojtkiewicz, 2016). На линии клеток НМКРЛ показано, что одновременная активация Notch-1 и EGFR сопровождается повышением пролиферативной активности и злокачественной трансформацией клеток (Baumgart et al., 2010; Sparaneo et al., 2016). В образцах опухолевой ткани пациентов с НМКРЛ увеличение экспрессии рецепторов Notch-1, Notch-3 положительно коррелирует с повышенной экспрессией рецептора EGFR (Baumgart et al., 2010; Galluzzo, Bocchetta, 2011; Sosa Iglesias et al., 2018; Sharif et al., 2020). Нокдаун гена рецептора Notch-1 приводит к значительному снижению экспрессии клетками EGFR (Baumgart et al., 2010).

Другие исследования (George et al., 2015) указывают на супрессорную роль генов семейства *Notch* в развитии МКРЛ и их регуляторное значение в дифференцировке нейроэндокринных клеток. Так, в большинстве исследуемых образцов опухолевой ткани высокий уровень экспрессии генов белкомаркеров-нейроэндокринных клеток *CHGA* (хромогранина А) и *GRP* (гастрин-релизинг пептид) регистрировался на фоне высокой экспрессии гена ингибитора передачи сигналов Notch (гена лиганда *DLK1*) и гена фактора транскрипции *Ascl1*, индуцирующего начальные стадии опухолевой трансформации и необходимого для выживания опухолевых клеток (George et al., 2015).

Одной из потенциальных мишеней таргетной терапии опухолей является лизин-специфическая гистондеметилаза 1 (LSD1), обеспечивающая пролиферацию и метастазирование путем ингибирования опухолевого супрессора p53 (Chen et al., 2012). В эксперименте на мышах и клеточных линиях показано, что подавление активности LSD1, высоко экспрессирующейся при МКРЛ, сопровождается реактивацией передачи сигналов через Notch-1-рецептор и последующим угнетением фактора транскрипции *Ascl1* (Augert et al., 2019). На супрессорную роль сигнального пути Notch в онкогенезе при МКРЛ также указывает высокая экспрессия на поверхности опухолевых клеток ингибирующего лиганда DLL3, регулируемая *Ascl1* (Leonetti et al., 2019; Owen et al., 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты представленных исследований подтверждают решающую роль передачи сигналов Notch в эмбриональном развитии легких, дифференцировке бокаловидных клеток и гиперпродукции слизи при ХОБЛ, гиперреактивности и ремоделировании дыхательных путей у больных бронхиальной астмой, инициации и прогрессировании опухолевой трансформации клеток. Плейотропный характер Notch-опосредованных изменений указывает на необходимость дальнейшего изучения молекулярных механизмов, модулирующих сигнальный каскад. Комплексный анализ особенностей Notch-опосредованной индукции или подавления механизмов развития рассмотренных патологий позволит установить потенциальные таргетные мишени, усовершенствовать диагностические методы, а также терапевтические стратегии профилактики и лечения заболеваний органов дыхания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках плановой темы НИР Сибирского государственного медицинского университета по программе САЕ “Молекулярная медицина” (Молекулярно-клеточные основы воспаления при социально значимой патологии).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не участвовали животные или люди в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ишутина О.В. 2021. Сурфактантная система легких. Обзорная статья. Вестник ВГМУ. Т. 20. № 4. С. 7. [https://doi.org/10.22263/2312-4156.2021.4.7](https://doi.org/(Ishutsina O.V. 2021. The surfactant system of the lungs. A review article. Vestnik VGMU T. 20. № 4. С. 7. https://doi.org/10.22263/2312-4156.2021.4.7))
- Целуйко С.С., Намаконова В.С., Красавина Н.П., Чжоу С.Д., Лу Ц. 2014. Идентификация и локализация стволовых клеток в органах дыхательной системы (обзор литературы). Бюллетень физиологии и патологии дыхания. № 52. С. 121. (Tseluyko S.S., Namakonova V.S., Krasavina N.P., Zhou X., Li Q. 2014. Identification and localization of stem cells in the respiratory system (review). Bulletin Physiology and Pathology of Respiration. V. 52. P. 121).
- Agustí A., Vogelmeier C., Faner R. 2020. COPD 2020: changes and challenges. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. V. 319. P. L879. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00429.2020>
- Augert A., Eastwood E., Ibrahim A.H., Wu N., Grunblatt E., Bassom R., Liggitt D., Eaton K.D., Martins R., Poirier J.T., Rudin C.M., Milletti F., Cheng W.Y., Mack F., MacPherson D. et al. 2019. Targeting NOTCH activation in small cell lung-cancer through LSD1 inhibition. Sci. Signal. V. 12. P. 2922. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aau2922>
- Bagdonas E., Raudoniute J., Bruzauskaite I., Aldonyte R. 2015. Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD. Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. V. 10. P. 995. <https://doi.org/d.s82518> <https://doi.org/10.2147/cop>
- Baumgart A., Seidl S., Vlachy P., Michel L., Mitova N., Schatz N., Specht K., Koch I., Schuster T., Grundler R., Kremer M., Fend F., Siweke J.T., Peschel S., Duister J. et al. 2010. ADAM17 regulates the expression of the epidermal growth factor receptor by activating Notch1 extra-small cell lung cancer. Cancer Res. V. 70. P. 5368. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>
- Boucherat O., Chakir J., Jeannotte L. 2012. The loss of Hoxa5 function promotes Notch-dependent goblet cell metaplasia in lung airways. Biol. Open. V. 1. P. 677. <https://doi.org/10.1242/bio.20121701>
- Cai W.X., Liang L., Wang L., Han J.T., Zhu X.X., Han H., Hu D.H., Zhang P. 2014. Inhibition of Notch signaling leads to increased intracellular ROS by up-regulating Nox4 expression in primary HUVECs. Cell Immunol. V. 287. P. 129. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.12.009>
- Chen C.Y., Chen Y.Y., Hsieh M.S., Ho C.C., Chen K.Y., Shih J.Y., Yu C.J. 2017. Expression of Notch Gene and Its Impact on Survival of Patients with Resectable Non-small Cell Lung Cancer. J. Cancer. V. 8. P. 1292. <https://doi.org/10.7150/jca.17741>

- Chen Y., Jie V., Yan V., Zhou K., Xiao Y. 2012. Lysine-specific histone demethylase 1 (LSD1): a potential molecular target for tumor therapy. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression*. V. 22. P. 53.
<https://doi.org/10.1615/critreveukargeneexpr.v22.i1.40>
- Galluzzo P., Bocchetta M. 2011. Notch signaling in lung cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther*. V. 11. P. 533.
<https://doi.org/10.1586/era.10.158>
- George J., Lim J.S., Chan S.J., Kun W., Ozretic L., Kong G., Lenders F., Lu H., Fernandez-Cuesta L., Bosco G., Muller S., Damen I., Yahchan N.S., Park K.S., Yang D. et al. 2015. Complex genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. V. 524. P. 47.
<https://doi.org/10.1038/nature14664>
- He Z., Wu J., Zeng X., Bao H., Liu X. 2021. Role of the Notch ligands Jagged1 and Delta4 in Th17/Treg immune imbalance in a mouse model of chronic asthma. *Exp. Lung Res*. V. 47. P. 289.
<https://doi.org/10.1080/01902148.2021.1933653>
- Hua S., Liu F., Wang M. 2019. Emodin Alleviates the Airway Inflammation of Cough Variant Asthma in Mice by Regulating the Notch Pathway. *Med. Sci. Monit*. V. 25. P. 5621.
<https://doi.org/10.12659/MSM.915080>
- Huang M.T., Chiu C.J., Chiang B.L. 2019. Multi-Faceted Notch in Allergic Airway Inflammation. *Int. J. Mol. Sci*. V. 20. P. 3508.
<https://doi.org/10.3390/ijms20143508>
- Huang Q., Han L., Lv R., Ling L. 2019. Magnolol exerts anti-asthmatic effects by regulating Janus kinase-signal transduction and activation of transcription and Notch signaling pathways and modulating Th1/Th2/Th17 cytokines in ovalbumin-sensitized asthmatic mice. *Korean J. Physiol. Pharmacol*. V. 23. P. 251.
<https://doi.org/10.4196/kjpp.2019.23.4.251>
- Kared H., Adle-Biasette H., Foïs E., Masson A., Bach J., Chatenoud L. 2006. Jagged2-expressing hematopoietic progenitors promote regulatory T cell expansion in the periphery through notch signaling. *Immunity*. V. 25. 823.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.09.008>
- Katoh M., Katoh M. 2020. Precision medicine for the treatment of human cancer with impaired regulation of Notch signal transmission (review). *Int. J. Mol. Med*. V. 45. P. 279.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4418>
- Kiyokawa H., Morimoto M. 2020. Notch signaling in the mammalian respiratory system, specifically the trachea and lungs, in development, homeostasis, regeneration, and disease. *Dev. Growth Differ*. V. 62. P. 67.
<https://doi.org/10.1111/dgd.12628>
- Lee C.C., Lin C.L., Leu S.J., Lee Y.L. 2018. Overexpression of Notch ligand Delta-like-1 by dendritic cells enhances their immunoregulatory capacity and exerts antiallergic effects on Th2-mediated allergic asthma in mice. *Clin. Immunol*. V. 187. P. 58.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.10.005>
- Leonetti A., Facchinetti F., Minari R., Cortellini A., Rolfo K.D., Giovannetti E., Tiseo M. 2019. The Notch pathway in small cell lung cancer: from preclinical data to therapeutic problems. *Cell. Oncol. (Dordr)*. V. 42. P. 261.
<https://doi.org/10.1007/s13402-019-00441-3>
- Lim J.S., Ibaseta A., Fischer M.M., Cancilla B., O'Young G., Cristea S., Luca V.C., Yang D., Jahchan N.S., Hamard C., Antoine M., Wislez M., Kong C., Cain J., Liu Y.W. et al. 2017. Intratumoural heterogeneity generated by Notch signalling promotes small-cell lung cancer. *Nature*. V. 545. P. 360.
<https://doi.org/10.1038/nature22323>
- Limbourg F.P., Takeshita K., Radtke F., Bronson R.T., Chin M.T., Liao J.K. 2005. Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation*. V. 111. P. 1826.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000160870.93058.DD>
- Lin C.L., Huang H.M., Hsieh C.L., Fan C.K., Lee Y.L. 2019. Jagged1-expressing adenovirus-infected dendritic cells induce expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells and alleviate T helper type 2-mediated allergic asthma in mice. *Immunology*. V. 156. P. 199.
<https://doi.org/10.1111/imm.13021>
- Luo J., Li L., Hu D., Zhang X. 2020. LINC00612/miR-31-5p/Notch1 Axis Regulates Apoptosis, Inflammation, and Oxidative Stress in Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells Induced by Cigarette Smoke Extract. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis*. V. 15. P. 2049.
<https://doi.org/10.2147/COPD.S255696>
- Ma J., Rubin B.K., Voynow J.A. 2018. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest*. V. 154. P. 169.
<https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.11.008>
- Morianos I., Semitekolou M. 2020. Dendritic Cells: Critical Regulators of Allergic Asthma. *Int. J. Mol. Sci*. V. 21. P. 7930.
<https://doi.org/10.3390/ijms21217930>
- Morimoto M., Liu Z., Cheng H.T., Winters N., Bader D., Kopan R. 2010. Canonical Notch signaling in the developing lung is required for determination of arterial smooth muscle cells and selection of Clara versus ciliated cell fate. *J. Cell. Sci*. V. 123. P. 213.
<https://doi.org/10.1242/jcs.058669>
- Motooka Y., Fujino K., Sato Y., Kudoh S., Suzuki M., Ito T. 2017. Pathobiology of Notch2 in lung cancer. *Pathology*. V. 49. P. 486.
<https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.05.005>
- Nie Y., Yang B., Hu J., Zhang L., Ma Z. 2021. Bruceine D ameliorates the balance of Th1/Th2 in a mouse model of ovalbumin-induced allergic asthma via inhibiting the NOTCH pathway. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. V. 49. P. 73.
<https://doi.org/10.15586/aei.v49i6.499>
- Ostedgaard L.S., Moninger T.O., McMenimen J.D., Sawin N.M., Parker C.P., Thornell I.M., Powers L.S., Gansemer N.D., Bouzek D.C., Cook D.P., Meyerholz D.K., Abou Alaiwa M.H., Stoltz D.A., Welsh M.J. 2017. Gel-forming mucins form distinct morphologic structures in airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 114. P. 6842.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1703228114>
- Owen D.H., Giffin M.J., Baylis J.M., Smith M.D., Carbone D.P., On K. 2019. DLL3: a new target in small cell lung cancer. *J. Hematol. Oncol*. V. 12. P. 61.
<https://doi.org/10.1186/s13045-019-0745-2>

- Pancevich-Wojtkiewicz J. 2016. Epidermal growth factor receptor and notch signaling in non-small cell lung cancer. *Cancer Med.* V. 5. P. 3572.
<https://doi.org/10.1002/cam4.944>
- Qin X., Zhang Z., Xu H., Wu Y. 2011. Notch signaling protects retina from nuclear factor- κ B- and poly-ADP-ribose-polymerase-mediated apoptosis under high-glucose stimulation. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* V. 43. P. 703.
<https://doi.org/10.1093/abbs/gmr069>
- Sharif A., Shaji A., Chammaa M., Pawlik E., Fernandez-Valdivia R. Sharif A. et al. 2020. Notch Transduction in Non-Small Cell Lung Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 5691.
<https://doi.org/10.3390/ijms21165691>
- Sinha K., Das J., Pal P.B., Sil P.S. 2013. Oxidative stress: mitochondrial-dependent and mitochondrial-independent pathways of apoptosis. *Arch. Toxicol.* V. 87. P. 1157.
<https://doi.org/10.1007/s00204-013-1034-4>
- Small R. J., Bacmeister J., Bailey D., Baker A., Bishop S., Bryan F., Caron J., Dennis J., Gent P., Hsu H.M., Jochum M., Lawrence D., Muñoz E., diNezio P., Scheitlin T. et al. 2014. A new synoptic scale resolving global climate simulation using the community earth system model. *J. Adv. Model. Earth Syst.* V. 6. P. 1065.
<https://doi.org/10.1002/2014MS000363>
- Sosa Iglesias V., Juranno L., Dubois L.J., Theis J., Voice M. 2018. Drug resistance in non-small cell lung cancer: potential for targeting NOTCH? *Front. Oncol.* V. 8. P. 267.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00267>
- Sparaneo A., Fabrizio F.P., Muscarella L.A. 2016. Transmission of Nrf2 and Notch signals in lung cancer: near the intersection. *Oxid. Med. Cell. Longev.* V. 2016. P. 7316492.
<https://doi.org/10.1155/2016/7316492>
- Tindemans I., van Schoonhoven A., KleinJan A., de Bruijn M.J., Lukkes M., van Nimwegen M., van den Branden A., Bergen I.M., Corneth O.B., van IJcken W.F., Stadhouders R., Hendriks R.W. 2020. Notch signaling licenses allergic airway inflammation by promoting Th2 cell lymph node egress. *J. Clin. Invest.* V. 130. P. 3576.
<https://doi.org/10.1172/JCI128310>
- Tsao P., Wei S., Wu M., Huang M., Lin H., Lee M. 2011. Notch signaling prevents mucous metaplasia in mouse conducting airways during postnatal development. *Development.* V. 138. P. 3533.
<https://doi.org/10.1242/dev.063727>
- Wang Y., Xu J., Meng Y., Adcock I.M., Yao X. 2018. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* V. 13. P. 3341.
<https://doi.org/10.2147/COPD.S176122>
- Whitsett J.A. 2018. Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Ann. Am. Thorac. Soc.* V. 15. P. S143.
<https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201802-128AW>
- Yu L., Li J. 2022. Pinalagin Alleviates Aged Bronchial Asthma by Inhibiting Th2 Differentiation through IL-4/STAT6 and Jagged1/Notch Pathways. *J. Healthc. Eng.* V. 2022. P. 1184677.
<https://doi.org/10.1155/2022/1184677>
- Zeng Z., Wang L., Ma W., Zheng R., Zhang H., Zeng X., Zhang H., Zhang W. 2019. Inhibiting the Notch signaling pathway suppresses Th17-associated airway hyperresponsiveness in obese asthmatic mice. *Lab. Invest.* V. 99. P. 1784.
<https://doi.org/10.1038/s41374-019-0294-x>
- Zhou B., Lin W., Long Y., Yang Y., Zhang H., Wu K., Chu Q. 2022. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct. Target. Ther.* V. 7. P. 95.
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-00934-y>
- Zong D., Ouyang R., Li J., Chen Y., Chen P. 2016. Notch signaling in lung diseases: focus on Notch1 and Notch3. *Ther. Adv. Respir. Dis.* V. 10. P. 468.
<https://doi.org/10.1177/1753465816654873>

The Role of the Notch Signaling Pathway in the Pathogenesis of Lung Diseases of Non-infectious Etiology

V. A. Serebryakova^{a, *}, A. E. Sanina^b, O. I. Urazova^{b, c}, A. A. Gadzhiev^b, and E. P. Stepanova^d

^aPharmacology Department of Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

^bPathophysiology Department of Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

^cTomsk State University of Control Systems and Radioelectronics, Tomsk, 634050 Russia

^dTomsk Phthisiopulmonological Medical Center, Tomsk, 634009 Russia

*e-mail: serebryakova-val@mail.ru

A review of current literature data on the significance of the Notch signaling pathway in the mechanisms of the development of diseases of the respiratory system – chronic obstructive pulmonary disease (COPD), bronchial asthma (BA) and lung cancer is presented. In studies of lung tissue samples of patients with COPD and lung tissues of mice, it was found that activation of the Notch signaling pathway promotes metaplasia and increases the functional activity of goblet cells, protects epithelial cells from apoptosis and oxidative stress. Suppression of the Notch–Jagged1/Jagged2 pathway is associated with the transdifferentiation of club-shaped cells into ciliated ones. In patients with AD, the Notch signaling pathway promotes differentiation of Th2 lymphocytes. In the ovalbumin-induced bronchial asthma model, the Notch cascade increases the imbalance of Th17/Treg lymphocyte populations, the production of IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, the formation of allergen-specific IgE, eosinophilic infiltration and metaplasia of goblet-shaped epithelial cells of the respiratory tract. A decrease in the concentration of IgE, Th2-type cytokines (IL-4, IL-5, IL-13), an increase in the number of Treg cells and the level of TGF β in bronchoalveolar lavage in mice with asthma, mediated by the introduction of dendritic cells expressing the ligands DLL1 and Jagged1, indicates the protective role of the Notch signaling pathway. On samples of tumor tissue and cell lines of non-small cell lung cancer,

it was found that an increase in the expression of Notch-1 and Notch-3 mRNA is associated with increased proliferative activity, malignant cell transformation, a high risk of metastasis to lymph nodes and an unfavorable prognosis of the disease. In the samples of tumor tissue of small cell lung cancer, an increase in the expression of the Notch ligand DLK1 signaling inhibitor gene, the Ascl1 transcription factor gene and lysine-specific histone demethylase 1 (LSD1) was recorded. Suppression of LSD1 activity is accompanied by reactivation of signaling via Notch-1 receptor and subsequent inhibition of the transcription factor Ascl1, which induces the initial stages of tumor transformation.

Keywords: Notch, chronic obstructive pulmonary disease, bronchial asthma, lung cancer

УДК 57.085.23

ПОТЕНЦИАЛ БИОМЕДИЦИНСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННЫХ МАТРИКСОВ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК

© 2023 г. Р. Е. Ушаков*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: uszakow@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.09.2022 г.

После доработки 10.12.2022 г.

Принята к публикации 15.12.2022 г.

Децеллюляризованные внеклеточные матриксы являются перспективным материалом для биоинженерии и регенеративной медицины. В последнее время возрастает интерес к использованию внеклеточного матрикса культивируемых клеток (ВКМ-КК). В представленном небольшом обзоре оцениваются преимущества и недостатки такого подхода, описывается многообразие способов модификации ВКМ-КК, рассматриваются сферы возможного применения ВКМ-КК: в качестве субстрата для культивирования, как основы для создания биосовместимых скаффолдов, как препарата для непосредственного применения в бесклеточной терапии и как модели для исследования заболеваний.

Ключевые слова: децеллюляризованный матрикс, бесклеточный матрикс, бесклеточная терапия, тканевая инженерия, регенеративная медицина

DOI: 10.31857/S004137712301011X, **EDN:** GLGYRX

Многоклеточный организм существует как единое целое благодаря внеклеточному матриксу. ВКМ — это многокомпонентная система, которая, в общих чертах, состоит из трехмерной сети белковых волокон, погруженных в протеогликановый гель. Помимо чисто структурных компонентов, ВКМ содержит белки-регуляторы клеточной активности (“матрицеллюлярные” белки), а также депонированные ростовые факторы и другие сигнальные молекулы. С функциональной точки зрения ВКМ — не просто “цемент”, скрепляющий клетки воедино, это субстрат для адгезии и передвижения клеток, это среда, формирующая надлежащее микроокружение, а также резервуар питательных веществ и источник биологических сигналов, контролирующих жизнедеятельность клетки во всех ее проявлениях — от пролиферации и дифференцировки до гибели; кроме того, ВКМ определяет форму органов и механические характеристики тканей, играет ключевую роль в процессах развития и регенерации, поддерживает тканевый гомеостаз.

В свете современных представлений о функциях ВКМ становится очевидным, что ВКМ — наиболее естественный субстрат для существования и функционирования клеток. Уникальная биологическая

активность и высочайшая биосовместимость ВКМ делают его крайне привлекательным материалом для регенеративной медицины и тканевой инженерии: интенсивное применение ВКМ в биоинженерных разработках (создание искусственных органов и тканей, сосудистых и других протезов) является трендом в исследованиях последних десяти–двадцати лет. ВКМ также успешно используется в клинической практике. В настоящее время известно более 80 зарегистрированных препаратов на основе ВКМ, которые употребляются в ортопедии, стоматологии, а также в реконструктивной и сердечно-сосудистой хирургии (Parmaksiz et al., 2016). К примеру, свою эффективность доказал препарат AlloDerm® (бесклеточный матрикс, выделяемый из кожи человека), использованный уже более миллиона раз для лечения ожогов, ран, рецессий десны, в маммопластике и т.д. (Konofaos et al., 2017). Применение ВКМ открывает новые возможности в медицине: вдохновляющим примером является регенерация мышц и восстановление способности к ходьбе после терапии с использованием ВКМ мочевого пузыря свиньи у пациентов со значительной потерей мышечной ткани (volumetric muscle loss), которым изначально рекомендовалась ампутация (Sicari et al., 2014).

Традиционным источником ВКМ являются децеллюляризованные органы и ткани, т.е. подвергнутые удалению клеточных компонентов с помощью различных физических и химических методов. В последние годы исследователи все чаще обращаются к

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс; ВКМ-КК — ВКМ культивируемых клеток; ИПС — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; МСК — мезенхимные стволовые (стромальные) клетки; ЭСК — эмбриональные стволовые клетки.

альтернативному подходу, в рамках которого источником ВКМ являются культивируемые клетки.

В представленном небольшом обзоре современной литературы мы рассмотрим преимущества и недостатки такого подхода, а также оценим перспективы использования ВКМ-КК.

ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ВКМ-КК

ВКМ-КК обладают следующими преимуществами. Во-первых, ВКМ-КК могут служить *альтернативой ксено- и аллогенному материалу*. Зарегистрированные препараты бесклеточных ВКМ выделяются из тканей животных и человека, и, хотя компоненты ВКМ считаются неиммуногенными в силу своей эволюционной консервативности (Cheng et al., 2014), было показано, что ксено- и аллотрансплантаты ВКМ могут вызывать иммунный ответ и отторжение (Methe, 2020; Massaro et al., 2021). Этих трудностей, а также проблем, связанных с работой с кадаверным материалом (этических, логистических, рисков передачи болезней и др.) можно избежать при использовании ВКМ, полученного с помощью культивирования клеток реципиента. Аналогичным образом материалы на основе ВКМ-КК могут представлять собой *альтернативу аутооттрансплантатам*. Хотя аутооттрансплантаты считаются “золотым стандартом”, например, при замещении костных дефектов, их использование сопряжено с рядом затруднений: с ограниченным объемом донорского материала, осложнениями в месте взятия, предварительной заданностью размеров и формы аутооттрансплантата. Эти проблемы могут быть преодолены, если использовать как основу для создания соответствующих трансплантатов ВКМ, полученный *in vitro* с помощью мезенхимных стволовых (стромальных клеток) (МСК) или остеогенных клеток пациента (Cheng et al., 2014).

Во-вторых, с помощью культивируемых клеток можно получать такие ВКМ, которые *сложно или невозможно выделить из тканей*. К примеру, плотный матрикс хрящевой ткани имеет плохую проницаемость для децеллюляризирующих агентов, чего нельзя сказать о клетках в культуре (Zhu et al., 2021); кроме того, едва ли возможно вычленив из ткани нишу стволовых клеток, однако характерное для ниши микроокружение можно воспроизвести с помощью ВКМ МСК (Assunção et al., 2020). Сравнительная простота децеллюляризации ВКМ-КК также дает возможность использовать более мягкие методы выделения ВКМ — например, без использования детергентов, что гарантирует отсутствие в ВКМ остаточных количеств веществ, которые могут приводить к нежелательным эффектам, а также позволяет сохранить состав ВКМ как можно более интактным (Nellinger et al., 2022).

В-третьих, ВКМ-КК обладает значительным *потенциалом кастомизации*. Если ВКМ органов или

тканей имеет детерминированный состав и структуру, то с помощью культивируемых клеток можно получать ВКМ с желаемыми свойствами для решения определенных задач (рис. 1). При этом может быть использовано все многообразие клеточных линий (как для получения тканеспецифичных ВКМ, так и для выделения ВКМ стволовых клеток), а также их генетическая модификация, например, для оверэкспрессии компонентов ВКМ или матрикс-ассоциированных белков. Так, был создан скаффолд на основе полилактида и децеллюляризованного матрикса клеток карциномы мочевого пузыря (линия 5637), трансфицированного вектором, несущим ген фибронектина; было показано, что полученный скаффолд поддерживает функциональную активность гепатоцитов HepG2 и поэтому потенциально может быть применен в тканевой инженерии печени (Grant et al., 2018). Иммунизация МСК плаценты с помощью трансдукции гена обратной транскриптазы теломеры (hTERT) позволила получить биологически активный ВКМ из клеток, прошедших через большое количество пассажей (Kusuma et al., 2017). В контексте разнообразия типов культивируемых клеток-продуцентов ВКМ интерес также представляют индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПС); было показано, что полученные из ИПС фибробласты демонстрируют повышенную продукцию белков ВКМ по сравнению с исходными дермальными фибробластами до репрограммирования (Shamis et al., 2012).

Для получения ВКМ-КК также может применяться и трехмерное культивирование. Известно, что МСК после агрегации в сфероиды демонстрируют повышенную экспрессию и секрецию паракринных факторов; культивирование сфероидов в присутствии макромолекулярных краудеров, ускоряющих депонирование ВКМ и способствующих аккумуляции секретируемых факторов, и последующая децеллюляризация позволили получить трехмерный скаффолд, способствующий адгезии и пролиферации клеток, а также ангиогенезу *in vivo* (Chiang et al., 2021).

Кроме того, отметим потенциал техники культивирования: с помощью смешанной культуры фибробластов и остеобластов был получен ВКМ, который превосходил матриксы каждой из клеточных линий в отдельности по способности стимулировать остеогенную дифференцировку *in vitro* и поддерживать регенерацию кости *in vivo* (Li et al., 2020). Композицию ВКМ-КК также можно задавать, варьируя условия культивирования (Матвеева, Андреева, 2020); например, использование хондроиндуктивной среды при культивировании МСК позволило выделить ВКМ, воспроизводящий микроокружение на раннем этапе хондрогенеза, и полученный ВКМ был использован для создания гидрогеля, стимулирующего хондрогенез и формирование гиалинового хряща *in vivo* (Antich et al., 2021). Кроме того, в ВКМ-КК можно вводить дополнительные функциональ-

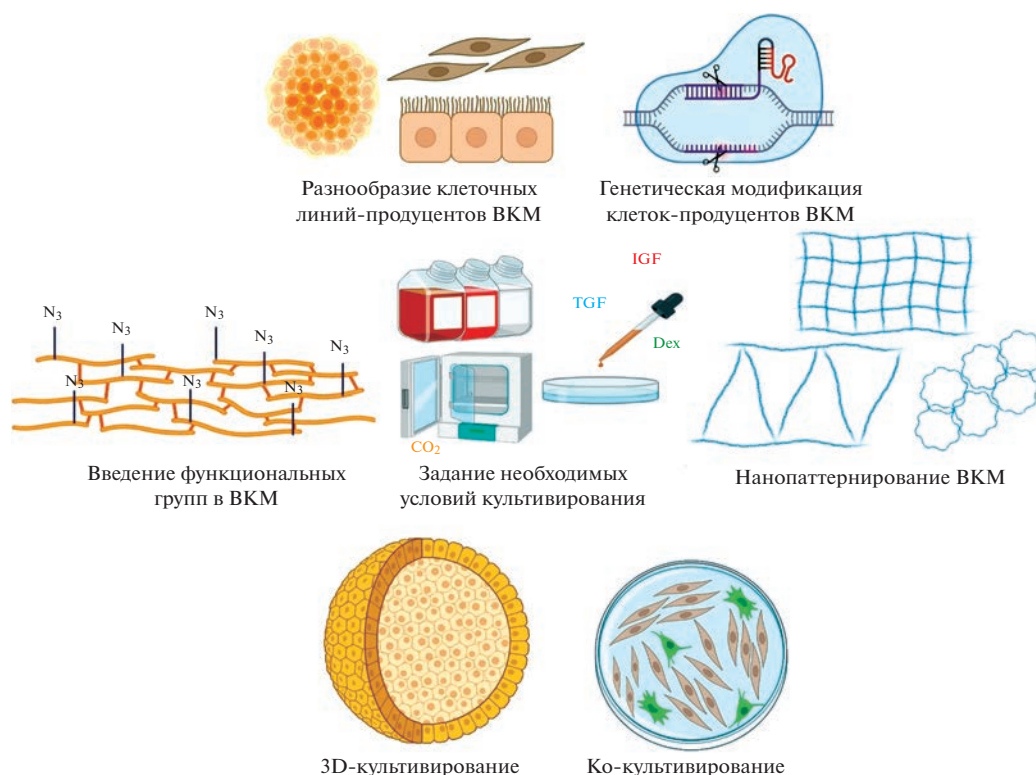


Рис. 1. Потенциал кастомизации внеклеточного матрикса (ВКМ) культивируемых клеток. Создано с помощью BioRender.com

ные группы прямо в процессе культивирования: так, с помощью добавления в ростовую среду модифицированного моносахарида удалось получить ВКМ, содержащий азидные группы; используя высокоспецифичную биоортогональную клик-реакцию азид-алкинового циклоприсоединения, такому ВКМ можно легко придать желаемые свойства путем ковалентного введения сигнальных пептидов, ростовых факторов, антибиотиков или других молекул (Ruff et al., 2017). Еще один подход к кастомизации ВКМ-КК – культивирование клеток-продуцентов ВКМ на подложках с предзаданной топографией; например, было показано, что полученный таким образом нанопаттернированный ВКМ может изменять профиль экспрессии генов посеянных на него клеток и, в том числе, приводить к апрегуляции генов, связанных с хондрогенезом (Ozguldez et al., 2018).

Теперь перечислим недостатки ВКМ-КК. Во-первых, по сравнению с органами и тканями, при децеллюляризации культивируемых клеток получается небольшое количество материала, поэтому разработка ВКМ-КК для биомедицинского применения *нуждается в масштабировании*. Масштабное культивирование влечет за собой ряд трудностей, таких как потребность в соответствующей инфраструктуре (автоматизированное оборудование для культивирования, биобанки), необходимость стан-

дартизации протоколов культивирования, культуральных сред и ростовых добавок, а также самих клеточных линий-продуцентов ВКМ; разумеется, надлежащее оснащение и собственно культивирование требуют и существенных финансовых затрат. Тем не менее, разработка оптимизированной технологии масштабирования теоретически позволила бы нарабатывать ВКМ желаемой композиции в неограниченных количествах (Chan et al., 2021). Заметим также, что в литературе описаны подходы к стимуляции депонирования ВКМ-КК – среди них культивирование в условиях гипоксии (Gilkes et al., 2013; Du et al., 2017), использование краудинг-агентов (Marinkovic et al., 2021) и ингибиторов матриксных металлопротеиназ (Han et al., 2016).

Во-вторых, ВКМ-КК *уступают ВКМ нативных тканей по своим физико-механическим характеристикам*. Среди возможных способов преодоления этого недостатка можно упомянуть введение швов в структуру ВКМ-КК (Nyambat et al., 2020), а также создание композитных материалов, в которых необходимые деформационно-прочностные параметры воспроизводятся синтетическими полимерами, а специфически биологические свойства задаются ВКМ культивируемых клеток. Так, поликапролактоновый скаффолд был модифицирован ВКМ кокультивируемых МСК и эндотелия пупочной вены; получившийся композит не потерял своих механи-

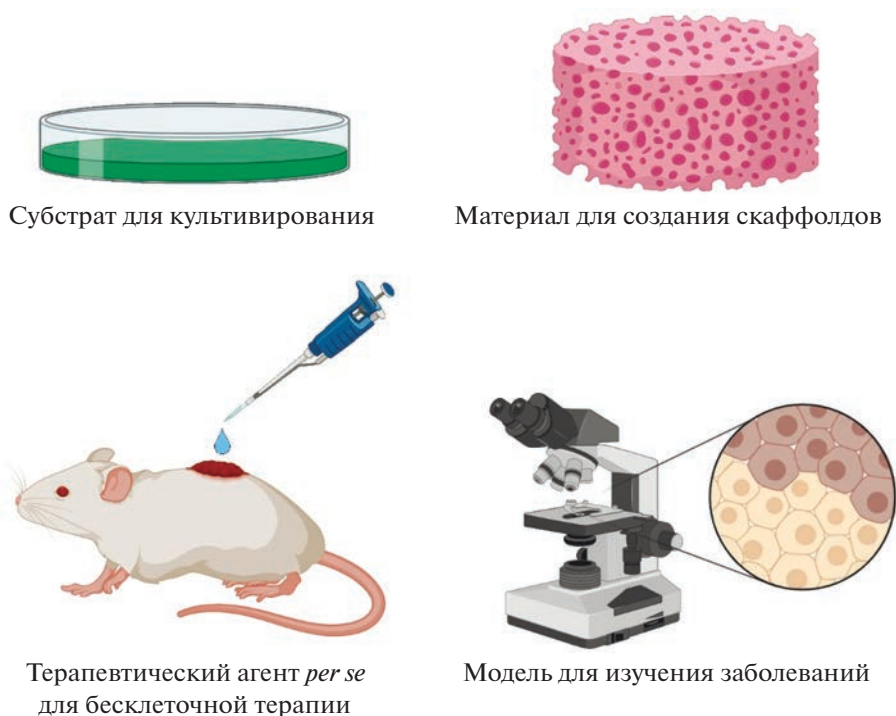


Рис. 2. Сферы возможного применения ВКМ культивируемых клеток. Создано с помощью BioRender.com.

ческих свойств и был способен поддерживать пролиферацию и остеогенную дифференцировку засеянных в него клеток (Carvalho et al., 2019).

ПОТЕНЦИАЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВКМ-КК

Дадим характеристику основным направлениям биомедицинского приложения ВКМ-КК.

Субстрат для культивирования. Очевидно, что стандартное культивирование на пластике не является в полной мере физиологически релевантным. ВКМ *in vivo* оказывает существенное влияние на клеточную физиологию, поскольку он имеет оптимальную жесткость, определяет полярность и морфологические особенности клеток, формирует специфическое микроокружение. Лишенные естественных условий, клетки в культуре демонстрируют хромосомную нестабильность, утрачивают дифференцировочный потенциал и претерпевают преждевременное старение. Эти проблемы актуальны, прежде всего, при наработке большого количества клеток для терапевтического применения, когда клетки в течение длительного времени проводятся через серию пассажей. По сравнению с пластиком, ВКМ-КК представляется более физиологичным субстратом для культивирования. В ряде работ было показано, что культивирование на ВКМ-КК стимулирует пролиферацию и миграцию (Lin et al., 2012) и вызывает апрегуляцию соответствующих генов (Ragelle et al., 2017), поддерживает стволовость (Lai et al., 2010), способствует дифференцировке в различных направлени-

ях (Rao Patabhi et al., 2014; Novoseletskaya et al., 2020) и приводит к омоложению культивируемых клеток (Choi et al., 2011; Joergensen, Rattan, 2014; Yu et al., 2019). Кроме того, ВКМ-КК может применяться как субстрат для бесфидерного культивирования ИПС и ЭСК. Собственно говоря, широко используемый в этих целях коммерческий субстрат Матригель представляет собой ВКМ мышинной саркомы; вместе с тем было показано, что в качестве субстрата для ИПС могут использоваться децеллюляризованные матриксы и других клеточных культур, таких как линия человеческой хориосаркомы и МСК пульпы зуба (Vuoristo et al., 2013; Chen et al., 2015).

Использование в тканевой инженерии и регенеративной медицине. В ряде исследований показано, что ВКМ-КК является перспективным материалом для инженерии костей (Cheng et al., 2014; Li et al., 2020; Junka, Yu, 2020; He et al., 2021), хрящей (Dikina et al., 2017; Tang et al., 2019; Zhu et al., 2021; Antich et al., 2021) и скелетных мышц (Zhang et al., 2020), причем в качестве источника ВКМ для этих нужд зачастую используются МСК. ВКМ фибробластов был применен для создания композитных тканеинженерных трансплантатов сосудов (L'Heureux et al., 2006), сердечных клапанов (Weber et al., 2013) и скаффолда для постинфарктной клеточной терапии (Kim et al., 2019). Изучается возможность употребления ВКМ-КК в регенеративной эндодонтии (Aksel et al., 2022).

ВКМ-КК может использоваться не только как основа для скаффолдов, служащих для доставки культивируемых клеток в организм пациента, но и

как терапевтическое средство *per se*, стимулирующее репаративные процессы за счет активации эндогенных клеток. Протеомный анализ матриксов клеточных культур показал, что они содержат белки, вовлеченные в регуляцию иммунных процессов, пролиферации, дифференцировки, миграции, адгезии и ангиогенеза (Ragelle et al., 2017; Li et al., 2020), и терапевтический эффект апплицированного к поврежденной ткани ВКМ, по всей видимости, связан с его деградацией в месте повреждения и высвобождением его биоактивных компонентов (Lee et al., 2019). В этом контексте, применение ВКМ-КК можно считать разновидностью бесклеточной терапии (cell-free therapy). Так, было продемонстрировано, что ВКМ астроцитов и нейтральных стволовых клеток может стимулировать регенерацию спинного мозга и препятствовать воспалению при его травмах (Thompson et al., 2018; Chen et al., 2022); ВКМ культивируемых шванновских клеток был применен для восстановления поврежденных нервов (Gu et al., 2014); было показано, что ВКМ стволовых клеток жировой ткани и МСК костного мозга обладают ранозаживляющими свойствами (Du et al., 2017; Lee et al., 2019); был запатентован скаффолд на основе ВКМ сердечных фибробластов для лечения ишемической болезни сердца, который может применяться и как средство для трансплантации клеток, и как самостоятельный терапевтический агент (Schmuck, Raval, 2016). В нашей стране разработан и запатентован способ получения бесклеточного матрикса на основе децеллюляризованных клеточных пластов МСК жировой ткани, предназначенного для стимуляции регенеративных процессов (Нимирицкий и др., 2016; Ткачук и др., 2020).

Модель для исследования заболеваний. Известно, что при целом ряде патологических состояний (нейродегенеративные и онкологические заболевания, остеоартрит, фиброз и др.) имеет место аномальное ремоделирование ВКМ, включающее в себя количественные и качественные изменения состава ВКМ, перестройку нативной архитектуры ткани, нарушение динамического равновесия между деградацией и синтезом ВКМ, изменение жесткости ВКМ (Sonbol, 2018; Theocharis et al., 2019). Поскольку ВКМ всесторонним образом контролирует клеточные функции, аномальное ремоделирование нарушает функциональность тканей и усугубляет течение болезни. Таким образом, установление роли ВКМ в патогенетических механизмах тех или иных заболеваний может послужить основой для разработки новых способов диагностики или поиска терапевтических мишеней (Rubi-Sans et al., 2020). В этой связи, например, большой интерес представляет ВКМ как компонент опухолевой ниши, способствующий прогрессии опухоли и метастазированию (Xiong, Xu, 2016). В качестве модели для изучения опухолевого микроокружения наряду с ВКМ злокачественных тканей используют и ВКМ, синтезированный линиями опухолевых клеток; хотя ВКМ-КК не может в пол-

ной мере воспроизвести микроокружение опухолевой ткани, это методологически удобная, масштабируемая модель для *in vitro* исследований (Hoshiba, 2019). Помимо двухмерных моделей опухолевой ниши также ведутся разработки трехмерных искусственных опухолей на основе ВКМ-КК (Malakpour-Permlid et al., 2021); так, с помощью полилактидного скаффолда, модифицированного ВКМ МСК жировой ткани, была создана макроскопическая (более сантиметра) трехмерная модель опухоли, схожая по фибриллярной структуре и механическим характеристикам с опухолевой тканью и повышающая устойчивость заселенных опухолевых клеток к доксорубину (Rubi-Sans et al., 2021). ВКМ-КК, а именно ВКМ клеток трабекулярной сети (НТМС), также используется для изучения роли ВКМ в развитии глаукомы (Raghunathan, 2018). Децеллюляризованным матриксом фибробластов удалось модифицировать микрофлюидное устройство (Hong et al., 2017), и такой подход в перспективе может быть использован в создании “органов-на-чипе” для учета микроокружения, создаваемого внеклеточным матриксом, при моделировании заболеваний или скрининге лекарственных соединений (в том числе персонализированном).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Культивируемые клетки представляются привлекательной альтернативой органам и тканям — традиционным источникам ВКМ. Основным преимуществом ВКМ-КК является возможность задания свойств ВКМ в контролируемых условиях, причем конструирование ВКМ может опираться не только на богатый опыт клеточной биологии, но и на достижения из других дисциплин. Публикации последних лет демонстрируют, что ВКМ-КК потенциально могут быть применены для решения широкого спектра биомедицинских задач. Тем не менее, связанные с ВКМ-КК исследования пока что проводятся только на клеточных и животных моделях. По всей видимости, переход к клиническим испытаниям сдерживается малым выходом ВКМ, получаемого из культивируемых клеток, и трансляция ВКМ-КК в клинику потребует решения соответствующей задачи масштабирования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 22-74-10126).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ ПРАВИЛ

Автор не проводил исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Матвеева Д.К., Андреева Е.Р. 2020. Регуляторная активность децеллюляризованного матрикса мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. Цитология. Т. 62. № 10. С. 699. (Matveeva D.K., Andreeva E.R. 2020. Regulatory Activity of Decellularized Matrix of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. Tsitologia. V. 62. № 10. P. 699.) <https://doi.org/10.31857/S004137712010003X>
- Нимирицкий П.П., Дусь Т.А., Григорьева О.А., Сагарадзе Г.Д., Ефименко А.Ю., Макаревич П.И. 2016. Клеточные пласты из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека и получение препаратов внеклеточного матрикса методом децеллюляризации. Технологии живых систем. Т. 13. № 6. С. 4. (Nimiritskiy P.P., Dus' T.A., Grigor'eva O.A., Sagaradze G.D., Efimenko A.Yu., Makarevich P.I. 2016. Cell sheets from human adipose tissue mesenchymal stromal cells and derivation of decellularized native extracellular matrix components. Tekhnologii zhivyykh sistem = Technologies of living systems. V. 13. № 6. P. 4.)
- Ткачук В.А., Акопян Ж.А., Ефименко А.Ю., Григорьева О.А., Макаревич П.И., Нимирицкий П.П., Новоселецкая Е.С. 2020. Пат. 2718907C1 Российская Федерация, МПК A61K35/28 C12N5/775. Биоматериал на основе бесклеточного матрикса, производимого мезенхимными стромальными клетками человека, способ его получения и способ применения для стимуляции регенеративных процессов / заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ). № 2018143484; заявл. 07.12.2018; опублик. 15.04.2020, Бюл. № 11. (Tkachuk V.A., Akopyan Zh.A., Efimenko A.Yu., Grigoreva O.A., Makarevich P.I., Nimiritskiy P.P., Novoseletskaia E.S. 2020. Invention 2718907C1 Russian Federation, Int. Cl. A61K35/28 C12N5/775. Biomaterial based on cell-free matrix produced by human mesenchymal stromal cells, method for preparing thereof and method of using thereof to stimulate regenerative processes. / proprietor FGBOU VO "Moskovskij gosudarstvennyj universitet imeni M.V. Lomonosova" (MGU) № 2018143484; date of filing 07.12.2018; date of publication 15.04.2020, Bull. № 11.)
- Aksel H., Sarkar D., Lin M.H., Buck A., Huang G.T. 2022. Cell-derived Extracellular Matrix Proteins in Colloidal Microgel as a Self-Assembly Hydrogel for Regenerative Endodontics. J. Endod. V. 48. P. 527. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2022.01.011>
- Antich C., Jiménez G., de Vicente J., López-Ruiz E., Chocarro-Wrona C., Griñán-Lisón C., Carrillo E., Montañez E., Marchal J.A. 2021. Development of a biomimetic hydrogel based on predifferentiated mesenchymal stem-cell-derived ECM for cartilage tissue engineering. Adv. Healthc. Mater. V. 10. P. e2001847. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001847>
- Assunção M., Dehghan-Baniani D., Yiu C.H.K., Später T., Beyer S., Blocki A. 2020. Cell-derived extracellular matrix for tissue engineering and regenerative medicine. Front. Bioeng. Biotechnol. V. 8. P. 602009. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.602009>
- Carvalho M.S., Silva J.C., Udangawa R. N., Cabral J.M.S., Ferreira F.C., da Silva C.L., Linhardt R.J., Vashishth D. 2019. Co-culture cell-derived extracellular matrix loaded electrospun microfibrous scaffolds for bone tissue engineering. Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. V. 99. P. 479. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.127>
- Chan W.W., Yu F., Le Q.B., Chen S., Yee M., Choudhury D. 2021. Towards Biomanufacturing of cell-derived matrices. Int. J. Mol. Sci. V. 22. P. 11929. <https://doi.org/10.3390/ijms222111929>
- Chen Y., Zheng Y.L., Qiu D.B., Sun Y.P., Kuang S.J., Xu Y., He F., Gong Y.H., Zhang Z. G. 2015. An extracellular matrix culture system for induced pluripotent stem cells derived from human dental pulp cells. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. V. 19. P. 4035.
- Chen Z., Wang L., Chen C., Sun J., Luo J., Cui W., Zhu C., Zhou X., Liu X., Yang H., Shi Q. 2022. NSC-derived extracellular matrix-modified GelMA hydrogel fibrous scaffolds for spinal cord injury repair. NPG Asia Mater. V. 14. P. 20. <https://doi.org/10.1038/s41427-022-00368-6>
- Cheng C.W., Solorio L.D., Alsberg E. 2014. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. Biotechnol. Adv. V. 32. P. 462. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.012>
- Chiang C.-E., Fang Y.-Q., Ho C.-T., Assunção M., Lin S.-J., Wang Y.-C., Blocki A., Huang C.-C. 2021. Bioactive Decellularized Extracellular Matrix Derived from 3D Stem Cell Spheroids under Macromolecular Crowding Serves as a Scaffold for Tissue Engineering. Adv. Healthcare Mater. V. 10. P. 2100024. <https://doi.org/10.1002/adhm.202100024>
- Choi H.R., Cho K.A., Kang H.T., Lee J.B., Kaerberlein M., Suh Y., Chung I.K., Park S.C. 2011. Restoration of senescent human diploid fibroblasts by modulation of the extracellular matrix. Aging Cell. V. 10. P. 148. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00654.x>
- Dikina A.D., Almeida H.V., Cao M., Kelly D.J., Alsberg E. 2017. Scaffolds derived from ECM produced by chondrogenically induced human MSC condensates support human MSC chondrogenesis. ACS Biomater. Sci. Eng. V. 3. P. 1426. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00654>
- Du H.-C., Jiang L., Geng W.-X., Li J., Zhang R., Dang J.-G., Shu M.-G., Li L.-W. 2017. Evaluation of xenogeneic extracellular matrix fabricated from CuCl₂-conditioned mesenchymal stem cell sheets as a bioactive wound dressing material. J. Biomater. Appl. V. 32(4). P. 472. <https://doi.org/10.1177/0885328217731951>
- Gilkes D.M., Bajpai S., Chaturvedi P., Wirtz D., Semenza G.L. 2013. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. J. Biol. Chem. V. 288. P. 10819. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.442939>

- Grant R., Hay D., Callanan A. 2018. From scaffold to structure: the synthetic production of cell derived extracellular matrix for liver tissue engineering. *Biomed. Phys. Eng. Express*. V. 4. P. 065015.
<https://doi.org/10.1088/2057-1976/aacbe1>
- Gu Y., Zhu J., Xue C., Li Z., Ding F., Yang Y., Gu X. 2014. Chitosan/silk fibroin-based, Schwann cell-derived extracellular matrix-modified scaffolds for bridging rat sciatic nerve gaps. *Biomaterials*. V. 35. P. 2253.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.087>
- Han S., Li Y.Y., Chan B.P. 2016. Extracellular protease inhibition alters the phenotype of chondrogenically differentiating human mesenchymal stem cells (MSCs) in 3D collagen microspheres. *PLoS One*. V. 11. P. e0146928.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146928>
- He S.K., Ning L.J., Yao X., Hu R.N., Cui J., Zhang Y., Ding W., Luo J.C., Qin T.W. 2021. Hierarchically demineralized cortical bone combined with stem cell-derived extracellular matrix for regeneration of the tendon-bone interface. *Am. J. Sports Med.* V. 49. P. 1323.
<https://doi.org/10.1177/0363546521994511>
- Hong Y., Koh I., Park K., Kim P. 2017. On-Chip fabrication of a cell-derived extracellular matrix sheet. *ACS Biomater. Sci. Eng.* V. 3. P. 3546.
<https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.7b00613>
- Hoshiba T. 2019. Decellularized extracellular matrix for cancer research. *Materials (Basel)*. V. 12. P. 1311.
<https://doi.org/10.3390/ma12081311>
- Joergensen P., Rattan S.I.S. 2014. Extracellular matrix modulates morphology, growth, oxidative stress response and functionality of human skin fibroblasts during aging in vitro. *J. Aging Sci.* V. 2. P. 122.
<https://doi.org/10.4172/2329-8847.1000122>
- Junka R., Yu X. 2020. Polymeric nanofibrous scaffolds laden with cell-derived extracellular matrix for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* V. 113. P. 110981.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110981>
- Kim I.G., Hwang M.P., Park J.S., Kim S.H., Kim J.H., Kang H.J., Subbiah R., Ko U.H., Shin J.H., Kim C.H., Choi D., Park K. 2019. Stretchable ECM patch enhances stem cell delivery for post-MI cardiovascular repair. *Adv. Healthc. Mater.* V. 8. P. e1900593.
<https://doi.org/10.1002/adhm.201900593>
- Konofaos P., Szpalski C., Rogers G.F., Rae M.M., Bumgardner J., Warren S.M. 2017. Biomaterials and their application in craniomaxillofacial surgery. *Comprehensive Biomat.* II. V. 7. P. 406.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10166-3>
- Kusuma G.D., Brennecke S.P., O'Connor A.J., Kalionis B., Heath D.E. 2017. Decellularized extracellular matrices produced from immortal cell lines derived from different parts of the placenta support primary mesenchymal stem cell expansion. *PLoS One*. V. 12(2). P. e0171488.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171488>
- Lai Y., Sun Y., Skinner C.M., Son E.L., Lu Z., Tuan R.S., Jilka R.L., Ling J., Chen X.D. 2010. Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix ex vivo: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* V. 19. P. 1095.
<https://doi.org/10.1089/scd.2009.0217>
- Lee Y.J., Baek S.E., Lee S., Cho Y.W., Jeong Y.J., Kim K.J., Jun Y.J., Rhie J.W. 2019. Wound-healing effect of adipose stem cell-derived extracellular matrix sheet on full-thickness skin defect rat model: histological and immunohistochemical study [published correction appears in *Int. Wound J.* 2019. V. 16. P. 873]. *Int. Wound J.* V. 16. P. 286.
<https://doi.org/10.1111/iwj.13030>
- L'Heureux N., Dusserre N., Konig G., Victor B., Keire P., Wight T.N., Chronos N.A., Kyles A.E., Gregory C.R., Hoyt G., Robbins R.C., McAllister T.N. 2006. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat. Med.* V. 12. P. 361.
<https://doi.org/10.1038/nm1364>
- Li M., Zhang A., Li J., Zhou J., Zheng Y., Zhang C., Xia D., Mao H., Zhao J. 2020. Osteoblast/fibroblast coculture derived bioactive ECM with unique matrisome profile facilitates bone regeneration. *Bioact. Mater.* V. 5. P. 938.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.06.017>
- Lin H., Yang G., Tan J., Tuan R.S. 2012. Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential. *Biomaterials*. V. 33. P. 4480.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.012>
- Malakpour-Permlid A., Buzzi I., Hegardt C., Johansson F., Oredsson S. 2021. Identification of extracellular matrix proteins secreted by human dermal fibroblasts cultured in 3D electrospun scaffolds. *Sci. Rep.* V. 11. P. 6655.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-85742-0>
- Marinkovic M., Sridharan R., Santarella F., Smith A., Garlick J.A., Kearney C.J. 2021. Optimization of extracellular matrix production from human induced pluripotent stem cell-derived fibroblasts for scaffold fabrication for application in wound healing. *J. Biomed. Mater. Res. A*. V. 109. P. 1803.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.37173>
- Massaro M.S., Pálek R., Rosendorf J., Červenková L., Liška V., Moulisová V. 2021. Decellularized xenogeneic scaffolds in transplantation and tissue engineering: Immunogenicity versus positive cell stimulation. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* V. 127. P. 112203.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112203>
- Methe K. 2020. Transplantation of normal and decellularized syngeneic, allogeneic and xenogeneic cardiac tissue in mice and non-human primates. Doctoral thesis. University of Gothenburg. Sahlgrenska Academy.
- Nellinger S., Mrcic I., Keller S., Heine S., Southan A., Bach M., Volz A.C., Chassé T., Kluger P.J. 2022. Cell-derived and enzyme-based decellularized extracellular matrix exhibit compositional and structural differences that are relevant for its use as a biomaterial. *Biotechnol. Bioeng.* V. 119. P. 1142.
<https://doi.org/10.1002/bit.28047>
- Novoseletskaya E., Grigorieva O., Nimiritsky P., Basalova N., Er-emichev R., Milovskaya I., Kulebyakin K., Kulebyakina M., Rodionov S., Omelyanenko N., Efimenko A. 2020. Mesenchymal stromal cell-produced components of extracellular

- matrix potentiate multipotent stem cell response to differentiation stimuli. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8. P. 555378. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.555378>
- Nyambat B., Manga Y.B., Chen C.H., Gankhuyag U., Pratomwong A., Kumar Satapathy M., Chuang E.Y. 2020. New insight into natural extracellular matrix: genipin cross-linked adipose-derived stem cell extracellular matrix gel for tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 4864. <https://doi.org/10.3390/ijms21144864>
- Ozgulmez H.O., Cha J., Hong Y., Koh I., Kim P. 2018. Nanoe-engineered, cell-derived extracellular matrix influences ECM-related gene expression of mesenchymal stem cells. *Biomater. Res.* V. 22. P. 32. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0141-y>
- Parmaksiz M., Dogan A., Odabas S., Elçin A.E., Elçin Y.M. 2016. Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomater. Mater.* V. 11. P. 022003. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/2/022003>
- Ragelle H., Naba A., Larson B.L., Zhou F., Purić M., Whittaker C.A., Del Rosario A., Langer R., Hynes R.O., Anderson D.G. 2017. Comprehensive proteomic characterization of stem cell-derived extracellular matrices. *Biomaterials.* V. 128. P. 147. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.008>
- Raghunathan V.K. 2018. Cell-derived matrices as a model to study ocular hypertension. In: *Glaucoma Research and Clinical Advances: 2018 to 2020*. Amsterdam: Kugler Publications. P. 69.
- Rao Pattabhi S., Martinez J.S., Keller T.C. 3rd. 2014. Decellularized ECM effects on human mesenchymal stem cell stemness and differentiation. *Differentiation.* V. 88. P. 131. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2014.12.005>
- Rubi-Sans G., Castaño O., Cano I., Mateos-Timoneda M.A., Perez-Amodio S., Engel E. 2020. Engineering cell-derived matrices: from 3D models to advanced personalized therapies. *Adv. Funct. Mater.* V. 30. P. 2000496. <https://doi.org/10.1002/adfm.202000496>
- Rubi-Sans G., Nyga A., Rebollo E., Pérez-Amodio S., Otero J., Navajas D., Mateos-Timoneda M.A., Engel E. 2021. Development of cell-derived matrices for three-dimensional in vitro cancer cell Models. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* V. 13. P. 44108. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c13630>
- Ruff S.M., Keller S., Wieland D.E., Wittmann V., Tovar G.E.M., Bach M., Kluge P.J. 2017. clickECM: Development of a cell-derived extracellular matrix with azide functionalities. *Acta Biomater.* V. 52. P. 159. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.12.022>
- Schmuck E., Raval A. 2016. Cardiac fibroblast-derived extracellular matrix and injectable formulations thereof for treatment of ischemic disease or injury. *Int. Publ. Number WO2016197038A1*
- Shamis Y., Hewitt K.J., Bear S.E., Alt-Holland A., Qari H., Margvelashvili M., Knight E.B., Smith A., Garlick J.A. 2012. iP-SC-derived fibroblasts demonstrate augmented production and assembly of extracellular matrix proteins. *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.* V. 48. P. 112. <https://doi.org/10.1007/s11626-011-9478-4>
- Sicari B.M., Rubin J.P., Dearth C.L., Wolf M.T., Ambrosio F., Boninger M., Turner N.J., Weber D.J., Simpson T.W., Wyse A., Brown E.H.P., Dziki J.L., Fisher L.E., Brown S., Badylak S.F. 2014. An acellular biologic scaffold promotes skeletal muscle formation in mice and humans with volumetric muscle loss. *Sci. Transl. Med.* V. 6. P. 234ra58. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008085>
- Sonbol H.S. 2018. Extracellular matrix remodeling in human disease. *J. Microsc. Ultrastruct.* V. 6. P. 123. https://doi.org/10.4103/JMAU.JMAU_4_18
- Tang C., Jin C., Li X., Li J., Du X., Yan C., Lu S., Wei B., Xu Y., Wang L. 2019. Evaluation of an autologous bone mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix scaffold in a rabbit and minipig model of cartilage repair. *Med. Sci. Monit.* V. 25. P. 7342. <https://doi.org/10.12659/MSM.916481>
- Theocharis A.D., Manou D., Karamanos N.K. 2019. The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J.* V. 286. P. 2830. <https://doi.org/10.1111/febs.14818>
- Thompson R.E., Pardieck J., Smith L., Kenny P., Crawford L., Shoichet M., Sakiyama-Elbert S. 2018. Effect of hyaluronic acid hydrogels containing astrocyte-derived extracellular matrix and/or V2a interneurons on histologic outcomes following spinal cord injury. *Biomaterials.* V. 162. P. 208. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.02.013>
- Vuoristo S., Toivonen S., Weltner J., Mikkola M., Ustinov J., Trokovic R., Palgi J., Lund R., Tuuri T., Otonkoski T. 2013. A novel feeder-free culture system for human pluripotent stem cell culture and induced pluripotent stem cell derivation. *PLoS One.* V. 8. P. e76205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076205>
- Weber B., Dijkman P.E., Scherman J., Sanders B., Emmert M.Y., Grünenfelder J., Verbeek R., Bracher M., Black M., Franz T., Kortsmi J., Modregger P., Peter S., Stamparoni M., Robert J. et al. 2013. Off-the-shelf human decellularized tissue-engineered heart valves in a non-human primate model. *Biomaterials.* V. 34. P. 7269. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.059>
- Xiong G.F., Xu R. 2016. Function of cancer cell-derived extracellular matrix in tumor progression. *J. Cancer Metastasis Treat.* V. 2. P. 357. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2016.08>
- Yu X., He Y., Chen Z., Qian Y., Wang J., Ji Z., Tan X., Li L., Lin M. 2019. Autologous decellularized extracellular matrix protects against H₂O₂-induced senescence and aging in adipose-derived stem cells and stimulates proliferation *in vitro*. *Biosci. Rep.* V. 39. P. BSR20182137. <https://doi.org/10.1042/BSR20182137>
- Zhang X., Liu Y., Clark K.L., Padgett A.M., Alexander P.G., Dai J., Zhu W., Lin H. 2020. Mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix (mECM): a bioactive and versatile scaffold for musculoskeletal tissue engineering. *Biomed. Mater.* V. 16. P. 012002. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/abb6b3>
- Zhu W., Cao L., Song C., Pang Z., Jiang H., Guo C. 2021. Cell-derived decellularized extracellular matrix scaffolds for articular cartilage repair. *Int. J. Artif. Organs.* V. 44. P. 269. <https://doi.org/10.1177/0391398820953866>

The Potential of Decellularized Cell-Derived Matrices for Biomedical Applications

R. E. Ushakov*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia

**e-mail: uszakow@yandex.ru*

Decellularized extracellular matrices show a great promise as materials for tissue engineering and regenerative medicine. Recently, there has been an increasing interest in the use of cell-derived extracellular matrices (CD-ECMs). The present mini-review focuses on advantages and disadvantages of the CD-ECMs, describes the variety of approaches to modify the CD-ECMs and discusses the CD-ECMs application fields. In particular, CD-ECMs were shown to serve as cell culture substrate, as base for biocompatible scaffold production, as drug for cell-free therapy and as component of disease models.

Keywords: decellularized matrix, cell-free matrix, cell-free therapy, tissue engineering, regenerative medicine

УДК 57.085.23

ОСТЕОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ОСТЕОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* АССОЦИИРОВАНА СО СЛАБЫМ ИЗМЕНЕНИЕМ ИХ ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ

© 2023 г. И. А. Хворова¹, Д. А. Костина¹, Б. Р. Зайнуллина², Е. А. Фефилова¹, Е. С. Громова¹, Р. М. Тихилов³, С. А. Божкова³, А. П. Середа³, В. В. Карелкин³, А. Б. Малашичева¹, А. А. Лобов¹, *

¹Лаборатория регенеративной биомедицины, Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Ресурсный центр “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Научного парка СПбГУ, Санкт-Петербург, 199034 Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, 195427 Россия

*E-mail: lobov@incras.ru

Поступила в редакцию 25.05.2022 г.

После доработки 02.07.2022 г.

Принята к публикации 03.07.2022 г.

Заживление переломов представляет собой сложный процесс, при котором основными источниками клеток-предшественников остеобластов становятся надкостница и эндост. Однако клеточные механизмы и сигнальные каскады, лежащие в основе начальных стадий дифференцировки предшественников остеобластов во взрослой кости, до сих пор недостаточно изучены. Поэтому мы провели протеомный анализ первичной культуры изолированных остеобластов человека из бедренной кости взрослых доноров в недифференцированных условиях и на пятый день остеогенной дифференцировки *in vitro*. Это ранняя временная точка, при которой еще не наблюдается минерализация внеклеточного матрикса. В протеомный анализ были включены 1612 белков, идентифицированных как минимум по двум пептидами. Данные доступны через ProteomeXchange с идентификатором PXD033697. Несмотря на то, что минерализация матрикса начинается только после индукции остеогенной дифференцировки, мы выявили неожиданно слабый физиологический сдвиг, связанный со снижением пролиферативной активности клеток и изменением белков, участвующих в секреции и организации внеклеточного матрикса. Мы показали, что при культивировании в стандартных условиях в остеобластах выявляются маркеры поздних стадий остеогенной дифференцировки, в том числе BMP-2/4, остеокальцин, остеопонтин и RUNX2. Следовательно, дальнейшая дифференцировка, необходимая для минерализации матрикса, требует минимальных физиологических изменений.

Ключевые слова: остеобласты, остеогенная дифференцировка, протеомика дробовика, кость, масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S0041377123010066, **EDN:** GPCARC

Остеобласты представляют собой специализированные мезенхимные клетки, ответственные за продукцию костного внеклеточного матрикса и его минерализацию. *In vivo* остеогенная дифференцировка происходит, главным образом, во время формирования кости путем эндохондральной или внутримем-

бранозной оссификации. В начале обоих процессов мезенхимные клетки начинают уплотняться. При внутримембранозной оссификации мезенхимные клетки непосредственно дифференцируются в остеобласты, начинают продуцировать остеоид (костный ВКМ) и формируют центр окостенения. При эндохондральной оссификации, наоборот, происходит хондрогенная дифференцировка уплотненных мезенхимных клеток, что приводит к образованию надхрящницы. Затем хондроциты в области диафиза гипертрофируются и продуцируют факторы роста эндотелия сосудов, привлекающие сосуды. Наконец, мезенхимные клетки и гипертрофированные хондроциты подвергаются остеогенной дифференцировке (Lobov, Malashicheva, 2022).

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс, ВЭЖХ-МС-МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием; МСК — мезенхимные стволовые клетки, УВЖХ — ультра высокоэффективная жидкостная хроматография; FDR — частота ложного обнаружения; PCA — метод главных компонент; ФСБ — фосфатно-солевой буферный раствор; sPLS-DA — разреженный дискриминантный анализ на основе частных наименьших квадратов; ФБС — фетальная бычья сыворотка.

Во взрослом организме аналогичные процессы могут происходить при заживлении переломов костей. В отличие от формирования кости, основным источником клеток-предшественников остеобластов для заживления переломов становятся надкостница и эндост. Мезенхимные стволовые клетки костного мозга также участвуют в этом процессе, но не в качестве основного источника клеток для остеобластов. Их основная функция заключается в секреции цитокинов и хемокинов, которые способствуют остеогенной или хондрогенной дифференцировке (Bragdon, Bahney, 2018; Matthews et al., 2021). Процесс заживления кости зависит от механических воздействий и стабильности микроокружения. Поэтому клетки-предшественники дифференцируются в остеобласты преимущественно вдоль эндостальной и периостальной поверхностей и способствуют заживлению перелома за счет внутримембранного сращения кости. В щели перелома подвижность выше, поэтому периостальные клетки-предшественники дифференцируются в хондроциты, образуя мягкую хрящевую мозоль, которая соединяет концы сломанной кости (Bahney et al., 2019). Далее по мере заживления перелома хондроциты трансформируются в остеобласты, которые участвуют в окончательном восстановлении кости.

В то время как остеогенная дифференцировка в зрелой кости обычно происходит от других клеток-предшественников, большинство экспериментов по остеогенной дифференцировке *in vitro* проводились на модели МСК (Lobov, Malashicheva, 2022). *In vitro* остеогенная дифференцировка МСК происходит в три этапа: пролиферация, созревание ВКМ и минерализация ВКМ (Pitkänen, 2020).

В отличие от МСК, предшественники остеобластов могут иметь относительно высокие уровни экспрессии остеокальцина, щелочной фосфатазы и коллагена I типа, поскольку они проходят через остеогенную дифференцировку. Тем не менее, предшественники остеобластов все еще способны пролиферировать и могут в дальнейшем дифференцироваться. Когда остеобласты заканчивают участвовать в процессе костеобразования, у них есть три возможных пути развития: они подвергаются апоптозу, становятся покоящимися остеобластами или остеоцитами (Flores-Silva et al., 2015). В последнем случае остеобласты окружаются минерализованным матриксом и претерпевают морфологические изменения, в результате которых приобретают звездчатую форму. Эти клетки образуют сеть и участвуют в передаче сигналов через костную ткань (Rutkovskiy et al., 2016).

Клеточные механизмы и сигнальные каскады, лежащие в основе дифференцировки предшественников остеобластов во взрослой кости, до сих пор недостаточно изучены. Изучение ранних механизмов дифференцировки остеобластов, выделенных из костей взрослых людей, важно для понимания молеку-

лярных механизмов индукции остеогенной дифференцировки в зрелой кости.

Мы провели анализ ранних стадий остеогенной дифференцировки остеобластов, выделенных из кости взрослого человека, при помощи протеомики дробовика. Для этого мы выделили первичные культуры остеобластов из фрагментов бедренной кости трех доноров. Затем мы индуцировали остеогенную дифференцировку по стандартному протоколу остеогенной дифференцировки *in vitro*, выделили белки на 5-е сут остеогенной дифференцировки и провели протеомный анализ. Чтобы сделать наши данные более сопоставимыми с протеомами цельных костей, мы использовали кислотную экстракцию белков, аналогичную методам, используемым для минерализованных тканей. В результате мы описали физиологический сдвиг, связанный с дальнейшей дифференцировкой остеобластов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные культуры. Остеобластоподобные клетки выделяли из фрагментов эпифизов костной губчатой ткани бедренной кости, полученных во время операции в Национальном медицинском исследовательском центре травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена. От каждого участника, включенного в исследование, было получено информированное письменное согласие.

Выделение остеобластоподобных клеток из костной ткани осуществляли ферментативным методом. Костную ткань промывали фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ), содержащем 1% раствора пенициллина-стрептомицина. Эксплантат измельчали на фрагменты размером до 0.5 мм с помощью твердосплавных фрез. Фрагменты соединительной ткани удаляли, губчатую кость многократно промывали в ФСБ и использовали для дальнейшего выделения. Фрагменты губчатой кости инкубировали в 0.2%-ном растворе коллагеназы II типа (Worthington Biochemical Corporation, США) в течение 30 мин при 37°C. Гомогенизированную массу промывали в ФСБ, переносили в 0.2%-ный раствор коллагеназы IV типа (Worthington Biochemical Corporation, США) и инкубировали 16 ч при 37°C. После инкубации коллагеназу IV типа инактивировали высокоглюкозной (4.5 г/л глюкозы) питательной средой DMEM (Gibco, США), содержащей 15% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, HyClone, США), 2 mM L-глутамин и 0.1% раствора аскорбиновой кислоты (Sigma-Aldrich, США). Эта же среда в дальнейшем использовалась для культивирования клеток. Полученную суспензию переносили в культуральный флакон и культивировали в течение нескольких недель в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂). Для дальнейших экспериментов использовали клетки после трех-четырех пассажей. Клетки высевали с плотностью 22 × 10³ на 1 см².

Для индукции остеогенной дифференцировки использовали классическую остеогенную среду, универсальную для клеток многих типов (Lobov, Malashicheva, 2022): DMEM, содержащую 10% ФБС, 2 mM L-глутамина, 100 Ед./мл пенициллина/стрептомицина, 50 мг/мл аскорбиновой кислоты, 0.1 mM дексаметазона (Sigma-Aldrich, США) и 10 mM β -глицерофосфата натрия (Sigma-Aldrich, США). На пятые сутки дифференцировки клетки снимали трипсином, центрифугировали (1500 g, 5 мин), промывали ФБС и центрифугировали. Полученный сухой осадок замораживали при -80°C . Отложение кальция выявляли с помощью окраски ализариновым красным (Sigma, США) на 14-й день дифференцировки.

Экстракция белка. Для экстракции белка использовали остеобласты от трех доноров в двух состояниях (контрольном (без дифференцировки) и на 5-е сут остеогенной дифференцировки). К осадку клеток добавляли 100 мкл 0.2 N HCl и инкубировали в течение 30 мин при 4°C . Затем образцы центрифугировали (16000 g, 10 мин, 4°C), супернатант переносили в новую пробирку и белок осаждали 4 объемами ледяного ацетона (LC-MS Grade; LiChrosolv, Германия) в течение ночи при -20°C . Белковый осадок сушили на воздухе и ресуспендировали в 8 M мочевины (Sigma Aldrich, США) в 50 mM бикарбонате аммония (Sigma Aldrich, США).

Трипсинолиз. Концентрацию белка измеряли с помощью флуориметра Qubit (Thermo Fisher Sci, США) с помощью набора QuDye Protein Quantification Kit (Lumiprobe, Россия). Использовали по 20 мкг каждого образца. Образцы инкубировали в течение 1 ч при 37°C с 5 mM ДТТ (Sigma Aldrich, США) с последующей инкубацией в 15 mM йодацетамиде в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре (Sigma Aldrich, США) с последующим гашением йодацетамидом дополнительным количеством 5 mM ДТТ. Затем образцы разбавляли семью объемами 50 mM бикарбоната аммония и инкубировали в течение 16 ч при 37°C с трипсином в соотношении 1 : 50 (Promega, США).

Образцы выпаривали в центрифужном концентраторе Labconco Centrivar (Labconco, США) и растворяли в воде (LC-MS Grade; LiChrosolv, Германия), содержащей 0.1% муравьиной кислотой (Sigma Aldrich, США). Триптические пептиды обессоливали методом твердофазной экстракции с использованием наконечников с 18 Zip-Tip (Merck, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Обессоленные пептиды упаривали в центрифужном концентраторе Labconco Centrivar (Labconco, США) и растворяли в воде с 0.1% муравьиной кислоты для дальнейшего ВЭЖХ-МС/МС-анализа.

ВЭЖХ-МС-МС-анализ. Приблизительно 600 нг пептидов использовали для анализа протеомики дробовика методом ВЭЖХ-МС-МС с ионной подвижностью в масс-спектрометре TimsToF Pro (Bruker Dalton-

ics, Германия) с УВЭЖХ-хроматографом nanoElute (Bruker Daltonics, Бремен, Германия). УВЭЖХ проводили в режиме двухколоночного разделения с использованием трэп-колонок AcclaimTM Pep-MapTM 5 мм (Thermo Fisher Scientific, США) и разделительной колонки Bruker Fifteen (C18 ReproSil AQ, 150 мм $\times$ 0.75 мм, 1.9 мкм, 120 Å; Bruker Daltonics, Германия) в градиентном режиме со скоростью потока 400 нл/мин при температуре колонки 40°C . Фаза А представляла собой 0.1%-ный водный раствор муравьиной кислоты, фаза В — 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (LC-MS Grade; LiChrosolv, Германия). Градиент составлял от 2 до 30% фазы В в течение 42 мин, затем до 95% фазы В в течение 6 мин с последующей промывкой 95%-ной фазы В в течение 6 мин. Колонку уравнивали 4 объемами колонки перед каждым образцом. Для ионизации электро-распылением использовали ионный источник CaptiveSpray (Bruker, Германия) с капиллярным напряжением 1600 В, потоком азота 3 л/мин и температурой источника 180°C . Масс-спектрометрию проводили в автоматическом режиме DDA PASEF с циклом 0.5 с в положительной полярности с фрагментацией ионов с не менее чем двумя зарядами в диапазоне m/z от 100 до 1700 и диапазоне ионной подвижности от 0.85 до 1.30 1/K0.

Протеомные данные масс-спектрометрии доступны в базе данных ProteomeXchange через партнерский репозиторий PRIDE (Perez-Riverol et al., 2022) с идентификаторами набора данных PXD033697 и 10.6019/PXD033697.

Анализ протеомных данных. Идентификацию белков проводили в программном обеспечении Peaks Xpro (Bioinformatics Solutions Inc., Канада) по базе данных белков человека SwissProt (<https://www.uniprot.org/>; по состоянию на 28 марта 2021 г.; загружено 2 марта 2021 г.; 20394 последовательностей) с допустимой ошибкой исходной массы 10 ppm и допустимой ошибкой массы фрагмента 0.05 ppm, частотой ложного обнаружения (FDR) белков и пептидов менее 1% и двумя возможными пропущенными сайтами трипсинолиза. За фиксированную модификацию принимали карбамидометилирование цистеина. В качестве переменных модификаций задавали окисление метионина, ацетилирование N-конца белка, дезамидирование аспарагина и глутамина.

Площади пиков (Area under the curve) были использованы для анализа данных в R (версия 4.1.2; графический интерфейс 1.77, сборка High Sierra; 2021 г.). В первую очередь был проведен качественный анализ. Для каждой группы (недифференцированные (контрольные) и дифференцированные остеобласты) отбирали белки, которые обнаруживались не менее чем в двух из трех образцов, и количество уникальных белков для контрольных или дифференцированных остеобластов сравнивали с помощью диаграммы Венна из пакета "ggvenn" (Yan, 2021).

Для количественного анализа использовали белки, обнаруженные более чем в 4 образцах. Отсутствующие значения были заполнены методом ближайших соседей из пакета “impute” (Hastie et al., 2022). Затем мы произвели логарифмическое преобразование и квантильную нормализацию данных с дальнейшим анализом дифференциальной экспрессии с помощью пакета “limma” (Ritchie et al., 2015). Мы также выполнили ординацию образцов с помощью метода главных компонент (PCA) и разреженного дискриминантного анализа на основе частных наименьших квадратов (sPLS-DA) из пакета “MixOmics” (Rohart et al., 2017). Мы использовали пакеты ggplot2 (Wickham, 2016) и EnhancedVolcano (Blighe et al., 2022) для визуализации данных. На диаграмме рассеивания мы представили дифференциально экспрессируемые белки между контрольными и дифференцированными остеобластами. На кратном изменении Log2 мы показываем уровень изменения экспрессии, на Log10P — логарифм скорректированного P-значения. Пунктирные линии отделяют данные со скорректированным значением $P < 0.05$ и кратным изменением Log2 $> |1|$. Функциональная аннотация белков была выполнена по Базе данных для аннотации, визуализации и комплексного обнаружения (DAVID; версия 6.8) (<https://david.ncifcrf.gov/>, по состоянию на 17 апреля 2022 г.).

Иммуноцитохимия. Для иммуноцитохимической окраски клетки выращивали на покровных стеклах в стандартных условиях культивирования. Затем клетки промывали PBS и фиксировали 10 мин в 4%-ном параформальдегиде, трижды промывали PBS и пермеабелизовали в 0.1%-ном Тритоне X-100 (на PBS) в течение 10 мин с последующим блокированием в 1%-ном БСА (PBS) в течение 30 мин. Затем клетки инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами к BMP-2/4 (sc-9003, Santa Cruz, США), RUNX2 (ab76956; Abcam, США), остеокальцину (ab93876; Abcam, США) и остеопонтину (sc-21742; Санта-Круз, США). Клетки трижды промывали PBS и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa488 (Invitrogen, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для визуализации ядер использовали краситель DAPI. Микрофотографии были получены с помощью микроскопа AxioObserver Microscope (Zeiss, Германия) с программным обеспечением AxioVision (Zeiss, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Остеобласты положительны на поздние маркеры остеогенной дифференцировки, но все еще не способны к минерализации внеклеточного матрикса. Сначала мы проводили иммуноцитохимическую окраску основных маркеров более поздних стадий остеогенной дифференцировки (BMP-2/4, остеокальцин, остеопонтин, RUNX2) и оценивали уровень минерализации ВКМ окрашиванием ализариновым красным в

стандартных условиях культивирования и после индукции остеогенной дифференцировки. Остеобласты были положительными по всем анализируемым маркерам (рис. 1а). Тем не менее, в стандартных условиях культивирования на среде DMEM мы не выявили минерализации ВКМ: образцы обоих доноров не окрашивались ализарином (рис. 1б, лунки слева). Добавление остеогенных индукторов индуцировало дифференцировку в обоих образцах, подтверждая, что клетки способны к остеогенной дифференцировке (рис. 1б, лунки справа).

Остеобластам требуется минимальный физиологический сдвиг, чтобы начать минерализацию внеклеточного матрикса. Протеомный анализ методом дробовика выявил 2207 белковых групп, которые были идентифицированы как минимум по двум пептидам с величиной FDR $< 1\%$. Мы начали с качественного анализа. Для каждой группы (контрольной или дифференцированной) отбирали белки, которые обнаруживались не менее чем в двух из трех образцов. Только 1785 таких белков были общими для всех образцов, в то время как 142 белка были уникальными для контрольных (недифференцированных) остеобластов и 111 — для дифференцированных (рис. 2в). Список уникальных идентификаторов белков, специфичных для контрольных и дифференцированных остеобластов, приведен в дополненных материалах (см. Приложение 1).

Анализ обогащения по базе данных Gene Ontology показал, что белки, уникальные для контрольных (недифференцированных) остеобластов (142 белка), связаны со многими биологическими процессами, среди которых организация внеклеточного матрикса ($P = 3.6 \times 10^{-2}$), ангиогенез ($P = 3.0 \times 10^{-2}$), клеточный цикл ($P = 4.0 \times 10^{-2}$), ремоделирование хроматина ($P = 11.8 \times 10^{-3}$) и сплайсинг мРНК ($P = 2.2 \times 10^{-3}$).

Белки, специфичные для дифференцированных остеобластов, были вовлечены в такие процессы, как регуляция трансляции ($p = 3.7 \times 10^{-3}$), метаболизм пирувата ($P = 2.4 \times 10^{-4}$) и углерода ($P = 5.3 \times 10^{-2}$), организация внеклеточного матрикса ($P = 1.7 \times 10^{-3}$), включая организацию коллагеновых фибрилл ($P = 3.1 \times 10^{-4}$) и актиновых микрофиламентов ($P = 7.5 \times 10^{-3}$), а также адгезию ($P = 2.7 \times 10^{-2}$), межклеточные контакты ($P = 4.9 \times 10^{-2}$) и ангиогенез ($P = 2.6 \times 10^{-3}$).

Затем мы провели количественный анализ, который включал 1612 белков. На основе этого набора данных мы выполнили кластеризацию наших образцов с помощью метода PCA и разреженного дискриминантного анализа sPLS-DA (рис. 2а). Оба метода выявили два кластера, поэтому остеобласты имели разные протеомные профили до и во время дифференцировки остеобластов, несмотря на раннюю временную точку дифференцировки, которую использовали для анализа (рис. 2а). Кроме того, мы провели анализ дифференциальной экспрессии и обнаружили

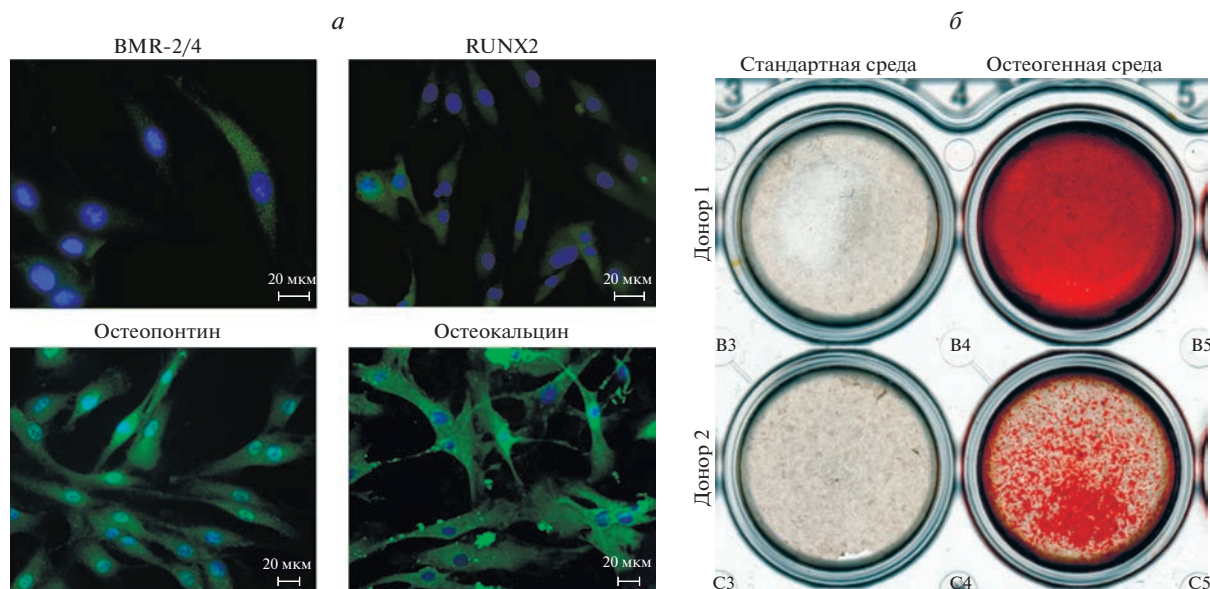


Рис. 1. Иммуноцитохимическое окрашивание остеобластов антителами к остеогенным маркерам (а) и окрашивание ализариновым красным контрольных и дифференцированных остеобластов от двух доноров (б).

только девять дифференциально экспрессируемых белков со скорректированным значением P менее 0.05 (рис. 2б). Семь из этих белков активировались, а два подавлялись в ходе дифференцировки.

Анализ обогащения по базе данных Gene Ontology показал, что белки, активируемые при остеогенной дифференцировке, участвуют в связывании рибосом ($P = 2.0 \times 10^{-4}$), биогенезе клеточных мембран ($P = 2.8 \times 10^{-4}$), негативной регуляции центральных сигнальных путей ($P = 1.0 \times 10^{-3}$), связывании углеводов ($P = 1.6 \times 10^{-3}$), адгезии и миграции клеток. Выявленные белки с пониженной регуляцией связаны с организацией коллагеновых фибрилл и восстановлением тканей.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы сравнили протеомы остеобластов, выделенных из костей взрослых, при стандартном культивировании *in vitro* и на ранней стадии остеогенной дифференцировки (5-е сут).

Мы выявили неожиданно небольшие протеомные различия между контрольными и дифференцированными остеобластами и только девять статистически значимых дифференциально экспрессирующихся белков между ними. Это можно объяснить тем, что остеобласты уже дифференцированы и имеют высокий уровень экспрессии специфичных белков костного внеклеточного матрикса и RUNX2 — главного регулятора остеогенной дифференцировки (рис. 1а). Анализ обогащения белков, идентифицированных в остеобластах, выявил 29 белков, связанных с термином “дифференциация остеобластов”. Следовательно, большинство белков, необходимых

для минерализации ВКМ, уже присутствуют в остеобластах. Мы не можем сделать вывод, являются ли анализируемые клетки зрелыми остеобластами или их предшественниками. Тем не менее, остеобласты способны осуществлять минерализацию ВКМ только в остеогенной среде, и для их перехода от пролиферации к минерализации матрикса необходимы некоторые физиологические изменения (рис. 1б). В случае такого незначительного сдвига протеома изменения могут быть связаны не с экспрессией белков, а с их посттрансляционными модификациями, локализацией, белок-белковыми взаимодействиями и многими другими факторами, влияющими на биологические функции белков, но упущенными в наших данных протеомики дробовика.

Другим фактором, снижающим количество идентифицируемых белков, является используемый метод кислой экстракции белков. Известно, что кость плохо поддается протеомному анализу, поскольку она минерализована. Поэтому большинство протоколов экстракции белка основаны на деминерализации кости с последующей солиubilизацией белка (Cleland et al., 2012 ; Cleland, Vashishth, 2015). Деминерализация является важным этапом экстракции костного белка, который значительно увеличивает выход белка (Jiang et al., 2007; Cleland, Vashishth, 2015). Таким образом, экстракция белка в кислой среде является часто используемым методом (Jiang et al., 2007). Однако большинство исследований протеомики костей основано на системах *in vitro*, таких как культивируемые остеобласты и остеокласты. Как правило, для выделения белков из культивируемых остеобластов используются стандартные методы экстракции, подходящие для мягких тканей. Также

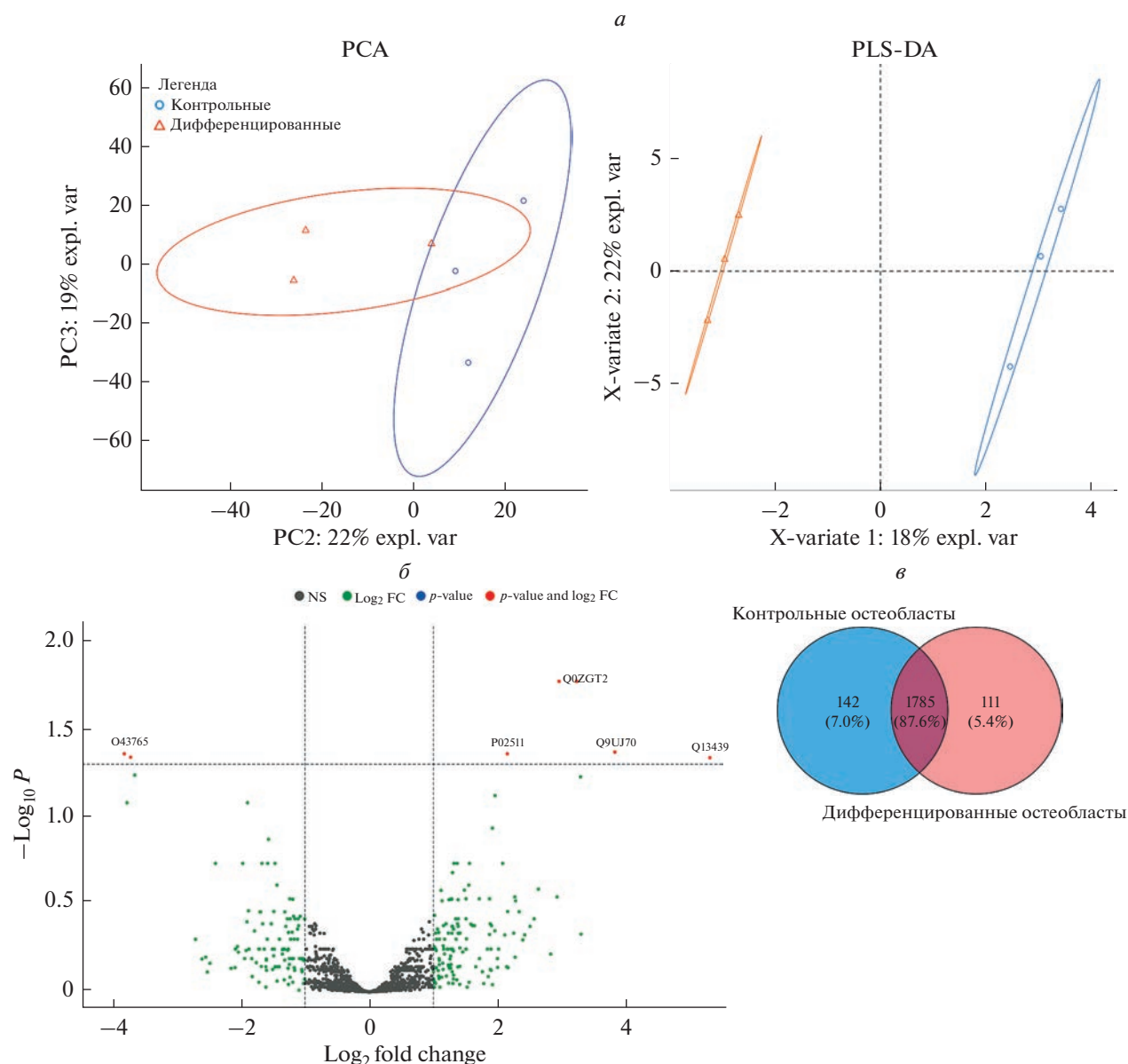


Рис. 2. Сравнение протеомных профилей остеобластов человека в контроле и на пятые сутки остеогенной дифференцировки. *a* – Метод главных компонент (PCA) и разреженный дискриминантный анализ на основе частных наименьших квадратов (sPLS-DA), представляющие кластеризацию протеомов контрольных и дифференцированных остеобластов. *б* – Диаграмма рассеивания, демонстрирующая дифференциально экспрессируемые белки между контрольными и дифференцированными остеобластами; Log₂ fold change – уровень изменения экспрессии, $-\text{Log}_{10} P$ – логарифм скорректированного значения P . Пунктирные линии отсекают данные со скорректированным значением $P < 0.05$ и кратным изменением $\text{Log}_2 > |1|$. *в* – Диаграмма Венна показывает количество уникальных белков для контрольных или дифференцированных остеобластов.

отмечается, что разные методы экстракции позволяют выделять разные типы белков (Jiang et al., 2007). Подобно методам, используемым для цельной кости, мы использовали кислотную экстракцию, но в нашем случае это приводит к более низкому охвату протеома по сравнению с нашим исследованием протеомики дробовика с методами экстракции белка, специализированными для клеточных культур (данные не показаны).

Тем не менее, мы обнаружили, что протеомы контрольных и дифференцированных остеобластов образуют отдельные кластеры как на графиках PCA, так и на графиках sPLS-DA. Эти данные подтверждают физиологический сдвиг и дальнейшую дифференцировку остеобластов, индуцированную остеогенной средой. В соответствии с этим минерализация ВКМ выявлялась только в дифференцированных остеобластах.

Мы идентифицировали только девять дифференциально экспрессируемых белков. Семь из них активируются: нексилин (регулирует миграцию клеток посредством ассоциации с актиновым цитоскелетом), NОMО1-3 (противодействует передаче сигналов Nodal), N-ацетил-D-глюкозаминкиназа, альфа-кристаллин В-цепи (малый белок теплового шока), GOLGA4 (участвует в везикулярном транспорте) и два белка с подавленной регуляцией (белок альфа, содержащий малый богатый глутамином тетраатрикопептидный повтор (ко-шаперон), и люмикан — малый протеогликан с повтором, богатым лейцином).

В то время как известно, что люмикан является важным компонентом ВКМ кости (Raouf et al., 2002), сигнальный путь Nodal ранее не был описан при дифференцировке остеобластов. Мы предполагаем, что эти белки связаны с усилением образования кристаллов гидроксиапатита, но их молекулярные функции требуют изучения в будущем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы охарактеризовали ранние стадии остеогенной дифференцировки остеобластов, выделенных из фрагментов бедренной кости взрослых людей, с помощью протеомики дробовика при кислотной экстракции белка. Мы обнаружили, что, несмотря на способность к пролиферации *in vitro*, эти клетки имеют сходный с остеобластами протеом на 5-е сут остеогенной дифференцировки, но мы обнаружили некоторый физиологический сдвиг, который может быть необходим для перехода от пролиферации к минерализации матрикса. Эти изменения в дифференцированных остеобластах связаны со снижением пролиферативной активности клеток и их участием в организации внеклеточного матрикса.

БЛАГОДАРНОСТИ

Протеомику дробовика выполнили в Ресурсном центре “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Научного парка СПбГУ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-14-00152).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам институционального и (или) национального комитета по этике исследований, а также Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым этическим стандартам. От каждого участника, включенного в исследование, было получено информированное письменное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.А.Л.: Концептуализация; И.А.Х., А.А.Л., А.Б.М.: методология; программное обеспечение; И.А.Х., А.А.Л., И.А.Х.: формальный анализ; И.А.Х., Д.А.К., Б.Р.З., Е.С.Г., Р.М.Т., С.А.Б., А.П.С., В.В.К.: средства; А.А.Л., А.Б.М.: проведение исследования; И.А.Х., Д.С.К.: курирование данных; И.А.Х.: написание статьи; А.А.Л. и А.Б.М.: редактирование; Е.С.Г., И.А.Х.: визуализация данных; А.А.Л., А.Б.М.: общее руководство. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Приложение 1 — результаты анализа дифференциальной экспрессии белка между контрольными и дифференцированными остеобластами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bahney C., Zondervan R., Allison P., Theologis A., Ashley J., Ahn J., Miclau T., Marcucio R., Hankenson K. 2019. Cellular biology of fracture healing. *J. Orthop. Res.* V. 37. P. 35. <https://doi.org/10.1002/jor.24170>
- Blighe K., Sharmila R., Myles L. 2022. EnhancedVcano: publication-ready Vcano plots with enhanced colouring and labeling. <https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/EnhancedVcano/inst/doc/EnhancedVcano.html>
- Bragdon B., Bahney C. 2018. Origin of reparative stem cells in fracture healing, *Curr. Osteoporos. Rep.* V. 16. P. 490. <https://doi.org/10.1007/s11914-018-0458-4>
- Cleland T., Vashishth D. 2015. Bone protein extraction without demineralization utilizing principles from hydroxyapatite chromatography. *Anal. Biochem.* V. 472. P. 62. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.006>
- Cleland T., Voegele K., Schweitzer M. 2012. Empirical evaluation of bone extraction protocols. *PLoS One.* V. 7. P. e31443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031443>
- Florencio-Silva R., Sasso G., Sasso-Cerri E., Simões M., Cerri P. 2015. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed. Res. Int.* V. 2015. P. e421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Hastie T., Tibshirani R., Narasimhan B., Chu G. 2022. Impute: imputation for microarray data. *Bioconductor version: Release (3.14)*. <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/impute.html>
- Jiang X., Ye M., Jiang X., Liu G., Feng S., Cui L., Zou H. 2007. Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis. *J. Proteome Res.* V. 6. P. 2287. <https://doi.org/10.1021/pr070056t>
- Lobov A., Malashicheva A. 2022. Osteogenic differentiation: a universal cell program of heterogeneous mesenchymal cells or a similar extracellular matrix mineralizing phenotype? *Bio. Comm.* V. 67. P. 32. <https://doi.org/10.21638/spbu03.2022.104>

- Matthews B., Novak S., Sbrana F., Funnell J., Cao Y., Buckels E., Grcevic D., Kalajzic I. 2021. Heterogeneity of murine periosteum progenitors inVved in fracture healing. *Elife*. V. 10. P. e58534.
<https://doi.org/10.7554/eLife.58534>
- Perez-Riverol Y., Bai J., Bandla C., García-Seisdedos D., Hewapathirana S., Kamatchinathan S., Kundu D.J., Prakash A., Frericks-Zipper A., Eisenacher M., Walzer M., Wang S., Brazma A., Vizcaino J.A. 2022. The PRIDE database resources in 2022: A hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res.* V. 50. D543–D552.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab1038>
- Pitkänen S. 2020. In vitro and in vivo osteogenesis and vasculogenesis in synthetic bone grafts. Doctoral dissertation: Tampere University.
- Raouf A., Ganss B., McMahon C., Vary C., Roughley P., Seth A. 2002. Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix. *Matrix Biol.* V. 21. P 361.
[https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(02\)00027-6](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(02)00027-6)
- Ritchie M.E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C.W., Shi W., Smyth G.K. 2015. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* V. 43. P. e47.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rohart F., Gautier B., Singh A., Cao K. 2017. mixOmics: an R package for ‘omics’ feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput. Biol.* V. 13. P. e1005752.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>
- Rutkovskiy A., Stensløkken K., Vaage I. 2016. Osteoblast differentiation at a glance. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* V. 22. P. 95.
<https://doi.org/10.12659/MSMBR.901142>
- Wickham H. 2016. ggplot2. Cham: Springer Int. Publishing.
- Yan L. 2021. ggvenn: Draw Venn Diagram by “ggplot2”.
<https://cran.r-project.org/web/packages/ggvenn/>

Osteogenic Differentiation *in vitro* off Human Osteoblasts is Associated with Only Slight Shift in Their Proteomics Profile

I. A. Khvorova^a, D. A. Kostina^a, B. R. Zainullina^b, E. A. Fefilova^a, E. S. Gromova^a, R. M. Tikhilov^c, S. A. Bozhkova^c, A. P. Sereda^c, V. V. Karelkin^c, A. B. Malashicheva^a, and A. A. Lobov^{a,*}

^aLaboratory of Regenerative Biology, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

^bResource Centre for Molecular and Cell Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

^cVreden National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, St. Petersburg, 195427 Russia

*e-mail: lobov@incras.ru

Fracture healing is a complex process in which the periosteum and endosteum become the main sources of osteoblast progenitor cells. However, cellular mechanisms and signaling cascades underlying the early stages of osteoblast progenitors differentiation in adult bone are still not well understood. Therefore, we performed shotgun proteomics analysis of primary culture of isolated human osteoblasts from femur of adult donors in undifferentiated conditions and on the sixth day of osteogenic differentiation *in vitro*. This is an early timepoint in which we have observed no extracellular matrix mineralization yet. 1612 proteins identified with at least two unique peptides were included in proteomics analysis. Data are available via ProteomeXchange with identifier PXD033697. Despite the fact, that matrix mineralization starts only after induction of osteogenic differentiation, we revealed unexpectedly weak physiological shift associated with a decrease of cells proliferative activity and changes in proteins inVved in extracellular matrix secretion and organization. We demonstrated that osteoblasts were positive for markers of later osteogenic differentiation stages during standard cultivation: osteopontin, osteocalcin, BMP-2/4 and RUNX2. Therefore, further differentiation required for matrix mineralization needs minimal physiological changes.

Keywords: osteoblasts, osteogenic differentiation, shotgun proteomics, bone, mass spectrometry

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В СПЕРМАТОЗОИДАХ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ТРАНСГЕНЕРАЦИОННОЙ ПЕРЕДАЧИ ЭФФЕКТОВ ОТЦОВСКОГО СТРЕССА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

© 2023 г. О. В. Малышева^{1, 2, *}, С. Г. Пивина¹, Е. Н. Пономарева², Н. Э. Ордян¹

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия

²Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*E-mail: omal99@mail.ru

Поступила в редакцию 06.09.2022 г.

После доработки 29.09.2022 г.

Принята к публикации 10.10.2022 г.

Доказано, что стресс отца может влиять на фенотип потомков, вызывая соматические, поведенческие, гормональные и молекулярные изменения. Одним из гипотетических механизмов, ответственных за передачу отцовских эффектов потомству, может быть изменение спектра регуляторных некодирующих РНК в сперматозоидах. В настоящей работе мы исследовали влияние стресса отца в моделях посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) и депрессии на представленность малых РНК (микро- и piwiРНК) в сперме стрессированных животных. Самцов крыс линии Wistar подвергали стрессу в двух парадигмах (“стресс–рестресс” и “выученная беспомощность”), что приводит к развитию у модельных животных ПТСР-подобного и депрессивно-подобного состояний соответственно. Через 48 суток после рестресса получали препараты сперматозоидов, из которых выделяли РНК. Спектр малых РНК исследовали методом NGS-секвенирования. У самцов с ПТСР-подобным состоянием по сравнению с группой контроля было выявлено изменение экспрессии 27 piwiРНК и 77 микроРНК. Среди мишеней этих miРНК можно выделить гены, продукты которых могут быть вовлечены в такие механизмы передачи отцовских эффектов потомству, как изменения метилирования ДНК, модификации гистонов и РНК-интерференции (*Dnmt3a*, *Setd5*, *Hdac1*, *Mllt10*, *Mtdh*), а также гены, связанные с функционированием инсулиноподобного фактора роста 2, экспрессия гена которого, как было показано ранее, изменена в ЦНС у потомства самцов с ПТСР-подобным состоянием (*Igf2*, *Igf2bp2*, *Igf2r*). У самцов со смоделированным депрессивно-подобным состоянием изменений представленности малых РНК не зарегистрировано. Полученные результаты свидетельствуют о выраженном влиянии стресса отца на спектр коротких некодирующих РНК в сперматозоидах у крыс, однако это влияние зависит от характера стрессового воздействия.

Ключевые слова: стресс отца, депрессия, посттравматическое стрессовое расстройство, сперма, малые некодирующие РНК, микроРНК, piwiРНК, крыса

DOI: 10.31857/S0041377123010078, **EDN:** GLBGPN

Последнее десятилетие ознаменовалось резким ростом интереса к идее о том, что условия окружающей среды предков могут влиять на фенотип будущих поколений. Очевидно, что матери играют гораздо большую роль в обеспечении раннего развития, чем отцы, особенно у млекопитающих (Sharma, 2013; Yan, 2014). Возможность отцовского вклада в потомство у многих видов ограничена сперматозоидами, благодаря чему могут быть созданы контролируемые условия эксперимента для исследования механизмов, ответственных за трансгенерационную

передачу эффектов влияния окружающей среды (Rando, 2012; Harker et al., 2018; Duffy et al., 2021).

Эпидемиологические и ретроспективные исследования, проведенные на различных выборках, подтверждают идею о том, что у человека отцовский стресс также может влиять на реактивность гипоталамо-адреналокортикальной системы, риск развития посттравматического стрессового расстройства (ПТСР), физическое и ментальное здоровье (Yehuda et al., 2007a, 2007b; Rodgers, Bale, 2015). Основными экспериментальными моделями, используемыми для изучения связи воздействий окружающей среды на отца с фенотипическими признаками потомства, являются особенности питания (Dimofski et al., 2021) и различ-

Принятые сокращения: ДПС — депрессивно-подобное состояние; ПТСР — посттравматическое стрессовое расстройство; ИФА — иммуноферментный анализ.

ные психологические стрессовые состояния. Примерами последних может служить хронический переменный стресс (Rodgers et al., 2013) и стресс социального поражения (Dietz et al., 2011).

В качестве потенциальных эпигенетических механизмов передачи отцовских эффектов могут выступать изменение паттернов метилирования генома (в том числе нарушения импринтинга), конденсации хроматина, гистоновых кодов. Также важную роль могут играть регуляторные некодирующие РНК, как длинные, так короткие (Yan, 2014; Rodgers et al., 2015; Yeshurun, Hannan, 2019). Зрелые сперматозоиды у млекопитающих изобилуют малыми РНК разных классов, в связи с чем этот тип молекул рассматривается как один из наиболее вероятных объектов, обеспечивающих влияние отцовского стресса на потомство (Fullston et al., 2013; Huang et al., 2013; Jodar et al., 2013; Kiani, Rassoulzadegan, 2013; Chen et al., 2016). В ряде работ доказана роль микроРНК сперматозоидов в передаче эффектов отцовского стресса потомству (Rodgers et al., 2013; Short et al., 2016).

Задача настоящей работы заключалась в сравнении спектра малых некодирующих РНК в сперме самцов крыс контрольных и крыс с сформированным ПТСР-подобным и депрессивно-подобным состоянием (ДПС), а также анализ возможных мишеней дифференциально экспрессирующихся микроРНК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. Работа проведена на крысах линии Вистар (аутбредная линия) из ЦКП “Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем”. Использовали самцов крыс в возрасте 3-х мес. и весом 250–280 г. с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, утвержденными правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по гуманному обращению с животными Института Физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в пластиковых клетках (по 5 животных в клетку) на стандартной диете (гранулированный комбикорм) при свободном доступе к воде и пище и 12-часовом режиме смены дня и ночи.

Экспериментальные группы животных. Было сформировано 3 группы животных: 1) с ПТСР-подобным состоянием, 2) с ДПС и 3) контрольная группа (интактные самцы). В каждую группу вошли 5 животных. Самцов группы 1 подвергали стрессу с использованием парадигмы “стресс–рестресс” (модель ПТСР). Вначале применяли комбинированное стрессовое воздействие, состоящее из 2-часовой иммобилизации в узких пластиковых пеналах, 20-минутного плавания в стеклянных цилиндрах диаметром 40 см и глубиной 60 см, заполненных водой при температуре $24 \pm 2^\circ\text{C}$, и далее после небольшой паузы эфирный стресс в течение 1 мин. Далее через 7 сут

самцов подвергали повторному стрессу (рестрессу) в виде 30-минутной иммобилизации с целью развития стойкого ПТСР-подобного состояния (Пивина и др., 2015). Критерием включения в группу было снижение уровня кортикостерона в крови на 10-е сут после рестресса по сравнению с контрольной группой. У самцов группы 2 вырабатывали ДПС в парадигме “выученная беспомощность” (Czén et al., 2016). Самцов подвергали неизбежному и неконтролируемому электрокожному раздражению в клетке с токопроводящим полом размером $30 \times 18 \times 20$ см. Удары электрического тока (1 мА, 50 Гц) длительностью 15 с подавались 60 раз в течение 1 ч с длительностью интервала между ударами током от 15 до 54 с. Критерием включения в группу служило повышение уровня кортикостерона в крови на 10-е сут после действия стресса. Контрольных самцов ($n = 5$) оставляли интактными.

Оценка уровня кортикостерона. Кровь для анализа на содержание кортикостерона отбирали на 10-е сутки после рестресса или неизбежного электрокожного раздражения из хвостовой вены у животных всех групп. Образцы крови центрифугировали 10 минут при 2500 об./мин, полученную плазму хранили при -20°C . Уровень кортикостерона определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов в соответствии с инструкцией производителя (ХЕМА, Россия) и анализатора Multiskan FS (Thermo Fisher Scientific, Финляндия).

Для статистического анализа содержания кортикостерона в крови использовали однофакторный ANOVA и последующие парные *post-hoc* сравнения (тест Тьюки) значений для каждой группы животных. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Получение сперматозоидов. Через 48 сут после стрессовых процедур (период, необходимый для полного цикла созревания сперматозоидов) самцов всех групп подвергали действию диэтилового эфира в течение 3 мин, а затем декапитуировали.

Сразу после забоя у самцов извлекали оба каудальных эпидидимуса, которые помещали в нагретый до 37°C стерильный сосуд с 1 мл 1-кратного PBS, содержащий 1% бычьего сывороточного альбумина. Эпидидимисы надрезали и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C , позволяя подвижным сперматозоидам свободно всплыть. С целью исключения загрязнения образцов соматическими клетками жидкость, полученную после инкубации эпидидимисов и содержащую сперматозоиды, подвергали очистке в градиенте суспензии силиконовых частиц SupraSperm System и среды для подготовки сперматозоидов Sperm Preparation® Medium (оба производства ORIGIO, Дания) согласно инструкции производителя. Чистоту препаратов и число полученных сперматозоидов оценивали в камере Горяева под световым микроскопом после окраски 1%-ным

водным раствором эозина. Число выделенных подвижных сперматозоидов составило 5.5 ± 0.5 млн на образец, а статистически значимых различий по этому показателю между группами самцов не было.

NGS-секвенирование. Полученные сперматозоиды помещали в Trizol (ThermoFisher) и хранили при -70°C до выделения РНК. Тотальную РНК выделяли стандартным методом (гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции), качество выделенной РНК (RIN) оценивали на TapeStation (Agilent, США). Для приготовления и очистки библиотек кДНК использовали кит QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Для приготовления библиотек использовали 200 нг тотальной РНК от каждого образца. Секвенирование было проведено на платформе Illumina HiSeq по протоколу, рекомендованному для малых РНК (однонаправленное секвенирование, длина прочтения 50 п.н., глубина секвенирования 1–5 млн прочтений на образец). Приготовление библиотек и секвенирование нового поколения (NGS) было проведено одновременно для всех образцов.

Для каждого образца было получено от 2623091 до 3881243 прочтений, после биоинформатической фильтрации по качеству количество прочтений на образец в среднем составило 1600000. После выравнивания в среднем 32.5% прочтений были аннотированы как известные малые РНК разных классов (микроРНК, piwiРНК, tРНК), еще 30.5% прочтений были охарактеризованы как фрагменты рРНК и мРНК. Оставшиеся прочтения были аннотированы как картированные не охарактеризованные фрагменты. Для анализа дифференциальной экспрессии использовали матрицу количества чтений на ген без нормализации. Для оценки дифференциальной экспрессии коротких РНК использовали пакет DESeq2 R (Love et al., 2014). Оценку дифференциальной экспрессии в DESeq2 проводили только для микроРНК и piwiРНК с суммарным числом считываний ≥ 15 по всем образцам. Заключение о дифференциальной экспрессии микроРНК и piwiРНК производили, если абсолютное значение $\log_2$ -кратного изменения ($\log_2$ fold change) было > 0.5 , а значение p , с учетом поправки на множественные сравнения, было < 0.05 .

Реактивы. Использовали силиконовые частицы SupraSperm System, среду для подготовки сперматозоидов Sperm Preparation®Medium (ORIGIO, Дания), Тризол (ThermoFisher, США), набор для приготовления и очистки библиотек кДНК QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen, Германия), ИФА-набор для определения кортикостерона в сыворотке крови (ХЕМА, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлено содержание кортикостерона в плазме крови контрольных самцов, самцов с моделированным ПТСР или моделированной де-

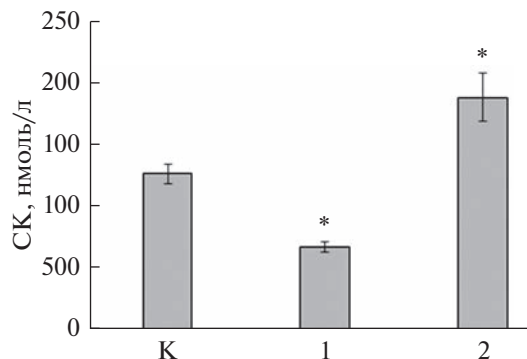


Рис. 1. Содержание кортикостерона (СК, нмоль/л) в крови самцов крыс контрольной группы (К), самцов с моделированным ПТСР (1) и самцов с моделированной депрессией (2) через 10 сут после стрессорного воздействия. Различия с контрольной группой достоверны при $*P < 0.001$ (тест Тьюки).

прессией на 10-е сут после действия стресса. Однофакторный ANOVA показал статистически значимое влияние фактора группа животных на уровень кортикостерона ($F_{2, 14} = 23.3$, $p < 0.0001$). Дополнительный анализ *post-hoc* выявил, что у самцов с моделированным ПТСР наблюдается сниженный уровень кортикостерона в крови, тогда как у самцов с моделированной депрессией, напротив, уровень кортикостерона повышается по сравнению с контрольными самцами, что соответствует ПТСР-подобному или ДПС соответственно.

В трех группах животных (модель ПТСР, модель депрессии, контрольная группа) было проведено NGS-секвенирование коротких РНК, выделенных из сперматозоидов. После фильтрации по качеству в каждом образце было обнаружено в среднем 1600000 прочтений, из которых 14% были аннотированы как микроРНК, 7.5% — как piwiРНК, 26% — как фрагменты рРНК, 11% — как фрагменты tРНК, 4.5% — как фрагменты мРНК, что в целом соответствует данным литературы о содержании коротких РНК в сперматозоидах (Peng et al., 2012; Short et al., 2016). Всего в образцах было обнаружено 335 видов piwiРНК и 635 микроРНК. В результате дальнейшего анализа нам удалось выявить сходные изменения экспрессии микро- и piwiРНК во всех образцах группы с моделированным ПТСР по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$). Дифференциальная экспрессия была выявлена для 27 piwiРНК (экспрессия 8 piwiРНК была понижена, 19 — повышена) и для 77 микроРНК (повышена экспрессия у 32 микроРНК и понижена — у 45 микроРНК) (рис. 2). Список коротких РНК, экспрессия которых в наибольшей степени изменена в сперматозоидах самцов с сформированным ПТСР-подобным состоянием, представлен в табл. 1.

Различия между группой животных с ДПС и контрольной группой оказались крайне незначительны-

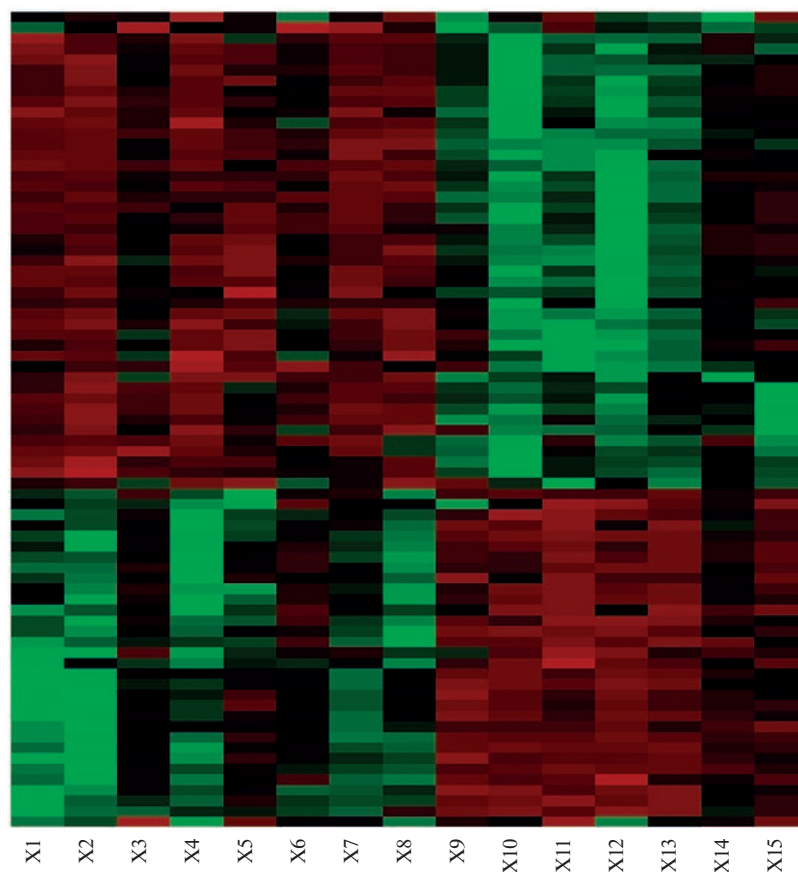
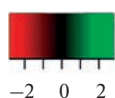


Рис. 2. Тепловая карта дифференциально экспрессирующихся коротких некодирующих РНК у крыс экспериментальных и контрольной групп. В верхнем левом углу показана цветовая шкала дифференциальной экспрессии. Животные: X1–X5 – животные с ПТСР-подобным состоянием, X6–X10 – группа с депрессивно-подобным состоянием, X11–X15 – группа контроля. Хорошо видно, что группа с моделированной депрессией неоднородна: животные X6, X7 и X8 по паттерну экспрессии похожи на группу с ПТСР, а X9 и X10 – на группу контроля.

ми. Достоверные отличия были выявлены только для двух piRNA (*gno_piR_019288* и *gno_piR_016741*), экспрессия которых была повышена в группе ДПС. В целом образцы, полученные от животных этой группы, оказались неоднородными – экспрессия коротких РНК в трех образцах (X6, X7 и X8) была схожа с наблюдаемой в группе самцов с ПТСР, а еще два образца (X9 и X10) демонстрировали паттерн экспрессии, сходный с группой контроля (рис. 2). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о выраженном влиянии ПТСР-подобного состояния самцов на паттерн экспрессии коротких РНК в сперматозоидах по сравнению с контрольной группой, и отсутствию однозначного влияния ДПС на этот показатель.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время накоплено большое количество экспериментальных и эпидемиологических данных, указывающих на влияние отцовского стресса на физиологические функции и поведение потомков. На лабораторных грызунах в ряде экспериментов, использующих различные модели стрессовых воздействий, было установлено, что у потомков стрессированных самцов усиливается ДПС и тревожное поведение (Franklin et al., 2010; Dietz et al., 2011). Отметим, что в этих исследованиях самцов подвергали действию стрессов, которые у лабораторных грызунов формируют депрессивно-подобное состояние, проявляющееся не только в соответствующих изменениях поведения, но и в повышенной

Таблица 1. МикроРНК и piwiРНК, дифференциально экспрессирующиеся в сперматозоидах самцов крыс с моделированным ПТСР-подобным состоянием по сравнению с самцами контрольной группы

Тип РНК и изменение экспрессии в группе с ПТСР	Название	Кратность изменения (log2 fold change)	Padj
piwiРНК, повышение экспрессии	rno_piR_005879	2.96	0.0004
	rno_piR_005900	1.915	5.038e-05
	rno_piR_000753	1.83	0.0007
	rno_piR_001415	1.84	0.0002
	rno_piR_005552	1.74	9.6e-05
	rno_piR_001414	1.69	5.04e-05
	rno_piR_005595	1.74	0.0003
	rno_piR_005901	1.69	2.9e-05
	rno_piR_035999	3.32	0.033
	rno_piR_033897	3.3	0.046
	rno_piR_013610	1.75	0.013
	rno_piR_015975	1.46	0.037
	rno_piR_038396	1.34	0.0015
	rno_piR_008131	1.31	0.0003
	rno_piR_001199	1.27	0.0067
	rno_piR_000194	1.30	0.0031
	rno_piR_000934	1.27	0.032
	rno_piR_005567	1.11	0.0031
	rno_piR_022621	0.79	0.030
piwiРНК, снижение экспрессии	rno_piR_030373	-1.5318	0.009
	rno_piR_000552	-1.5734	2.9e-05
	rno_piR_021540	-2.0849	0.0002
	rno_piR_028038	-2.0892	0.024
	rno_piR_010135	-1.3756	0.038
	rno_piR_015914	-0.93	0.033
	rno_piR_011541	-1.02	0.022
	rno_piR_000219	-1.1	0.033
микроРНК, повышение экспрессии	rno-miR-375-3p	1.70152	0.0007
	rno-miR-106b-3p	1.67601	0.002
	rno-let-7a-5p	1.65067	0.0002
	rno-let-7d-5p	1.59074	0.0045
	rno-miR-3596b	1.54832	0.0021
	rno-let-7c-5p	1.08706	0.0045
	rno-let-7b-5p	1.13304	0.007
	rno-let-7e-5p	1.01823	0.011
	rno-miR-34c-5p	1.38827	0.017
	rno-miR-30d-5p	0.90920	0.032
	rno-miR-103-3p	0.89165	0.009
	rno-miR-185-5p	0.83723	0.012
	rno-miR-98-5p	1.03522	0.014
	rno-miR-26a-5p	0.61820	0.041
	rno-miR-3596a	1.35	0.00024
	rno-miR-149-3p	1.23	0.0092
	rno-miR-425-5p	1.21	0.007
	rno-miR-132-3p	1.16	0.041
	rno-let-7b-3p	1.1	0.014
	rno-miR-3102	1.07	0.041
	rno-miR-34b-3p	1.05	0.037
	rno-miR-331-3p	1.05	0.033
	rno-miR-196b-5p	1.04	0.022
	rno-miR-98-5p	1.035	0.014
	rno-miR-34c-3p	0.97	0.037
	rno-miR-7a-1-3p	0.93	0.031

Таблица 1. Окончание

Тип РНК и изменение экспрессии в группе с ПТСР	Название	Кратность изменения (log2 fold change)	Padj
микроРНК, снижение экспрессии	rno-miR-146b-5p	0.91	0.0044
	rno-miR-103-3p/107-3p	0.89	0.0099
	rno-miR-342-3p		
	rno-miR-369-3p	0.86	0.025
	rno-let-7g-5p	0.74	0.033
	rno-let-7i-5p	0.71	0.035
	rno-miR-148b-3p	0.63	0.044
		0.60	0.026
	rno-miR-411-3p	-1.63	1.05e-05
	rno-miR-503-3p	-1.69	0.0012
	rno-miR-207	-1.70	0.00017
	rno-miR-142-5p	-1.71	0.027
	rno-miR-539-3p	-1.87	0.012
	rno-miR-30a-3p	-0.73	0.013
	rno-miR-185-3p	-0.79	0.0145
	rno-miR-30e-3p	-1.08	0.0073
	rno-miR-101a-3p	-1.32	0.0002
	rno-let-7a-1-3p/7c-2-3p	-0.94	0.0198
	rno-miR-29b-3p		
	rno-miR-3556b	-0.80	0.0166
	rno-miR-743b-3p	-0.63	0.0032
	rno-miR-3587	-0.73	0.037
	rno-miR-672-5p	-0.84	0.009
	rno-miR-126a-5p	-0.90	0.037
	rno-miR-27b-3p	-0.91	0.0031
	rno-miR-203a-3p	-0.91	0.0036
	rno-miR-3065-5p	-0.92	0.0070
	rno-miR-497-5p	-0.97	0.034
	rno-miR-758-3p	-0.97	0.0062
	rno-miR-27a-3p	-0.97	0.039
	rno-miR-3542	-1.00	0.012
	rno-miR-503-5p	-1.03	0.021
	rno-miR-210-3p	-1.07	0.036
	rno-miR-3583-3p	-1.08	0.006
	rno-miR-3590-5p	-1.09	0.027
	rno-miR-130a-3p	-1.10	0.032
	rno-miR-3574	-1.14	0.014
	rno-miR-29c-3p	-1.15	0.0053
	rno-miR-3072	-1.19	1.4e-05
	rno-miR-203b-5p	-1.19	0.016
	rno-miR-24-2-5p	-1.25	0.0066
	rno-miR-149-5p	-1.29	0.046
	rno-miR-301a-3p	-1.3	0.0056
	rno-miR-532-5p	-1.3	0.023
	rno-miR-592	-1.31	0.00023
	rno-miR-203a-5p	-1.32	0.011
	rno-miR-542-3p	-1.32	0.0045
	rno-miR-31a-3p	-1.33	0.0070
	rno-miR-126a-3p	-1.35	0.0036
	rno-miR-224-3p	-1.35	0.0004
	rno-miR-322-5p	-1.36	0.024
	rno-miR-3357	-1.45	0.018
		-1.45	0.0062

Padj – значение *P* с поправкой на множественные сравнения.

секреции глюкокортикоидов, что также характерно для больных депрессией (Czén et al., 2016).

Экспериментальные исследования на человеке не проводятся по очевидным причинам, однако в эпидемиологических исследованиях также была обнаружена связь между стрессом отца и физиологическими и психологическими особенностями потомства. Показано, что в семьях больных ПТСР наблюдается усиление ПТСР-подобных симптомов у их потомков, хотя такие потомки воздействию какого-либо травматического стресса не подвергались. (Yehuda et al., 2007a, 2007b). Таким образом, можно считать доказанным то, что психопатология отца, связанная со стрессовым воздействием, оказывает специфическое влияние на потомков.

В настоящее время в качестве основного механизма передачи эффектов отцовского стресса потомкам рассматривается эпигенетическая модификация генома в сперматозоидах, связанная с метилированием ДНК, модификацией гистонов и экспрессией некодирующих РНК, в том числе микро- и piwiРНК (Rodgers et al., 2015; Morgan et al., 2019, 2020; Xavier et al., 2019). Такие модификации с большей вероятностью могут происходить только в зреющих сперматозоидах на стадиях от сперматогониев до сперматид (Lu et al., 2015). В настоящей работе мы сосредоточились на анализе влияния модельной психопатологии отца на содержание в сперме коротких РНК, играющих важнейшую роль в регуляции экспрессии генов и обеспечивающих нормальный сперматогенез.

МикроРНК играют критическую роль в регуляции экспрессии большого числа генов, действуя в основном на пост-транскрипционном уровне, хотя не исключена возможность их воздействия на структуру хроматина, и, следовательно, транскрипционную активность генов. В настоящий момент у человека аннотировано 2656, у мыши — 1978 и у крысы (*R. norvegicus*) — 764 микроРНК (<http://www.mirdb.org/statistics.html>). МикроРНК регулируют ключевые процессы в эмбриональном развитии и дифференцировке; продукты некоторых генов, регулируемых микроРНК, играют важную роль в процессах сперматогенеза. Дисрегуляция продукции микроРНК в процессе созревания сперматозоидов рассматривается как одна из причин мужского бесплодия (Kamalidehghan et al., 2020). Кроме того, нормальный паттерн экспрессии микроРНК в сперме имеет особое значение в контроле транскрипционного гомеостаза зиготы (Yuan et al., 2016; Guo et al., 2017). Важно, что измененный паттерн экспрессии микроРНК в сперме может быть передан потомству (Godia et al., 2018).

Другой класс малых некодирующих РНК, обильно представленный в сперматозоидах — это piwiРНК. Данный тип РНК обнаруживаются преимущественно в клетках зародышевой линии и в сперматозоидах; они несколько длиннее, чем микроРНК

(26–32 нуклеотида). Биогенез piwiРНК до конца не изучен. Основная функция, которую выполняет этот класс молекул, действуя совместно с белками PIWI, по которым они получили свое название — это пост-транскрипционный сайленсинг транспозонов (Czech et al., 2008; Ozata et al., 2019). Считается, что piwiРНК могут выполнять какие-то регуляторные функции, однако точные механизмы этого остаются неизвестными.

Выраженные статистически значимые отличия содержания в сперме микро- и piwiРНК мы обнаружили у самцов с моделированным ПТСР при сравнении их с группой контроля. Дифференциальная экспрессия была выявлена для 27 piwiРНК и для 77 микроРНК. В наибольшей степени (более чем в 3 раза) была повышена экспрессия микроРНК gno-miR-375-3p, gno-miR-106b-3p, gno-let-7a-5p, gno-let-7d-5p; среди микроРНК с наиболее значимым снижением экспрессии можно выделить gno-miR-539-3p, gno-miR-142-5p, gno-miR-207, gno-miR-503-3p (см. табл. 1). Различия между группой ДПС и контрольной группой были крайне незначительными. Достоверные отличия были выявлены только для двух piwiРНК (gno_piR_019288 и gno_piR_016741), экспрессия которых была повышена в группе ДПС. Стоит заметить, что результаты этой группы оказались весьма неоднородными (рис. 2). Два образца (X9 и X10) по паттерну экспрессии коротких РНК напоминали образцы группы контроля, а остальные три образца были похожи на группу с моделированным ПТСР.

Нельзя исключить того, что при действии стресса в парадигме выученной беспомощности не все самцы развивают классическое ДПС, и без дополнительного контроля не только уровня кортикостерона в крови, но и какого-то еще признака из ДПС, например, изменений поведения стрессированных самцов, нам не удалось создать однородную группу экспериментальных животных. С другой стороны, мы показали ранее, что эффекты отцовской психопатологии значительно менее выражены в группе с ДПС, и возможно, что при стрессовом воздействии такого рода изменение экспрессии коротких РНК в сперме может иметь вероятностный характер. В целом, ПТСР-подобное состояние самцов оказывает несомненное воздействие на паттерн экспрессии коротких РНК в сперматозоидах, в то время как влияние ДПС отца на этот показатель нуждается в уточнении.

Ранее в ряде исследований других авторов были предприняты попытки оценить влияние стресса самцов на содержание в сперматозоидах некоторых микроРНК. Так, в одном из исследований, (Rogers et al., 2013), с использованием метода ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ПЦР-РВ-ОТ) авторы обнаружили в сперме самцов мышей, подвергнутых хроническому умеренному стрессу в период сперматогенеза, повышение содержания 9

микроРНК (miR29-a, miR30-a, miR30c, miR32, miR193, miR204, miR375, miR532-3p, miR698). В другой работе, в которой изучали последствия хронического введения самцам мышей кортикостерона, показано увеличение в сперме содержания других микроРНК (miR98, miR144, miR190b) (Short et al., 2016). В исследовании с помощью NGS экспрессии микроРНК в сперме взрослых мышей, подвергнутых длительному отъему от матери, авторы обнаружили повышение в ней miR-200b-3p, miR-672-5p, miR-375-3p, miR-375-5p, miR-46-5p (Gapp et al., 2014).

Следует отметить, что эти исследования были проведены на мышах, геном которых аннотирован гораздо лучше, чем у крыс, а авторы использовали различные системы анализа экспрессии коротких РНК (ПЦР-РВ-ОТ и NGS). Тем не менее, мы обнаружили частичное совпадение полученных нами результатов с этими данными из литературы. Так, по нашим данным, в наибольшей степени в сперме самцов с ПТСР-подобным состоянием увеличена экспрессия miR-375-5p, что было выявлено и в упомянутых выше работах (Rogers et al., 2013; Gapp et al., 2014). Повышение экспрессии miR-30 (в нашей работе, прежде всего, gno-miR-30d-5p) тоже было отмечено другими авторами (Rogers et al., 2013). Таким образом, несмотря на различия модельных объектов, используемых типов стрессовых воздействий и других деталей, изменение экспрессии некоторых микроРНК при отцовском стрессе может носить универсальный характер.

Список некоторых из предполагаемых генов-мишеней для микроРНК, экспрессия которых изменяется в сперматозоидах самцов с моделированным ПТСР, представлен в табл. 2. Анализируя возможные мишени, мы выделили две группы генов, которые, с нашей точки зрения, представляют особый интерес. Это, во-первых, гены, продукты которых участвуют в метилировании ДНК (*Dnmt3a*), модификациях гистонов через метилирование и деацетилирование (*Setd5*, *Hdac1*, *Mllt10*) и в регуляции РНК-интерференции (*Tnrc6b*, *Mtdh*). Для нашего исследования эти гены представляют значительный интерес, потому что все они вовлечены в гипотетические механизмы передачи отцовских эффектов потомству, а установленные в гаметах или в раннем эмбрионе эпигенетические метки, влияющие на их работу, способны привести к очень широкому спектру последствий.

Другую группу, выделенную нами, составили гены, связанные с функционированием инсулиноподобного фактора роста 2 (*Igf2*, *Igf2bp2*, *Igf2r*). Ранее мы показали, что экспрессия гена *Igf2* изменена в ЦНС у потомства самцов с ПТСР-подобным состоянием (Ordyan et al., 2020; Ордян и др., 2021a, 2021b).

В их регуляции задействованы многочисленные микроРНК семейств let-7, а также miR-30 и miR-185. Мы обнаружили кооперативное повышение экспрессии микроРНК семейства let-7, которое может иметь широкий спектр последствий, так как эти молекулы вовлечены в регуляцию гомеостаза глюкозы и чувствительности к инсулину, а также в регуляцию метилирования гистонов через ген *Mllt10*. Известно, что повышенная экспрессия микроРНК из семейства let-7 у мышей снижает размер тела и его массу вследствие уменьшения массы жира и ухудшении толерантности к глюкозе (Frost et al., 2011). В свою очередь, мы выявили ранее торможение соматического развития в ранний неонатальный период у потомков отцов с моделированным ПТСР (Ordyan et al., 2021). Вопрос о том, может ли изменение экспрессии микроРНК семейства let-7 в сперматозоидах самцов оказать влияние на соматическое развитие потомков, остается открытым и нуждается в дальнейшем исследовании. Принципиальная возможность влияния микроРНК, введенных в зиготу, на фенотип потомков, была доказана (Rodgers et al., 2015).

Таким образом, мы показали, что ПТСР-подобное состояние самцов, которое моделировали в парадигме “стресс–рестресс”, влияет на спектр малых РНК (микроРНК и piwiРНК) в сперме. Выявленные отдельные совпадения с изменениями спектра коротких РНК у других авторов при использовании других моделей стрессовых воздействий и других видов животных и человека свидетельствует об универсальном характере изменения экспрессии некоторых микроРНК вследствие отцовского стресса. Дальнейшие исследования в этом направлении, в том числе с использованием спермы человека, могут способствовать выявлению специфических биомаркеров в сперме, которые будут свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе для здоровья потомства и смогут служить диагностическим критерием нежелательности зачатия при воздействии стрессов на отца.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (тема № 0134-2019-0002) и Института акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта (тема ФНИ № АААА-А19-119021290033-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу проводили с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, утвержденными правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по гуманному обращению с животными Института Физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Таблица 2. Предсказанные мишени для некоторых микроРНК, дифференциально экспрессированных в сперме самцов с моделированным ПТСР по сравнению с группой контроля

микроРНК	Гены-мишени								
	<i>Dnmt3a</i> (a)	<i>Setd5</i> (a)	<i>Turc6b</i> (a)	<i>Hdac1</i> (a)	<i>Mllt10</i> (a)	<i>Mtdh</i> (a)	<i>Igf2</i> (б)	<i>Igf2bp2</i> (б)	<i>Igf2r</i> (б)
с повышенной экспрессией									
let-7-a-5p									
let-7-b-5p									
let-7-c-5p									
let-7-d-5p									
let-7-g-5p									
let-7-i-5p									
rno-miR-30d-5p									
rno-miR-34c-5p									
с пониженной экспрессией									
let7a-1-3p/let-7c-2-3p									
rno-miR-29b-3p									
rno-miR-30a-3p									
rno-miR-30e-3p									
rno-miR-30b-3p									
rno-miR-101a-3p									
rno-miR-185-3p									
rno-miR-185-5p									
rno-miR-98-5p									
rno-miR-103-3p									

(a) — Гены, вовлеченные в регуляцию хроматина, метилирования, процессинга микроРНК; (б) — гены, вовлеченные в регуляцию инсулиноподобного фактора роста 2. Цветом выделены ячейки, показывающие возможные взаимодействия между дифференциально экспрессированными микроРНК и генами-мишенями, предсказанными с использованием базы микроРНК (<http://www.mirdb.org/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ордян Н.Э., Малышева О.В., Холова Г.И., Акулова В.К., Пивина С.Г. 2021а. Зависимое от пола влияние стресса самцов крыс на память и экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 в мозге потомков. Журнал высшей нервной деятельности. Т. 71. № 3. С. 387. (Ordyan N.E., Malysheva O.V., Holova G.I., Akulova V.K., Pivina S.G. 2021. Sex-dependent influence of male rat stress on the memory and expression of the insulin-like growth factor 2 gene in the offspring brain. Zhurnal Vysshei Nervnoi Deyatelnosti imeni I. P. Pavlova. V. 71. № 3. P. 387.) <https://doi.org/10.31857/S0044467721030060>
- Ордян Н.Э., Малышева О.В., Акулова В.К., Холова Г.И., Пивина С.Г. 2021б. Нарушение когнитивных функций потомков самцов крыс, подвергнутых стрессированию в парадигмах “стресс–рестресс” или “выученная беспомощность”: роль инсулиноподобного фактора роста 2. Интегративная физиология. Т. 2. № 1. С. 61. (Ordyan N.E., Malysheva O.V., Akulova V.K., Holova G.I., Pivina S.G. 2021b. Cognitive impairment in the offspring of male rats exposed to stress in “stress – restress” or “learned helplessness” paradigms: The role of insulin-like growth factor 2. Integrative Physiology. V. 2. № 1. P. 61.) <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-61-70>
- Пивина С.Г., Ракицкая В.В., Акулова В.К., Ордян Н.Э. 2015. Активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы пренатально стрессированных самцов крыс в экспериментальной модели посттравматического стрессового расстройства. Бюллетень экспер. биол. мед. Т. 160. № 11. С. 542. (Pivina S.G., Rakitskaya V.V., Akulova V.K., Ordyan N.E. 2016. Activity of the hypothalamic–pituitary–adrenal system in prenatally stressed male rats on the experimental model of post-traumatic stress disorder. Bull. Exper. Biol. Med. V. 160. P. 601.) <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3227-3>
- Chen Q., Yan M., Cao Z., Li X., Zhang Y., Shi J., Feng G., Peng H., Zhang X., Zhang Y., Qian J., Duan E., Zhai Q., Zho Q. 2016. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. Science. V. 351. P. 397. <https://doi.org/10.1126/science.aad7977>
- Czech B., Munafó M., Ciabrelli F., Eastwood E.L., Fabry M.H., Kneuss E., Hannon G.J. 2018. piRNA-guided genome defense: from biogenesis to silencing. Annu. Rev. Genet. V. 52. P. 131. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031441>

- Czén B., Fuchs E., Wiborg O., Simon M. 2016. Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*. V. 64. P. 293. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.04.004>
- Dietz D.M., LaPlant Q., Watts E.L., Hodes G.E., Russo S.J., Feng J., Oosting R.S., Vialou V., Nestler E.J. 2011. Paternal transmission of stress-induced pathologies. *Biol. Psychiatry*. V. 70. P. 408. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.05.005>
- Dimofski P., Meyre D., Dreumont N., Leininger-Muller B. 2021. Consequences of paternal nutrition on offspring health and disease. *Nutrients*. V. 13. P. 2818. <https://doi.org/10.3390/nu13082818>
- Duffy K.A., Bale T.L., Epperson C.N. 2021. Germ cell drivers: transmission of preconception stress across generations. *Front. Hum. Neurosci.* V. 15. P. 642762. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.642762>
- Franklin T.B., Russig H., Weiss I.C., Gräff J., Linder N., Michalon A., Vizi S., Mansuy I. 2010. Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biol. Psychiatry*. V. 68. P. 408. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.036>
- Frost R.J.A., Olson E.N. 2011. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 108. P. 21075. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118922109>
- Fullston T., Ohlsson Teague E.M., Palmer N.O., DeBlasio M.J., Mitchell M., Corbett M., Owens M. 2013. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *FASEB J.* V. 27. P. 4226. <https://doi.org/10.1096/fj.12-224048>
- Gapp K., Jawaid A., Sarkies P., Bohacek J., Pelczar P., Prados J., Farinell L., Miska E., Mansuy I. 2014. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat. Neurosci.* V. 17. P. 667. <https://doi.org/10.1038/nn.3695>
- Godia M., Swanson G., Krawetz S.A. 2018. A history of why fathers' RNA matters. *Biol. Reprod.* V. 99. P. 147. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox007>
- Guo L., Chao S.-B., Xiao L., Wang Z.-B., Meng T.-G., Li Y.-Y., Han Z.-M., Ouyang Y.-C., Hou Y., Sun Q.-Y., Ou X.-H. 2017. Sperm-carried RNAs play critical roles in mouse embryonic development. *Oncotarget*. V. 8. P. 67394. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18672>
- Harker A., Carroll C., Raza S., Kolb B., Gibb R. 2018. Preconception paternal stress in rats alters brain and behavior in offspring. *Neurosci.* V. 388. P. 474. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.06.034>
- Huang Y., Zhang J.L., Yu X.L., Xu T.S., Wang Z., Bin Z., Chao X. 2013. Molecular functions of small regulatory noncoding RNA. *Biochemistry*. V. 78. P. 221. <https://doi.org/10.1134/S0006297913030024>
- Jodar M., Selvaraju S., Sendler E., Diamond M.P., Krawetz S.A. 2013. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Hum. Reprod. Update*. V. 19. P. 604. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt031>
- Kamalidehghan B., Habibi M., Afjeh S.S., Shoai M., Alidoost S., Ghal R.A., Eshghifar N., Pouresmaeli F. 2020. The importance of small non-coding RNAs in human reproduction: a review article. *Application Clinical Genetics*. V. 13. P. 1. <https://doi.org/10.2147/TACG.S207491>
- Kiani J., Rassoulzadegan M. 2013. A load of small RNAs in the sperm — how many bits of hereditary information? *Cell Res.* V. 23. P. 18. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.181>
- Love M.I., Huber W., Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* V. 15. P. 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Ly L., Chan D., Trasler J.M. 2015. Developmental windows of susceptibility for epigenetic inheritance through the male germline. *Seminars Cell Devel. Biol.* V. 43. P. 96. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.07.006>
- Morgan C.P., Chan J.C., Bale T.L. 2019. Driving the next generation: paternal lifetime experiences transmitted via extra-cellular vesicles and their small RNA cargo. *Biol. Psychiatry*. V. 85. P. 164. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.09.007>
- Morgan C.P., Shetty A.C., Chan J.C., Berger D.S., Ament S.A., Epperson C.N., Bale T.L. 2020. Repeated sampling facilitates within- and between-subject modeling of the human sperm transcriptome to identify dynamic and stress-responsive sncRNAs. *Scientific Reports*. V. 10. P. 17498. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73867-7>
- Ordyan N.E., Malysheva O.V., Akulova V.K., Pivina S.G., Kholova G.I. 2020. The capability to learn and expression of the insulin-like growth factor II gene in the brain of male rats whose fathers were subjected to stress factors in the “stress—restress” paradigm. *Neurochem. J.* V. 14. P. 191. <https://doi.org/10.1134/S1819712420020075>
- Ordyan N.E., Pivina S.G., Akulova V.K., Kholova G.I. 2021. Changes in the nature of behavior and the activity of the hypothalamic-adrenocortical system in the offspring of paternal rats subjected to stress in the stress—restress paradigm before mating. *Neurosci. Behav. Physiol.* V. 51. P. 528. <https://doi.org/10.1007/s11055-021-01100-7>
- Ozata D.M., Gainetdinov I., Zoch A., O'Carroll D., Zamore P.D. 2019. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nat. Rev. Genet.* V. 20. P. 89. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0073-3>
- Peng H., Shi J., Zhang Y., Zhang H., Liao S., Li W., Lei L., Han C., Ning L., Cao Y., Zhou Q., Chen Q., Duan E. 2012. A novel class of tRNA-derived small RNAs extremely enriched in mature mouse sperm. *Cell Res.* V. 22. P. 1609. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.141>
- Rando O.J. 2012. Daddy issues: paternal effects on phenotype. *Cell*. V. 151. P. 702. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.020>
- Rodgers A.B., Morgan C.P., Bronson S.L., Revello S., Bale T.L. 2013. Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation. *J. Neurosci.* V. 33. P. 9003. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0914-13.2013>
- Rodgers A.B., Bale T.L. 2015. Germ cell origins of posttraumatic stress disorder risk: the transgenerational impact of parental stress experience. *Biol. Psychiatry*. V. 78. P. 307. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.03.018>
- Rodgers A.B., Morgan C.P., Leu N.A., Bale T.L. 2015. Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA. V. 112. P. 13699.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1508347112>
- Sharma A. 2013. Transgenerational epigenetic inheritance: Focus on soma to germline information transfer. *Progress Biophysics Mol. Biology*. V. 113. P. 439.
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2012.12.003>
- Short A.K., Fennell K.A., Perreau V.M., Fox A., O'Bryan M.K., Kim J.H., Bredy T.W., Pang T.Y., Hannan A.J. 2016. Elevated paternal glucocorticoid exposure alters the small non-coding RNA profile in sperm and modifies anxiety and depressive phenotypes in the offspring. *Transl. Psychiatry*. V. 6. P. e837. Ye
- Xavier M.J., Roman S.D., Aitken R.J., Nixon B. 2019. Transgenerational inheritance: how impacts to the epigenetic and genetic information of parents affect offspring health. *Hum. Reprod. Update*. V. 25. P. 518.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmz017>
- Yan W. 2014. Potential roles of noncoding RNAs in environmental epigenetic transgenerational inheritance. *Mol. Cell. Endocrinol.* V. 398. P. 24.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.09.008>
- Yehuda R., Blair W., Labinsky E., Bierer L.M. 2007a. Effects of parental PTSD on the cortisol response to dexamethasone administration in their adult offspring. *Am. J. Psychiatry*. V. 164. P. 163.
<https://doi.org/10.1176/ajp.2007.164.1.163>
- Yehuda R., Teicher M.H., Seckl J.R., Grossman R.A., Morris A., Bierer L.M. 2007b. Parental posttraumatic stress disorder as a vulnerability factor for low cortisol trait in offspring of Holocaust survivors. *Archiv. Gen. Psychiatry*. V. 64. P. 1040.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.9.1040>
- Yeshurun S., Hannan A.J. 2019. Transgenerational epigenetic influences of paternal environmental exposures on brain function and predisposition to psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry*. V. 24. P. 536.
<https://doi.org/10.1038/s41380-018-0039-z>
- Yuan S., Schuster A., Tang C., Yu T., Ortogero N., Bao J., Zheng H., Yan W. 2016. Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs are important for fertilization and preimplantation embryonic development. *Develop.* V. 143. P. 635.
<https://doi.org/10.1242/dev.131755>

Changes in the Content of Small Non-Coding RNAs in Spermatozoa as a Possible Mechanism of Transgenerational Transmission of the Effects of Paternal Stress: Experimental Research

O. V. Malysheva^{a, b, *}, S. G. Pivina^a, E. N. Ponomareva^b, and N. E. Ordyan^a

^a*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Science, St. Petersburg, 199034 Russia*

^b*Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology, St. Petersburg, 199034 Russia*

*e-mail: omal99@mail.ru

It has been proven that the stress of the father can affect the phenotype of offspring, causing somatic, behavioral, hormonal and molecular changes. One of the hypothetical mechanisms responsible for the transmission of paternal effects to offspring may be a change in the spectrum of regulatory non-coding RNAs in spermatozoa. In this paper, we investigated the effect of paternal stress in models of post-traumatic stress disorder (PTSD) and depression on the representation of small RNAs (micro- and piwiRNAs) in the sperm of stressed animals. Male Wistar rats were subjected to stress in two paradigms ("stress—restress" and "learned helplessness"), which leads to the development of PTSD-like and depressive-like states in model animals, respectively. 48 days after the restress, sperm preparations were received and RNA was isolated. The spectrum of small RNAs was studied by NGS sequencing. In males with a PTSD-like condition, a change in the expression of 27 piwi RNAs and 77 microRNAs was detected compared with the control group. Among the targets of these miRNAs, it is possible to identify genes whose products may be involved in such mechanisms of transmission of paternal effects to offspring as changes in DNA methylation, histone modifications and RNA interference (*Dnmt3a*, *Setd5*, *Hdac1*, *Mllt10*, *Mtdh*), as well as genes associated with the functioning of insulin-like growth factor 2, the expression of which as previously shown, it is altered in the central nervous system in the offspring of males with a PTSD-like condition (*Igf2*, *Igf2bp2*, *Igf2r*). No changes in the representation of small RNAs were registered in males with a simulated depression-like state. The results indicate a pronounced effect of paternal stress on the spectrum of short non-coding RNAs in sperm cells in rats, however, it depends on the nature of the stress effect.

Keywords: paternal stress, depression, post-traumatic stress disorder, sperm, small noncoding RNAs, microRNAs, piwiRNAs, rat

УДК 577.33

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АТМОСФЕРНОЙ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЕННОЙ СТРУИ В ОТНОШЕНИИ 3D-КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. Е. А. Патракова^{1, 2}, М. М. Бирюков^{1, 2, 5}, *, О. С. Троицкая^{1, 5}, Д. Д. Новак^{1, 2, 5}, Е. В. Милахина^{3, 5}, П. П. Гугин^{4, 5}, Д. Э. Закревский^{3, 4, 5}, И. В. Швейгерт⁵, О. А. Коваль^{1, 2, 5}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

³Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, 630073 Россия

⁴Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

⁵Институт теоретической и прикладной механики им. С.А. Христиановича СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

*E-mail: biryukov.mm@ya.ru

Поступила в редакцию 03.08.2022 г.

После доработки 28.09.2022 г.

Принята к публикации 28.09.2022 г.

Воздействие на солидные опухоли струей холодной плазмы (ХПС) является инновационным подходом, который активно начали разрабатывать лишь в последнее десятилетие. Вследствие этого актуальны исследования, направленные на выявление условий селективности такого воздействия на опухолевые клетки, в том числе в составе 3D-моделей, имитирующих злокачественные новообразования. Известно, что основные цитотоксические эффекты ХПС обуславливают активные формы кислорода и азота, которые образуются в потоке плазмы, и доступность которых может отличаться для клеток в классических 2D- и 3D-моделях культивирования. В настоящей работе использовали многоклеточные сфероиды из клеток MCF7-EGFR с гиперэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), клетки родительской линии аденокарциномы молочной железы MCF7, а также клетки нетрансформированной молочной железы человека MCF10A. Облучение сфероидов MCF7-EGFR вело к деструкции многоклеточных 3D-структур на отдельные клетки с активацией в них процессов гибели. Показано, что клетки облученных сфероидов подвергаются фагоцитозу активированными макрофагами. При сравнении прямого воздействия ХПС и культивирования сфероидов MCF7-EGFR в среде, облученной ХПС (СО-ХПС), обнаружено большее содержание активных форм кислорода и азота в клетках сфероидов при культивировании в облученной среде, что далее ведет к большему цитотоксическому эффекту, чем при прямом облучении. Показано, что цитотоксические свойства СО-ХПС лучше сохраняются при хранении такой среды при 4, чем при –20°C. Таким образом, для индукции гибели опухолевых клеток в составе сфероидов добавление культуральной среды, облученной ХПС, было эффективнее, чем прямое облучение клеток.

Ключевые слова: 3D-сфероиды, холодная плазменная струя, противоопухолевая терапия, активные формы кислорода, EGFR, аденокарцинома молочной железы

DOI: 10.31857/S004137712301008X, **EDN:** GLBBFZ

Проблема недостаточной эффективности существующих методов терапии онкобольных обусловлена тем, что многообразие генетических дефектов опухолевых клеток и их сочетаний делает опухоли высокогетерогенными, что, в свою очередь, диктует

необходимость дифференцированных подходов к лечению. Рак молочной железы (РМЖ) — наиболее частое злокачественное новообразование у женщин, которое занимает второе место в структуре смертности населения от злокачественных новообразований во всем мире, уступая только раку легкого (Sung et al., 2021). Поэтому, разработка новых подходов к терапии солидных опухолей не теряет своей актуальности.

В настоящее время активно развивается плазменная медицина, исследующая электромагнитное и химическое воздействие плазменных образований на биологические объекты, изменяющих гомеостаз клетки. Стимулированные плазмой химические ре-

Принятые сокращения: АФА — активные формы азота; АФК — активные формы кислорода; ЗМП — заземленная металлическая подложка; МТТ-реагент — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид; РМЖ — рак молочной железы; СО-ХПС — среда, облученная ХПС; УФО — ультрафиолетовое облучение; ХПС — холодная плазменная струя; EGFR — рецептор эпидермального фактора роста; H₂DCFDA — 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеина диацетат; PMA — фобол-12-миристан-13-ацетат.

акции в жидкости и в клетке ведут к повышению концентраций кислород- и азотсодержащих активных радикалов и ионов, которые взаимодействуют с клеточными структурами и молекулами, повреждая их и вызывая клеточную гибель. Газоразрядная неравновесная плазма, применяемая в плазменной медицине, состоит из низкоэнергетичных ионов и высокоэнергетичных электронов, ионизирующих газ и генерирующих радикалы, вступающие в реакции со всеми основными типами биополимеров клетки — липидами, углеводами, белками и нуклеиновыми кислотами (Attri et al., 2015; Klinkhammer et al., 2017). Температура газа в плазменной струе остается близкой к температуре тела человека, что делает возможным ее использование в медицинских целях. Применение именно инертных газов в плазменных струях обусловлено низким напряжением пробоя таких газов (порядка нескольких кВ). В основном, в качестве рабочего газа используются аргон и гелий, что связано с их доступностью.

Успешное применение холодной плазмы для заживления поверхностных ран, атопических дерматитов и диабетической стопы у человека указывало на то, что применение ХПС также будет безопасно при облучении зоны опухоли (Domonkos et al., 2021). В 2015 г. пациенты с немелкоклеточной карциномой головы и шеи с изъязвленными опухолями были подвергнуты облучению холодной плазмой, в результате чего был достигнут ряд терапевтических эффектов: уменьшение бактериальной нагрузки, частичное заживление язв и, в некоторых случаях, торможение роста опухоли в зоне прямого воздействия плазмы (Metelmann et al., 2015).

Поскольку в экспериментах *in vitro* показана чувствительность опухолевых клеток различного гистологического происхождения к действию холодной плазмы и культуральной среды, облученной плазмой (СО-ХПС), потенциал этого метода для противоопухолевой терапии оценивают как многообещающий, и уже определены категории больных, для которых облучение холодной плазмой может иметь значительные терапевтические эффекты (Dai et al., 2018). В то же время, число исследований биологических и химических эффектов холодной плазмы в отношении 3D-клеточных моделей опухолей, позволяющих выявить параметры облучения, при которых эффективно подавляется пролиферация большинства опухолевых клеток в составе сфероидов, пока невелико (Judée et al., 2016; Wiegand et al., 2016; Xu et al., 2016; Wanigasekara et al., 2022).

Применение 3D-клеточных моделей для доклинических исследований по сравнению с классическими 2D-моделями имеет ряд преимуществ: они более точно отражают межклеточные взаимодействия, пространственную организацию рецепторов клеточной поверхности, распределение метаболитов и кислорода в межклеточном пространстве (Ferreira et al., 2018; Colombo, Cattaneo 2021; Salinas-Vera et al., 2022).

Поэтому использование 3D-сфероидов в качестве модели для облучения ХПС имеет существенное значение для последующей трансляции метода в клиническую практику.

В настоящей работе для облучения применяли газоразрядное устройство, генерирующее последовательность стримеров при синусоидальном рабочем напряжении с диапазоном частоты 13–40 кГц. Стримеры распространялись от плазменного устройства по струе гелия или аргона в окружающем воздухе при атмосферном давлении и касались облучаемых объектов (клеток или культуральной среды). Способ воздействия плазмой, когда стримеры касались непосредственно клеток, называется прямым облучением, в отличие от опосредованного воздействия, когда плазмой облучается питательная среда (СО-ХПС), которая затем добавляется к клеткам.

Оптимизация условий облучения для преимущественной гибели опухолевых клеток входила в задачи нашего исследования. Нам удалось определить длительность облучения, обеспечивающую преимущественную гибель раковых клеток человека для условий с заземленным электродом под планшетом с клетками и без него. Мы показали, что как прямое облучение, так и культивирование клеток в присутствии СО-ХПС, снижает жизнеспособность клеток MCF7 в дозозависимом режиме. Далее были изучены эффекты прямого облучения плазмой и СО-ХПС в отношении сфероидов РМЖ.

В качестве 3D-клеточной модели для исследования эффектов ХПС в работе использовали полученную нами ранее линию MCF7-EGFR, растущую преимущественно в виде сфероидов без использования гидрогелей и факторов роста (Troitskaya et al., 2021).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Реактивы и материалы. Использовали: культуральные среды IMDM, RPMI-1640, DMEM, термически инактивированную эмбриональную сыворотку телят (FBS) и раствор антибиотиков-антимикотиков (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин) (GIBCO, Life Technologies, США), GlutaMAX™ (GIBCO, Invitrogen, Франция), раствор йодистый пропидий (BD Pharmingen Apoptosis Detection Kit; BD Biosciences, США), натрий-фосфатный буфер (PBS), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (MTT), форбол-12-миристат 13-ацетат (PMA; Sigma-Aldrich, США), H₂DCFDA и StemPro™ Accutase (Thermo Fisher Scientific, США), красители цитоплазмы Cell Tracker Green и Cell Tracker Red (Life Technologies, США), ДМСО (Рехим, Москва, Россия), флаконы для культивирования с площадью поверхности 25 см² (TPP, Швейцария), 96-луночные планшеты и 6-луночные планшеты (Thermo Scientific, Япония), электронные планшеты

Е-планшеты RTCA (ASEA Biosciences, США), набор реагентов Griess Reagent System (Promega, США).

Оборудование. Использовали: центрифугу Mini-spin (Eppendorf, Германия), CO₂-инкубатор (Heraeus, Германия), инвертированный флуоресцентный микроскоп Eclipse Ti2 (Nikon Corporation, Япония), систему iCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA; ACEA Biosciences, США), проточный цитометр BD FACSCantoII (BD Biosciences, США), многоканальный спектрофотометр (Berthold Technologies, Германия).

Клеточные линии и их культивирование. Клеточная линия MCF7-EGFR была получена в лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия) методом ретровирусной трансдукции как описано (Troitskaya et al., 2021).

Клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF7 (ACC 115, DSMZ, Германия) и эпителиальные клетки молочной железы MCF10A (ATCC CRL-10317; Манасас, США) выращивали в среде IMDM, клетки острой моноцитарной лейкемии THP-1 (из коллекции культур клеток позвоночных ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия) культивировали в среде RPMI-1640, клетки MCF7-EGFR выращивали в среде DMEM в присутствии 10% FBS, 2 mM L-глутамин и 1%-ного раствора антибиотиков-антимикотиков (100 ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина сульфата, 0.25 мкг/мл амфотерицина) при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в атмосфере CO₂ ($5.0 \pm 0.5\%$).

Для пассирования сфероиды MCF7-EGFR размером более 500 мкм диссоциировали до единичных клеток добавлением реактива StemPro™ Accutase как рекомендовано производителем, после чего клетки высаживали в 96-луночные или 24-луночные планшеты по 1×10^4 или 4×10^4 клеток на лунку соответственно и культивировали в стандартных условиях в течение 5–7 сут до образования открепленных сфероидов.

Холодная плазменная струя (ХПС). В работе для генерации плазменной струи использовали источник синусоидального напряжения с диапазоном частоты $f \approx 13\text{--}40$ кГц и напряжением $U = 3.5\text{--}5$ кВ. Газоразрядная ячейка выполнена в виде коаксиального диэлектрического канала длиной 100 мм с внутренним диаметром 8 мм, на выходе из которого размещен диэлектрический капилляр с диаметром 2.3 мм, формирующий сопло. Внутри канала соосно размещен стержневой электрод длиной 50 мм и диаметром 2 мм. У сопла диэлектрического канала расположен кольцевой заземленный электрод, который вместе с внутренним потенциальным электродом формирует разрядную зону. Инертный газ поступает в диэлектрический канал плазменного источника со скоростью 3–9 л/мин и распространяется до облучаемой мишени. Дополнительный заземленный металлический электрод располагался на расстоянии 2.5 см от сопла устройства перпендикулярно направлению распространения струи.

При прямой обработке клеток, культивируемых в 100 мкл среды, после облучения добавляли 100 мкл свежей среды в лунки и продолжали культивирование в стандартных условиях. В экспериментах с добавлением облученной культуральной среды (СО-ХПС), ее объем составлял 1/2 финального объема среды в лунке.

Анализ пролиферации клеток в режиме реального времени на приборе iCELLigence. Определение жизнеспособности клеток в режиме реального времени в системе iCELLigence проводили как описано ранее (Нуштаева и др., 2022). Клеточный индекс рассчитывали для каждой лунки Е-планшета с помощью программного обеспечения RTCA 1.2 (Roche Diagnostics, Франция), генерирующего кривые роста клеток. В каждом эксперименте использовали не менее 3-х экспериментальных образцов, эксперимент повторяли не менее 2-х раз.

Анализ жизнеспособности клеток сфероидов методом проточной цитометрии. Сфероиды MCF7-EGFR культивировали в лунках 96-луночного планшета в объеме 100 мкл культуральной среды, облучали ХПС, после чего добавляли 100 мкл свежей среды и продолжали культивирование. В случае обработки СО-ХПС, к сфероидам добавляли 100 мкл облученной среды и продолжали культивирование в стандартных условиях. По окончании культивирования сфероиды разрушали добавлением раствора StemPro™ Accutase, открепленные клетки окрашивали раствором йодидистого пропидия в соответствии с протоколом производителя и анализировали на проточном цитометре не менее 1×10^5 событий в образце.

Анализ уровня внутриклеточных активных форм азота и кислорода. Молекула АФК-зависимого флуоресцентного зонда H₂DCFDA способна проникать через клеточную мембрану, где в неизменном состоянии не флуоресцирует при облучении светом с длиной волны $\lambda = 485$ нм. Под действием внутриклеточных эстераз происходит деацетилирование H₂DCFDA до H₂DCF, который накапливается в клетке, а его дальнейшее окисление под действием внутриклеточных АФК и АФА способствует превращению его в 2',7'-дихлорофлуоресцеин (DCF⁻), обладающий флуоресценцией ($\lambda_{\text{em}} = 530$ нм) при возбуждении светом с характеристической длиной волны $\lambda_{\text{ex}} = 485$ нм (Yazdani, 2015). Концентрация DCF⁻ в клетке пропорциональна концентрации АФК и АФА, которые, таким образом, могут быть определены методами флуоресцентного анализа.

К сфероидам MCF7-EGFR, культивируемым в стандартных условиях в лунках 96-луночного планшета, добавляли раствор красителя H₂DCFDA (10 мкМ), культивировали в стандартных условиях 30 мин, после чего облучали ХПС или добавляли СО-ХПС. Через 6 ч после облучения, изменения флуоресценции H₂DCFDA визуализировали в клетках сфероидов с помощью инвертированного мик-

роскопа в канале FITC. Полуколичественную оценку изменения активных форм азота (АФА) и кислорода (АФК) в клетках проводили, используя проточный цитометр ($\lambda = 535$ нм) после разрушения сфероидов добавлением StemPro™ Accutase.

Определение концентрации ионов нитрита в культуральной среде. Для определения концентрации ионов нитрита (NO_2^-) в культуральной среде отбирали аликвоты среды по 25 мкл и определяли концентрацию NO_2^- методом Грисса с использованием коммерчески доступного набора реагентов Griess Reagent System. Оптическое поглощение измеряли на спектрофотометре при длине волны $\lambda = 540$ нм. Используя стандарты с известной концентрацией NO_2^- , строили калибровочную кривую. По трем независимым повторам рассчитывали средние значения концентрации нитрит-ионов в образцах и стандартные отклонения.

МТТ-тест. Анализ жизнеспособности клеток методом МТТ-теста проводили, как уже описано (Bagamanshina et al., 2019) через 24 ч после облучения или добавления облученной среды. Среду в лунках 96-луночного планшета с культивируемыми клетками заменяли на среду RPMI-1640 без сыворотки, содержащую 0.25 мг/мл МТТ-реагента и выдерживали 4 ч при 37°C. Далее среду удаляли, а образовавшиеся кристаллы формазана растворяли добавлением 100 мкл ДМСО. Оптическую плотность раствора в лунках измеряли на многоканальном спектрофотометре при $\lambda = 570$ нм.

Анализ фагоцитоза сфероидов активированными клетками ТНР-1. К клеткам ТНР-1, растущим в среде RPMI-1640 в 6-луночном планшете (5×10^5 кл./лунку), добавляли 50 нМ РМА для индукции дифференцировки в М1-макрофагальный фенотип и продолжали культивирование в течение 48 ч. По окончании культивирования клетки ТНР-1 окрашивали добавлением флуоресцентного реагента Cell Tracker Green (1 мкМ) при 37°C течение 30 мин, после чего культуральную среду удаляли, клетки дважды промывали добавлением 1 мл PBS. Аналогичным образом предварительно окрашивали сфероиды MCF7-EGFR раствором Cell Tracker Red (10 мкМ). К окрашенным культивируемым ТНР-1 добавляли образцы окрашенных сфероидов MCF7-EGFR в примерном соотношении клеток и сфероидов 30 : 1 и продолжали совместное культивирование в течение 2 ч в стандартных условиях. Сфероиды и клетки в лунках анализировали с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа. Для количественной оценки активности макрофагов проводили подсчет общего количества сфероидов размером более 40 нм (в месте с наибольшим диаметром) в поле зрения микроскопа площадью 0.4 мм² и рассчитывали долю сфероидов, атакованных макрофагами, как отношение числа сфероидов с зеленым сигналом к общему числу сфероидов. Данные представляли, как среднее

значение и его стандартное отклонение для трех независимых полей зрения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение параметров ХПС, индуцирующих преимущественную гибель опухолевых клеток. Индукция гибели раковых клеток зависит от интенсивности взаимодействия ХПС с биологическим объектом, которая, в свою очередь, определяется частотой и амплитудой приложенного напряжения, расстоянием до объекта, скоростью и типом рабочего газа, а также влажностью воздуха (Schweigert et al., 2021). При неизменности указанных параметров интенсивность воздействия может изменяться в зависимости от продолжительности облучения или при введении дополнительных компонентов в систему.

Условия облучения ХПС, при котором гибели подвергаются преимущественно опухолевые клетки, оптимизировали по продолжительности воздействия на примере пары культур единого гистологического происхождения: аденокарциномы молочной железы человека MCF7 и клеток нетрансформированной молочной железы MCF10A (Qu et al., 2015). Жизнеспособность клеток анализировали в режиме реального времени с использованием прибора iCelligence и методом МТТ (рис. 1). Облучение проводили с использованием дополнительного заземленного электрода (так называемой заземленной подложки, или без нее). При сравнении кривых роста опухолевых и нормальных клеток после облучения ХПС можно видеть, что цитотоксический эффект существенно зависел от длительности облучения клеток MCF7 (рис. 1а): облучение в течение 2 мин снижало долю живых клеток (индекс пролиферации, см. рис. 1) на 75% относительно необработанного контроля; в то же время, облучение эпителиальных клеток молочной железы MCF10A в течение 1 и 2 мин приводило к незначительному торможению роста клеток относительно необлученного контроля (рис. 1б) — на 8 и 30% соответственно. Полученные результаты позволяют считать облучение в течение 1 мин специфичным для индукции гибели опухолевых клеток данного типа и при выбранных параметрах генерации ХПС.

Ранее нами было показано, что введение в систему заземленной металлической подложки (ЗМП), помещенной под культуральным планшетом с растущими клетками, усиливало гибель облученных опухолевых клеток (Schweigert et al., 2019). На моделях MCF7 и MCF10A использование ЗМП также усиливало цитотоксический эффект ХПС (рис. 1). При длительности облучения 2 мин с использованием ЗМП наблюдали полное подавление жизнеспособности как опухолевых, так и здоровых клеток, поэтому для достижения относительной специфичности ХПС в отношении опухолевых клеток, необходимо снижать продолжительность воздействия. Снижение времени облучения с ЗМП до 30 с позво-

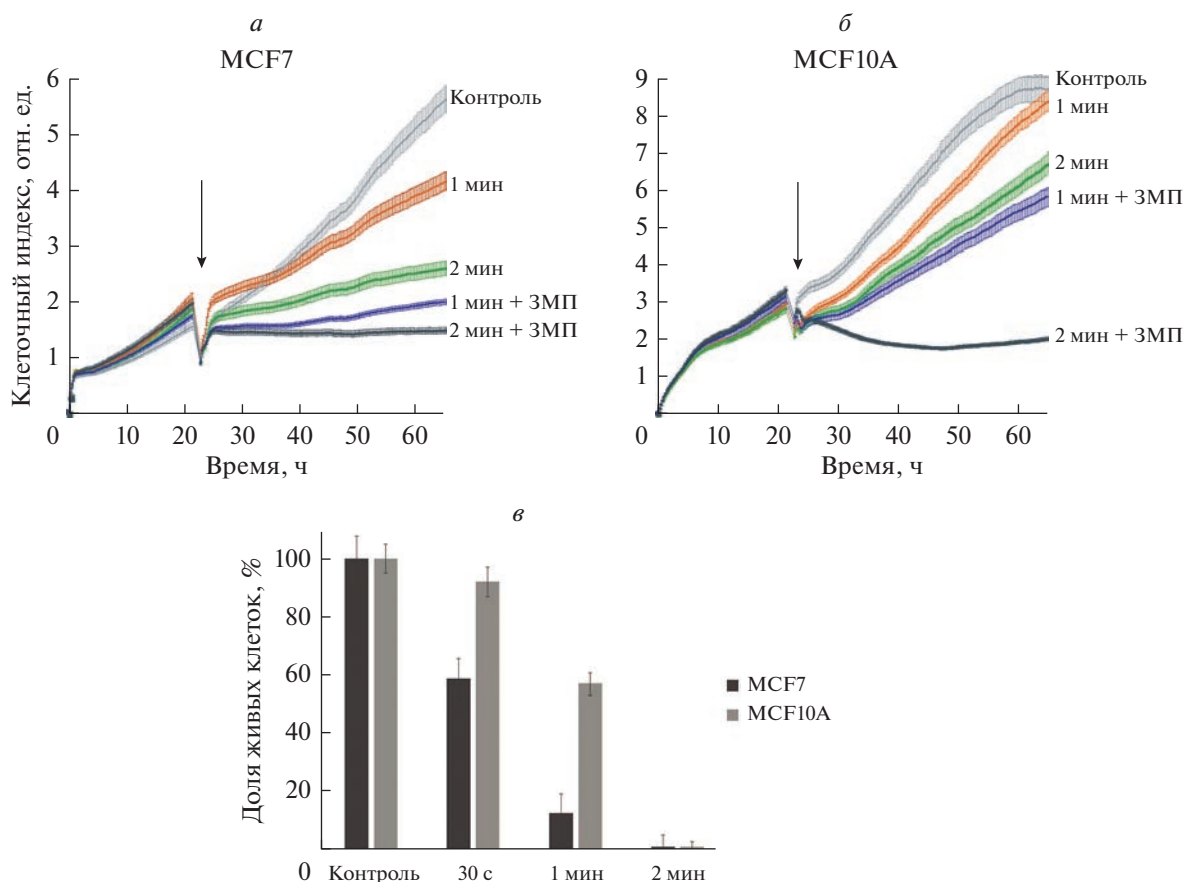


Рис. 1. Влияние продолжительности прямой обработки холодной плазменной струей (ХПС) на пролиферацию клеток MCF7 и MCF10A. *а, б* – Характерные кривые пролиферации клеток в режиме реального времени на приборе iCELLigence; стрелка показывает момент обработки ХПС. *в* – Данные МТТ-теста о жизнеспособности клеток через 24 ч после облучения ХПС с использованием заземленной металлической подложки (ЗМП); представлен характерный пример анализа, в котором приведены средние значения и их статистические отклонения (SD) из 3-х экспериментов. Здесь и на рис. 2, 3, 4 параметры генератора ХПС: амплитуда напряжения 4.9 кВ и частота 40 кГц, газ – аргон, 4 л/мин.

лила добиться преимущественной гибели опухолевых клеток (рис. 1*в*).

Таким образом, определено характерное время преимущественного цитотоксического действия ХПС в отношении клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF7 с использованием ЗМП и без нее.

Помимо прямого воздействия, когда облучению подвергают непосредственно растущие клетки, в ряде работ показано цитотоксическое действие на клетки культуральной среды, предварительно облученной ХПС, которую называют “активированной средой”, а мы обозначаем ее СО-ХПС (Tanaka et al., 2021). Высокоэнергетичные электроны в плазменной струе за счет неупругих столкновений с молекулами кислорода, азота и воды генерируют химически активные радикалы и включают цепочки химических реакций в смеси гелия с воздухом в газовой фазе и на поверхности жидкости с образованием основных молекулярных триггеров гибели клеток – АФК и АФА, которые сохраняются при переносе та-

кой СО-ХПС к растущим клеткам (Boehm et al., 2016).

Определение цитотоксического воздействия СО-ХПС в отношении клеток MCF7 и MCF10A проводили с помощью МТТ через 24 ч после добавления облученной среды (ее объем составлял 1/2 финального объема среды в лунке) (рис. 2). Можно видеть, что снижение жизнеспособности при культивировании клеток в присутствии СО-ХПС было сравнимо с таковым значением для клеток, подвергнутых прямому облучению ХПС (рис. 1). Онкотрансформированные клетки MCF7 также оказались более чувствительны к цитотоксическому воздействию СО-ХПС, чем MCF10A. Таким образом, при одинаковых условиях воздействия, опухолевые клетки MCF7 были чувствительны не только к прямому к воздействию ХПС, но и к СО-ХПС.

Анализ изменения содержания АФА в культуральной среде при культивировании клеток в присутствии СО-ХПС. Использовали реактив Гриса, позволяющий оценить концентрацию ионов нитрита. Культу-

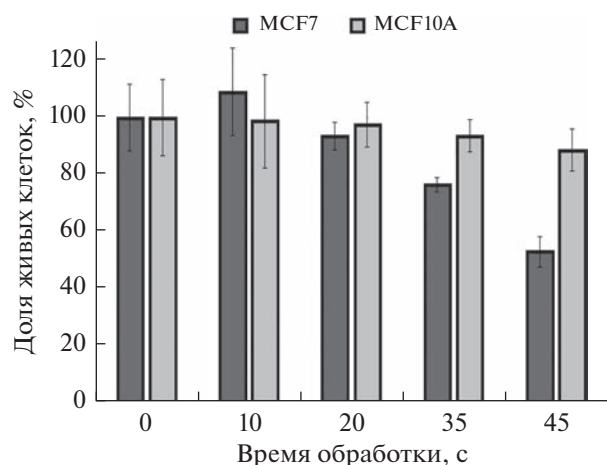


Рис. 2. Влияние опосредованной обработки ХПС на жизнеспособность клеток MCF7 и MCF10A. Данные МТТ-теста, проведенного через 24 ч после добавления к клеткам облученной культуральной среды (СО-ХПС). Конечный объем облученной среды составлял 1/2 объема среды в лунке. Результаты представлены как средние значения ($\pm$ SD) из 3-х экспериментов.

ральную среду обрабатывали ХПС в течение 2 или 5 мин в лунках 96-луночного планшета и непосредственно после облучения добавляли ее (СО-ХПС) к культивируемым клеткам MCF7, после чего продолжали культивирование в стандартных условиях. Через 30 мин, 1 и 6 ч после добавления СО-ХПС отбирали аликвоты среды и определяли концентрацию NO_2^- . В качестве отрицательного контроля использовали культуральную среду от клеток, культивируемых в стандартных условиях. В качестве положительного контроля использовали образцы облученной среды, разбавленной аналогично добавляемой к клеткам и инкубированной в аналогичных условиях. Можно видеть (рис. 3), что ХПС-обработка среды приводит к увеличению концентраций ионов нитрита до 10 раз при 2-минутном облучении и до 30 раз при 5-минутном. Таким образом, наблюдаемое увеличение ионов нитрита в культуральной среде при увеличении длительности облучения наиболее вероятно вносит вклад в цитотоксическую активность СО-ХПС.

Влияние температуры хранения облученной среды (СО-ХПС) на ее цитотоксическую активность. Отметим, что короткоживущие активные кислородные и азотные радикалы распадаются, либо вступают в реакцию с молекулярными мишенями в клетке и образуют вторичные долгоживущие радикалы. Такие долгоживущие способны сохраняться в течение времени при оптимальных условиях хранения, что должно отражаться на цитотоксической активности СО-ХПС. Для анализа изменения свойств облученной культуральной среды при хранении, образцы СО-ХПС разделяли на аликвоты и помещали на хранение при температуре 4 и -20°C .

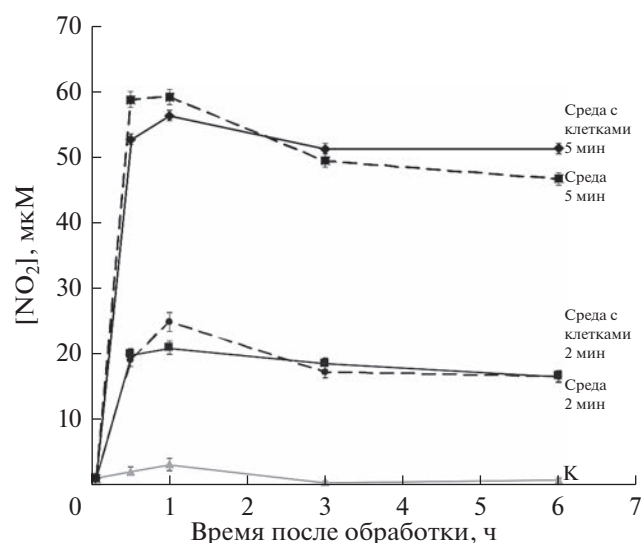


Рис. 3. Концентрация ионов нитрита NO_2^- в культуральной среде. Культуральную среду без клеток облучали 2 или 5 мин (среда), после чего добавляли к культивируемым клеткам A549 (среда с клетками) и продолжали культивирование в стандартных условиях, отбирая аликвоты сред для анализа. Контроль (К): к клеткам добавляли необлученную среду. Концентрацию NO_2^- в среде определяли методом Грисса, представлены средние значения ($\pm$ SD) из 3-х независимых экспериментов

Для анализа цитотоксических свойств СО-ХПС культивирование клеток MCF7 проводили в присутствии СО-ХПС, хранившейся при указанных температурах от 1 до 168 ч. В образцах “контроль” использовали необлученную среду после хранения при тех же температурах в течение 48 ч. Точка 0 ч на рис. 4 отражает образец среды, добавленный к клеткам после облучения без хранения. Жизнеспособность клеток оценивали МТТ-тестом через 24 ч после замены обычной культуральной среды на облученную. Можно видеть (рис. 4), что СО-ХПС, хранившаяся при 4°C сохраняет свою цитотоксическую активность в течение 48 ч, а хранившаяся при -20°C — только 24 ч. Таким образом, для среды, обработанной ХПС, предпочтительно хранение при 4°C .

Изменение морфологии сфероидов и жизнеспособности клеток в составе сфероидов при прямом облучении ХПС и в присутствии СО-ХПС. Полученные данные о чувствительности клеток MCF7 к прямому и опосредованному воздействию ХПС были важны для перехода исследования к модели многоклеточных сфероидов MCF7-EGFR, в которой также оценивали воздействие прямого и опосредованного влияния ХПС. В отличие от клеток, культивируемых в монослое, сфероиды приближены к многоклеточной структуре организма. В экспериментах с модельными сфероидными использовали плазменную струю в гелии, как более применимую для экспериментов на животных. Аргон и гелий имеют разные физические свойства, что сказывается на свойствах

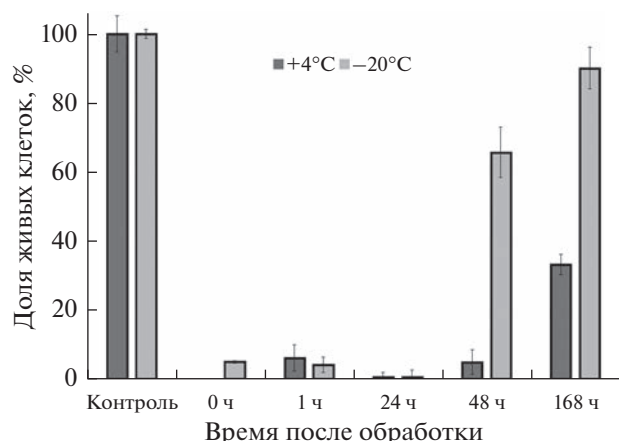


Рис. 4. Влияние температуры хранения облученной культуральной среды (СО-ХПС) и длительности хранения на ее цитотоксическую активность. Время облучения 8 мин. Аликвоты облученной среды помещали для хранения при 4 и -20°C на 0–168 ч, культивировали в ней клетки MCF7 в стандартных условиях и через 24 ч анализировали их жизнеспособность с помощью МТТ-теста. Результаты представлены средними значениями ($\pm$ SD) из 3-х независимых экспериментов.

самой плазменной струи и на плазмохимии у поверхности биоматериала. При сопоставимых напряжениях струи (4–5 кВ), токи ХПС в аргоне, в отличие от токов в гелии, достигают десятков мА, что не-

комфортно и опасно для живых организмов с точки зрения электробезопасности. Ранее мы определили, что увеличение напряжения струи в гелии с 4.5 до 4.9 кВ ведет к увеличению температуры струи с 35 до 40°C при частоте 13 кГц, а при частоте 22 кГц температура струи становится горячей (65°C) уже при 4.5 кВ (данные готовятся к публикации). Поскольку разрабатываемый подход имеет целью исследование метода для внедрения его в клиническую практику, температура струи является критическим параметром. Поэтому, в экспериментах со струей в гелии использовали напряжение 4.5 кВ и частоту 13 кГц.

На рис. 5 представлен характерный вид сфероидов до облучения и через 6 и 24 ч после облучения. Можно видеть, что через 24 ч после облучения происходит разрушение крупных сфероидов до сфероидов более мелких и до отдельных клеток, как при прямом облучении, так и при культивировании с СО-ХПС.

Изменение жизнеспособности клеток сфероидов в ответ на облучение ХПС оценивали по изменению доли клеток в состоянии позднего апоптоза (некроза). Для этого применяли метод проточной цитометрии с окрашиванием йодистым пропидием (PI). PI проникает в ядра гибнущих клеток с поврежденной плазматической мембраной, и такие клетки можно визуализировать флуоресцентными методами анализа. Сравнение доли PI-положительных клеток (%), подвергнутых прямому облучению и СО-ХПС

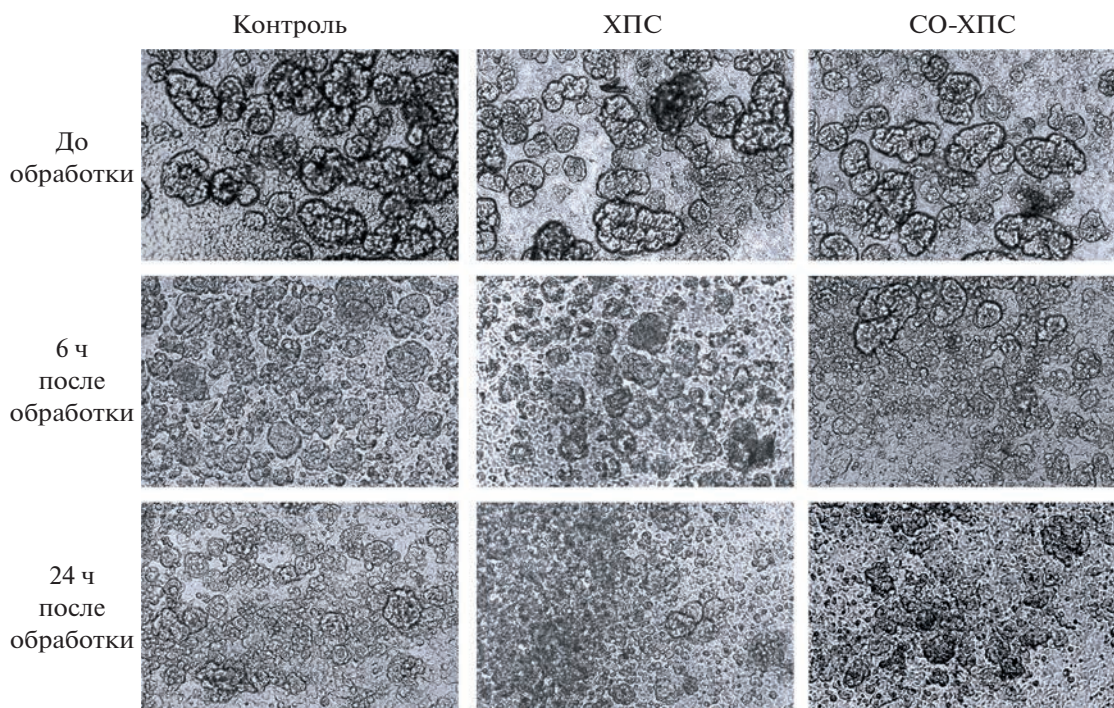


Рис. 5. Изменение морфологии клеток MCF7-EGFR в 3D-культуре после прямого облучения их ХПС и СО-ХПС в течение 1 мин. Микроскопия в проходящем свете; показаны характерные изображения препаратов до облучения и через 6 и 24 ч после облучения. Здесь и на рис. 6, 7, 8 параметры генерации ХПС: 4.5 кВ, 13 кГц, газ — гелий, 9 л/мин.

при выбранных условиях показало, что культивирование сфероидов с СО-ХПС вызывало несколько больший цитотоксический эффект: 78% клеток были PI-положительными против 70% при прямой обработке ХПС (рис. 6). В контрольных необлученных образцах доля PI-положительных клеток была высокой и составляла до 50%. Такую высокую гибель клеток можно объяснить как особенностями подготовки образцов из сфероидов, так и особенностями роста самих сфероидов.

Известно, что для крупных сфероидов характерно наличие некротического “ядра”, обусловленного сниженной доступностью кислорода и питательных веществ для центральных клеток сфероида (Laschke, Menger, 2017; Verjans et al., 2018). Такая особенность сфероидов подчеркивает их сходство с природными солидными опухолями, в которых даже без воздействия химио- или лучевой терапии часто наблюдается некроз внутренней области опухоли. Во-вторых, обработка сфероидов раствором Accutase для диссоциации на отдельные клетки с последующим мягким пипетированием является достаточно травмирующей обработкой для клеток сфероидов. Тем не менее, поскольку подготовку проб для анализа проводили для контрольных и облученных клеток единообразно, разница в доле PI-положительных клеток в контрольных и облученных образцах может рассматриваться как появление клеток, погибающих от воздействия ХПС.

Содержание АФК в клетках сфероидов, подвергнутых прямому или опосредованному воздействию ХПС. Поскольку основными индукторами гибели клеток при воздействии холодной плазмы являются АФК и АФА (Vandamme et al., 2012), было важно оценить изменение содержания АФК в клетках сфероидов MCF7-EGFR, подвергнутых прямому или опосредованному воздействию ХПС. Для этого к облученным сфероидом или сфероидом, культивируемым с облученной средой, добавляли реагент H_2DCFDA и анализировали сфероиды методом флуоресцентной микроскопии.

Мы обнаружили, что как при прямом облучении ХПС, так и при воздействии СО-ХПС, в образцах сфероидов значительно усиливался зеленый сигнал, указывающий на присутствие АФК в клетках. В качестве положительного контроля использовали сфероиды, к которым добавляли 5%-ный раствор H_2O_2 , который стимулирует конвертацию H_2DCFDA в DCF^- . Анализ показал, что при опосредованном способе воздействия ХПС доля клеток сфероидов с увеличенным содержанием АФК была незначительно больше, чем при прямом воздействии (рис. 7) при используемых условиях облучения.

Таким образом, сфероиды MCF7-EGFR чувствительны как к прямому облучению ХПС, так и к воздействию СО-ХПС, и эти воздействия сопровожда-

ются увеличением уровня активных форм кислорода внутри клеток.

Захват фагоцитирующими клетками сфероидов, облученных ХПС. Для того, чтобы оценить возможность захвата облученных сфероидов клетками с фагоцитарной активностью, сфероиды предварительно окрашивали флуоресцентным красителем цитоплазмы, подвергали прямому облучению ХПС, после чего через 24 ч добавляли к культивируемым активированным моноцитам ТНР-1. Активированные моноциты характеризуются фагоцитарной активностью, а их окрашивание флуоресцентным красителем позволяет визуализировать захват флуоресцентного субстрата методом флуоресцентной микроскопии (рис. 8а). В контрольных образцах заметны крупные сфероиды без атаки фагоцитами (рис. 8б). Сопоставление наложения изображений в флуоресцентных каналах и в проходящем свете показало, что в стадии активного фагоцитоза происходит потеря красного сигнала от сфероидов в результате полного экранирования зелеными макрофагами, покрывающими сфероиды (рис. 8в, г). Подсчет на основании данных рис. 8 показывает, что облучение ХПС увеличивает долю сфероидов, которые активно захватываются макрофагами, с 59.6 ± 12.0 до $86.2 \pm 4.9\%$ (рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время исследование применения ХПС в отношении солидных опухолей человека проводят не только *in vitro* и на животных, но и в рамках ранних стадий клинических испытаний на пациентах. В базе данных клинических исследований (www.clinicaltrials.gov) официально зарегистрированы два исследования, в которых тестируют противоопухолевое действие ХПС в отношении солидных опухолей.

Первое из них (NCT04267575) было начато в 2019 г. и предполагает исследование безопасности применения ХПС для облучения операционного поля после удаления крупных солидных новообразований при IV-ой стадии рака молочной железы, предстательной железы, поджелудочной железы, немелкоклеточного рака легкого, рака яичников и других с окончанием исследований в 2023 г. Во втором исследовании (NCT03218436) холодная аргонная плазма была использована для облучения цервикальной интраэпителиальной неоплазии, которая классифицируется как предраковое состояние (Basu et al., 2018). Облучение проводили в процессе кольпоскопического исследования без анестезии и оценивали ремиссию через 3 и 6 мес после облучения, но итоговые результаты исследования пока не представлены. Таким образом, в настоящее время нет доступных данных клинических исследований о противоопухолевой активности ХПС на людях. Поэтому исследование эффективных режимов облучения, механизмов действия, селективности облучения на клеточ-

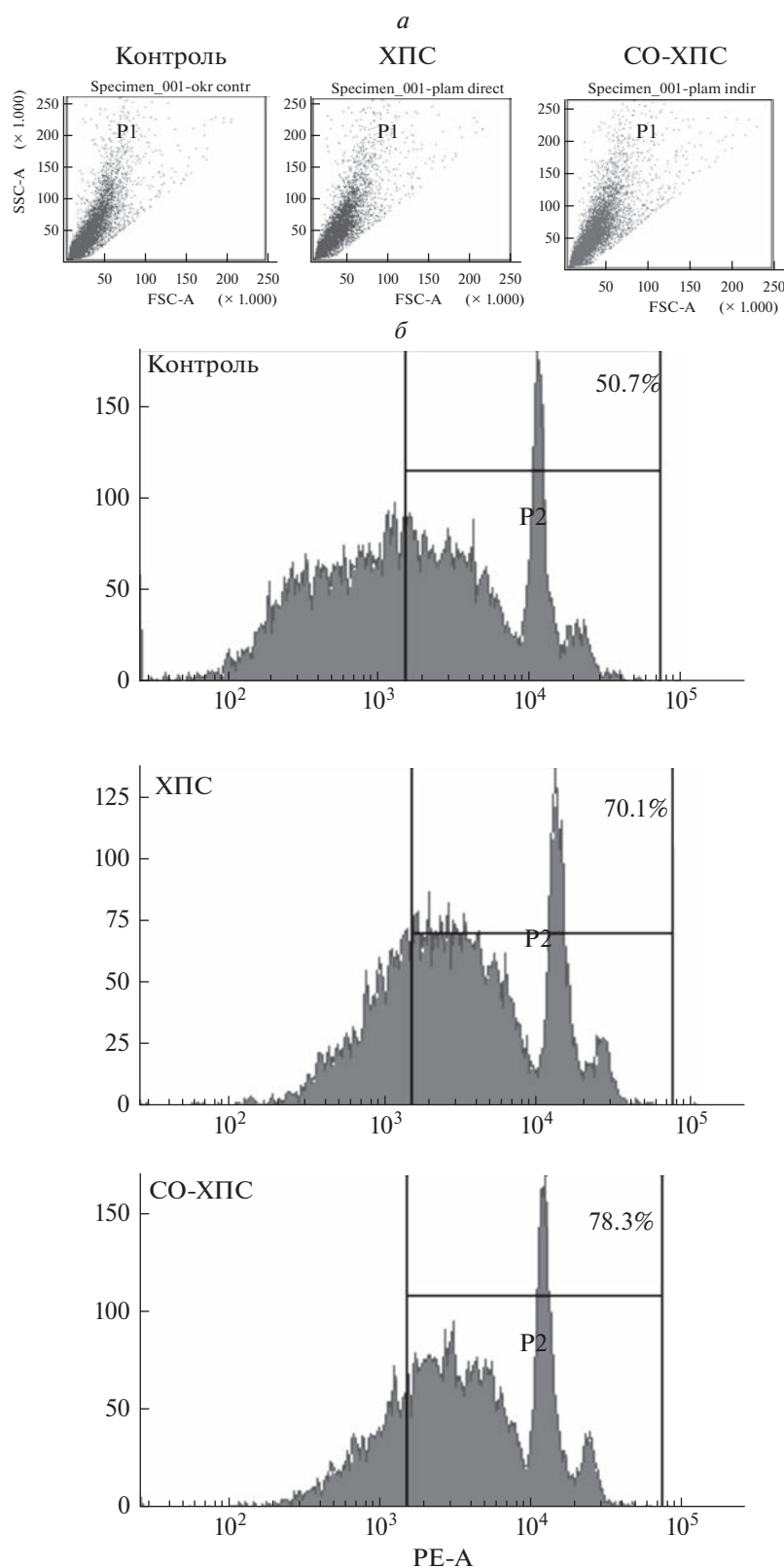


Рис. 6. Изменение жизнеспособности клеток сфероидов MCF7-EGFR в контроле и после прямой обработки их с помощью ХПС и СО-ХПС. Через 24 ч после воздействия сфероиды диссоциировали на отдельные клетки, образцы клеток инкубировали с йодидистым пропидием (PI) и анализировали методом проточной цитометрии. *a* – Распределения клеток по параметрам прямого и бокового светорассеяния; P1 – популяция, анализируемая по интенсивности сигнала PI. *б* – гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции PI в канале PE-A (P2 – диапазон позитивности по PI); в правом верхнем углу гистограмм указаны доли погибших клеток.

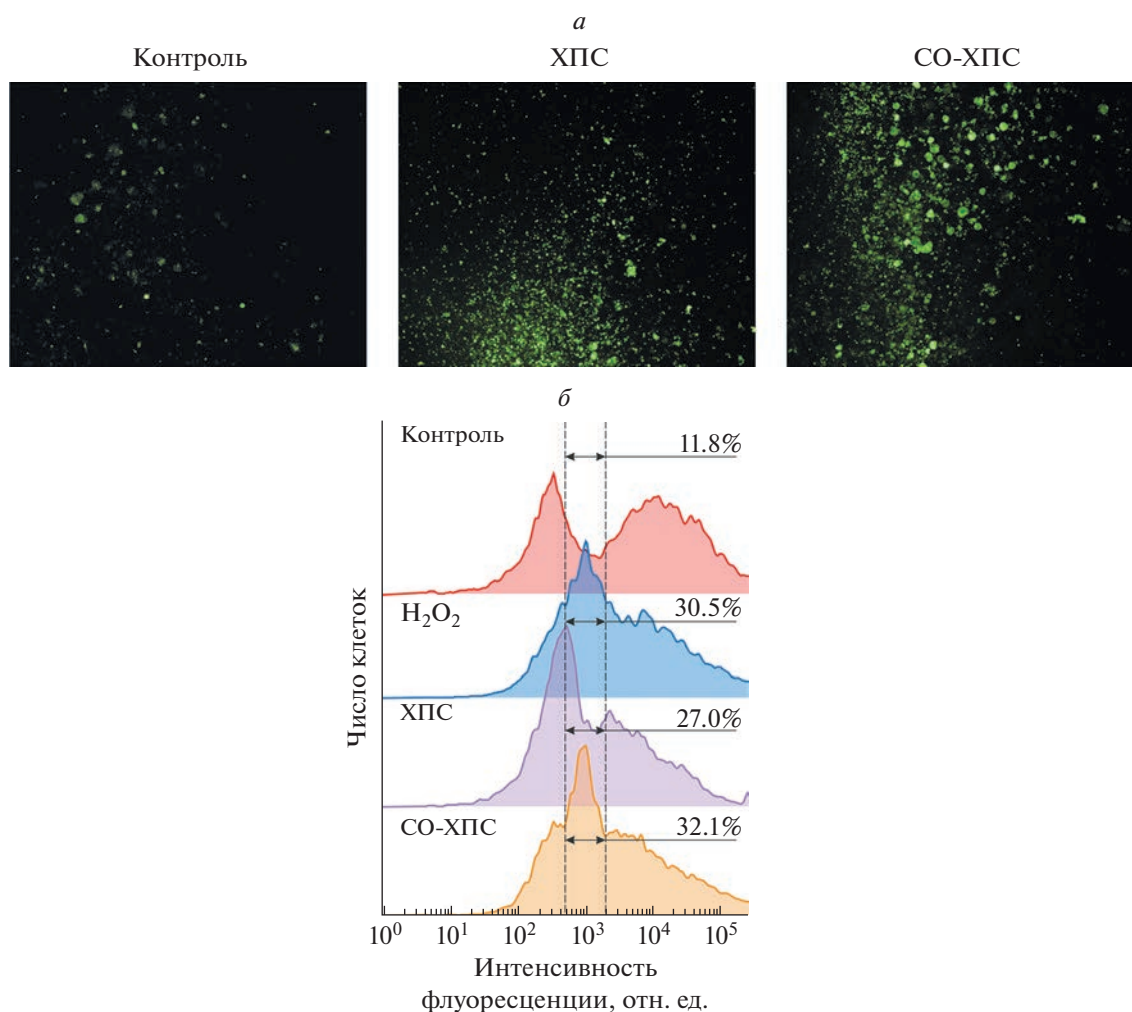


Рис. 7. Изменение АФК и АФА в клетках 3D сфероидов MCF7-EGFR после воздействия ХПС. *a* – Интенсивность флуоресценции АФК-зависимого зонда H₂DCF в клетках сфероидов, окрашенных H₂DCFDA. *б* – Данные проточной цитометрии для клеток сфероидов через 6 ч после облучения; представлены характерные образцы анализа; в правом верхнем углу гистограмм указаны доли (%) H₂DCF-позитивных клеток.

ных моделях, приближенных к опухолям, не теряет своей актуальности.

Тем не менее, доклинические исследования ХПС позволили сформировать представления о том, какие опухоли могут быть чувствительны к облучению. Основными потенциальными мишенями струи холодной плазмы будут опухоли, для которых не предложено эффективной таргетной терапии, опухоли, залегающие неглубоко в тканях, изолированные, устойчивые к радиотерапии, рецидивирующие и метастазирующие. Эти опухоли должны быть удалены хирургически, а обработке ХПС должно подвергаться операционное поле, что позволяет преодолеть лимит распространения генерируемых активных частиц вглубь тканей (Dai et al., 2018). Позитивный ответ реализуется за счет селективности по отношению к опухолевым клеткам, стимулированию иммунной системы, элиминации стволовых опухолевых клеток. Се-

лективное воздействие достижимо как при применении таргетных препаратов, так и при оптимизации условий воздействия – концентрации препарата, времени воздействия и т.д. Поэтому оптимизация условий формирования ХПС и условия облучения ею клеток-мишеней направлены на определение диапазона цитотоксического воздействия на опухолевые клетки без повреждения клеток здоровых. Для этого мы использовали пару клеточных культур – здоровых и опухолевых – одного гистологического происхождения: клетки аденокарциномы молочной железы MCF7 и MCF10A.

В качестве 3D-клеточной модели в работе использовали линию MCF7-EGFR, растущую преимущественно в виде сфероидов без использования матриксов и ростовых факторов. Культура клеток MCF7-EGFR была получена на основе клеток MCF7, в геном которых методом ретровирусной тран-

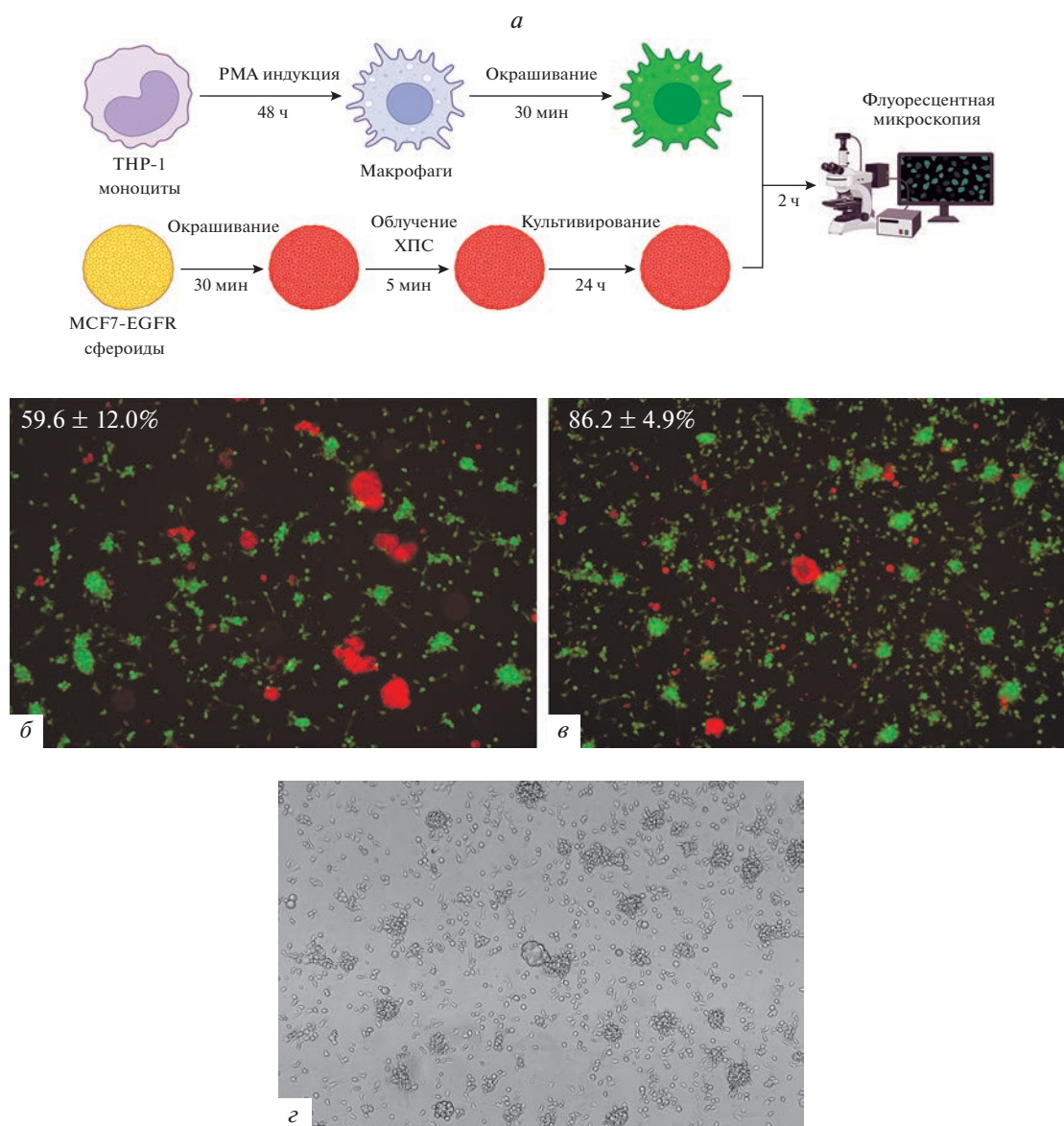


Рис. 8. Фагоцитарная активность макрофагов в отношении сфероидов MCF7-EGFR, облученных ХПС. *a* – Схема эксперимента; РМА – форбол-12-мирикат 13-ацетат. *б, в* – Фагоцитоз через 2 ч после добавления сфероидов к макрофагам; красным флуоресцентным красителем окрашены сфероиды, зеленым – макрофаги; флуоресцентная микроскопия (в левом верхнем углу указана доля (%) сфероидов, атакованных макрофагами), *г* – сфероиды в проходящем свете после облучения ХПС, атакованные макрофагами. *б–г* – Характерные примеры анализа; красным флуоресцентным красителем окрашены сфероиды, зеленым флуоресцентным красителем – макрофаги.

сдукции была встроена последовательность, кодирующая полноразмерный белок EGFR (Troitskaya et al., 2021). Использование сфероидов MCF7-EGFR, растущих без гидрогелей и ростовых факторов позволило упростить систему оценки реакции клеток сфероидов на стимулы и не учитывать дополнительно эффекты от воздействия ХПС на гидрогели и факторы роста.

Обработку 2D- и 3D-клеточных моделей осуществляли двумя способами: прямым облучением, когда поток плазмы взаимодействовал со средой и

растущими клетками, и непрямым, при котором к клеткам добавляли предварительно облученную среду (СО-ХПС). Следует отметить, что при воздействии на клетки и сфероиды СО-ХПС исключаются физические эффекты воздействия ХПС, такие как электрическое поле и УФО.

В настоящее время описано сравнительно немного исследований по воздействию холодной плазмы на 3D-клеточные модели (Wiegand et al., 2016; Wani-gasekara et al., 2022). Поскольку 3D-модели более полно имитируют рост опухоли и ее архитектуру по

сравнению с клеточными моделями 2D, не вызывает сомнения важность исследования эффектов ХПС в клеточных 3D-моделях. Мы наблюдали, что как при прямом облучении, так и при воздействии СО-ХПС на сфероиды происходит деструкция сфер до единичных клеток. Такое наше наблюдение хорошо согласуется с результатами других авторов о том, что одним из эффектов обработки клеток холодной плазмой является снижение их адгезионной, миграционной и инвазивной способностей (Semmler et al., 2020). Предполагают, что ХПС стимулирует негативную регуляцию интегринов – белков, располагающихся на поверхности клеток и формирующих межклеточные контакты (Shashurin et al., 2010). Наиболее вероятно, что наблюдаемая нами деструкция сфероидов также обусловлена уменьшением интегринов на поверхности облученных клеток и ослаблением межклеточных контактов в сфероиде.

АФК и АФА являются продуктами жизнедеятельности клетки, которые постоянно образуются в ходе метаболизма и участвуют в регуляции сигнальных каскадов. При этом известно, что в опухолевых клетках концентрации АФК и АФА повышены в результате более интенсивного метаболизма (Arfin et al., 2021). Как уже отмечалось ранее, основной вклад в цитотоксическое действие ХПС вносят АФК и АФА (Graves, 2012; Yousfi et al., 2014). Идентификация и количественное определение конкретных активных частиц в биологических образцах затруднительно из-за большого их разнообразия и локализации. Поэтому применяют косвенные методы, основанные на окислительно-восстановительных превращениях молекул-индикаторов окислительного стресса, таких как H_2DCFDA .

Используя H_2DCFDA , мы показали, что воздействие СО-ХПС на сфероиды MCF7-EGFR вело к большому накоплению АФК в обработанных клетках, чем при прямом воздействии. Показано (Yousfi et al., 2014), что однократное добавление среды, облученной ХПС к сфероидам, образованным клетками карциномы головы и шеи FaDu, не вело к торможению роста сфероидов, но стимулировало открепление отдельных клеток от многоклеточной 3D-структуры, что хорошо согласуется с полученными нами данными. Цитотоксического воздействия в отношении сфероидов FaDu удалось добиться при многократном добавлении среды, облученной ХПС (Yousfi et al., 2014). Авторы предполагают, что низкая чувствительность к активированной среде при однократном добавлении объясняется резистентностью клеток FaDu к H_2O_2 . Поскольку мы показали изменение относительного количества АФК после воздействия ХПС на сфероиды MCF7-EGFR, можно говорить о том, что это изменение опосредует цитотоксический ответ сфероидов MCF7-EGFR на ХПС-активированную среду и прямое облучение.

Для продвижения применения среды или биосовместимых жидкостей, облученных ХПС, в клиниче-

ской практике, необходимо иметь представление об оптимальных условиях хранения ХПС-обработанных жидкостей, при которых сохраняется их цитотоксическая активность. Было показано, что ХПС-обработанная среда сохраняла цитотоксическую и генотоксическую активность в течение 7 сут при хранении при 4 или $-80^{\circ}C$ (Chauvin et al., 2018). В качестве клеточной модели авторы использовали сфероиды HCT116 карциномы кишечника и диэлектрический барьерный разряд для генерации плазмы. Наиболее интересно, что хранение облученной среды при $-20^{\circ}C$ снижало ее цитотоксическую и генотоксическую активность, что хорошо согласуется с данными, полученными в нашей работе. Авторы показали, что при хранении облученной среды при 37 и при $-20^{\circ}C$ происходит разложение H_2O_2 (Chauvin et al., 2018). Тем не менее авторы не дают ответа, почему при промежуточной температуре $4^{\circ}C$ такого разложения не происходит.

В качестве нашего собственного предположения, мы можем выдвинуть гипотезу о том, что при хранении в жидкости наиболее вероятно протекают несколько параллельных процессов. Можно предположить, что и при 4, и при $-20^{\circ}C$ происходит разложение как H_2O_2 , так и других активных частиц, образуемых при воздействии ХПС на культуральную среду. В то же время, параллельно этому, при $4^{\circ}C$ происходят реакции взаимодействия первичных активных частиц с компонентами среды с накоплением вторичных перекисных соединений, чего не происходит при $-20^{\circ}C$. Накопление вторичных активных частиц обеспечивает цитотоксическое воздействие на клетки при добавлении такой среды. В свою очередь, можно предположить, что при $-80^{\circ}C$ замедляются химические реакции и лучше сохраняются первичные активные частицы. Точное выявление определенных АФК и АФА в облученной культуральной среде при хранении при разных температурах является отдельной научной задачей. Тем не менее, наши результаты и результаты других исследователей (Judée et al., 2016) показывают низкую эффективность хранения облученной среды при $-20^{\circ}C$. Суммируя, можно сказать, что СО-ХПС может применяться как эффективный индуктор гибели опухолевых клеток, если ее хранить при 4 или $-80^{\circ}C$.

Неэффективное удаление гибнущих опухолевых клеток фагоцитирующими клетками ведет к развитию воспалительных реакций. Мы показали, что при облучении сфероидов происходит активное поглощение облученных клеток макрофагами. Макрофаги реагируют на комбинацию молекулярных сигналов, испускаемых погибающими клетками, после чего происходит фагоцитоз. Ранее мы уже показали, что облучение опухолевых клеток ведет к активации в них сигналов, распознаваемых фагоцитирующими клетками как сигналы “найди меня” и “съешь меня” (Troitskaya et al., 2020). Можно предположить, что в случае облучения ХПС солидных опухолей *in vivo*,

также возможна деструкция опухоли на отдельные опухолевые клетки, в которых активируются процессы гибели, и они будут эффективно удаляться клетками иммунной системы с фагоцитарной активностью. Такое развитие событий на клеточном уровне препятствует процессам воспаления, что улучшает ответ на терапию.

Таким образом, возможно достижение относительной селективной цитотоксической активности ХПС в отношении опухолевых клеток, в том числе в составе сфероидов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-34-90021); работы по оптимизации специфического воздействия ХПС в отношении адгезивных культур клеток выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-19-00255-П).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не включала эксперименты с участием животных или людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А. Патракова и М.М. Бирюков внесли равный вклад.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Нуштаева А.А., Савинкова М.М., Ермаков М.С., Варламов М.Е., Новак Д.Д., Рихтер В.А., Коваль О.А. 2022. Клетки рака молочной железы изменяют чувствительность к гормональным и ростовым стимулам при 3D культивировании. Цитология Т. 64. С. 353. (Nush-taeva A.A., Savinkova M.M., Ermakov M.S., Varlamov M.E., Novak D.D., Richter V.A., Koval O.A. 2022. Breast cancer cells in 3D model alters their sensitivity to hormonal and growth factors. Cell Tiss. Biol. V. 16. P. 555.)
https://doi.org/10.1134/S1990519X22060050
- Arfin S., Jha N.K., Jha S.K., Kesari K.K., Ruokolainen J., Roychoudhury S., Rath B., Kumar D. 2021. Oxidative stress in cancer cell metabolism. Antioxidants. V. 10. P. 642.
https://doi.org/10.3390/antiox10050642
- Attri P., Kumar N., Park J.H., Yadav D.K., Choi S., Uhm H.S., Kim I.T., Choi E.H., Lee W. 2015. Influence of reactive species on the modification of biomolecules generated from the soft plasma. Sci. Rep. V. 5. P. 8221.
https://doi.org/10.1038/srep08221
- Bagamanshina A.V., Troitskaya O.S., Nush-taeva A.A., Yunusova A.Y., Starykovych M.O., Kuligina E.V., Kit Y.Y., Richter M., Wohlfromm F., Kähne T., Lavrik I.N., Richter V.A., Koval O.A. 2019. Cytotoxic and antitumor activity of lactapin in combination with autophagy inducers and inhibitors. BioMed. Res. Int. V. 2019.
https://doi.org/10.1155/2019/4087160
- Basu P., Taghavi K., Hu, S.-Y., Mogri S., Joshi S. 2018. Management of cervical premalignant lesions. Curr. Probl. Cancer. V. 42. P. 129.
https://doi.org/10.1016/j.crrprcancer.2018.01.010
- Boehm D., Heslin C., Cullen P.J., Bourke P. 2016. Cytotoxic and mutagenic potential of solutions exposed to cold atmospheric plasma. Sci. Rep. V. 6. P. 21464.
https://doi.org/10.1038/srep21464
- Chauvin J., Judee F., Merbahi N., Vicendo P. 2018. Effects of plasma activated medium on head and neck FaDu cancerous cells: comparison of 3D and 2D response. ACAMC. V. 18. P. 776.
https://doi.org/10.2174/1871520617666170801111055
- Colombo E., Cattaneo M.G. 2021. Multicellular 3D models to study tumour-stroma interactions. IJMS. V. 22. P. 1633.
https://doi.org/10.3390/ijms22041633
- Dai X., Bazaka K., Richard D.J., Thompson E.W., Ostrikov K. 2018. The emerging role of gas plasma in oncotherapy. Trends in Biotechnol. V. 36. P. 1183.
https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.06.010
- Domonkos M., Tichá P., Trejbal J., Demo P. 2021. Applications of cold atmospheric pressure plasma technology in medicine, Agriculture Food Industry. Applied Sci. V. 11. P. 4809.
https://doi.org/10.3390/app11114809
- Ferreira L.P., Gaspar V.M., Mano J.F. 2018. Design of spherically structured 3D in vitro tumor models – advances and prospects. Acta Biomat. V. 75. P. 11.
https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.034
- Graves D.B. 2012. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. J. Phys. D: Appl. Phys. V. 45. P. 263001.
https://doi.org/10.1088/0022-3727/45/26/263001
- Judée F., Fongia C., Ducommun B., Yousfi M., Lobjois V., Merbahi N. 2016. Short and long time effects of low temperature plasma activated media on 3D multicellular tumor spheroids. Sci. Rep. V. 6. P. 21421.
https://doi.org/10.1038/srep21421
- Klinkhammer C., Verlack C., Smiłowicz D., Kogelheide F., Bo-gaerts A., Metzler-Nolte N., Stapelmann K., Havenith M., Lackmann J.-W. 2017. Elucidation of plasma-induced chemical modifications on glutathione and glutathione disulphide. Sci. Rep. V. 7. P. 13828.
https://doi.org/10.1038/s41598-017-13041-8
- Laschke M.W., Menger M.D. 2017. Spheroids as vascularization units: from angiogenesis research to tissue engineering applications. Biotechnol. Advances. V. 35. P. 782.
https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.07.002
- Metelmann H.-R., Nedrelow, D.S., Seebauer, C., Schuster, M., von Woodtke, T., Weltmann, K.D., Kindler S., Metelmann P.H., Finkelstein S.E., Von Hoff D.D., Podmelle F. 2015. Head and neck cancer treatment and physical plasma. Clinical Plasma Med. V. 3. P. 17.
https://doi.org/10.1016/j.cpme.2015.02.001
- Qu Y., Han B., Yu Y., Yao W., Bose S., Karlan B.Y., Giuliano A.E., Cui X. 2015. Evaluation of MCF10A as a reliable model for normal human mammary epithelial cells. PLoS One. V. 10. P. e0131285.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131285

- Salinas-Vera Y.M., Valdés J., Hidalgo-Miranda A., Cisneros-Villanueva M., Marchat L.A., Nuñez-Olvera S.I., Ramos-Payán R., Pérez-Plasencia C., Arriaga-Pizano L.A., Prieto-Chávez J.L., López-Camarillo C. 2022. Three-dimensional organotypic cultures reshape the microRNAs transcriptional program in breast cancer cells. *Cancers*. V. 14. P. 2490. <https://doi.org/10.3390/cancers14102490>
- Schweigert I., Alexandrov A., Zakrevsky D., Milakhina E., Patrakova E., Troitskaya O., Birykov M., Koval O. 2021. Mismatch of frequencies of ac voltage and streamers propagation in cold atmospheric plasma jet for typical regimes of cancer cell treatment. *J. Phys.: Conf. Ser.* V. 2100. P. 012020. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2100/1/012020>
- Schweigert I., Zakrevsky D., Gugin P., Yelak E., Golubitskaya E., Troitskaya O., Koval O.: 2019. Interaction of cold atmospheric argon and helium plasma jets with bio-target with grounded substrate beneath. *Applied Sci.* V. 9. P. 4528. <https://doi.org/10.3390/app9214528>
- Semmler M.L., Bekeschus S., Schäfer M., Bernhardt T., Fischer T., Witzke K., Seebauer C., Rebl H., Grambow E., Vollmar B., Nebe J.B., Metelmann H.-R., Woedtke T. von, Emmert S., Boeckmann L. 2020. Molecular mechanisms of the efficacy of cold atmospheric pressure plasma (CAP) in cancer treatment. *Cancers*. V. 12. P. 269. <https://doi.org/10.3390/cancers12020269>
- Shashurin A., Stepp M.A., Hawley T.S., Pal-Ghosh S., Brieda L., Bronnikov S., Jurjus R.A., Keidar, M. 2010. Influence of Cold plasma atmospheric jet on surface integrin expression of living cells: influence of cold plasma atmospheric jet on surface integrin expression of living cells. *Plasma Processes Polym.* V. 7. P. 294. <https://doi.org/10.1002/ppap.200900086>
- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomatara, I., Jemal A., Bray F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J. Clin.* V. 71. P. 209. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tanaka H., Bekeschus S., Yan D., Hori M., Keidar M., Laroussi M. 2021. Plasma-treated solutions (PTS) in cancer therapy. *Cancers*. V. 13. P. 1737. <https://doi.org/10.3390/cancers13071737>
- Troitskaya O., Golubitskaya E., Biryukov M., Varlamov M., Gugin P., Milakhina E., Richter V., Schweigert I., Zakrevsky D., Koval O. 2020. Non-thermal plasma application in tumor-bearing mice induces increase of serum HMGB1. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. E5128. <https://doi.org/10.3390/ijms21145128>
- Troitskaya O., Novak D., Nushtaeva A., Savinkova M., Varlamov M., Ermakov M., Richter V., Koval O. 2021. EGFR Transgene stimulates spontaneous formation of MCF7 breast cancer cells spheroids with partly loss of HER3 receptor. *IJMS*. V. 22. P. 12937. <https://doi.org/10.3390/ijms222312937>
- Vandamme M., Robert E., Lerondel S., Sarron V., Ries D., Dozias S., Sobilo J., Gosset D., Kieda C., Legrain B., Pouvesle J.-M., Pape A.L. 2012. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *Int. J. Cancer*. V. 130. P. 2185. <https://doi.org/10.1002/ijc.26252>
- Verjans E.-T., Doijen J., Luyten W., Landuyt B., Schoofs L. 2018. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort? *J. Cell Physiol.* V. 233. P. 2993. <https://doi.org/10.1002/jcp.26052>
- Wanigasekara J., Barcia C., Cullen P.J., Tiwari B., Curtin J.F. 2022. Plasma induced reactive oxygen species-dependent cytotoxicity in glioblastoma 3D tumourspheres. *Plasma Processes Polymers*. V. 19. P. 2100157. <https://doi.org/10.1002/ppap.202100157>
- Wiegand C., Fink S., Beier O., Horn K., Pfuch A., Schimanski A., Grünler B., Hipler U.-C., Elsner P. 2016. Dose- and time-dependent cellular effects of cold atmospheric pressure plasma evaluated in 3D skin models. *Skin Pharmacol. Physiol.* V. 29. P. 257. <https://doi.org/10.1159/000450889>
- Xu D., Wang B., Xu Y., Chen Z., Cui Q., Yang Y., Chen H., Kong M.G. 2016. Intracellular ROS mediates gas plasma-facilitated cellular transfection in 2D and 3D cultures. *Sci. Rep.* V. 6. P. 27872. <https://doi.org/10.1038/srep27872>
- Yazdani M. 2015. Concerns in the application of fluorescent probes DCDHF-DA, DHR 123 and DHE to measure reactive oxygen species in vitro. *Toxicol. in Vitro*. V. 30. P. 578. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.08.010>
- Yousfi M., Merbahi N., Pathak A., Eichwald O. 2014. Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: toward new pharmaceutical treatments in medicine. *Fundam. Clin. Pharmacol.* V. 28. P. 123. <https://doi.org/10.1111/fcp.12018>

Cytotoxic Activity of Atmospheric Cold Plasma Jet Towards 3D Human Breast Cancer Cell Model

E. A. Patrakova^{a, b}, M. M. Biryukov^{a, b, e, *}, O. S. Troitskaya^{a, e}, D. D. Novak^{a, b, e}, E. V. Milakhina^{c, e}, P. P. Gugin^{d, e}, D. E. Zakrevskiy^{c, d, e}, I. V. Schweigert^e, and O. A. Koval^{a, b, e}

^aInstitute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

^bNovosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

^cNovosibirsk State Technical University, Novosibirsk, 630090 Russia

^dRzhanov Institute of Semiconductor Physics, SB Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

^eKhrstianovich Institute of Theoretical and Applied Mechanics, SB Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: biryukov.mm@ya.ru

The treatment of solid tumors with a cold atmospheric plasma jet (CAP) is an innovative approach, which began to be actively developed only in the last decade. As a consequence, the studies aimed at revealing the conditions of se-

lectivity of such effects on tumor cells, including in 3D tumor models, are important. It is known that the main cytotoxic effects of CAP are caused by reactive oxygen and nitrogen species, which are formed in the plasma flow and the availability of which for the cells in the classical 2D and 3D cultivation models may be different. We used multicellular spheroids of MCF7-EGFR cells with hyperexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR), the parental MCF7 breast adenocarcinoma cell line, and MCF10A non-transformed human breast cells. Irradiation of MCF7-EGFR spheroids led to destruction of multicellular 3D structures into individual cells with activation of death processes. It was shown that cells of CAP-irradiated spheroids underwent phagocytosis by activated macrophages. When comparing direct exposure to CAP and cultivation of MCF7-EGFR spheroids in CAP-irradiated medium (CAP-IM), a higher content of reactive oxygen and nitrogen species in spheroid cells was found when cultured in CAP-IM, which further leads to a greater cytotoxic effect than in direct irradiation. The cytotoxicity of CAP-IM has been shown to be valid longer when such medium is stored at 4 than at -20°C . Thus, it was shown that the treatment of spheroids with CAP-IM was more effective in death induction than direct CAP irradiation.

Keywords: 3D spheroids, cold plasma jet, antitumor therapy, reactive oxygen species, EGFR, breast adenocarcinoma

РОЛЬ МАР-КИНАЗ В ИНДУЦИРОВАННОМ ФОСФОРИЛИРОВАНИИ ГИСТОНА H2AX В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

© 2023 г. О. О. Гнедина¹, А. В. Моршнева¹, М. В. Иготти¹, *

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: marie.igotti@gmail.com

Поступила в редакцию 28.07.2022 г.

После доработки 06.10.2022 г.

Принята к публикации 16.10.2022 г.

Ингибиторы гистондеацетилаз (ИГД) обладают антипролиферативными свойствами и являются перспективными агентами комбинированной противоопухолевой терапии. Ранее нами было показано, что представитель семейства ИГД бутират натрия (NaBut) самостоятельно не вызывает двунитевых разрывов ДНК (ДР-ДНК), однако, подобно генотоксическим агентам, инициирует накопление фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX), являющегося маркером ДР-ДНК. ИГД способны также снижать эффективность репарации ДНК, поврежденной при генотоксических воздействиях, в трансформированных клетках. Цель настоящей работы состояла в идентификации сигнальных путей, приводящих к накоплению γ H2AX при действии ИГД в трансформированных клетках. Для этого исследовали роль киназ семейства МАРК в NaBut-индуцированном фосфорилировании гистона H2AX, а также в ингибировании репарации ДНК. Мы показали, что накопление γ H2AX в трансформированных клетках в ответ на действие NaBut сопровождается снижением уровня фосфорилирования киназ ERK и PKB/Akt. Активирующее фосфорилирование киназы p38 увеличивается при действии NaBut, вследствие чего накапливается фосфатаза Wip1, что может быть одной из причин ингибирования репарации ДНК. При этом подавление активности киназы p38 отменяет NaBut-индуцированное снижение эффективности репарации. Полученные нами результаты об отмене негативного влияния NaBut на репарацию ДНК при ингибировании МАР-киназы p38, а также данные о накоплении фосфатазы Wip1 при действии NaBut позволяют предположить, что путь p38/Wip1 вовлечен в NaBut-индуцированное снижение эффективности репарации в трансформированных клетках.

Ключевые слова: ингибитор гистондеацетилаз, бутират натрия, фосфорилирование гистона H2AX, МАР-киназы, репарация ДНК, фосфатаза Wip1

DOI: 10.31857/S0041377123010030, **EDN:** GOTCEB

Одно из первых событий в процессе узнавания и репарации двунитевых разрывов (ДР) ДНК – маркирование места повреждения, в ходе которого происходит фосфорилирование гистона H2AX в месте разрыва (Rogakou et al., 1998). В зависимости от характера воздействия, вызвавшего повреждение ДНК, в клетке активируются разные сигнальные каскады, поэтому гистон H2AX может быть фосфорилирован различными киназами. Основными киназами, ответственными за фосфорилирование H2AX, являются киназы семейства PI3K-подобных киназ (PI3K-like kinases, PIKK): АТМ, АТР и ДНК-ПК (van Attikum, Gasser, 2009). При появлении двунитевых разрывов ДНК, например, после воздействия ионизирующего излучения, в фосфорилировании H2AX принимают участие киназы АТМ и ДНК-ПК, тогда как АТР активируется при обнаружении длинных однонитевых участков ДНК, в ответ на репликатив-

ный стресс и ультрафиолетовое облучение (Menolfi, Zha, 2020).

Ранее нами было показано, что ингибиторы гистондеацетилаз (ИГД), подобно генотоксическим агентам, вызывают накопление фосфорилированной формы гистона H2AX (γ H2AX) в онкоген-трансформированных фибробластах (Abramova et al., 2011), что, однако, не сопровождается появлением двунитевых разрывов ДНК (ДР-ДНК) (Abramova et al., 2011; Gnedina et al., 2022). Накопление γ H2AX при действии ИГД было показано и в других типах опухолевых и трансформированных клеток (Gaumes et al., 2006; Wang et al., 2012), но ни в одной из опубликованных работ не было доказано наличие ДР-ДНК методом нейтральных комет, специфически выявляющим именно двунитевые разрывы.

ИГД способны повышать чувствительность ряда опухолевых клеток к ионизирующему излучению (Konsoula et al., 2011) и к действию генотоксических агентов (Abramova et al., 2011; Thurn et al., 2013; Wu et al., 2017), что сопровождается увеличением количества

Принятые сокращения: ДР – двунитевые разрывы; ИГД – ингибиторы гистондеацетилаз; ДНК-ПК – ДНК-зависимая протеинкиназа; NaBut – бутират натрия.

γ H2AX при совместном действии этих факторов. Многочисленные экспериментальные данные указывают на способность ИГД модулировать клеточный ответ на повреждение ДНК (DNA damage response, DDR) через изменение экспрессии генов, кодирующих белки распознавания ДНК-повреждений и репарации, таких как ATM, BRCA1/2 (Konsoula et al., 2011; Thurn et al., 2013), Ku70/Ku80, Rad51, DNA-PKcs и Mre11 (Adimoolam et al., 2007; Lee et al., 2010; Munshi et al., 2005; Wu et al., 2017), в раковых, но не в нормальных клетках (Lee et al., 2010; Munshi et al., 2005). Способность ИГД сенсibilизировать раковые клетки к терапевтическим агентам, нацеленным на повреждение ДНК, и их низкая токсичность для нормальных медленно делящихся клеток позволяет рассматривать эти вещества как перспективные агенты противораковой терапии.

Представленная работа направлена на выявление вероятных мишеней, вовлеченных в сенсibilизацию раковых клеток с помощью ИГД. Такими мишенями могут быть митоген-активируемые протеинкиназы (MAP-киназы). MAP-киназы представляют собой семейство серинтреониновых киназ, передающих сигнал от внешних стимулов (факторов роста, цитокинов, гормонов) к нижележащим сигнальным белкам, регулирующим различные клеточные процессы — клеточный рост, пролиферацию, дифференцировку и пр. MAP-киназы принимают участие в регулировании ответа клетки на повреждение ДНК (Sanchez-Prieto et al., 2000; Wu et al., 2006; Picco, Pagès, 2013), в частности в фосфорилировании гистона H2AX (Kasibhatla et al., 1998; Lu et al., 2008; Phong et al., 2010) и регуляции активности белков системы репарации ДНК (Wu et al., 2006; Golding et al., 2007; Wei et al., 2011; Wang et al., 2013). Для выявления сигнальных путей, регулирующих фосфорилирование H2AX в отсутствие ДР-ДНК в ответ на действие ИГД, мы исследовали вклад MAP-киназ в накопление γ H2AX, а также ингибирование репарации ДНК при действии ИГД в трансформированных клетках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные линии и воздействия. В работе использовали линию трансформированных клеток mERas, полученную из первичных эмбриональных фибробластов мыши с помощью Ca-фосфатной трансфекции онкогеном cHa-ras, несущим активирующие точечные мутации в кодонах 12 и 61, и ранним районом E1A генома аденовируса человека 5-го типа (Pospelova et al., 1999). Эмбриональные фибробласты мыши с дезактивирующими мутациями киназы p38 (p38Y182F/Y182F (p38ki/ki), клеточная линия mERas-p38-/-), а также с нокаутом киназ JNK1/2 (mERas-JNK-/-) были любезно предоставлены доктором Дмитрием Булавиным (Институт исследований рака и старения Ниццы (IRCAN), INSERM, Университет Лазурного Берега, CNRS, Ницца, Франция). Клетки культивировали при 37°C и 5%

CO₂ в среде DMEM (Биолот, Россия), дополненной 10% сыворотки FCS (Gibco, США), 2 mM L-глутамин (Биолот, Россия) и содержащей 40 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия). Клетки обрабатывали 4 mM бутирата натрия (NaBut) в течение короткого (1–4 ч) или длительного времени (24–72 ч) и (или) ингибиторами киназ MEK (50 мкМ PD98059), p38 (20 мкМ SB203580), JNK (10 мкМ SP600125), PI3K (20 мкМ LY294002 или 10 мкМ вортманнина (WM)) в течение 24 ч.

Вестерн-блоттинг белков. Клетки лизировали в буфере PBS, содержащем 1% NP-40, 0.5% дезоксихолата натрия, 0.1% додецилсульфата натрия (SDS), ингибиторы протеаз и фосфатаз, а также 1 mM PMSF. Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически при длине волны 595 нм по методу Бредфорда (Bradford, 1976). Клеточные экстракты (20–40 мкг) прогревали в буфере для проб (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% глицерина, 5% β -меркаптоэтанола, 0.01% бромфенолового синего) при 95°C в течение 5 мин. Белки разделяли электрофоретически в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии 0.1% SDS, переносили на мембрану PVDF (Millipore). Мембраны блокировали в течение 1.5 ч при комнатной температуре в блокирующем буфере (5%-ное обезжиренное сухое молоко в PBST (PBS с 0.5% Tween 20)) и инкубировали с соответствующими первичными антителами, разведенными в 1–5%-ном BSA/PBST, в течение 1 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C. Мембраны отмывали в PBST и инкубировали 1 ч при комнатной температуре в PBST с 5%-ным молоком, содержащем вторые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Белки на мембранах выявляли методом усиления хемилюминесценции (Thermo Sci., США) и визуализировали на Syngene PXi6 Access. В качестве первичных использовали антитела к следующим белкам: киназе ERK (no. sc-94), p38 (no. sc-535) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. США), белку репарации Mre11 (no. NB100–142; Novus Biologicals, LLC, США), к фосфорилированной (p) форме pERK (no. 4377), pp38 (no. 9211), SAPK/JNK (no. 9252), pJNK (no. 9255), Akt (no. 9272), pAkt (no. 4058), фосфогистону H2AX (γ H2AX; no. 2577), фосфатазе Wip1 (no. 11901), белку pp53 (no. 12571), GAPDH (no. 2118) (Cell Signaling, США).

Оценка эффективности репарации ДР методом реактивации транскрипции. Метод реактивации транскрипции (Host Cell Reactivation assay, HCR) для изучения эффективности восстановления как ДР-ДНК, так и повреждений ДНК другого характера широко используется в биологических исследованиях (Johnson, Latimer, 2005; Thoms et al., 2007; Sears, Turchi, 2012). В репортерный вектор pGL3basic-luc вносят ДР в область, кодирующую люциферазу, с помощью эндонуклеазы рестрикции, что делает невозможным транскрипцию поврежденного гена до его репарации в клетке-реципиенте. Клетки, рассеянные на 96-луночные планшеты (в среде DMEM с 10% FCS

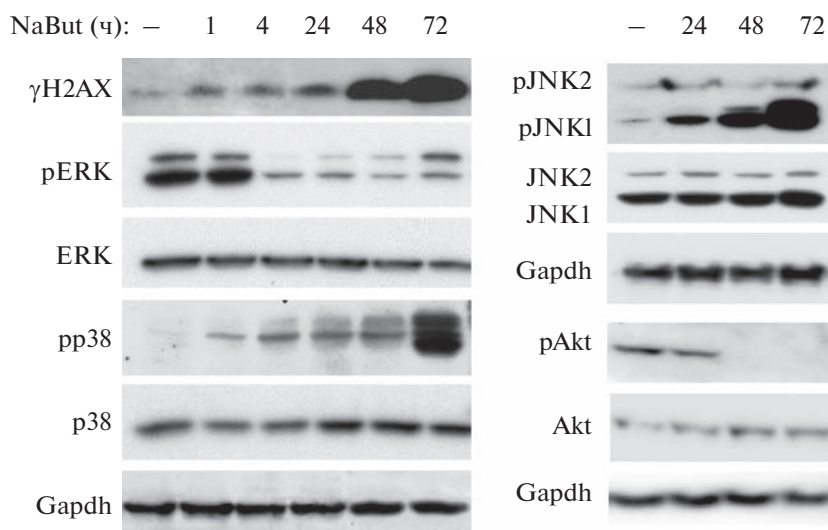


Рис. 1. Вестерн-блоты белков клеток mERas, необработанных или обработанных ингибитором HDAC бутиратом натрия (NaBut) в течение 1–72 ч, с антителами к фосфорилированной форме гистона H2AX (γ H2AX), а также к тотальным и фосфорилированным формам киназ ERK, p38, JNK и Akt. Gapdh использован в качестве контроля нагрузки.

без антибиотика) в плотности 10×10^3 кл./лунку, трансфицировали интактным или линейаризованным вектором pGL3basic-luc с помощью трансфицирующего агента Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для контроля эффективности трансфекции клетки одновременно трансфицировали контрольным вектором pRL-TK, экспрессирующим люциферазу Renilla.

Через 16 ч после трансфекции клетки оставляли необработанными или обрабатывали специфическими ингибиторами киназ отдельно или совместно с NaBut в течение 24 ч, после чего клетки лизировали и измеряли в лизатах активность люциферазы с использованием набора для репортерного анализа с двумя люциферазами — Firefly и Renilla (Promega, США) на люминометре TD-20/20 (Turner Design, США) в соответствии с инструкцией производителя. Результаты вычисляли в изменениях активности люциферазы Firefly относительно активности люциферазы Renilla (в разах). По активности люциферазы, синтезированной после восстановления поврежденной плазмидной ДНК, оценивали эффективность репарации ДР. Люциферазная активность в клетках с поврежденной ДНК, не обработанных агентами, принята за 1 ед. Было проведено не менее трех независимых экспериментов по совместной трансфекции. На графиках представлены средние значения из трех независимых экспериментов и ошибки среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Индукцированное NaBut накопление γ H2AX сопровождается изменением активности MAP-киназ. ИГД

вызывают накопление фосфорилированной формы гистона H2AX (γ H2AX) (Gaymes et al., 2006; Abramova et al., 2011; Wang et al., 2012). Однако в отличие от генотоксических агентов, также индуцирующих накопление γ H2AX, действие ИГД не приводит к ДР-ДНК (Abramova et al., 2011; Gnedina et al., 2022). Данные вестерн-блот-анализа (рис. 1) показывают, что индуцированное NaBut накопление фосфорилированной формы H2AX сопровождается изменением активности белков семейства MAP-киназ. Установлено, что NaBut вызывает накопление фосфорилированных форм киназ p38 и JNK1 в клетках mERas (рис. 1). Увеличение содержания γ H2AX и активированных (фосфорилированных) форм киназ p38 и JNK1 обнаруживается через 24 ч после добавления NaBut к клеткам и продолжает увеличиваться до 72 ч действия агента. Стоит отметить, что NaBut не изменяет фосфорилирования киназы JNK2, являющейся положительным регулятором белка p53, в отличие от JNK1 (Fogarty et al., 2003; Tafolla et al., 2005). Активирующее фосфорилирование MAP-киназы ERK, а также киназы PKB/Akt, наоборот, уменьшается при действии NaBut с течением времени (рис. 1). По данным вестерн-блотинга с антителами против фосфорилированных форм киназ видно, что NaBut приводит практически к полной инактивации ERK и PKB/Akt в клетках mERas.

Таким образом, индуцированное NaBut фосфорилирование гистона H2AX сопровождается активацией киназ p38 и JNK1 и снижением активности ERK и PKB/Akt.

Роль MAP-киназ в регулировании базального и индуцированного фосфорилирования гистона H2AX. Для изучения вовлеченности MAP-киназ в фосфорилирование гистона H2AX анализировали изменение

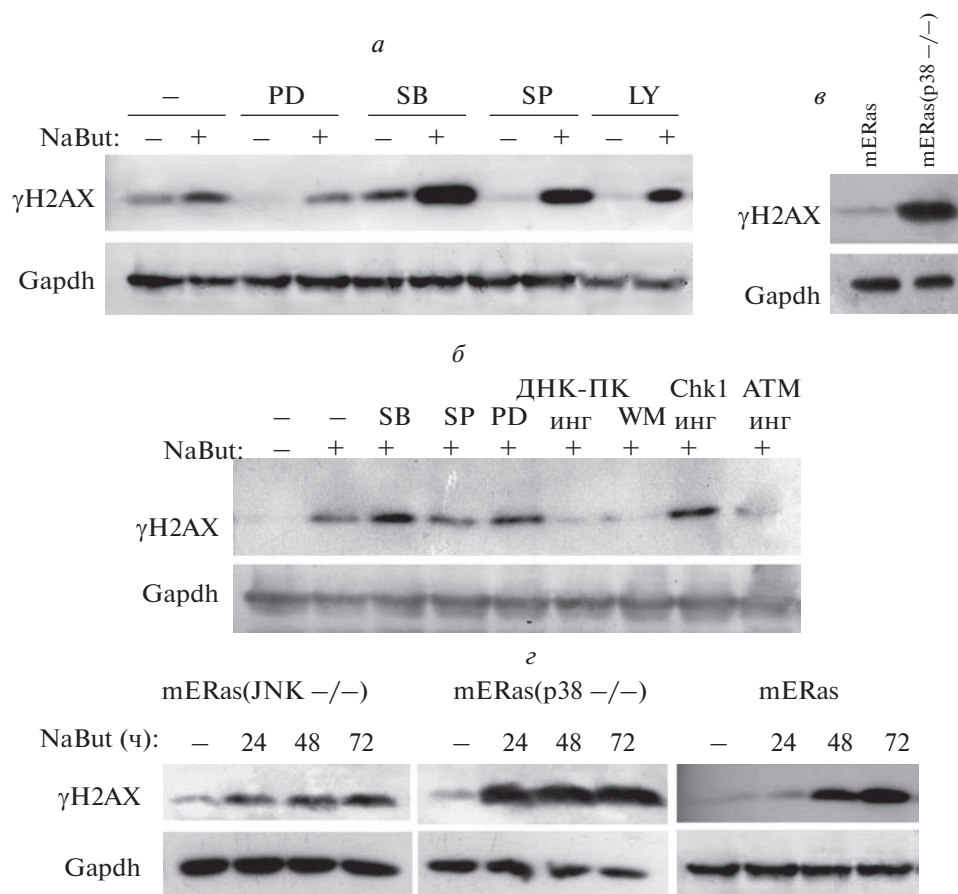


Рис. 2. Вестерн-блоты с антителами к фосфорилированной форме гистона H2AX (γ H2AX) белков клеток mERas с нормальными (а, б) или инактивированными (в, г) формами киназ JNK (mERas(JNK-/-) или p38 (mERas(p38-/-)). а, б – Клетки mERas не обработаны (–) или обработаны ингибиторами (инг) MAP-киназ или киназ PI3, ATM, Chk1 или ДНК-ПК отдельно, или в комбинации с NaBut в течение 24 ч. в – Базальный уровень γ H2AX в контрольных клетках mERas и в клетках с инактивированной киназой p38 (mERas(p38-/-)). г – Клетки не обработаны или обработаны NaBut в течение 24–72 ч. Gapdh использован в качестве контроля нагрузки. Обозначения: PD – PD98059 (ингибитор киназы ERK); SB – SB203580 (ингибитор киназы p38); SP – SP600125 (ингибитор киназы JNK1/2); WM и LY – соответственно вортманн и LY294002 (ингибиторы киназы PI3).

содержания γ H2AX при подавлении активности соответствующих киназ, как с помощью специфических химических ингибиторов, так и на генетическом уровне. Результаты вестерн-блотинга показывают, что подавление активности киназ ERK и JNK специфическими ингибиторами PD98059 и SP600125 соответственно снижает базальный уровень фосфорилированности H2AX (рис. 2а). Ингибитор киназы p38, вещество SB203580, увеличивает экспрессию γ H2AX (рис. 2а). Также по результатам вестерн-блотинга видно, что содержание γ H2AX повышено в клетках mERas с генетически инактивированной киназой p38 (mERas(p38-/-)) по сравнению с нативными клетками mERas (рис. 2в), что подтверждает негативную роль киназы p38 в фосфорилировании H2AX.

Индукционное NaBut фосфорилирование H2AX не снижается при подавлении MAP-киназ p38, JNK или ERK специфическими химическими ингибиторами (рис. 2а, б). Только ингибитор PI3-киназы

WM или специфические ингибиторы PI3-подобных киназ ДНК-ПК и ATM отменяют NaBut-индуцированное накопление γ H2AX (рис. 2б). Соответствующие результаты получены при использовании клеток, в которых активность киназ p38 и JNK подавлена с помощью генетических модификаций. Данные вестерн-блотинга (рис. 2г) показывают, что в клетках mERas с инактивированными киназами p38 или JNK (mERas(p38-/-) и mERas(JNK-/-) соответственно) NaBut вызывает накопление γ H2AX с течением времени (рис. 2г), как и в контрольных трансформантах mERas.

При подавлении активности киназы p38 усиливается индуцированная NaBut экспрессия γ H2AX (рис. 2). На рисунке 2г видно, что при сниженной активности киназы p38 в клетках mERas(p38-/-) γ H2AX накапливается быстрее при действии NaBut, достигая максимального уровня уже через 24 ч действия агента. При этом уровень γ H2AX, накопленный в резуль-

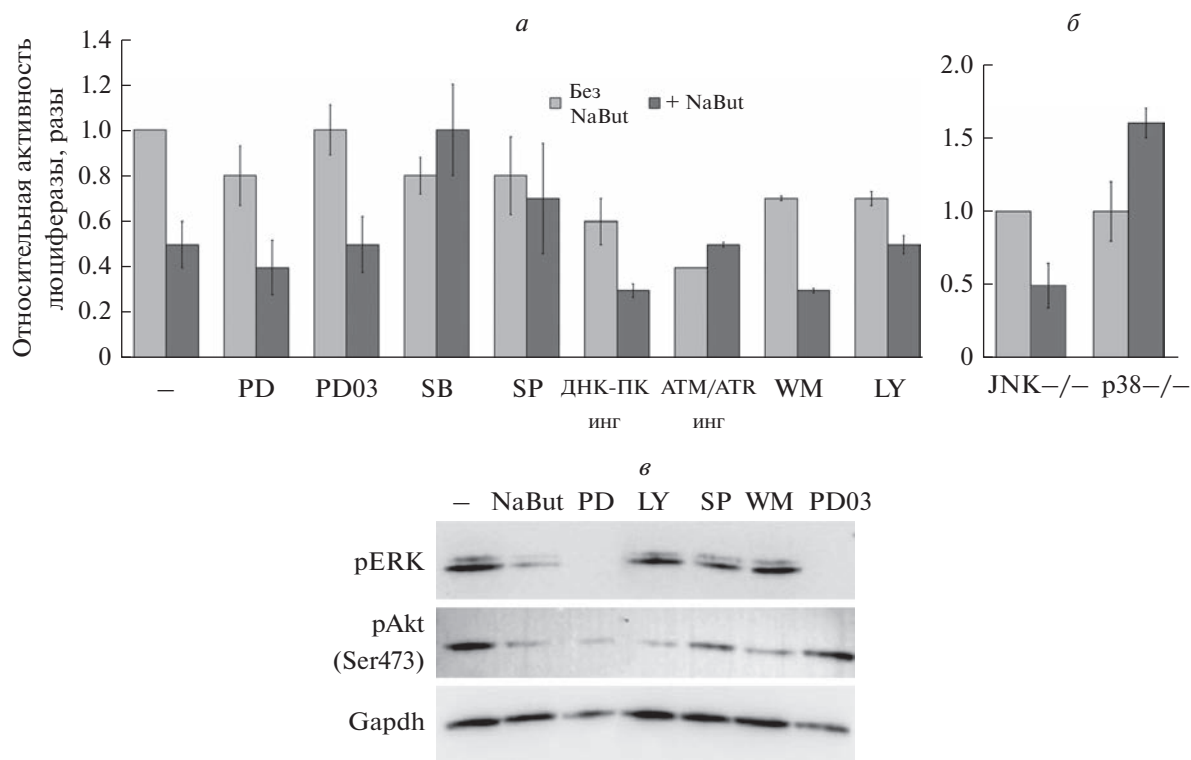


Рис. 3. Реактивация клетками-хозяевами транскрипции поврежденного эндонуклеазой гена люциферазы вектора pGL3-luc в контрольных клетках mERas (*а*) и в клетках mERas с инактивированными формами киназы JNK (JNK^{-/-}) или p38 (p38^{-/-}) (*б*). Клетки трансфицировали интактным или поврежденным вектором pGL3-luc и инкубировали без NaBut (серые столбики) или в присутствии NaBut (темные столбики) отдельно или в комбинации с ингибиторами (инг) MAP-киназ p38 (SB), ERK (PD, PD03), JNK (SP) или киназ ДНК-ПК, АТМ/АТР или PI3K (WM, LY) в течение 24 ч. Относительную активность люциферазы, соответствующую эффективности репарации ДНК при действии химических веществ, рассчитывали по отношению к эффективности восстановления транскрипции гена люциферазы в ничем не обработанных клетках mERas. PD03 — PD0325901, другие обозначения те же, что и на рис. 2.

тате действия NaBut, значительно превышает количество γ H2AX в случае интактной p38 (рис. 2*а, з*).

Таким образом, подавление активности MAP-киназ не отменяет индуцированное NaBut накопление γ H2AX, а ингибирование MAP-киназы p38, наоборот, приводит к увеличению количества γ H2AX, как базального, так и индуцированного NaBut.

Роль MAP-киназ в индуцированном ИГД подавлении репарации в трансформированных клетках. Ранее было показано, что ИГД пролонгируют существование фокусов γ H2AX, индуцированных генотоксическим воздействием (облучением, ингибиторами топоизомеразы II), благодаря снижению эффективности репарации ДНК в трансформированных клетках (Abramova et al., 2011; Gnedina et al., 2022). Для идентификации сигнальных путей, приводящих к ИГД-зависимому ингибированию репарации, анализировали влияние MAP-киназ на репарацию ДР-ДНК методом реактивации транскрипции поврежденной ДНК в клетке-реципиенте. Данные экспериментов по реактивации транскрипции показывают, что фармакологическое ингибирование PI3-киназы или PI3-подобных киназ ДНК-ПК и АТМ снижает эффективность репарации ДР (рис. 3*а*, светлые столб-

цы), тогда как ингибирование киназ ERK, JNK и p38 не влияет на эффективность базальной репарации (рис. 3*а*).

Индукцированное NaBut ингибирование репарации ДНК (рис. 3*а, б*, темные столбцы) отменялось только при подавлении активности киназы p38 веществом SB203580. Подобные результаты, свидетельствующие об определяющей роли киназы p38 в ИГД-зависимом ингибировании репарации, были получены при использовании клеток с генетически инактивированными киназами (рис. 3*б*). В клетках с инактивированной киназой JNK ДНК-репарация снижается в присутствии NaBut, как и в контрольных клетках mERas (рис. 3*а, б*). Однако в клетках, экспрессирующих p38 с инактивирующими мутациями, NaBut не снижает эффективность восстановления ДР. Полученные результаты позволяют рассматривать киназу p38, как один из возможных определяющих факторов в ИГД-индуцированной задержке репарации ДНК в трансформированных клетках.

Вестерн-блот, представленный на рис. 3*в*, демонстрирует эффективность работы ингибиторов киназ, использованных нами. Вещество PD98059 снижает содержание фосфорилированных форм киназ

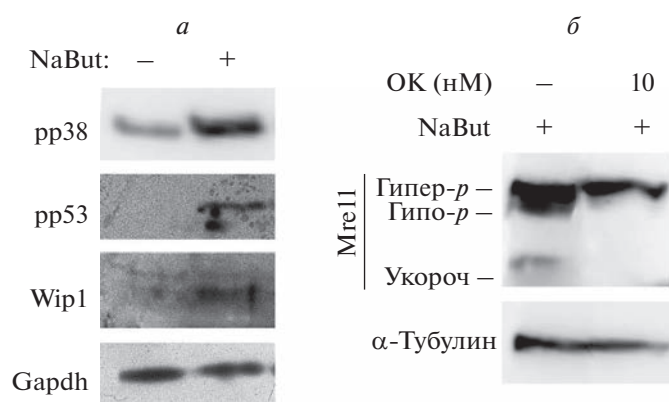


Рис. 4. Вестерн-блоты белков из клеток mERas, обработанных только NaBut в течение 24 ч (а) и NaBut отдельно или совместно с ингибитором фосфатаз оокадаиковой кислотой (ОК) в течение 6 ч (б). ОК отменяет индуцированное NaBut появление гипофосфорилированной формы (Гипо-р) репарационного белка Mre11; Гипер-р и Укороч – гиперфосфорилированная и укороченная форма Mre11 соответственно.

ERK1/2 и PKB/Akt (рис. 3б), а его ингибирующая активность в отношении вышележащих киназ в каскадах MEK/ERK и PI3K/Akt описана в литературе (Ye et al., 2018). Более специфичный ингибитор для MEK/ERK-пути вещество PD0325901 снижает содержание только pERK1/2. Ингибиторы PI3-киназы вещества LY294002 и WM уменьшают уровень фосфорилированности PKB/Akt. Ингибиторы киназ p38 и JNK не влияют на фосфорилированность этих киназ, а изменяют только их активность. Вещество SB203580 ингибирует каталитическую активность МАР-киназы p38 через связывание с АТФ-связывающим карманом киназы (Young et al., 1997) и не ингибирует фосфорилирование p38 (Kumar et al., 1999). Вещество SP600125 ингибирует активность киназ JNK за счет конкурирования за сайт связывания с АТФ (Bennett et al., 2001) и также не влияет на фосфорилирование самих киназ семейства JNK.

Таким образом, мы показали, что индуцированное NaBut ингибирование репарации ДНК отменялось только при подавлении активности МАР-киназы p38, как при использовании специфического химического ингибитора p38, так и при ее генетической инактивации.

Ингибитор гистон-деацетилаз бутират натрия активирует фосфатазу Wip1. Для выяснения возможной роли МАР-киназы p38 в ИГД-зависимой задержке репарации ДНК и накоплении γ H2AX в трансформированных клетках исследовали влияние NaBut на изменение нижележащей мишени p38 фосфатазы Wip1 (Lowe et al., 2012). Фосфатаза Wip1 является членом семейства серин-треониновых фосфатаз PP2C, которая способна как самостоятельно дефосфорилировать гистон H2AX (Cha et al., 2010; Moon et al., 2010), так и через инактивирование киназы ATM

(Shreeram et al., 2006) снижать количество γ H2AX, в результате чего нарушается рекрутирование важных факторов репарации ДНК к поврежденным участкам и задерживается репарация ДР ДНК.

Результаты вестерн-блоттинга показывают, что NaBut параллельно с накоплением активированной формы киназы p38 вызывает накопление онкосупрессорного белка p53 и, как следствие, увеличение содержания фосфатазы Wip1 в трансформированных клетках mERas (рис. 4а).

Ранее нами было показано, что ИГД-индуцированное нарушение репарации ДНК в трансформированных клетках связано с дерегуляцией ключевых репарационных белков, а именно с уменьшением пула фосфорилированного белка репарации ДР Mre11 и накоплением его гипофосфорилированной и укороченной неактивной формы (Gnedina et al., 2022). Для изучения возможной роли фосфатазы Wip1 в дефосфорилировании и инактивировании белка Mre11 клетки mERas были обработаны NaBut отдельно или совместно с ингибитором фосфатаз оокадаиковой кислотой. Результаты вестерн-блот-анализа показывают, что оокадаиковая кислота предотвращает индуцированное NaBut появление гипофосфорилированного белка Mre11, а также его укороченной неактивной формы (рис. 4б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на наличие новых терапевтических стратегий, распространенной тактикой противоопухолевой терапии остается применение генотоксических агентов. Генотоксические агенты вызывают разрывы ДНК, которые сопровождаются накоплением маркера ДР-ДНК фосфорилированной формы гистона H2AX (γ H2AX) (Rogakou et al., 1998; van Attikum, Gasser, 2009). ИГД самостоятельно не вызывают ДР-ДНК, однако, подобно генотоксическим агентам, вызывают накопление γ H2AX (Gaymes et al., 2006; Abramova et al., 2011; Wang et al., 2012), а также продлевают существование фокусов γ H2AX, индуцированных генотоксическими воздействиями (Abramova et al., 2011), что позволяет предположить такую реорганизацию клеточного ответа на повреждение ДНК при действии ИГД в трансформированных клетках, которая приводит к нарушению или невозможности восстановления повреждений ДНК, вызванных генотоксическими агентами. Для идентификации сигнальных путей, приводящих к накоплению γ H2AX при действии ИГД в трансформированных клетках, нами исследована роль представителей семейства МАР-киназ.

Мы показали, что индуцированное NaBut фосфорилирование гистона H2AX сопровождается активацией киназ p38 и JNK1 и снижением активности ERK и PKB/Akt (рис. 1). Подавление активности киназ ERK и JNK уменьшало базальный уровень γ H2AX, но не отменяло NaBut-индуцированного

фосфорилирования H2AX и не влияло на задержку репарации ДР-ДНК, обусловленную действием NaBut (рис. 3). Ингибирование MAP-киназы p38 увеличивало как базальное, так и индуцированное NaBut фосфорилирование H2AX (рис. 2). Индуцированное NaBut ингибирование репарации ДНК отменялось при снижении активности p38 как при использовании специфического химического ингибитора p38, так и при генетической инактивации (рис. 3).

В литературе широко представлены данные о роли MAP-киназ в клеточном ответе на повреждения ДНК. Сигнальный путь MEK/ERK участвует в регулировании клеточного ответа на ДНК-повреждения, способствуя остановке клеточного цикла (Wu et al., 2006; Yan et al., 2007) для предотвращения деления с поврежденной ДНК и инициирования репарации. Также ERK может осуществлять регулирование фосфорилирования гистона H2AX через модуляцию активности киназ ATM и ATR (Wu et al., 2006; Golding et al., 2007).

Киназы JNK вовлечены в регулирование ответа клетки на повреждение ДНК и репарации через транскрипционный фактор p53 (Picco, Pagès, 2013), изменяя его стабильность и активность. Киназы JNK могут также непосредственно фосфорилировать гистон H2AX по положению Ser139 в ответ на генотоксические воздействия (Lu et al., 2006; Sluss, Davis, 2006).

MAP-киназы семейства p38 активируются в ответ на повреждение ДНК, накапливаются преимущественно в ядре, где стабилизируют и активируют транскрипционный фактор p53 (Sanchez-Prieto et al., 2000), следствием чего является пролиферативный блок клеточного цикла G₁/S, репарация ДНК и (или) запуск апоптоза. Существуют противоречивые данные о влиянии киназ p38 на фосфорилирование гистона H2AX. С одной стороны, показано, что ингибирование активности p38 не отменяет экспрессию γ H2AX, вызванную генотоксическим воздействием, в клетках HeLa, и активирует апоптоз (Phong et al., 2010). С другой стороны, ингибирование p38 снижает фосфорилирование H2AX и апоптоз, индуцированные сывороточным голоданием в трансформированных кератиноцитах (Lu et al., 2008). Более того, p38 способны непосредственно фосфорилировать H2AX, что необходимо для индукции апоптоза, вызванного сывороточным голоданием (Lu et al., 2008).

Показанная нами активация MAP-киназы p38 при действии ИГД приводит к p53-зависимому накоплению фосфатазы Wip1 (рис. 4). Серин-треониновая фосфатаза Wip1 вовлечена в передачу сигнала о повреждении ДНК (Cha et al., 2010; Moon et al., 2010) и способна как самостоятельно дефосфорилировать гистон γ H2AX (Cha et al., 2010; Moon et al., 2010), так и через инактивирование киназы ATM (Shreeram et al., 2006) снижать количество γ H2AX, в результате чего нарушается рекрутирование важных

факторов репарации ДНК к поврежденным участкам и задерживается репарация ДР-ДНК (Moon et al., 2010). Полученные результаты о накоплении Wip1 при действии NaBut позволяют сделать предположение о ее роли в NaBut-зависимом ингибировании репарации.

Ранее нами было показано, что снижение эффективности восстановления ДР-ДНК при действии NaBut в трансформированных клетках связано с нарушением стабильности одного из компонентов репарационного комплекса MRN (Nbs1/Rad50/Mre11) белка Mre11 (Gnedina et al., 2022). NaBut вызывает накопление гипофосфорилированной формы Mre11, а также его неактивной укороченной формы (Gnedina et al., 2022). Известно, что дефосфорилирование белка Mre11 является иницирующим событием для его дальнейшего протеолиза до укороченной формы, лишенной ДНК-связывающей и нуклеазной активности (Nicholson et al., 2017). Инактивацию комплекса MRN связывают с повышением чувствительности опухолевых клеток к генотоксической терапии за счет снижения эффективности репарации повреждений ДНК (Bian et al., 2019).

Мы предположили участие фосфатазы Wip1 в дестабилизации репарационного белка Mre11 и показали, что ингибитор фосфатаз октадиновая кислота, подавляющая активность Wip1 (Fiscella et al., 1997), отменяет NaBut-индуцированное накопление гипофосфорилированной формы белка Mre11 и его неактивной укороченной формы в трансформированных клетках (рис. 4б). Таким образом, индуцированная NaBut инактивация белка Mre11, опосредованная фосфатазой Wip1, предотвращает последующую сборку комплекса репарации и восстановление поврежденной ДНК, что и может объяснить ИГД-зависимое ингибирование репарации ДР-ДНК и персистирование фокусов γ H2AX. Действие генотоксических агентов на клетки с модифицированной подобным образом системой ответа на ДНК-повреждения и репарации приводит к накоплению ДР-ДНК, репарация которых затруднена. Следовательно, можно предположить, что ИГД, самостоятельно не вызывая ДР, модифицируют систему ответа клетки на ДНК-повреждения таким образом, что сенсibilизируют клетки к генотоксическому стрессу, препятствуя репарации вносимых ими повреждений ДНК.

Фосфатаза Wip1 в настоящее время активно изучается как потенциальная мишень комбинированной противоопухолевой терапии в сочетании с генотоксическими агентами. Однако четкого видения, в каком направлении необходимо изменение активности Wip1, пока нет. Существуют данные о повышении чувствительности опухолевых клеток к генотоксическим агентам при ингибировании Wip1 (Belova et al., 2005; Pechackova et al., 2016). С другой стороны, увеличение апоптотической гибели p53-негативных опухолевых клеток при действии генотоксических агентов происходило при повышении

экспрессии фосфатазы Wip1 через активацию транскрипции гена проапоптотического белка Bax (Goloudina et al., 2012; Eren et al., 2021).

Предложенная нами модель сенсibilизации трансформированных клеток к ДНК-повреждающим воздействиям с помощью фосфатазы Wip1 через дефосфорилирование и инактивирование репарационного белка Mre11 еще нуждается в дополнительном обосновании в исследованиях с применением более специфических ингибиторов фосфатазы и методов генетической инактивации *wip1*. Однако полученные результаты позволяют сделать предположение об участии p38/Wip1-пути в ИГД-индуцированном накоплении γ H2AX и ингибировании репарации ДНК в трансформированных клетках.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-20229, <https://rscf.ru/project/22-25-20229/>) и Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 13 апреля 2022 г. № 05/2022.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах представленной работы животные и люди не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abramova M.V., Svetlikova S.B., Kukushkin A.N., Aksenov N.D., Pospelova T.V., Pospelov V.A. 2011. HDAC inhibitor sodium butyrate sensitizes E1A + Ras-transformed cells to DNA damaging agents by facilitating formation and persistence of γ H2AX foci. *Cancer Biol. Ther.* V. 12. P. 1069.
- Adimoolam S., Sirisawad M., Chen J., Thiemann P., Ford J.M., Buggy J.J. 2007. HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 104. P. 19482.
- Belova G.I., Demidov O., Fornace A.J., Bulavin D.V. 2005. Chemical inhibition of Wip1 phosphatase contributes to suppression of tumorigenesis. *Cancer Biol. Ther.* V. 4. P. 1154.
- Bennett B.L., Sasaki D.T., Murray B.W., O'Leary E.C., Sakata S.T., Xu W., Leisten J.C., Motiwala A., Pierce S., Satoh Y., Bhagwat S.S., Manning A.M., Anderson D.W. 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 98. P. 13681.
- Bian L., Meng Y., Zhang M., Li D. 2019. MRE11-RAD50-NBS1 complex alterations and DNA damage response: implications for cancer treatment. *Mol. Cancer.* V. 18. P. 169.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* V. 72. P. 248.
- Cha H., Lowe J.M., Li H., Lee J.-S., Belova G.I., Bulavin D.V., Fornace A.J. 2010. Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response. *Cancer Res.* V. 70. P. 4112.
- Eren M.K., Kartal N.B., Pilevneli H. 2021. Oncogenic WIP1 phosphatase attenuates the DNA damage response and sensitizes p53 mutant Jurkat cells to apoptosis. *Oncol. Lett.* V. 21. P. 479.
- Fiscella M., Zhang H., Fan S., Sakaguchi K., Shen S., Mercer W.E., Vande Woude G.F., O'Connor P.M., Appella E. 1997. Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 94. P. 6048.
- Fogarty M.P., Downer E.J., Campbell V. 2003. A role for c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1), but not JNK2, in the beta-amyloid-mediated stabilization of protein p53 and induction of the apoptotic cascade in cultured cortical neurons. *Biochem. J.* V. 371. P. 789.
- Gaymes T.J., Padua R.A., Pla M., Orr S., Omidvar N., Chomienne C., Mufti G.J., Rassool F.V. 2006. Histone deacetylase inhibitors (HDI) cause DNA damage in leukemia cells: a mechanism for leukemia-specific HDI-dependent apoptosis? *Mol. Cancer Res. MCR.* V. 4. P. 563.
- Gnedina O.O., Morshneva A.V., Skvortsova E.V., Igotti M.V. 2022. HDAC inhibitor sodium butyrate attenuates the DNA repair in transformed but not in normal fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. P. 3517.
- Golding S., Rosenberg E., Neill S., Dent P., Povirk L., Valerie K. 2007. Extracellular signal-related kinase positively regulates ataxia telangiectasia mutated, homologous recombination repair, and the DNA damage response. *Cancer Res.* V. 67. P. 1046.
- Goloudina A.R., Tanoue K., Hammann A., Fourmaux E., Le Guezennec X., Bulavin D.V., Mazur S.J., Appella E., Garrido C., Demidov O.N. 2012. Wip1 promotes RUNX2-dependent apoptosis in p53-negative tumors and protects normal tissues during treatment with anticancer agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 109. P. E68.
- Kasibhatla S., Brunner T., Genestier L., Echeverri F., Mahboubi A., Green D.R. 1998. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- κ B and AP-1. *Mol. Cell.* V. 1. P. 543.
- Konsoula Z., Cao H., Velen A., Jung M. 2011. Adamantanylhistone deacetylase inhibitor H6CAHA exhibits favorable pharmacokinetics and augments prostate cancer radiation sensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* V. 79. P. 1541.
- Kumar S., Jiang M.S., Adams J.L., Lee J.C. 1999. Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 263. P. 825.
- Lee J.H., Choy M.L., Ngo L., Foster S.S., Marks P.A. 2010. Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 107. P. 14639.
- Lowe J., Cha H., Lee M.-O., Mazur S.J., Appella E., Fornace A.J. 2012. Regulation of the Wip1 phosphatase and its effects on the stress response. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* V. 17. P. 1480.

- Lu C., Zhu F., Cho Y.-Y., Tang F., Zykova T., Ma W., Bode A.M., Dong Z. 2006. Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Mol. Cell*. V. 23. P. 121.
- Lu C., Shi Y., Wang Z., Song Z., Zhu M., Cai Q., Chen T. 2008. Serum starvation induces H2AX phosphorylation to regulate apoptosis via p38 MAPK pathway. *FEBS Lett*. V. 582. P. 2703.
- Menolfi D., Zha S. 2020. ATM, ATR and DNA-PKcs kinases—the lessons from the mouse models: inhibition $\neq$ deletion. *Cell Biosci*. V. 10. Article number 8.
- Moon S.-H., Lin L., Zhang X., Nguyen T.-A., Darlington Y., Waldman A.S., Lu X., Donehower L.A. 2010. Wild-type p53-induced phosphatase 1 dephosphorylates histone variant γ -H2AX and suppresses DNA double strand break repair. *J. Biol. Chem*. V. 285. P. 12935.
- Munshi A., Kurland J.F., Nishikawa T., Tanaka T., Hobbs M.L., Tucker S.L., Ismail S., Stevens C., Meyn R.E. 2005. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin. Cancer Res*. V. 11. P. 4912.
- Nicholson J., Jevons S.J., Groselj B., Ellermann S., Konietzny R., Kerr M., Kessler B.M., Kiltie A.E. 2017. E3 Ligase cIAP2 mediates downregulation of MRE11 and radiosensitization in response to HDAC inhibition in bladder cancer. *Cancer Res*. V. 77. P. 3027.
- Pechackova S., Burdova K., Benada J., Kleiblova P., Jenikova G., Macurek L. 2016. Inhibition of WIP1 phosphatase sensitizes breast cancer cells to genotoxic stress and to MDM2 antagonist nutlin-3. *Oncotarget*. V. 7. P. 14458.
- Phong M.S., Van Horn R.D., Li S., Tucker-Kellogg G., Surana U., Ye X.S. 2010. P38 mitogen-activated protein kinase promotes cell survival in response to DNA damage but is not required for the G₂ DNA damage checkpoint in human cancer cells. *Mol. Cell. Biol*. V. 30. P. 3816.
- Picco V., Pagès G. 2013. Linking JNK activity to the DNA damage response. *Genes Cancer*. V. 4. P. 360.
- Pospelova T.V., Medvedev A.V., Kukushkin A.N., Svetlikova S.B., van der Eb A.J., Dorsman J.C., Pospelov V.A. 1999. E1A + cHa-ras transformed rat embryo fibroblast cells are characterized by high and constitutive DNA binding activities of AP-1 dimers with significantly altered composition. *Gene Expr*. V. 8. P. 19.
- Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem*. V. 273. P. 5858.
- Sanchez-Prieto R., Rojas J.M., Taya Y., Gutkind J.S. 2000. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res*. V. 60. P. 2464.
- Shreeram S., Demidov O.N., Hee W.K., Yamaguchi H., Onishi N., Kek C., Timofeev O.N., Dudgeon C., Fornace A.J., Anderson C.W., Minami Y., Appella E., Bulavin D.V. 2006. Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways. *Mol. Cell*. V. 23. P. 757.
- Sluss H.K., Davis R.J. 2006. H2AX is a target of the JNK signaling pathway that is required for apoptotic DNA fragmentation. *Mol. Cell*. V. 23. P. 152.
- Tafolla E., Wang S., Wong B., Leong J., Kapila Y.L. 2005. JNK1 and JNK2 oppositely regulate p53 in signaling linked to apoptosis triggered by an altered fibronectin matrix: JNK links FAK and p53. *J. Biol. Chem*. V. 280. P. 19992.
- Thurn K.T., Thomas S., Raha P., Qureshi I., Munster P.N. 2013. Histone deacetylase regulation of ATM-mediated DNA damage signaling. *Mol. Cancer Ther*. V. 12. P. 1535. <https://doi.org/10.1158/1535>
- Van Attikum H., Gasser S.M. 2009. Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol*. V. 19. P. 207.
- Wang D., Zhao M., Chen G., Cheng X., Han X., Lin S., Zhang X., Yu X. 2013. The histone deacetylase inhibitor vorinostat prevents TNF α -induced necroptosis by regulating multiple signaling pathways. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death*. V. 18. P. 1348.
- Wang H., Zhou W., Zheng Z., Zhang P., Tu B., He Q., Zhu W.-G. 2012. The HDAC inhibitor depsipeptide transactivates the p53/p21 pathway by inducing DNA damage. *DNA Repair*. V. 11. P. 146.
- Wei F., Yan J., Tang D. 2011. Extracellular signal-regulated kinases modulate DNA damage response — a contributing factor to using MEK inhibitors in cancer therapy. *Curr. Med. Chem*. V. 18. P. 5476.
- Wu D., Chen B., Parihar K., He L., Fan C., Zhang J., Liu L., Gillis A., Bruce A., Kapoor A., Tang D. 2006. ERK activity facilitates activation of the S-phase DNA damage checkpoint by modulating ATR function. *Oncogene*. V. 25. P. 1153.
- Wu Y.-H., Hong C.-W., Wang Y.-C., Huang W.-J., Yeh Y.-L., Wang B.-J., Wang Y.-J., Chiu H.-W. 2017. A novel histone deacetylase inhibitor TMU-35435 enhances etoposide cytotoxicity through the proteasomal degradation of DNA-PKcs in triple-negative breast cancer. *Cancer Lett*. V. 400. P. 79.
- Yan Y., Black C.P., Cowan K.H. 2007. Irradiation-induced G2/M checkpoint response requires ERK1/2 activation. *Oncogene*. V. 26. P. 4689.
- Ye M., Zhang Y., Gao H., Xu Y., Jing P., Wu J., Zhang X., Xiong J., Dong C., Yao L., Zhang J., Zhang J. 2018. Activation of the aryl hydrocarbon receptor leads to resistance to EGFR TKIs in non-small cell lung cancer by activating Src-mediated bypass signaling. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*. V. 24. P. 1227.
- Young P.R., McLaughlin M.M., Kumar S., Kassis S., Doyle M.L., McNulty D., Gallagher T.F., Fisher S., McDonnell P.C., Carr S.A., Huddleston M.J., Seibel G., Porter T.G., Livi G.P., Adams J.L. et al. 1997. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J. Biol. Chem*. V. 272. P. 12116.

The Role of MAP Kinases in the Induced Histone H2AX Phosphorylation in Transformed Cells

O. O. Gnedina^a, A. V. Morshneva^a, and M. V. Igotti^{a, *}

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

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

Previously, we have shown that inhibitors of histone deacetylases (HDIs) do not induce DNA double strand breaks (DNA DSBs). However, like genotoxic agents, HDIs initiate the accumulation of phosphorylated histone H2AX (γ H2AX), which is a DNA DSB marker. HDIs can also reduce the efficiency of repair of DNA damaged by genotoxic effects in transformed cells. The aim of this work was to identify the signaling pathways leading to the accumulation of γ H2AX under the HDIs treatment in transformed cells. There was considered the role of the MAPK family kinases in phosphorylation of histone H2AX as well as inhibition of DNA repair induced with HDI sodium butyrate (NaBut). It was shown that the accumulation of γ H2AX under the NaBut treatment is accompanied by a decrease of the ERK and PKB/Akt kinases phosphorylation level in transformed cells. The activating phosphorylation of p38 kinase increases under the NaBut treatment, causing Wip1 phosphatase accumulation, which may be one of the reasons for the DNA repair inhibition. Suppression of p38 kinase activity abolishes the NaBut-induced inhibition of repair efficiency. The data obtained suggest the role of the p38/Wip1 pathway in the HDIs-induced decrease in repair efficiency in transformed cells.

Keywords: HDAC inhibitor, sodium butyrate, histone H2AX phosphorylation, MAP kinase, DNA repair, Wip1 phosphatase

УДК 616.894-092.9-092.4

НАРУШЕНИЕ УРОВНЯ ТРАНСПОРТЕРОВ ЛАКТАТА В КЛЕТКАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ БЕТА-АМИЛОИДА *IN VITRO* И *IN VIVO*

© 2023 г. Я. В. Горина^{1, *}, Е. В. Харитонов¹, Е. Д. Хилажева¹, А. А. Семенова¹, А. В. Моргун²,
Ю. К. Комлева^{1, 3}, О. Л. Лопатина², А. Б. Салмина^{1, 4}

¹Научно-исследовательский институт молекулярной медицины и патобиохимии Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ (КрасГМУ), Красноярск, 660022 Россия

²Кафедра поликлинической педиатрии и пропедевтики детских болезней с курсом ПО КрасГМУ, Красноярск, 660022 Россия

³Центр коллективного пользования Молекулярные и клеточные технологии, КрасГМУ, Красноярск, 660022 Россия

⁴Лаборатория нейробиологии и тканевой инженерии Института мозга Научного центра неврологии, Москва, 125367 Россия

*E-mail: yana_20@bk.ru

Поступила в редакцию 12.08.2022 г.

После доработки 22.09.2022 г.

Принята к публикации 07.10.2022 г.

Снижение энергетического метаболизма головного мозга коррелирует с когнитивными нарушениями при болезни Альцгеймера. Накапливающиеся экспериментальные данные указывают на то, что переносчики лактата и монокарбоксилатные транспортеры (МСТ) принимают непосредственное участие в церебральном энергетическом метаболизме. Однако в настоящее время изменения уровня лактата и МСТ при болезни Альцгеймера остаются неясными. Цель исследования заключалась в изучении содержания лактата и уровня его транспортеров МСТ1 и МСТ2 в клетках нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы при остром токсическом действии бета-амилоида (A β 1–42) *in vitro* и *in vivo*. Показано, что в условиях острого токсического действия A β 1–42 *in vivo* значительно ($P \leq 0.05$) уменьшается уровень лактата в ткани гиппокампа и повышается в диализате на фоне низкого уровня МСТ1 и МСТ2. *In vitro* выявлена высокая ($P \leq 0.05$) продукция лактата астроцитами, сопряженная с низким ($P \leq 0.05$) уровнем МСТ2 на нейронах. Таким образом, A β 1–42 вызывает снижение уровня лактата в ткани гиппокампа и повышение его уровня в диализате *in vivo*, что коррелирует с нарушением уровня МСТ1 и МСТ2. Это указывает на нарушение энергетического метаболизма за счет острого токсического действия A β 1–42. При этом выявленное повышение продукции лактата астроцитами *in vitro* может свидетельствовать о включении компенсаторного механизма, направленного на поддержание астроцитарно-нейронального взаимодействия.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, лактат, МСТ, энергетический метаболизм

DOI: 10.31857/S0041377123010042, **EDN:** GOTNXZ

Болезнь Альцгеймера (БА) — хроническое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся наличием клубков гиперфосфорилированного таубелка, отложением пептида бета-амилоида (A β 1–42) и потерей нейронов (Forlenza et al., 2010). Характерной особенностью пациентов с БА является неспособность консолидировать долговременную память, что приводит к прогрессирующему ухудшению памяти по мере развития заболевания (Bondi et al., 2017).

Важно отметить, что энергетические потребности головного мозга очень высокие, и в этом контексте действуют жесткие регулирующие механизмы, обеспечивающие своевременную доставку необходимых энергетических субстратов в соответствии с активностью нейронов, для формирования и консолидации памяти (Falkowska et al., 2015; Shin et al., 2018). Ряд исследований убедительно продемонстрировали, что снижение энергетического метаболизма головного мозга может не только предшествовать, но и способствовать развитию БА с выраженным проявлением митохондриальной и когнитивной дисфункции (Mosconi et al., 2009; Croteau et al., 2018). Глюкоза является одним из ключевых компонентов сигнальных путей для поддержания функции нейронов.

Принятые сокращения: БА — болезнь Альцгеймера; ГЭБ — гемато-энцефалический барьер; МСТ — монокарбоксилатные транспортеры; A β 1–42 — бета-амилоид; BSA — бычий сывороточный альбумин; GFAP — глиальный фибриллярный кислый белок; NSE — нейрон-специфическая энолаза; PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

При этом в условиях покоя астроциты потребляют больше всего глюкозы (около 85%) и выделяют лактат, в то время как нейроны вносят минимальный вклад в потребление этого субстрата в головном мозге (Bolaños et al., 2010).

Как показывают последние экспериментальные данные, нарушение церебрального метаболизма глюкозы, обусловленное снижением нейронального поглощения глюкозы, дисфункцией митохондрий и увеличением продукции активных форм кислорода, обнаруживается у лиц с семейной формой БА еще до накопления бляшек A β 1–42 (Ding et al., 2013; Wang et al., 2020).

Многие исследования также продемонстрировали, что переносчики глюкозы в значительной мере уменьшаются в головном мозге при БА, что, в свою очередь, может способствовать нарушению памяти (Correia et al., 2012; Jin et al., 2013; Bartolotti, Lazarov, 2019). Это прямо указывает на существование тесной корреляции между гипометаболизмом глюкозы и дефицитом памяти при БА (Cunnane et al., 2011).

Несмотря на ряд свидетельств того, что лактат является важным энергетическим субстратом для организма, особенно на ранних этапах онтогенеза, его присутствие в головном мозге интерпретируется как признак церебрального повреждения. Кроме того, долгое время лактат считался потенциально токсичным продуктом метаболизма, однако теперь он признан не только ключевым участником нейрон-астроглиального метаболического сопряжения, но даже предпочтительным источником энергии при определенных обстоятельствах (Tang, 2018; Muraleedharan et al., 2020).

Известно, что в физиологических условиях активация анаэробного гликолиза является обычным способом адаптации при дефиците энергии в головном мозге (Koenig, 2008).

Необходимо отметить и установленные доказательства того, что аэробный гликолиз и связанное с ним производство и транспорт лактата от астроцитов к нейронам важен для поддержания синаптической пластичности и долговременной памяти (Newman et al., 2011; Suzuki et al., 2011). Было выявлено, что интрагиппокампальные инфузии лактата в значительной степени улучшают память у крыс, при этом эффект выраженно подавляется фармакологическим ингибированием транспорта лактата в нейроны (Newman et al., 2011).

Стоит отметить, что транспорту лактата в нейроны ЦНС способствуют монокарбоксилатные транспортеры (МСТ). Известно, что МСТ1 во взрослом головном мозге экспрессируется, в основном, астроцитами и клетками церебрального эндотелия, а МСТ2 — преимущественно нейронами (Salmina et al., 2015), но экспрессия этих транспортеров может быть зарегистрирована и на других клетках, например, транспортеры МСТ1 при гипоксии активно экспрессируются на нейронах, тогда как экспрессия МСТ2 на

нейронах в данных условиях резко снижается. Интересно, что PGC-1 (стимулятор митохондриального биогенеза) увеличивает уровень МСТ1 в разных клетках (Bergersen, 2015).

Примечательно, что МСТ1 может работать и на импорт, и на экспорт лактата, в зависимости от энергетических потребностей клеток, тогда как МСТ2, в основном, используется для транспорта лактата внутрь клеток, однако некоторые авторы считают, что МСТ1 и МСТ2 в большей степени предназначены для импорта лактата, а МСТ4 — для высвобождения лактата из клеток (Bergersen, 2015).

Ряд исследований показал, что содержание лактата и уровня МСТ изменяются при патологических заболеваниях, таких как опухоль и ишемия головного мозга (Moreira et al., 2009; Pinheiro et al., 2012). Сопутствующие исследования продемонстрировали, что уровни лактата в значительной мере повышены в спинномозговой жидкости у пациентов с БА на фоне сопровождающегося гипометаболизма глюкозы (Liguori et al., 2016). Однако исследования влияния уровня лактата и содержания МСТ на нейрональную и астроглиальную дисфункцию при БА весьма ограничены.

Таким образом, цель настоящего исследования — изучение содержания лактата и содержания его транспортеров — МСТ1 и МСТ2 в клетках нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы при остром токсическом действии A β 1–42 *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для проведения исследований использовали моделирование БА в условиях *in vivo* и *in vitro*. Использование в нашем исследовании мышинной модели БА обеспечивает не только лучшее понимание поведенческих изменений, ассоциированных с нарушением экспрессии транспортеров лактата в процессе развития заболевания, но также учитывает биологическую сложность живого организма. Однако модель *in vivo* ограничивает доступность к интересующей ткани, затрудняет мониторинг в реальном времени и измерение уровня целевых маркеров при развитии заболевания, нивелируя влияние побочных факторов. Напротив, модель БА *in vitro* с использованием клеточных культур (нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов) — модель гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) с добавлением A β 1–42 — позволяет провести исследования на живых клетках, а также дает возможность осуществлять непрерывное наблюдение за процессами, протекающими на клеточном уровне (Shin et al., 2019). Иными словами — получить подробную информацию о молекулярных механизмах в интересующих нервных клетках определенного региона головного мозга. При этом возможное влияние сопутствующих факторов, наличие которых вероятно в условиях *in vivo*, исключается. Таким об-



Рис. 1. Блок-схема эксперимента по определению уровня лактата и его транспортеров *in vivo*. ИК — интрагиппокампальное, ПО — послеоперационный, СФМ — спектрофотометрия, ИГХ — иммуногистохимия.

разом, модель БА *in vitro* выступает в качестве значимого дополнительного инструмента для преодоления ограничений модели заболевания на животных.

В нашем случае модель БА *in vitro* использовалась для изучения уровня лактата и содержания его транспортеров, то есть возможных метаболических изменений, происходящих в клетках нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы (в модели ГЭБ) при культивировании в присутствии Аβ1-42. Блок-схема эксперимента *in vivo* представлена на рис. 1.

Животные и эксперименты с ними. В работе использовали 20 самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 4 мес. Экспериментальная группа животных (C57BL/6 + Аβ1-42) — мыши после введения в зону гиппокампа CA1 амилоида Аβ1-42 по 1 мкл билатерально согласно стереотаксическим координатам (ML ± 1.3 мм, в AP — 2.0 мм, DV — 1.9 мм) ($n = 10$). Контрольная группа мышей (C57BL/6 + PBS) — ложно-оперированные животные после введения фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), растворителя для Аβ1-42 ($n = 10$).

Животные во всех вариантах экспериментов находились в клетках со свободным доступом к воде и корму при температуре $21 \pm 1^\circ\text{C}$ и регулярном световом цикле 12 ч день/12 ч ночь. Планирование и проведение экспериментов на животных осуществляли при соблюдении “принципа 3R”: Replacement — использование альтернативных методов (культуры клеток); Reduction — использование минимального количества животных в эксперименте; Refinement — не подвергать животных безосновательному стрессу до, во время и после проведения эксперимента. Рандомизации не было при распределении объектов исследования. Размер выборки не рассчитывался.

Все исследования на животных проводили в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС). Исследования выполняли после утверждения заявки и протокола на использование лабораторных животных для исследования на заседании биоэтической комиссии по работе с животными при локальном этическом комитете Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Мини-

стерства здравоохранения РФ (выписка из протокола № 3 от 29.10.2019 г.).

Экспериментальное моделирование нейродегенерации *in vivo*. Моделирование БА проводили путем интрагиппокампального введения Аβ1-42 (Sigma-Aldrich, США) по стереотаксическим координатам мозга в зону CA1. Аβ1-42 предварительно растворяли в ДМСО (Sigma-Aldrich, США) до концентрации 4 мМ, затем брали аликвоту и разбавляли в PBS (Sigma-Aldrich, США) до концентрации 50 мкМ с последующей агрегацией в термостате при 37°C в течение 7 сут. 1 мкл Аβ1-42 вводили с каждой стороны гиппокампа в зону CA1 (Epelbaum et al., 2015). Контрольной группе животных вводили PBS, содержащий ДМСО в том же количестве, что и при растворении Аβ1-42, с использованием той же процедуры.

Признаки БА выявляли, начиная с 10 сут (Sipos et al., 2007) после оперативного вмешательства. Верификацию модели БА проводили с помощью окрашивания срезов головного мозга тирофлавином S (Sigma-Aldrich, США) (Комлева и др., 2015). После введения Аβ1-42 в ткани головного мозга амилоидные бляшки флуоресцировали зеленым цветом (рис. 2).

Оценку когнитивных функций у исследуемых групп животных проводили с использованием нейрореповеденческого теста Fear conditioning, результаты по которому были представлены нами ранее (Горина и др., 2017).

Микродиализ тканей головного мозга экспериментальных животных. Сбор межклеточной жидкости (диализата) осуществляли с использованием установки для микродиализа (Eicom Corporation, США). Перед проведением микродиализа экспериментальным животным в левый желудочек головного мозга с помощью стереотаксического аппарата устанавливали направляющую канюлю по координатам ML 1 мм, в AP — 0.46 мм, DV 2.2 мм, которую затем фиксировали стоматологическим цементом.

После операции животное помещали в клетку на 5 сут для полного восстановления со свободным доступом к воде и корму при постоянной температуре $21 \pm 1^\circ\text{C}$ и регулярном световом цикле 12 ч день/12 ч ночь.

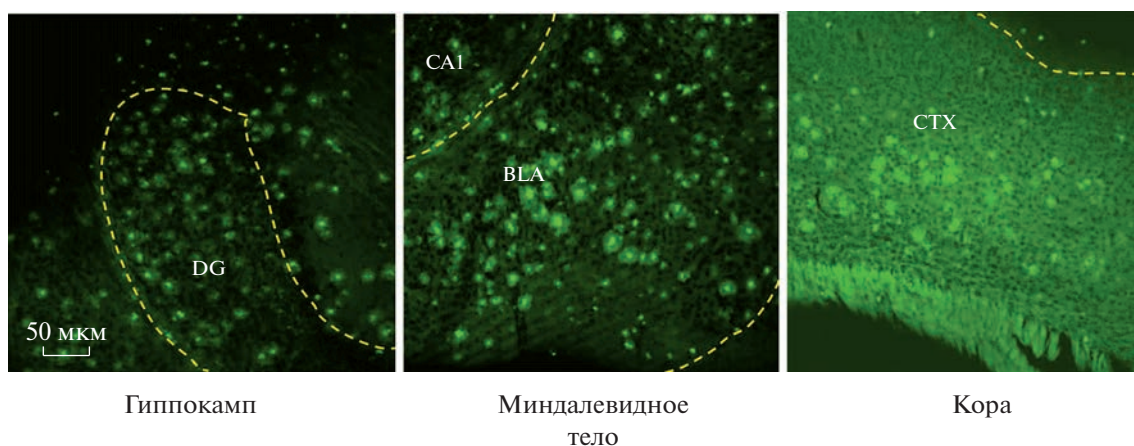


Рис. 2. Визуализация бляшек бета-амиоида ($A\beta 1-42$) в областях головного мозга экспериментальных мышей. DG — зубчатая извилина гиппокампа, CA1 — область гиппокампа, BLA — базолатеральное миндалевидное тело, CTX — кора.

Сбор целевых компонентов межклеточной жидкости головного мозга осуществляли с использованием искусственной спинномозговой жидкости, приготовление которой осуществляли следующим образом: в деионизованной воде (5 мл) растворяли 0.36525 г NaCl (Sigma-Aldrich, США), 0.0093 г KCl (Sigma-Aldrich, США) и 0.0075 г NaH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, США). К 0.5 мл полученного раствора добавляли 0.01092 г $NaHCO_3$ (Sigma-Aldrich, США), 0.009 г кристаллической глюкозы (Sigma-Aldrich, США), 0.01 г $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich, США), 0.0025 г $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich, США) и доводили общий объем аликвоты до 5 мл. Полученный раствор фильтровали.

Сбор диализата проводился в течение 24 ч у свободнодвижущегося животного, подключенного через капилляры к направляющей канюле. Мышь находилась в прозрачном боксе со свободным доступом к воде и корму. Диализат ($V = 20$ мкл) собирался со скоростью 0.3 мкл/мин в микропланшет, расположенный в коллекторе с системой охлаждения до $2^\circ C$.

Иммуногистохимия ткани головного мозга. Через 60 мин после проведения микродиализа осуществляли транскардиальную перфузию 4%-ным параформальдегидом (Sigma-Aldrich, США) с последующим забором головного мозга. Мозг фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине pH 7.4 (Sigma-Aldrich, США), после чего погружали в 20%-ный раствор сахарозы (Sigma-Aldrich, США). С помощью микротомы (Thermo Scientific Microm HM 650, США) изготавливали срезы толщиной 50 мкм. Изучали наличие и уровень целевых маркеров методом непрямой иммуногистохимии для свободно плавающих срезов (Encinas, Enikolopov, 2008).

После промывки в PBS срезы блокировали 3%-ным бычьим сывороточным альбумином (BSA, Sigma-Aldrich, США) в PBS и 1%-ном Тритоне X-100 (Sigma-Aldrich, США) в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим инкубированием в те-

чение ночи с первичными антителами с 3%-ным BSA в PBS и 0.2%-ным Тритоном X-100 при $4^\circ C$. После инкубации с первичными антителами срезы промывали и инкубировали со вторичными антителами в течение 2 ч при комнатной температуре. Наименование первичных и вторичных антител представлены в табл. 1. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа (Olympus FV 10i, Япония).

В иммуногистохимическом исследовании в экспериментальной и контрольной группах было по 5 животных. От каждого животного отбирали по 3 среза головного мозга. Подсчет клеток, экспрессирующих MCT1 и MCT2 в клетках нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы, в каждом срезе в области гиппокампа проводили в трех полях зрения (100×100 мкм). Регистрировали среднее значение по трем полям зрения. В графическом изображении представлены среднее значение по трем полям зрения с каждого среза (число срезов $n = 15$). При обработке полученных результатов принимали во внимание долю клеток, которые несли целевую метку и выражали в процентах от общего числа клеток.

Определение уровня лактата в ткани гиппокампа и диализате *in vivo*. Уровень лактата определяли в группах по 5 животных. Подготовку ткани гиппокампа проводили следующим образом: образцы тканей (около 10 мг ткани) промывали в холодном PBS, ресуспендировали ткань в 6-кратном объеме буфера для анализа лактата (Lactate Assay Buffer, Abcam, Великобритания) на льду с помощью гомогенизатора Даунса (WK Life Sciences GmbH, Германия), затем центрифугировали (центрифуга с охлаждением Hitachi Koki, Япония) при 11000 g в течение 5 мин при $4^\circ C$, после чего супернатанты собирали и переносили в чистые пробирки. Уровень лактата определяли спектрофотометрически с помощью микропланшетного фотометра (Anthos 2010; Biochrom, Великобритания) согласно протоколу производителя, пред-

Таблица 1. Антитела, используемые в иммуногистохимическом исследовании *in vivo* и *in vitro*

Антитела <i>in vivo</i> (разбавление 1 : 1000)	
Первичные	Вторичные
Против CD31 моноклональные мыши (MBS532307; MyBioSource, США)	Козлиные антимышинные, Alexa Fluor 488 (ab 150157; Abcam, Великобритания)
Против NSE (нейрон-специфическая энолаза) поликлональные цыпленка (GTX85462; GeneTex, США)	Козлиные антицыплячьи, Alexa Fluor 488 (ab 150169; Abcam, Великобритания)
Против GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок) моноклональные мыши (MBS8241552; MyBioSource, США)	Козлиные антимышинные, Alexa Fluor 488 (ab 150113; Abcam, Великобритания)
Против MCT1 поликлональные кролика (TA321556; OriGene Technologies, США)	Ослиные антикроличьи, Alexa Fluor 555 (ab 150074; Abcam, Великобритания)
Против MCT2 поликлональные кролика (bs-3995R; Bioss Inc., США)	Ослиные антикроличьи, Alexa Fluor 555 (ab 150074; Abcam, Великобритания)
Антитела <i>in vitro</i>	
Первичные (разбавление 1 : 300)	Вторичные (разбавление 1 : 500)
Против ZO1 поликлональные козла (sc-8147; Santa Cruz; США)	Ослиные антикозьи, Alexa Fluor 488 (A11055; Thermo Fisher Scientific, США)
Против NeuN моноклональные мыши (MAB377; Merck Millipore, США)	Козлиные антимышинные, Alexa Fluor 488 (ab150117; Abcam, Великобритания)
Против GFAP поликлональные цыпленка (LS-B6299; LSBio, США)	Козлиные антицыплячьи, Alexa Fluor 555 (A-21437; Thermo Fisher Scientific, США)
Против MCT1 поликлональные кролика (LS-B14628; LSBio, США)	Козлиные антикроличьи, Alexa Fluor 555 (ab 150078; Abcam, Великобритания)
Против MCT2 поликлональные кролика (ab224627; Abcam, Великобритания)	Ослиные антикроличьи, Alexa Fluor 555 (ab 150074, Abcam, Великобритания)

ставленного в наборе L-Lactate Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) (Abcam, Великобритания).

Получение первичных культур клеток и моделирование нейроваскулярной единицы/ГЭБ. Блок-схема эксперимента *in vitro* представлена на рис. 3. В работе использовали первичные культуры клеток церебрального эндотелия, астроцитов и нейронов, выделенные из головного мозга эмбрионов мыши линии C57BL/6 (общее число животных 32).

Выделение церебральных эндотелиоцитов проводили по модифицированному протоколу (Liu et al., 2013). Кору головного мозга выделяли в холодном растворе Хенкса (ПанЭко, Россия), мелко измельчали и центрифугировали при 150 g и комнатной температуре в течение 3 мин. Затем к осадку добавляли двукратный объем 25%-ного раствора фетальной бычьей сыворотки (FBS, HyClone, Южная Америка), тритуировали 25 раз пипеткой 5 мл с последующим центрифугированием гомогената при 600 g и комнатной температуре в течение 10 мин. Забирали нижний слой и переносили в коническую пробирку. Повторяли этапы тритуирования и центрифугирования 3 раза. Затем проводили ферментативную обработку пеллета в двукратном объеме (по отношению к объему пеллета) 0.1%-ного раствора коллаге-

назы II (ПанЭко, Россия) при температуре 37°C в течение 35 мин с периодическим перемешиванием. Затем проводили ресуспензирование осадка с последующим центрифугированием при 150 g в течение 5 мин.

Культивирование фрагментов и отдельных эндотелиальных клеток осуществляли при температуре 37°C и 5% CO₂ в культуральных флаконах, предварительно покрытых желатином (Gelatin Solution 0.1%. Biological Industries, США) в культуральной среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 20% раствора FBS (ПанЭко, Россия), 3 мг/мл глюкозы (Sigma-Aldrich, США), 0.58 мг/мл глутамина (Sigma-Aldrich, США), 100 Ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина (HyClone, Южная Америка); смену среды проводили каждые 3 сут. Клетки во флаконе промывали 2 раза раствором Хенкса (ПанЭко, Россия) и обрабатывали 0.25%-ным раствором трипсина и ЭДТА (ПанЭко, Россия). Смену среды осуществляли каждые 2–3 сут.

Выделение и культивирование нейросфер. Головной мозг помещали в ледяной 2%-ный раствор глюкозы в PBS, затем выделяли интересующие области (гиппокамп, стенки боковых желудочков) и иссекали до размеров 1 мм³. Далее переносили в свежий

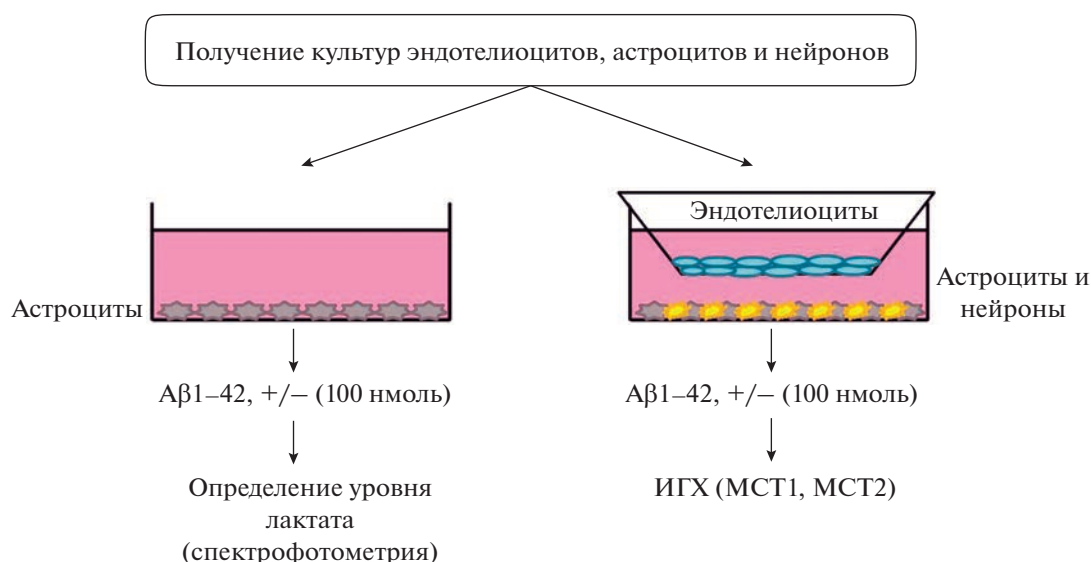


Рис. 3. Схема-дизайн эксперимента по определению уровня лактата и его транспортеров *in vitro*. ИГХ — иммуногистохимия.

2%-ный раствор глюкозы в PBS на 1 мин. После осаждения ткани супернатант удаляли. Оставшуюся ткань ресуспендировали в 1 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, США). Тритурацию ткани проводили (около 30 раз) стерильным пластиковым наконечником до получения однородной суспензии клеток. Затем добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation. Через 2 мин после осаждения неразделенных кусочков ткани собирали супернатант и переносили его в другую пробирку. Собранный супернатант центрифугировали при 150 g в течение 5 мин, после чего удаляли супернатант и добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation с последующей тритурацией.

С помощью цитометра Scepter Cell Counter (Millipore, США) проводили подсчет клеток. Клетки (1.5×10^6 кл./мл) сеяли в культуральные флаконы T-75 см² с 25 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation и культивировали в условиях инкубатора при 37°C и 5% CO₂. Образование нейросфер наблюдали через 24–48 ч.

Получение культуры астроцитов. Поводили направленную дифференцировку нейросфер в среде Astrocyte Medium (ScienCell, США) следующего состава: базальная среда (Basal Medium, ScienCell, США), 10% FBS (HyClone, США), AGS (ScienCell, США), раствора пенициллина-стрептомицина (ScienCell, США) в конечной концентрации 50 Ед./мл. Через 7–9 сут наблюдали образование монослоя астроцитов.

Получение сокультуры астроцитов и нейронов. Сокультуру получали из нейросфер путем направленной дифференцировки в астроциты и нейроны (Моргун и др., 2013). В качестве культуральной среды использовали NeuroCult NS-A Proliferation Kit, с

добавлением гепарина, основного фактора роста фибробластов (βFGF) и эпидермального фактора роста (EGF). Полученные клетки (1.5×10^6 кл./мл) засевали в культуральные флаконы T-75 см² с 25 мл среды. Далее проводили дифференцировку нейросфер в астроциты и нейроны в культуральной среде NeuroCult NS-A Differentiation Kit.

Получение модели ГЭБ *in vitro*. Смесь астроцитов и нейронов помещали на дно культурального планшета, после устанавливали культуральную вставку (Corning-Costar, США), на которую помещали эндотелиоциты. Для получения модели нейроваскулярной единицы эндотелиоциты культивировали совместно с астроцитами и нейронами (при соотношении 1 : 2 : 1 соответственно) в культуральном планшете в среде DMEM с FBS, глутамином и смесью антибиотиков при 37°C и 5% CO₂.

Моделирование острого токсического действия Aβ1–42 *in vitro*. Для исследования действия Aβ1–42 на культуру изолированных астроцитов клетки экспериментальной группы культивировали в среде, содержащей Aβ1–42 в конечной концентрации 100 нмоль. Через 24 ч производили забор культуральной среды для последующего определения в ней концентрации лактата. В экспериментальной и контрольной группах было по 6 лунок.

Для исследования острого токсического действия Aβ1–42 в модели ГЭБ к клеткам добавляли Aβ1–42 в той же конечной концентрации (100 нмоль) в питательной среде. Через 24 ч и 48 ч оценивали изменение уровня исследуемых молекул на каждом типе клеток (астроцитах, нейронах, эндотелиоцитах). В обеих группах было по 10.

Оценка уровня лактата в среде культивирования астроцитов в присутствии и отсутствии Aβ1–42. Опре-

деление уровня лактата (Colorimetric/Fluorometric) проводили по стандартному протоколу фирмы-изготовителя (Abcam, Великобритания) в среде, в которой культивировались астроциты с добавлением Аβ1–42 (в конечной концентрации 100 нмоль) и без его добавления (контроль). Для этого смешивали 50 мкл образца с 50 мкл реакционной смеси (46 мкл Lactate Assay Buffer, 2 мкл Lactate Probe, 2 мкл Enzyme Mix), инкубировали при комнатной температуре в защищенном от света месте в течение 30 мин. Оптическую плотность определяли с помощью микропланшетного ридера CLARIOstar Plus (Германия) при длине волны 492 нм. Полученные результаты выражали в нмоль на 1 лунку по данным калибровочной кривой, построенной по стандартным растворам различной концентрации (0, 2, 4, 6, 8 и 10 нмоль/мкл), приготовленным из стандарта, прилагаемого в наборе.

Иммуногистохимическое исследование *in vitro*. Регистрацию уровня МСТ1 и МСТ2 в клетках эндотелия, нейронах и астроцитах, культивируемых совместно в течение 24 и 48 ч, осуществляли в модели ГЭБ после добавления 100 нмоль Аβ1–42 и без его добавления (контроль). Первичные антитела для иммуногистохимического исследования (см. табл. 2) использовали в рабочем разведении 1 : 300. Время инкубации составляло 18 ч при 4°C. Вторичные антитела использовали в разведении 1 : 500, время инкубации составляло 2 ч при 37°C (табл. 1).

Микроскопию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE (Bio-Rad, США). Каждый эксперимент повторяли 10 раз. Считали клетки, позитивные по каждому виду антигена в образце (не менее 5 полей зрения). При обработке полученных результатов принимали во внимание долю клеток, которые несли целевую метку и выражали ее в процентах от общего числа клеток (100%).

Статистический анализ. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программ GraphPad Prism 8.0.1 (версия 8.0, США) и Statplus Professional (AnalystSoft Inc, США), сборка 5.9.8.5/Core v.5.9.33 и GraphPad 6.0 (США). В связи с отсутствием нормальности распределения сравнение двух групп проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Проверку статистических гипотез выполняли при критическом уровне значимости $P = 0.05$. Результаты представлены в виде Me [Q1; Q3], где Me – медиана, Q1 – нижний квартиль, Q3 – верхний квартиль.

Реактивы. Использовали Аβ1–42, ДМСО, PBS, тиофлавин S, глутамин, NaCl, KCl, NaH₂PO₄, NaHCO₃, CaCl₂, MgCl₂, параформальдегид, сахарозу, BSA и Triton X-100 от Sigma-Aldrich (США); лактат (Lactate Assay Buffer), L-Lactate Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) (Abcam, Великобритания); культуральную среду DMEM, раствор Хенкса, раствор трипсина и коллагеназу II, ЭДТА (ПанЭко, Россия); фетальную бычью сыворотку (FBS), пени-

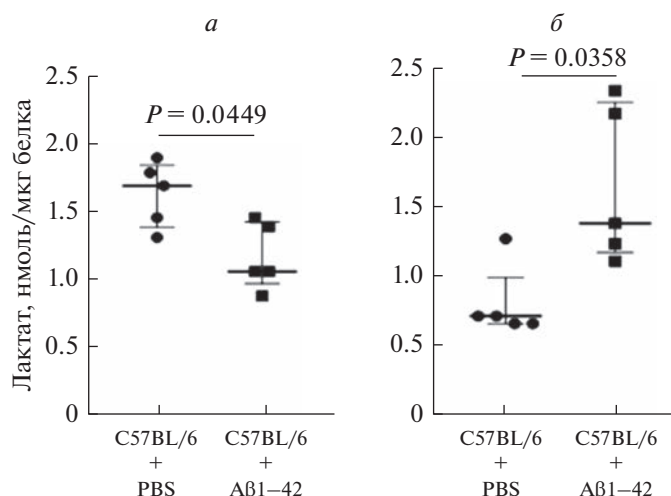


Рис. 4. Уровни лактата в ткани головного мозга при остром токсическом действии Аβ1–42 *in vivo*. Концентрация лактата в ткани гиппокампа (а) и в диализате головного мозга (б) животных с интрагиппокампальным введением Аβ1–42 (C57BL/6 + Аβ1–42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6 + PBS). Данные показаны в виде Me [Q1; Q3], где Me – медиана, Q1 – нижний квартиль, Q3 – верхний квартиль, P – уровень значимости.

циллин, стрептомицина (HyClone, Южная Америка), NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, США), среду Astrocyte Medium (ScienCell, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы оценили уровни лактата в ткани и во внеклеточном пространстве (диализате) головного мозга в норме и при остром токсическом действии Аβ1–42 *in vivo*. В ходе исследований установлено, что уровень лактата в гиппокампе животных опытной группы значимо ($P = 0.0449$) снижается по сравнению с ложно-оперированными животными. Интересно, что во внеклеточном пространстве головного мозга наблюдается противоположная картина, а именно высокий уровень лактата в условиях острого действия Аβ1–42 ($P = 0.0358$) по сравнению с ложно-оперированными животными (рис. 4).

Для выяснения вклада астроцитов в продукцию лактата при токсическом действии Аβ1–42 мы проанализировали уровень лактата в среде культивирования клеток. При оценке концентрации лактата в среде выявлено, что в астроцитах, культивированных в присутствии Аβ1–42 (100 нмоль), уровень лактата в среде значимо выше, чем в астроцитах контрольной группы ($P = 0.0014$) (рис. 5).

Определение уровня МСТ1 в экспериментальных группах *in vivo* показало статистически значимое ($P = 0.0308$) снижение уровня МСТ1 в нейронах в гиппокампе головного мозга у животных с интрагиппокампальным введением Аβ1–42 по сравнению с ложно-оперированными животными (рис. 6а, 7).

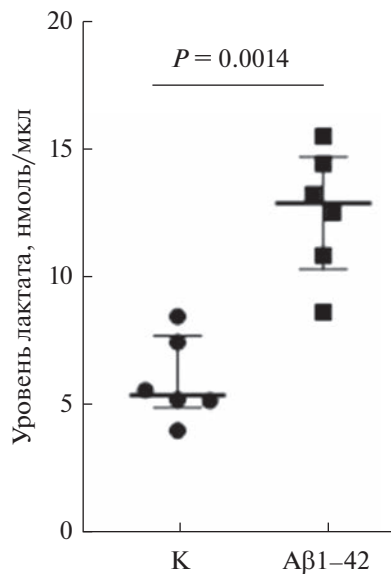


Рис. 5. Уровень лактата в среде культивирования астроцитов *in vitro* в физиологических условиях в отсутствие (контроль, К) и в присутствии $A\beta 1-42$ (100 нмоль). Данные показаны в виде Ме [Q1; Q3], P – уровень значимости (U-критерий Манна–Уитни).

астроцитах и эндотелиоцитах по сравнению с контрольной группой (рис. 10, 12, 13).

При анализе уровня МСТ1 в клетках нейроваскулярной единицы/ГЭБ как в физиологических условиях, так и в присутствии $A\beta 1-42$ статистически значимых отличий выявлено не было ($P > 0.05$). Однако наблюдали тенденцию к снижению количества МСТ1-позитивных астроцитов и нейронов (рис. 14).

При культивировании клеток нейроваскулярной единицы/ГЭБ в присутствии $A\beta 1-42$ в течение 48 ч произошло значимое снижение уровня МСТ2 в нейронах ($P \leq 0.05$; рис. 15в). Также была выявлена тенденция к снижению МСТ2-иммунопозитивных эндотелиоцитов и астроцитов (рис. 15а, б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Как установлено в одной из работ, высокий уровень церебрального лактата во фронтальной коре мышей с генетической моделью БА (линия APP/PS1), обусловленный нарушением обработки лактата, коррелировал со снижением пространственной памяти (Harris, 2017).

Согласно результатам клинических исследований, у пациентов с БА увеличение уровня лактата в переднем отделе поясной извилины находится в тесной взаимосвязи со степенью выраженности когнитивных нарушений (Лобзин и др., 2013).

Интересно, что лечение L-лактатом после ишемического инсульта оказывало нейропротекторный эффект и снижало неврологический дефицит у мышей (Berthet et al., 2012). Примечательно, что этот эффект лактат оказывает через активацию транскрипции экспрессии нейротрофического фактора мозга (BDNF), как было показано на астроцитах человека, а также на клеточной линии SH-SY5Y (Coco et al.,

Аналогичную ситуацию наблюдали и при исследовании содержания МСТ1 на астроцитах и эндотелиоцитах в гиппокампе, а именно, выраженное снижение ($P = 0.0492$ и $P = 0.0284$ соответственно) у животных экспериментальной группы по сравнению с контролем (рис. 6б–в, 8, 9).

Кроме того, нами установлено, что при остром токсическом действии $A\beta 1-42$ значимо снижается и уровень МСТ2 как в нейронах (рис. 10, 11), так и в

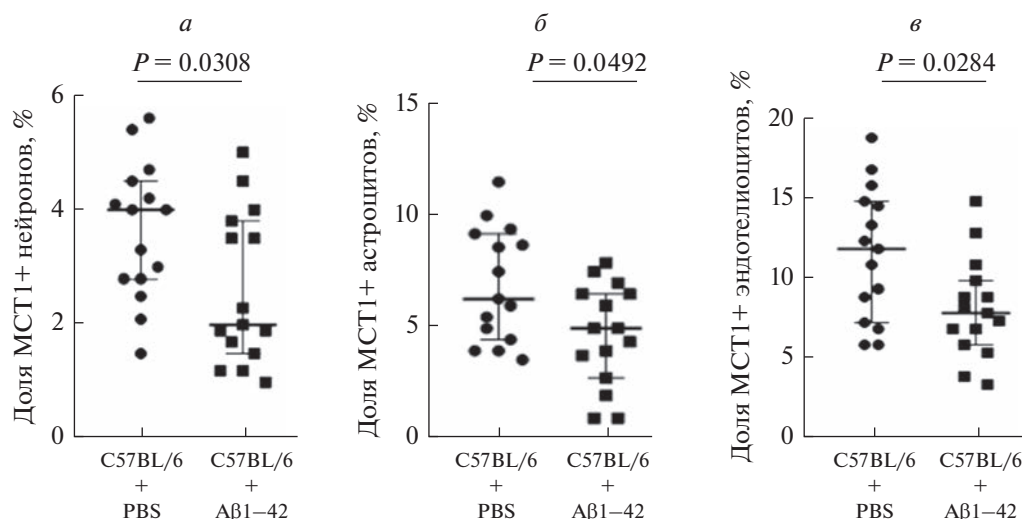


Рис. 6. Уровень МСТ1 в нейронах (а), астроцитах (б) и эндотелиоцитах (в) в гиппокампе головного мозга *in vivo* у животных с интрагиппокампальным введением $A\beta 1-42$ (C57BL/6 + $A\beta 1-42$) и ложно-оперированных животных (C57BL/6 + PBS). Данные показаны в виде Ме [Q1; Q3], P – уровень значимости (U-критерий Манна–Уитни).

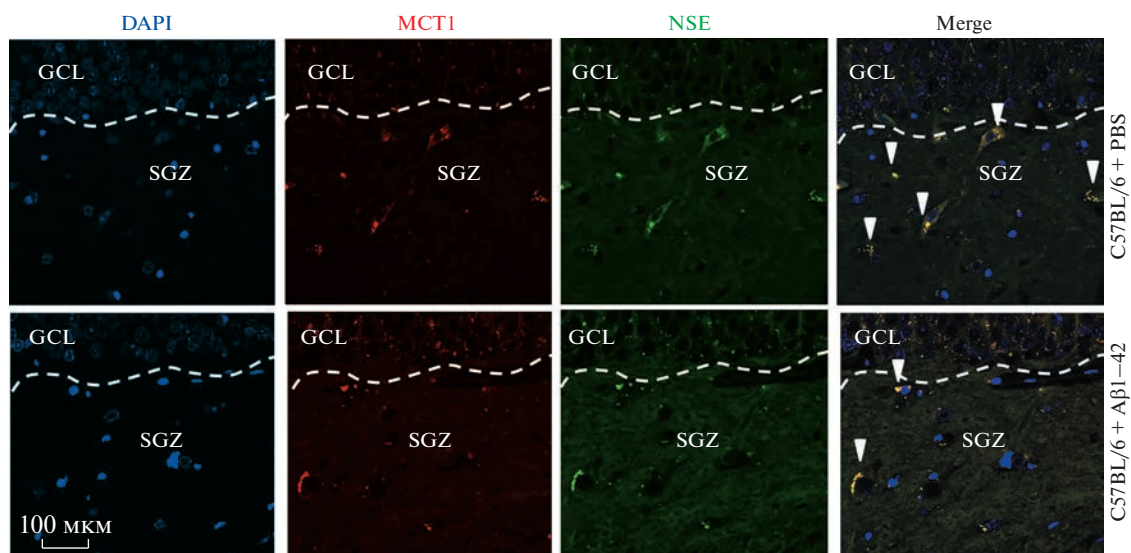


Рис. 7. Уровень MCT1 в нейронах в гиппокампе головного мозга животных *in vivo*. Маркер MCT1 — красный, NSE (нейрон-специфическая энолаза) — зеленый, ядра окрашены DAPI (синий цвет). GCL — гранулярный слой, SGZ — субгранулярная зона. Стрелками на совмещенных изображениях (Merge) показаны клетки, несущие целевую метку. Увел. об.: 10×.

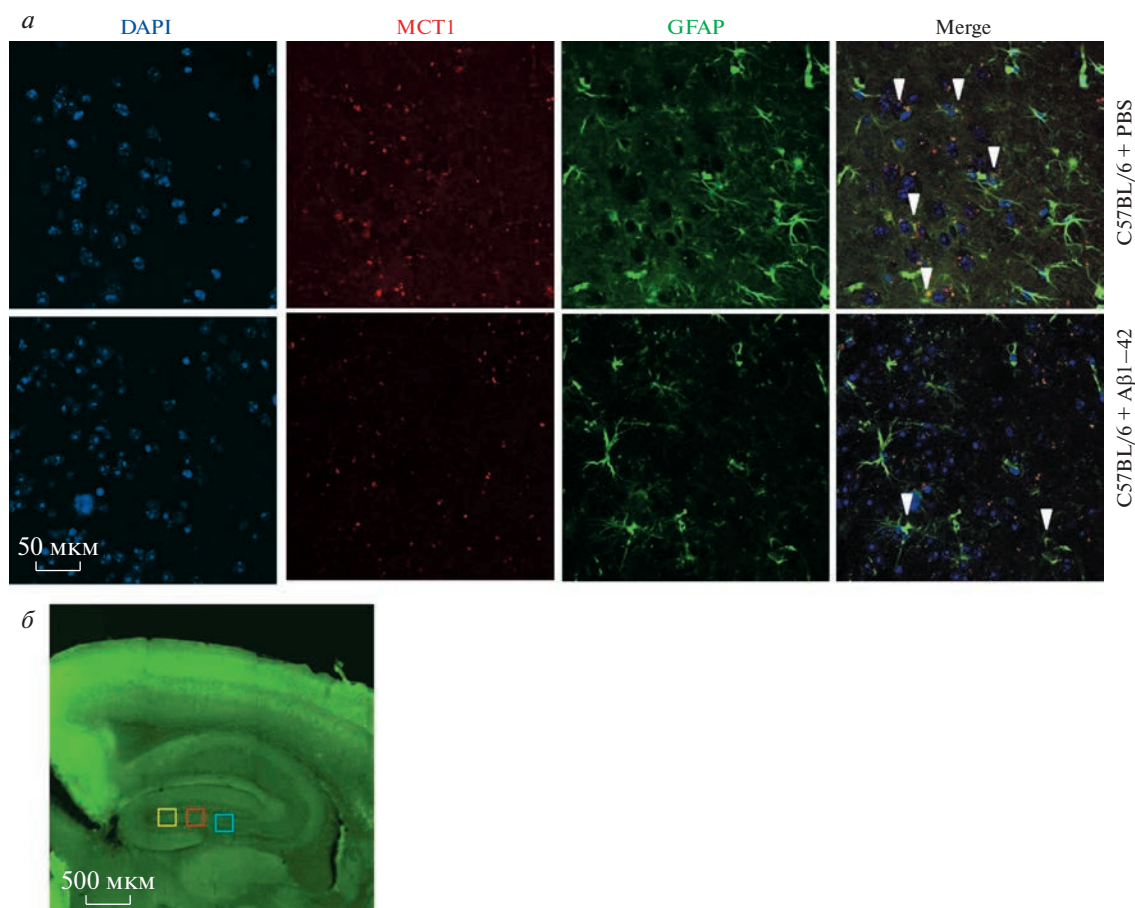


Рис. 8. MCT1 в астроцитах в гиппокампе головного мозга животных *in vivo*. *а* — MCT1 (красный цвет), GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок; зеленый) и ядра, окрашенные DAPI (синий); стрелками на совмещенных изображениях (Merge) показаны клетки, несущие целевую метку. Увел. об.: 10×. *б* — Сагитальный срез гиппокампа мыши с обозначением полей зрения в зубчатой извилине (зеленый цвет — белок GFAP. Увел. об.: 1×.

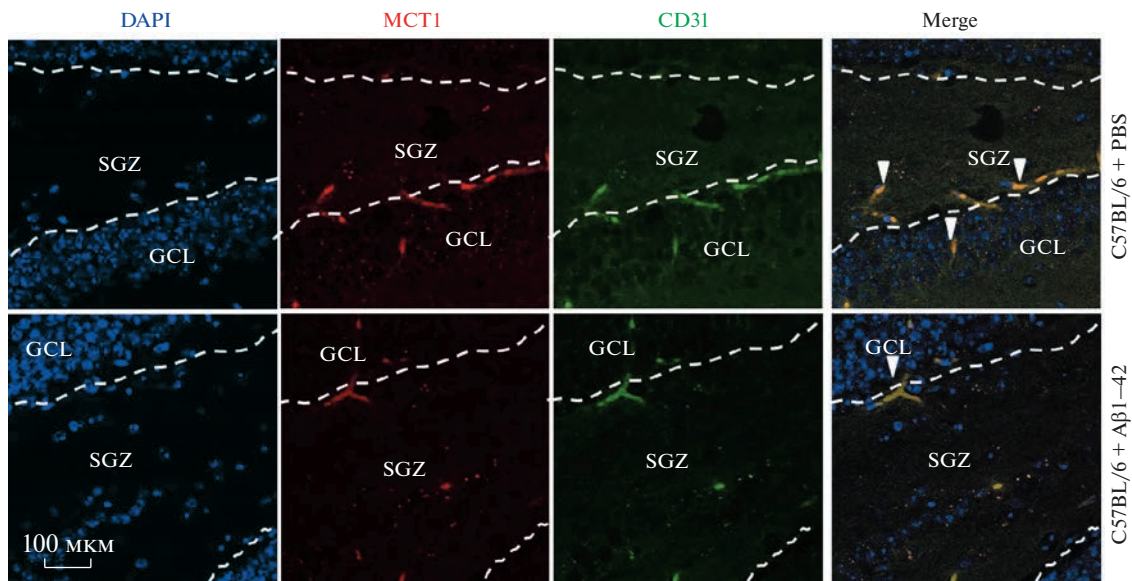


Рис. 9. MCT1 в эндотелиоцитах в гиппокампе головного мозга животных *in vivo*. CD31 показан зеленым цветом, ядра — синим (DAPI). GCL — гранулярный слой, SGZ — субгранулярная зона. Стрелками показаны клетки, несущие целевую метку. Увел. об.: 10×.

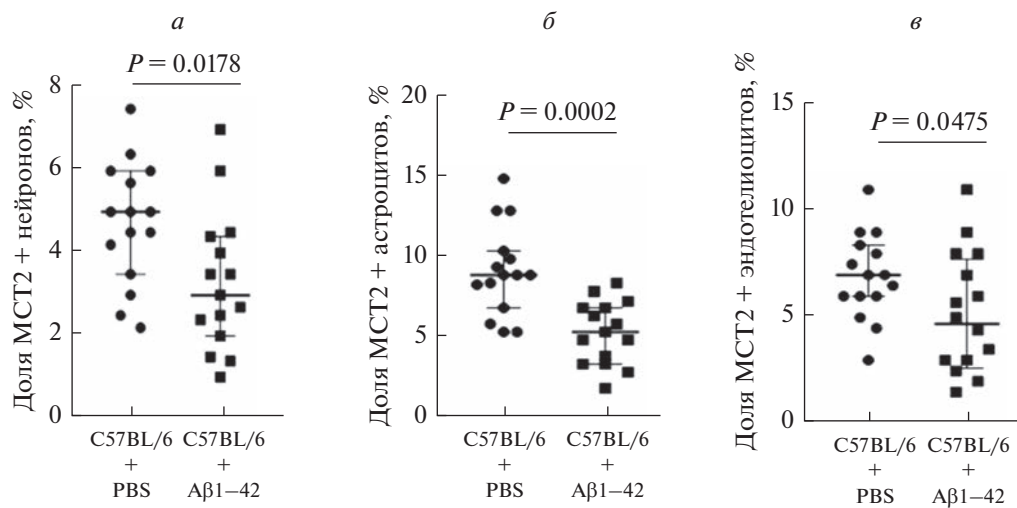


Рис. 10. Уровень MCT2 в гиппокампе головного мозга животных *in vivo* на нейронах (а), астроцитах (б) и эндотелиоцитах (в) у животных с интрагиппокампаальным введением Aβ1-42 (C57BL/6 + Aβ1-42) и ложно-оперированных животных (C57BL/6 + PBS). Доля положительных клеток представлена в процентах от общего числа клеток в поле зрения. Данные показаны в виде Me [Q1; Q3], *P* — уровень значимости (U-критерий Манна–Уитни).

2013). При этом важно отметить, что BDNF является не только необходимым фактором выживания нервных клеток в ЦНС, но и играет существенную роль в реализации долговременной памяти (Bekinschtein et al., 2008).

Более того, экзогенный лактат, как было показано, увеличивает экспрессию мРНК и белков — как MCT1, так и цитохром-с-оксидазы в мышечных клетках (Hashimoto et al., 2007). Таким образом, лак-

тат может вызывать ряд событий, ведущих к активации факторов транскрипции, участвующих в обеспечении его транспорта и возможном процессинге через митохондрии. Кроме того, в нескольких исследованиях сообщалось, что лактат увеличивает вазодилатацию (Yamanishi et al., 2006; Gordon et al., 2016), а непрерывное производство лактата в активированном головном мозге может служить сигнальным механизмом для увеличения кровотока и доставки лактата в мозг.

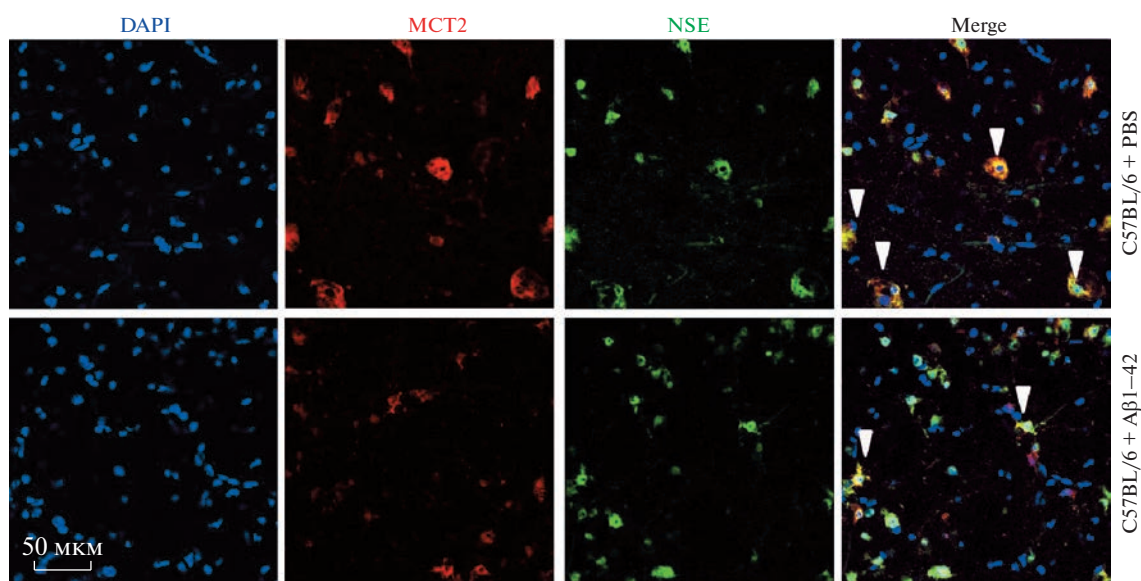


Рис. 11. Уровень МСТ2 в нейронах в гиппокампе головного мозга животных *in vivo*. Маркеры: МСТ2 — красный, NSE (нейрон-специфическая энолаза) — зеленый, ядра — синий (DAPI). Стрелками на совмещенных изображениях (Merge) показаны клетки, несущие целевую метку. Увел. об.: 10×.

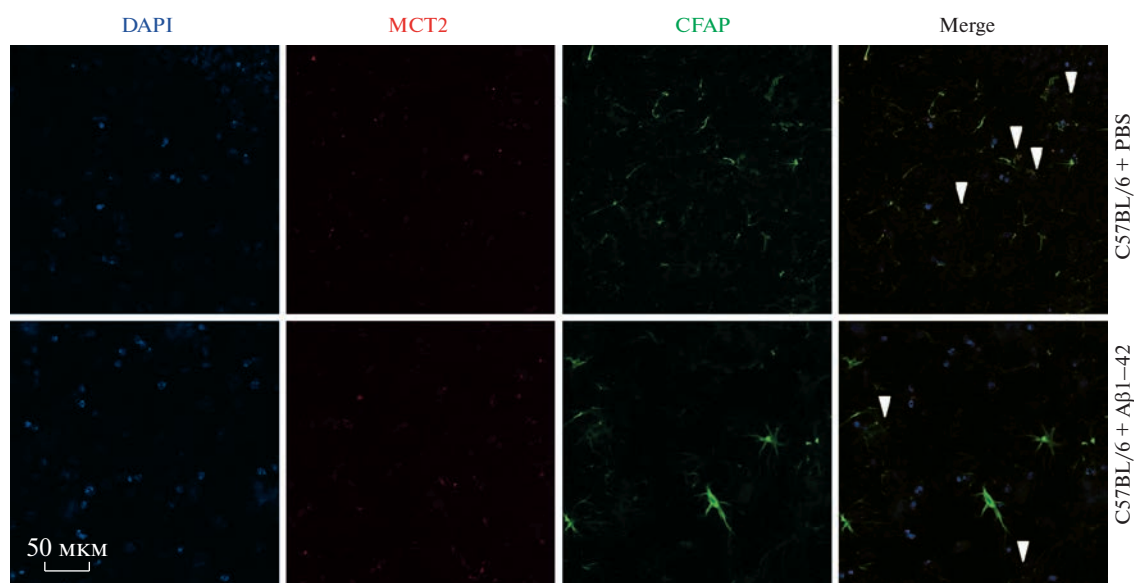


Рис. 12. МСТ2 в астроцитах в гиппокампе головного мозга животных экспериментальных групп *in vivo*. Маркеры: МСТ2 — красный, GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок — зеленый, ядра — синий (DAPI). Стрелками обозначены клетки, несущие целевую метку. Увел. об.: 10×.

Установленное нами значительное увеличение уровня лактата в диализате животных экспериментальной группы соответствует данным из литературы о высокой концентрации лактата в спинномозговой жидкости пациентов с БА, что связывают с токсическим действием тау-белка на митохондрии (Liguori et al., 2015). Более того, обратная зависимость между локальным низким метаболизмом глюкозы в ткани головного мозга при БА и высоким

уровнем лактата в ликворе интерпретируется некоторыми авторами как признак нейродегенерации при БА (Liguori et al., 2016).

Также показано, что Аβ1–42 увеличивает поглощение глюкозы и гликолиз, производство перекиси водорода и высвобождение глутатиона в культивируемых астроцитах. Аβ-индуцированные изменения метаболизма глюкозы связаны с агрегацией, интернализацией и клиренсом Аβ1–42 в астроцитах (Niel-

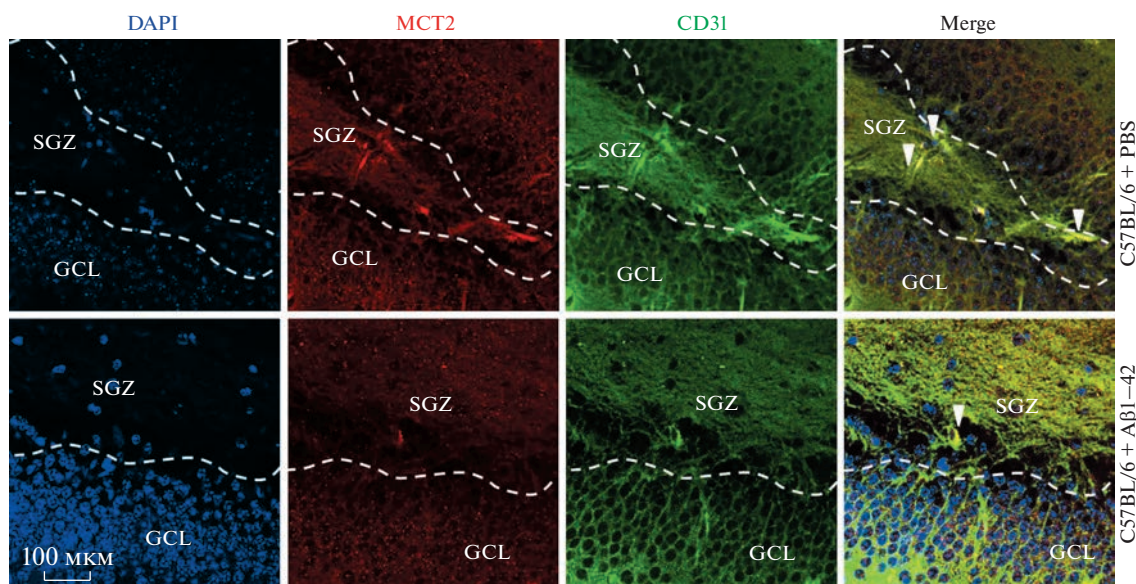


Рис. 13. МСТ2 в эндотелиоцитах в гиппокампе головного мозга животных *in vivo*. Маркер МСТ2 — красный, CD31 — зеленый, ядра — синий (DAPI). GCL — гранулярный слой, SGZ — субгранулярная зона. Стрелки показывают клетки, несущие целевую метку. Увел. об.: 10×.

sen et al., 2009; Mohamed, Posse de Chaves, 2011). Следствием внутриклеточного накопления Aβ1–42 является изменение метаболизма астроцитарной глюкозы, что приводит к снижению глутатиона и лактата, а это, в свою очередь, способствует повышенной уязвимости соседних нейронов (Allaman et al., 2010).

Необходимо отметить и тот установленный факт, что транспортеры семейства МСТ играют важную роль в метаболических взаимодействиях между клетками головного мозга (Pierre, Pellerin, 2005; Cunnane et al., 2011). Так, установлено, что нарушение уровня транспортеров МСТ1 и МСТ4 в астроцитах вызывает амнезию, которая, как и нарушение долговременной потенциации, предотвращается введением экзогенного лактата. Нарушение содержания МСТ2 в нейронах также приводит к амнезии, однако введение лактата не оказывает значимого влияние, что позволяет предположить, что транспорт лактата из астроцитов в нейроны необходим для формирования долговременной памяти и синаптической пластичности (Suzuki et al., 2011). В другой работе показано, что лактат, транспортируемый из астроцитов в нейроны с помощью МСТ1–МСТ4, необходим для поддержания синаптической передачи в возбуждающих синапсах даже при условии наличия достаточного запаса глюкозы и внутриклеточного АТФ (Nagase et al., 2014). Кроме того, МСТ1 может стимулировать митохондриальный метаболизм, тем самым облегчая использование лактата в качестве метаболического субстрата для цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования (Harris, Attwell, 2012; Hui et al., 2017). С другой стороны, дисфункция МСТ1 может привести к aberrантному переносу лактата, что, в свою очередь,

приведет к нарушению энергетического обмена и когнитивному дефициту (Newman et al., 2011; Suzuki et al., 2011; Boury-Jamot et al., 2016).

Так, в ходе одного из исследований у мышей (линия C57BL/6) в гиппокампе выявлены изменения экспрессии генов, вызванные обучением, которые участвуют в метаболическом взаимодействии астроцитов и нейронов, а именно: через 24 ч после тренировки в тесте ингибирующего избегания наблюдали повышенную экспрессию генов, кодирующих транспортеры МСТ1 и МСТ4, альфа2-субъединицу Na/K-АТФазы и транспортер глюкозы GLUT1. Примечательно, что при оценке функциональной роли одного из этих генов, участвующих в обучении (гена МСТ1), обнаружено нарушение долговременной памяти у МСТ1-нокаутных мышей (Tadi et al., 2015).

В другом исследовании продемонстрировано, что подавление МСТ1 и МСТ4 в глиальных клетках и МСТ2 в нейронах гиппокампа крыс вызывает нарушение процесса обучения и дисфункцию памяти (Pérez-Escuredo et al., 2016). Снижение содержания лактата, сопровождающееся подавлением экспрессии гена МСТ в коре головного мозга и гиппокампе, способствовало нарушению пространственного обучения и памяти у крыс с моделью БА (Lu et al., 2015). В целом, это убедительно доказывает значимое влияние лактата и МСТ на энергетический метаболизм, формирование гиппокамп-зависимой памяти и активность нейронов гиппокампа, что существенным образом нарушается при развитии БА.

Таким образом, установленное нами снижение уровня лактата в ткани головного мозга и увеличение уровня лактата в диализате при остром токсиче-

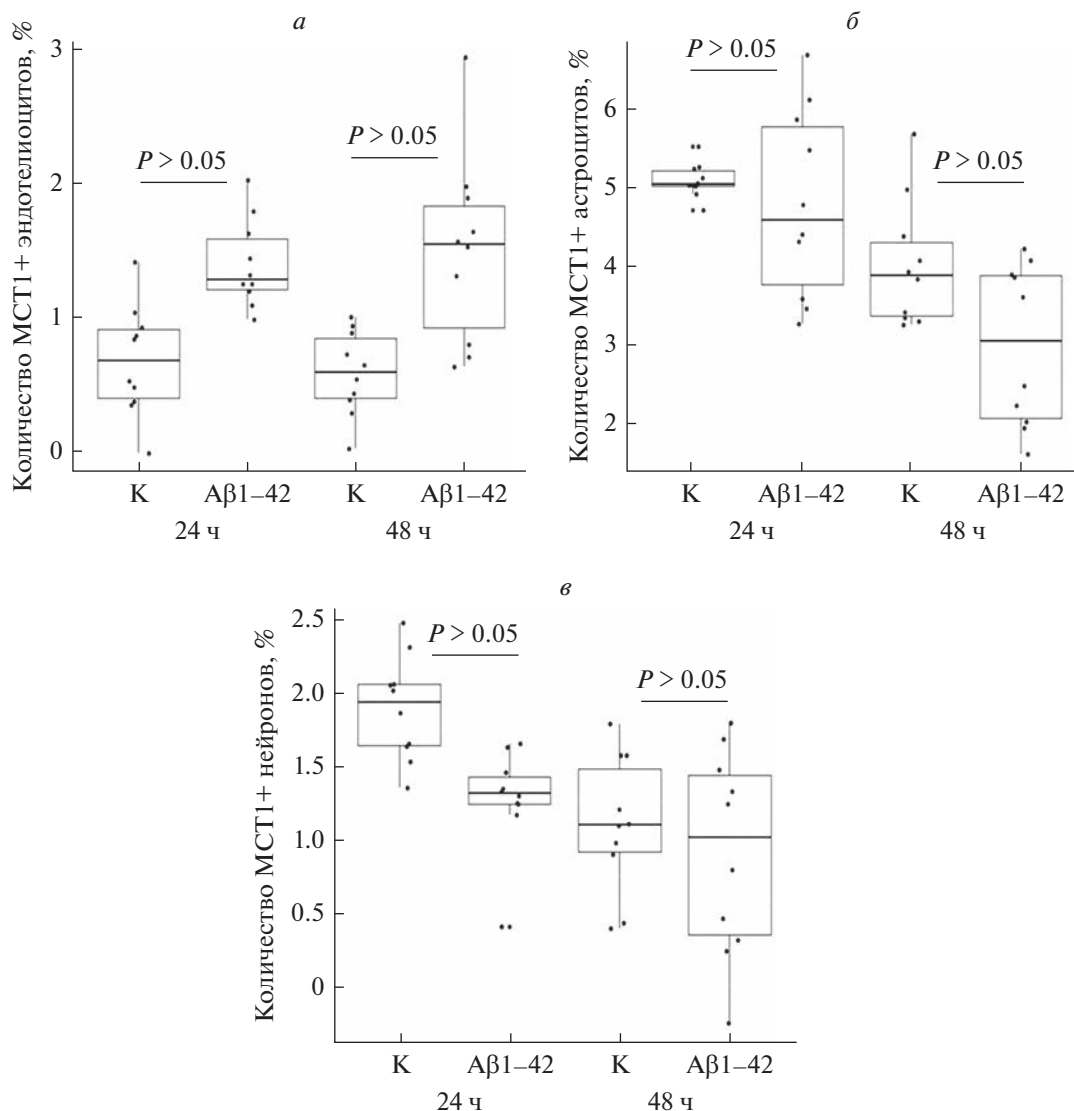


Рис. 14. Уровень MCT1 в клетках нейроваскулярной единицы/ГЭБ при их культивировании в течение 24 и 48 ч в отсутствие (контроль, К) и в присутствии Aβ1-42 (100 нМ). а – Эндотелиоциты, б – астроциты, в – нейроны ($P > 0.05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна–Уитни). Доли положительных клеток представлены в % от общего числа клеток в поле зрения. Данные показаны в виде Me [Q1; Q3], P – уровень значимости.

ском действии Aβ1-42 *in vivo* являются признаками нарушения энергетического метаболизма вследствие токсического действия Aβ1-42 на нервные клетки.

В дополнение к этому, нами выявлено, что клетки астроглии под влиянием Aβ1-42 *in vitro* характеризуются повышенной продукцией лактата, что, в совокупности с представленными выше результатами дает право предполагать, что они вносят важный вклад в увеличение уровня лактата во внеклеточном пространстве, сохраняя свою гликолитическую активность.

Это сопряжено с зарегистрированным нами при остром токсическом действии Aβ1-42 *in vivo* и *in vitro* снижением уровня импорт-ориентированных изо-

форм MCT в нейронах, астроглии и церебральном эндотелии. С учетом полученных нами ранее данных о гипометаболизме глюкозы при развитии БА (Горина и др., 2017), логично предположить, что такие изменения уровня MCT1 и MCT2 маркируют энергодефицит в ткани головного мозга. Это соответствует результатам, полученным у животных с генетической моделью БА (линия APP/PS1), что приводит к лактат-дефициту в нейронах, в норме зависящих от транспорта лактата из гликолитически активных астроцитов (Zhang et al., 2018). Более того, согласно ранее полученным нами результатам (Горина и др., 2017), при остром токсическом действии Aβ1-42 у мышей выявлено нарушение ассоциативного обучения и эмоциональной памяти в тесте “Fear condi-

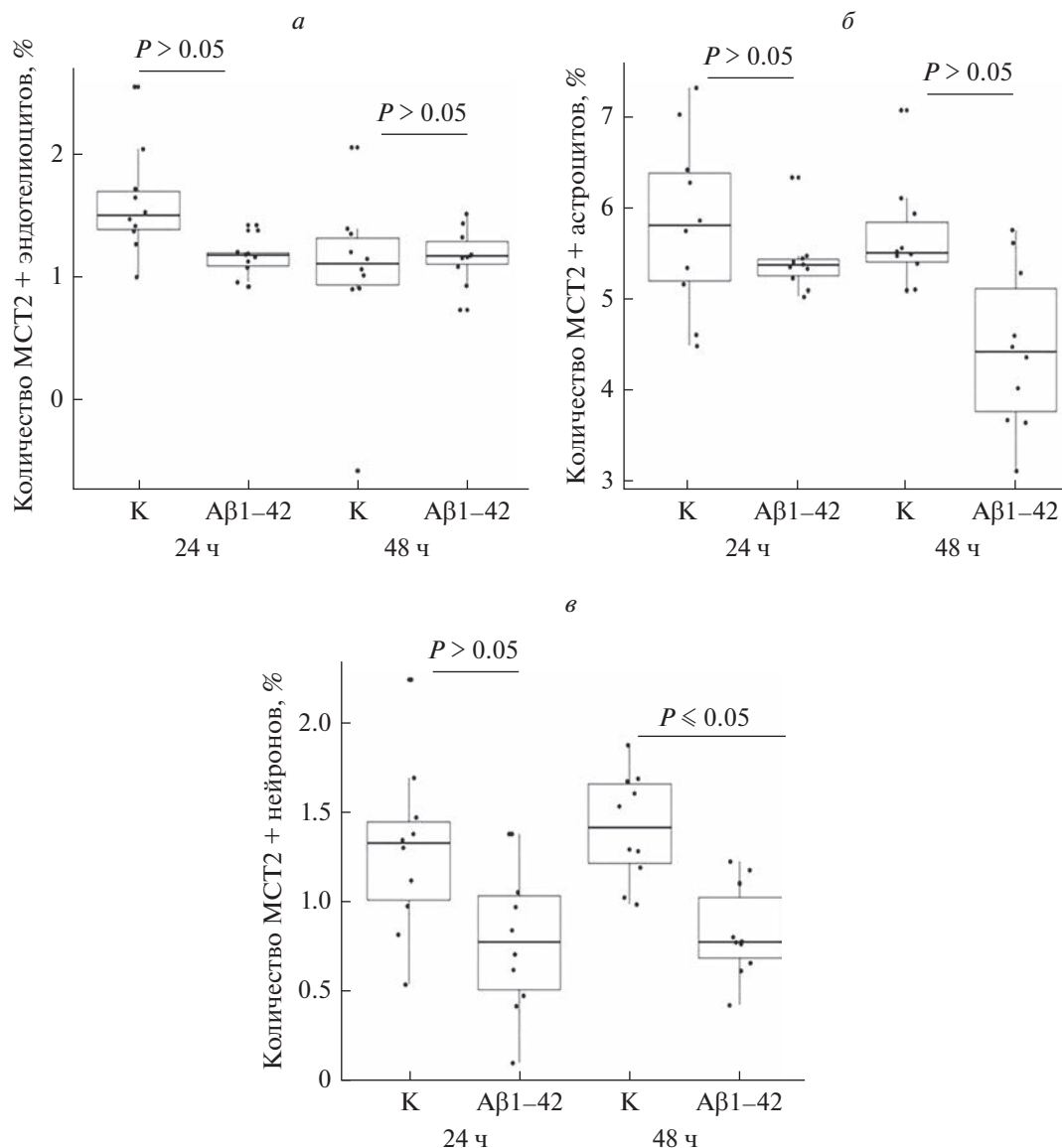


Рис. 15. Уровень MCT2 в клетках нейроваскулярной единицы/ГЭБ при культивировании *in vitro* в отсутствие (контроль, К) и в присутствии Aβ1-42 (100 нМ). а – Эндотелиоциты, б – астроциты, в – нейроны ($P > 0.05$ – сравнение с контрольной группой, U-критерий Манна–Уитни). Доля положительных клеток представлена в процентах от общего числа клеток в поле зрения. Данные показаны в виде Me [Q1; Q3], P – уровень значимости.

tioning” (условного рефлекса страха), о чем указывало отсутствие формирования условного рефлекса на протяжении всего периода тестирования в ответ на неприятный стимул. Это позволяет сделать предположение о том, что установленные патологические изменения поведения сопряжены с нарушением уровня транспортеров лактата в клетках головного мозга в условиях острого токсического действия Aβ1-42.

Таким образом, установлено, что в условиях острого токсического действия Aβ1-42 у экспериментальных животных наблюдается снижение уровня лактата в ткани гиппокампа и повышение его

уровня в диализате *in vivo*, которое сопряжено с aberrантной экспрессией транспортеров лактата MCT1 и MCT2 в нейронах, астроглии и церебральном эндотелии. В свою очередь, это может препятствовать транспорту лактата от глиальных клеток до нейронов, вызывая выраженный дефицит лактата в нейронах. В совокупности это указывает о нарушении энергетического метаболизма вследствие Aβ-индуцированного патологического изменения церебрального метаболизма глюкозы. При этом зафиксированное нами выраженное увеличение продукции лактата астроцитами *in vitro* может свидетельствовать о включении компенсаторного механизма, направленного на

поддержание межклеточного метаболического сопряжения в поврежденных регионах головного мозга.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием ресурсной базы Центра коллективного пользования Молекулярные и клеточные технологии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Программы Президента РФ – государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-2547.2020.7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования на животных проводили с соблюдением принципов гуманности, которые изложены в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС). Протокол экспериментов был одобрен биоэтической комиссией по работе с животными при локальном этическом комитете Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (выписка из протокола № 3 от 08 октября 2019 г.). Каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Черных А.И., Салмина А.Б. 2017. Влияние инсулинорезистентности на нарушение метаболизма глюкозы в миндале головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера. Бюлл. сибирской мед. № 6. С. 1. (Gorina Ya.V., Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Chernykh A.I., Salmina A.B. 2017. Influence of insulin resistance on increased risk of brain amygdala development in experimental Alzheimer's disease. Bulletin of Siberian medicine. № 6. P. 1.)
- Комлева Ю.К., Малиновская Н.А., Горина Я.В., Лопатина О.Л., Волкова В.В., Салмина А.Б. 2015. Экспрессия молекул CD38 и CD157 в олифакторных луковицах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера. Сибирское медицинское обозрение. № 5. С. 45. (Komleva Yu.K., Malinovskaya N.A., Gorina Ya.V., Lopatina O.L., Volkova V.V., Salmina A.B. 2015. Expression of CD38 and CD157 molecules in the olfactory bulbs of the brain in experimental Alzheimer's disease. Siberian Med. Rev. № 5. P. 45.)
- Лобзин В.Ю., Одинак М.М., Фокин В.А., Воробьев С.В., Емелин А.Ю., Лупанов И.А., Кудяшева А.В., Соколов А.В. 2013. Метаболические изменения головного мозга при болезни Альцгеймера, сосудистой и смешанной деменции. Биомед. журнал медлайн.ру. С. 1085. (Lobzin V.Yu., Odinak M.M., Fokin V.A., Vorobyov S.V., Emelin A.Yu., Lupanov I.A., Kudyasheva A.V., Sokolov A.V. 2013. Brain metabolic changes in Alzheimer's disease, vascular and mixed dementia. Biomed. J. Medline.ru. P. 1085.)
- Моргун А.В., Кувачева Н.В., Комлева Ю.К., Кутищева И.А., Окунева О.С., Дробушевская А.И., Хилажева Е.Д., Черепанов С.М., Салмина А.Б. 2013. Дифференцировка эмбриональных прогениторных клеток мозга крыс в астроциты и нейроны. Сибирское мед. обозрение. № 6. С. 9. (Morgun A.V., Kuvacheva N.V., Komleva Yu.K., Kutishcheva I.A., Okuneva O.S., Drobusheskaya A.I., Khilazheva E.D., Cherepanov S.M., Salmina A.B. 2013. Differentiation of rat brain embryonic progenitor cells into astrocytes and neurons. Siberian Med. Rev. № 6. P. 9.)
- Allaman I., Gavillet M., Bélanger M., Laroche T., Viret D., Lashuel H.A., Magistretti P.J. 2010. Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability. J. Neurosci. V. 30. P. 3326. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5098-09.2010>
- Bartolotti N., Lazarov O. 2019. CREB signals as PBMC-based biomarkers of cognitive dysfunction: a novel perspective of the brain-immune axis. Brain Behav. Immun. V. 78. P. 9. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.01.004>
- Bekinschtein P., Cammarota M., Kathe C., Slipczuk L., Rossato J.I., Goldin A., Izquierdo I., Medina J.H. 2008. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 105. P. 2711. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711863105>
- Bergersen L.H. 2015. Lactate transport and signaling in the brain: potential therapeutic targets and roles in body-brain interaction. J. Cereb. Blood Flow. Metab. V. 35. P. 176. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.206>
- Berthet C., Castillo X., Magistretti P.J., Hirt L. 2012. New evidence of neuroprotection by lactate after transient focal cerebral ischaemia: extended benefit after intracerebroventricular injection and efficacy of intravenous administration. Cerebrovasc. Dis. V. 34. P. 329. <https://doi.org/10.1159/000343657>
- Bolaños J.P., Almeida A., Moncada S. 2010. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? Trends Biochem. Sci. V. 35. P. 145. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.006>
- Bondi M.W., Edmonds E.C., Salmon D.P. 2017. Alzheimer's disease: past, present, and future. J. Int. Neuropsychol. Soc. V. 23. P. 818. <https://doi.org/10.1017/S135561771700100X>
- Boury-Jamot B., Carrard A., Martin J.L., Halfon O., Magistretti P.J., Boutrel B. 2016. Disrupting astrocyte-neuron lactate transfer persistently reduces conditioned responses to cocaine. Mol. Psychiatry. V. 21. P. 1070. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.157>
- Coco M., Caggia S., Musumeci G., Perciavalle V., Graziano A.C.E., Pannuzzo G., Cardile V. 2013. Sodium L-lactate differentially affects brain-derived neurotrophic factor, inducible nitric oxide synthase, and heat shock protein 70 kDa production in human astrocytes and SH-SY5Y cultures. J. Neurosci.

- Res. V. 91. P. 313.
<https://doi.org/10.1002/jnr.23154>
- Correia S.C., Santos R.X., Carvalho C., Cardoso S., Candeias E., Santos M.S., Oliveira C.R., Moreira P.I. 2012. Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. *Brain Res.* V. 1441. P. 64.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.12.063>
- Croteau E., Castellano C.A., Fortier M., Bocti C., Fulop T., Paquet N., Cunnane S.C. 2018. A cross-sectional comparison of brain glucose and ketone metabolism in cognitively healthy older adults, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* V. 107. P. 18.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.07.004>
- Cunnane S., Nugent S., Roy M., Courchesne-Loyer A., Croteau E., Tremblay S., Castellano A., Pifferi F., Bocti C., Paquet N., Begdouri H., Bentourkia M., Turcotte E., Allard M., Barberger-Gateau P., Fulop T., Rapoport S.I. 2011. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition.* V. 27. P. 3.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.07.021>
- Ding F., Yao J., Rettberg J.R., Chen S., Brinton R.D. 2013. Early decline in glucose transport and metabolism precedes shift to ketogenic system in female aging and Alzheimer's mouse brain: implication for bioenergetic intervention. *PLoS One.* V. 8. P. e79977.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079977>
- Encinas J.M., Enikolopov G. 2008. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods Cell Biol.* V. 85. P. 243.
[https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)85011-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)85011-X)
- Epelbaum S., Youssef I., Lacor P.N., Chaurand P., Duplus E., Brugg B., Duyckaerts C., Delatour B. 2015. Acute amnesic encephalopathy in amyloid- β oligomer-injected mice is due to their widespread diffusion in vivo. *Neurobiol Aging.* V. 36. P. 2043.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.005>
- Falkowska A., Gutowska I., Goschorska M., Nowacki P., Chlubek D., Baranowska-Bosiacka I. 2015. Energy metabolism of the brain, including the cooperation between astrocytes and neurons, especially in the context of glycogen metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* V. 16. P. 25959.
<https://doi.org/10.3390/ijms161125939>
- Forlenza O.V., Diniz B.S., Gattaz W.F. 2010. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease. *BMC Med.* V. 8. P. 89.
<https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-89>
- Gordon G.R., Howarth C., MacVicar B.A. 2016. Bidirectional control of blood flow by astrocytes: a role for tissue oxygen and other metabolic factors. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 903. P. 209.
https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7678-9_15
- Harris J.J., Attwell D. 2012. The energetics of CNS white matter. *J. Neurosci.* V. 32. P. 356.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3430-11.2012>
- Harris R.A. 2017. Cerebral lactate metabolism and memory: Implications for Alzheimer's disease. *Electronic Thesis and Dissertation Repository.* P. 4529.
- Hashimoto T., Hussien R., Oommen S., Gohil K., Brooks G.A. 2007. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB J.* V. 21. P. 2602.
<https://doi.org/10.1096/fj.07-8174com>
- Hui S., Ghergurovich J.M., Morscher R.J., Jang C., Teng X., Lu W., Esparza L.A., Reya T., Le Z., Yanxiang Guo J., White E., Rabinowitz J.D. 2017. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature.* V. 551. P. 115.
<https://doi.org/10.1038/nature24057>
- Jin N., Qian W., Yin X., Zhang L., Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Gong C.-X., Liu F. 2013. CREB regulates the expression of neuronal glucose transporter 3: a possible mechanism related to impaired brain glucose uptake in Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res.* V. 41. P. 3240.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks1227>
- Koenig M.K. 2008. Presentation and diagnosis of mitochondrial disorders in children. *Pediatr. Neurol.* V. 38. P. 305.
<https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol>
- Liguori C., Chiaravalloti A., Sancesario G., Stefani A., Sancesario G.M., Mercuri N.B., Schillaci O., Pierantozzi M. 2016. Cerebrospinal fluid lactate levels and brain [18F]FDG PET hypometabolism within the default mode network in Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* V. 43. P. 2040.
<https://doi.org/10.1007/s00259-016-3417-2>
- Liguori C., Stefani A., Sancesario G., Sancesario G.M., Marciani M.G., Pierantozzi M. 2015. CSF lactate levels, τ proteins, cognitive decline: a dynamic relationship in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* V. 86. P. 655.
<https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-308577>
- Liu Y., Xue Q., Tang Q., Hou M., Qi H., Chen G., Chen W., Zhang J., Chen Y., Xu X. 2013. A simple method for isolating and culturing the rat brain microvascular endothelial cells. *Microvasc. Res.* V. 90. P. 199.
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.08.004>
- Lu W., Huang J., Sun S., Huang S., Gan S., Xu J., Yang M., Xu S., Jiang X. 2015. Changes in lactate content and monocarboxylate transporter 2 expression in A β_{25-35} -treated rat model of Alzheimer's disease. *Neurol Sci.* V. 36. P. 871.
<https://doi.org/10.1007/s10072-015-2087-3>
- Mohamed A., Posse de Chaves E. 2011. A β internalization by neurons and glia. *Int. J. Alzheimers Dis.* P. 127984.
<https://doi.org/10.4061/2011/127984>
- Moreira T.J., Pierre K., Maekawa F., Repond C., Cebere A., Liljequist S., Pellerin L. 2009. Enhanced cerebral expression of MCT1 and MCT2 in a rat ischemia model occurs in activated microglial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* V. 29. P. 1273.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.50>
- Mosconi L., Mistur R., Switalski R., Tsui W.H., Glodzik L., Li Y., Pirraglia E., De Santi S., Reisberg B., Wisniewski T., de Leon M. 2009. FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease. *J. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* V. 36. P. 811.
<https://doi.org/10.1007/s00259-008-1039-z>
- Muraleedharan R., Gawali M.V., Tiwari D., Sukumaran A., Oatman N., Anderson J., Nardini D., Bhuiyan M.A.N., Tkáč I., Ward A.L., Kundu M., Waclaw R., Chow L.M., Gross C., Rao R., Schirmeier S., Dasgupta B. 2020. AMPK-Regulated Astrocytic lactate shuttle plays a non-cell-autonomous role in neuronal survival. *Cell Rep.* V. 32. P. 108092.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108092>

- Nagase M., Takahashi Y., Watabe A.M., Kubo Y., Kato F. 2014. On-site energy supply at synapses through monocarboxylate transporters maintains excitatory synaptic transmission. *J. Neurosci.* V. 34. P. 2605.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4687-12.2014>
- Newman L.A., Korol D.L., Gold P.E. 2011. Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. *PLoS One.* V. 6. P. e28427.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028427>
- Nielsen H.M., Veerhuis R., Holmqvist B., Janciauskiene S. 2009. Binding and uptake of A β 1-42 by primary human astrocytes in vitro. *Glia.* V. 57. P. 978.
<https://doi.org/10.1002/glia.20822>
- Pérez-Escuredo J., Van Hée V.F., Sboarina M., Falces J., Payen V.L., Pellerin L., Sonveaux P. 2016. Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1863. P. 2481.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2016.03.013>
- Pierre K., Pellerin L. 2005. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J. Neurochem.* V. 94. P. 1.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03168.x>
- Pinheiro C., Longatto-Filho A., Azevedo-Silva J., Casal M., Schmitt F.C., Baltazar F. 2012. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J. Bioenerg. Biomembr.* V. 44. P. 127–139.
<https://doi.org/10.1007/s10863-012-9428-1>
- Salmina A.B., Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Komleva Y.K., Pozhilenkova E.A., Lopatina O.L., Gorina Y.V., Taranushenko T.E., Petrova L.L. 2015. Glycolysis-mediated control of blood-brain barrier development and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* V. 64. P. 174.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.04.005>
- Shin B.K., Kang S., Kim D.S., Park S. 2018. Intermittent fasting protects against the deterioration of cognitive function, energy metabolism and dyslipidemia in Alzheimer's disease-induced estrogen deficient rats. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). V. 243. P. 334.
<https://doi.org/10.1177/1535370217751610>
- Shin Y., Choi S.H., Kim E., Bylykhashi E., Kim J.A., Chung S., Kim D.Y., Kamm R.D., Tanzi R.E. 2019. Blood-brain barrier dysfunction in a 3D in vitro model of Alzheimer's disease. *Adv. Sci.* V. 6. P. 1900962.
<https://doi.org/10.1002/advs.201900962>
- Sipos E., Kurunczi A., Kasza A., Horvath J., Felszeghy K., Laroche S., Toldi J., Parducz A., Penke B., Penke Z. 2007. Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease. *Neurosci.* V. 147. P. 28.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.04.011>
- Suzuki A., Stern S.A., Bozdagi O., Huntley G.W., Walker R.H., Magistretti P.J., Alberini C.M. 2011. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell.* V. 144. P. 810.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.018>
- Tadi M., Allaman I., Lengacher S., Grenningloh G., Magistretti P.J. 2015. Learning-induced gene expression in the hippocampus reveals a role of neuron-astrocyte metabolic coupling in long term memory. *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0141568.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141568>
- Tang B.L. 2018. Brain activity-induced neuronal glucose uptake/glycolysis: is the lactate shuttle not required? *Brain Res. Bull.* V. 137. P. 225.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.12.010>
- Wang Y., Shang Y., Mishra A., Bacon E., Yin F., Brinton R. 2020. Midlife chronological and endocrinological transitions in brain metabolism: system biology basis for increased Alzheimer's risk in female brain. *Sci. Rep.* V. 10. P. 8528.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-65402-5>
- Yamanishi S., Katsumura K., Kobayashi T., Puro D.G. 2006. Extracellular lactate as a dynamic vasoactive signal in the rat retinal microvasculature. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* V. 290. P. 925H.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01012.2005>
- Zhang M., Cheng X., Dang R., Zhang W., Zhang J., Yao Z. 2018. Lactate deficit in an Alzheimer disease mouse model: the relationship with neuronal damage. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* V. 77. P. 1163.
<https://doi.org/10.1093/jnen/nly102>

Disturbance in Expression of Lactate Transporters in Brain Cells under Acute Toxic Effect of Beta-Amyloid *In Vitro* and *In Vivo*

Ya. V. Gorina^{a,*}, E. V. Kharitonova^a, E. D. Khilazheva^a, A. A. Semenova^a, A. V. Morgun^b, Yu. K. Komleva^{a,c}, O. L. Lopatina^b, and A. B. Salmina^{a,d}

^aResearch Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022 Russia

^bDepartment of Outpatient Pediatrics and Propaedeutics of Childhood Diseases with a Postgraduate Course, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022 Russia

^cCenter for Collective Use Molecular and Cellular Technologies, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022 Russia

^dLaboratory of Neurobiology and Tissue Engineering, Brain Institute, Scientific Center of Neurology, Moscow, 125367 Russia

*e-mail: yana_20@bk.ru

Decreased energy metabolism in the brain correlates with cognitive impairment in Alzheimer's disease. Accumulating experimental data indicate that lactate transporters and monocarboxylate transporters (MCTs) are directly involved in cerebral energy metabolism. However, to date, changes in lactate levels and MCT content in Alzheimer's disease remain unclear. The aim of the study was to study the content of lactate and of its transporters – MCT1 and MCT2 in cells of neuronal, astroglial and endothelial nature under acute toxic effects of beta-amyloid (A β 1–42) in

vitro and in vivo. Under conditions of acute toxic action of A β 1–42 in vivo, a significant ($P \leq 0.05$) decrease in the level of lactate in the hippocampal tissue and an increase ($P \leq 0.05$) in the dialysate were found. At the same time, a low ($P \leq 0.05$) levels of MCT1 and MCT2 was set. In vitro, significantly high ($P \leq 0.05$) production of lactate by astrocytes was revealed, coupled with low ($P \leq 0.05$) level of MCT2 on neurons. Thus, it was found that A β 1–42 causes a decrease in the level of lactate in the hippocampal tissue and an increase in its level in dialysate in vivo, which correlates with the impaired level of MCT1 and MCT2. This indicates a violation of energy metabolism due to the acute toxic effect of A β 1–42. At the same time, the revealed increase in the production of lactate by astrocytes in vitro may indicate the inclusion of a compensatory mechanism aimed at maintaining the astrocyte-neuronal interaction.

Keywords: Alzheimer's disease, lactate, MCT, energy metabolism

ВЛИЯНИЕ 2,3-БУТАНДИОН-МОНОКСИМА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИОЗИНА С АКТИНОМ В НОРМЕ И ПРИ ВРОЖДЕННОЙ МИОПАТИИ

© 2023 г. Д. Д. Андреева¹, Н. А. Рысев¹, Ю. С. Боровиков¹, О. Е. Карпичева¹, *

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: olexiya6@ya.ru

Поступила в редакцию 02.08.2022 г.

После доработки 18.08.2022 г.

Принята к публикации 31.08.2022 г.

Врожденные миопатии представляют собой неоднородную группу заболеваний скелетной мышечной ткани человека, характеризующихся мышечной гипотонией и слабостью. Клиническая картина миопатии значительно отличается у разных пациентов, что крайне затрудняет диагностику варианта миопатии и разработку подходов к лечению. Существует несколько применяемых в клинике или проходящих клинические исследования фармакологических агентов для лечения кардиомиопатий, механизм действия которых можно использовать для лечения и врожденных миопатий. Одним из таких агентов является 2,3-бутандион-моноксим (BDM) — неконкурентный ингибитор АТФазной активности миозина, использующийся для подавления острых повреждений миокарда. Молекулярные механизмы ингибирования миозина в присутствии BDM в скелетных мышцах не исследованы, поэтому цель настоящей работы заключалась в изучении влияния этого агента на взаимодействие миозина с актином при моделировании нескольких стадий АТФазного цикла в скелетном мышечном волокне, чтобы оценить перспективы применения BDM для лечения врожденных миопатий. Мы обнаружили, что BDM в отсутствие регуляторных белков тропомиозина и тропонина усиливает жесткость связывания миозина с актином при моделировании слабых форм связывания этих мышечных белков, что может замедлить переход актомиозина из состояния $A \cdot M \cdot ADF \cdot F_n$ в состояние $A \cdot M \cdot ADF$ и является одной из причин снижения АТФазной активности миозина. При моделировании последовательных стадий АТФазного цикла с использованием АДФ, АМРРNP, АТР γ S и АТФ происходит постепенный перевод головок миозина в состояние слабого взаимодействия с актином. В присутствии тропомиозина и тропонина в мышечном волокне BDM не влияет на образование слабой формы связывания актомиозина, однако увеличивает число головок миозина, существенных для генерации усилия. BDM может быть использован для увеличения эффективности конформационных перестроек миозина в присутствии тропомиозина с мутацией R90P, связанной с врожденной миопатией, поскольку этот реагент увеличивает число головок миозина в мышечном волокне, способных к эффективным конформационным перестройкам в АТФазном цикле и частично ингибирует патологические эффекты мутации.

Ключевые слова: актин-миозиновое взаимодействие, регуляция мышечного сокращения, мышечное волокно, поляризованная флуоресценция, 2,3-бутандион-моноксим (ингибитор АТФазной активности миозина), врожденные миопатии

DOI: 10.31857/S0041377123010029, EDN: GORVHZ

Известно, что в основе сокращения скелетных мышц лежит взаимодействие актина и миозина, сопровождаемое гидролизом АТФ в активном центре миозина. Регуляцию мышечного сокращения осуществляет тропонин-тропомиозиновый комплекс,

связанный с актином и придающий тонким нитям Ca^{2+} -зависимость для оперативного переключения между разными функциональными состояниями, в которых тонкие нити могут активировать или блокировать цикл миозиновых поперечных мостиков, лежащий в основе развития силы. Механизмы регуляции сокращения мышц могут быть нарушены вследствие мутаций в генах белков саркомера, что приводит к развитию мышечной дисфункции. По видимому, вначале происходят незначительные (казалось бы) отклонения сократительной функции от нормы, такие как смещение равновесия между открытым и блокирующим функциональными состояниями тонких нитей в сторону активации или инги-

Принятые сокращения: Ф-актин — фибриллярный актин; F_n — неорганический фосфат; АМРРNP — аденилил-имидодифосфат; АТР γ S — аденозин-5'-[γ -тио]-трифосфорная кислота; BDM — 2,3-бутандион-моноксим; 1,5-IAEDANS — N-йодоацетил-N'-(5-сульфо-1-нафтил)-этилендиамин; N — количество неориентированных флуорофоров 1,5-IAEDANS; S1 — субфрагмент-1 миозина; Φ_E — угол ориентации диполей излучения флуорофоров 1,5-IAEDANS относительно оси мышечного волокна.

бирования актин-миозинового взаимодействия. В ответ на образование открытого функционального состояния тонких нитей увеличивается количество миозиновых мостиков, сильно связанных с актином и существенных для генерации силы, и дополнительное количество мономеров актина переходит во включенное состояние (при котором актин способен активировать гидролиз АТФ в активном центре миозина). И наоборот, если регуляторный комплекс вследствие мутации в одном из мышечных белков находится преимущественно в блокирующем состоянии, то количество миозиновых мостиков в сильной форме связывания значительно снижается и часть мономеров актина переходит в выключенное состояние (при котором актин не способен активировать гидролиз АТФ в миозине). Такие отклонения в функционировании белкового комплекса внутри саркомера способны усиливаться и накапливаться, запуская компенсаторные процессы, и вызывать мышечную слабость или контрактуры, появление агрегатов белков в виде разнообразных внутриклеточных включений (немалиновых телец, кэп-структур, ядер и стержней различной природы и локализации) и, как результат, приводить к ограничению двигательной функции, астении и (или) быстрой утомляемости мышц.

Обнаружено большое количество генетических причин возникновения заболеваний скелетных мышц человека, характеризующихся мышечной слабостью и гипотонией. Прямая корреляция между конкретной генетической причиной и фенотипом заболевания отсутствует, определение патологического варианта крайне затруднено, а терапевтические подходы до сих пор не разработаны. В этой научной проблеме важно выделить то, что пациент после выявления мышечной слабости и постановки диагноза врожденной миопатии не получает своевременного и соответствующего лечения, из-за чего со временем может потребоваться регулярный мониторинг дыхательной недостаточности и назначение неинвазивной и инвазивной вентиляции легких, а также терапия, направленная на предупреждение сердечной недостаточности. Таким образом, имеет место острая необходимость разработки принципов этиотропного лечения врожденных миопатий.

Существует несколько применяемых в клинике и проходящих клинические испытания лекарственных препаратов для лечения кардиомиопатий, механизм действия которых можно использовать для формирования основных принципов лечения и заболеваний скелетных мышц. Это такие химические соединения, которые способны модулировать функцию тропонина и миозина. Однако исследования, посвященные изучению молекулярных механизмов действия потенциальных лекарственных препаратов при заболеваниях скелетных мышц практически отсутствуют.

Одним из фармакологических агентов, перспективных для лечения миопатий является 2,3-бутандион-моноксим (BDM) — неконкурентный ингибитор химической и двигательной активности миозина II (McKillop et al., 1994). Было продемонстрировано, что при выполнении сердечно-легочной реанимации у свиней, у которых моделировали остановку сердца, BDM обращал ишемию сердечной мышцы (Lee et al., 2015). BDM оказывает защитное действие на структуру кардиомиоцитов (Wheeler, Chien, 2012). Предполагается, что BDM стабилизирует конформационный домен сердечного миозина в промежуточном конформационном состоянии, характерном для слабого связывания с актином и ингибирует скорость высвобождения фосфата из активного центра. Несмотря на имеющиеся в литературе исследования, до сих пор неизвестны молекулярные механизмы действия BDM в скелетном мышечном волокне.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании ответа миозиновых головок на присутствие в скелетном мышечном волокне BDM. Работа была выполнена на одиночных мышечных волокнах, вначале лишенных миозина и регуляторных белков (так называемых “теневых” волокон), а затем реконструированных с помощью необходимых белков. Информацию о влиянии BDM на взаимодействие миозина и актина получали путем анализа поляризованной флуоресценции зондов 1,5-IAEDANS, связанных с субфрагментом-1 миозина (S1), который был инкорпорирован в мышечное волокно. Измерения поляризованной флуоресценции осуществляли при моделировании нескольких стадий АТФазного цикла в отсутствие или в присутствии АДФ, АМРРNP, АТРγS, АТФ и 20 мМ BDM. Регуляторную систему в теневом волокне восстанавливали с помощью скелетно-мышечного тропонина и рекомбинантного тропомиозина дикого типа или тропомиозина с аминокислотной заменой R90P (Arg90Pro), обнаруженной при врожденной миопатии человека (Lawlor et al., 2010). Функциональные состояния тонких нитей моделировали при низкой и высокой концентрациях ионов кальция.

Результаты проведенного нами исследования показали перспективность использования BDM для коррекции нарушений в работе миозинового поперечного мостика в скелетных мышцах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Получение моделей мышечных волокон и мышечных белков. Работа выполнена на одиночных мышечных волокнах кролика с реконструированной сократительной системой. Такие волокна являются перспективной и адекватной моделью для исследования молекулярных механизмов мышечного сокращения (Vorobikov et al., 2009). Источником мышечных волокон служила большая поясничная мышца кролика, из которой выделяли небольшие пучки длиной 4–5 см. Волокна помещали на лигатурах в

глицеринизирующий раствор, в котором они хранились при -20°C в течение 3–36 мес. Затем отделяли одиночные мышечные волокна и экстрагировали из них мышечные белки до получения теневых волокон, состоящих на 80–90% из чистого фибриллярного актина (UniProt P68135), который на 100% идентичен актину скелетных мышц человека (UniProt P68133). Экстрагирующий раствор содержал 800 мМ KCl, 1 мМ MgCl_2 , 67 мМ Na,K-фосфатный буфер pH 7.0 и 10 мМ АТФ. Далее теневые мышечные волокна закрепляли на предметных стеклах и помещали в отмывающий раствор, содержащий 10 мМ KCl, 3 мМ MgCl_2 , 6.7 мМ K,Na-фосфатный буфер pH 7.0.

Сократительный аппарат мышечных волокон восстанавливали с помощью фрагмента миозина (S1) из скелетных мышц кролика, легко проникающего через мембрану теневого волокна и способного активировать и деактивировать регулируемые тонкие нити и изменять свою конформацию при связывании нуклеотидов и аналогов АТФ. Раствор для инкубации включал в себя 50 мМ KCl, 3 мМ MgCl_2 , 1 мМ DTT, 6.7 мМ Na,K-фосфатный буфера pH 7.0 и S1 в концентрации 2–3 мг/мл.

Рекомбинантные препараты тропомиозина дикого типа изоформы Trpm2.2, кодируемой геном TPM2, а также тропомиозина с аминокислотной заменой R90P были любезно предоставлены для исследований д-ром С. Redwood (Оксфордский университет, Великобритания). Миозин и тропонин выделяли из быстрых скелетных мышц кролика согласно методам, разработанным ранее (Margossian, Lowey, 1982; Potter, 1982). S1, не имеющий регуляторных легких цепей, получали расщеплением скелетно-мышечного миозина α -химотрипсином в течение 20 мин при 25°C при весовом соотношении 300 : 1, осаждали с помощью насыщенного раствора сульфата аммония и очищали путем диализа (Okamoto, Sekine, 1985). Диализный раствор включал 10 мМ KCl, 1 мМ MgCl_2 , 0.1 мМ NaN_3 , 0.1 мМ DTT, 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5). Затем S1 модифицировали флуоресцентным зондом 1,5-IAEDANS по описанной методике (Borejdo et al., 1982), согласно которой специфически модифицируется наиболее реактивный остаток цистеина в головке миозина Cys707. Чистоту препарата S1 и состав мышечных волокон определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Согласно анализу электрофоретического разделения белков, молярное отношение S1 к актину составляло 1 : 4 (± 2).

Измерение поляризованной флуоресценции S1, связанного с актином в мышечном волокне. С помощью метода поляризационной микрофлуориметрии исследовали конформационные перестройки S1, происходящие при моделировании разных структурно-функциональных состояний тонких нитей и стадий АТФазного цикла в одиночном мышечном волокне. Флуоресценцию зондов 1,5-IAEDANS, связанных с Cys707 S1, возбуждали при длине волны

407 ± 5 нм; интенсивность флуоресценции регистрировали в диапазоне длин волн 500–600 нм. Измерения проводили в проточной камере в отсутствие или в присутствии нуклеотидов (3 мМ АДФ, 15 мМ $\text{ATP}\gamma\text{S}$, 15 мМ AMPNP или 3 мМ АТФ, содержащих Mg), имитирующих различные стадии цикла гидролиза АТФ (Borovikov et al., 2009, 2017). Низкую и высокую концентрацию ионов кальция в мышечном волокне моделировали в присутствии 4 мМ ЭГТА и 0.1 мМ CaCl_2 соответственно.

Интенсивности компонентов поляризованной флуоресценции $\parallel I_{\perp}$, $\perp I_{\perp}$, $\perp I_{\parallel}$, $\parallel I_{\parallel}$ регистрировали с помощью поляризационного флуориметра в проточной камере (Borovikov et al., 2004). Полученные данные обрабатывали с помощью модель-зависимого метода (Tregear, Mendelson, 1975; Borovikov et al., 2009). Предполагали, что в мышечном волокне имеется две популяции флуорофоров: популяция упорядоченных флуорофоров (1 – N), осцилляторы поглощения и излучения которых расположены под углами Φ_A и Φ_E относительно оси мышечного волокна, и популяция хаотически расположенных флуорофоров N. Поскольку характер изменений Φ_A и Φ_E совпадал, то в работе рассматривается только один из этих параметров (Φ_E). Параметры поляризованной флуоресценции (Φ_E , N) вычисляли с помощью математической обработки измеренных интенсивностей флуоресценции. Результаты были получены на 5–6 волокнах (25–30 измерений). Статистическую значимость изменений параметров оценивали с использованием *t*-теста Стьюдента при $P < 0.05$.

Определение актин-активированной АТФазы S1. Актин-содержащий ацетоновый порошок получали из скелетных мышц кролика по методике, описанной ранее (Spudich, Watt, 1971), и хранили при -45°C в течение 1–3 лет. Перед экспериментом актин выделяли из ацетонового порошка и очищали с помощью как минимум 3 циклов полимеризации–деполимеризации. Фибриллярный актин (Ф-актин) хранили в растворе, содержащем 60 мМ KCl, 0.2 мМ АТФ, 0.2 мМ CaCl_2 , 1 мМ MgCl_2 , 0.2 мМ NaN_3 и 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0).

Скорость АТФазной реакции определяли в растворе, содержащем 1 мкМ S1, 7 мкМ Ф-актина в буфере следующего состава: 12 мМ трис-HCl (pH 7.9), 2.5 мМ MgCl_2 , 15 мМ KCl, 20 мМ NaCl, 0.2 мМ DTT и 2 мМ АТФ при 25°C . Концентрацию белков оценивали с помощью метода Брэдфорда (Bradford, 1976). Реакцию проводили в диапазоне концентраций Ca^{2+} от 10^{-10} до 10^{-4} М в отсутствие или в присутствии 20 мМ BDM. Реакцию останавливали через 10 мин, добавляя трихлоруксусную кислоту до конечной концентрации 5%. Количество образовавшегося неорганического фосфата определяли методом Фiske и Суббароу (Fiske, Subbarow, 1925) на основании 3 экспериментов. Статистическую обработку данных и построение графиков осуществляли с помощью программы GraphPadPrism.

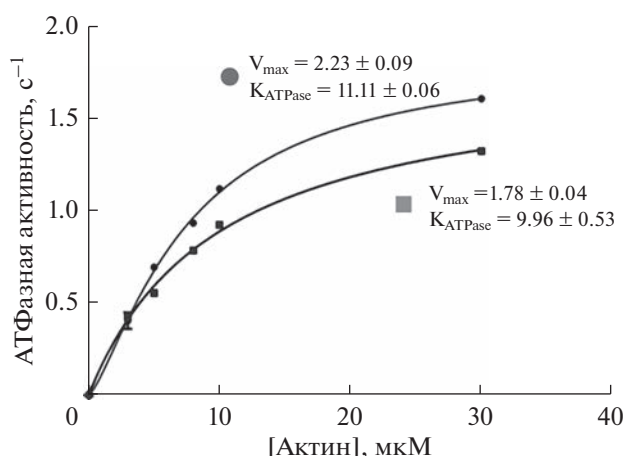


Рис. 1. Актин-активируемая Mg^{2+} -АТФазная активность головок миозина (S1 миозина) в отсутствие (круглые символы) и в присутствии (квадратные символы) 20 мМ BDM. Снижение величин $V_{\max}$ (максимальной скорости АТФазной реакции) и K_{ATPase} (концентрации актина, при которой АТФазная активность равна половине максимума) в присутствии BDM указывает на то, что скорость освобождения неорганического фосфата из активного центра миозина ингибируется.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние BDM на АТФазную активность S1 миозина. В присутствии BDM наблюдали снижение количества неорганического фосфата и уменьшение максимальной АТФазной активности головок миозина (рис. 1). Полученные результаты согласуются с опубликованными ранее данными (Higuchi, Takemori, 1992).

Влияние нуклеотидов на параметры поляризованной флуоресценции зондов 1,5-IAEDANS, связанных с S1 в скелетном мышечном волокне. Связывание S1, модифицированного флуоресцентными зондами 1,5-IAEDANS по Cys707 (S1-AEDANS), с Ф-актином теневых мышечных волокон инициировало появление поляризованной флуоресценции, которая регистрировалась нами с помощью поляризационного микрофлуориметра. Величина степени поляризации флуоресценции при ориентации волокна параллельно ($P_{\parallel}$) и перпендикулярно ($P_{\perp}$) плоскости поляризации света возбуждения была соответствен-

но высокой ($P_{\parallel} = 0.432 \pm 0.003$) и низкой ($P_{\perp} = -0.004 \pm 0.004$) (табл. 1). Подобные величины степени поляризации для S1-AEDANS неоднократно наблюдались нами ранее (Borovikov et al., 2009; Karpicheva et al., 2017).

Математический анализ измеренных параметров флуоресценции показал, что величина Φ_E — угла ориентации диполей излучения 1,5-IAEDANS относительно оси волокна для головок миозина, связанных с актиновыми нитями, составляла 42.9 ± 0.1 град. (рис. 2a). Известно, что в отсутствие нуклеотидов головки миозина ориентированы вдоль актиновой нити по спирали и образуют с тонкой нитью угол, близкий к 45 град. (Reedy et al., 1965). Следовательно, осцилляторы излучения зондов 1,5-IAEDANS располагались практически параллельно моторному домену миозина. Помимо упорядоченных флуорофоров в волокне имеется фракция неориентированных осцилляторов, которая отражает, главным образом, колебательные и вращательные движения головки миозиновой молекулы в мышечном волокне (Andreev et al., 1995). Количество неупорядоченных флуорофоров характеризуется параметром N, который можно использовать для характеристики сродства или жесткости связывания миозина к актину, изменяющегося при образовании слабой или сильной форм связывания этих двух белков. Согласно полученным данным (рис. 2б), в отсутствие нуклеотида величина N составляла 0.223 ± 0.004 отн. ед. (т.е. менее 25%, $P < 0.05$), что свидетельствует о низкой подвижности головок миозина, а следовательно, о большой области взаимодействия миозина с актином и жестком связывании этих белков (Borovikov et al., 2009, 2017; Karpicheva et al., 2017).

Рассмотрим изменения параметров Φ_E и N при моделировании основных стадий цикла гидролиза АТФ (рис. 2). В отсутствие нуклеотидов имитировалось состояние актомиозина $A \cdot M$, где символы A (актин) и M (миозин) обозначают конформационные состояния актина и головки миозина соответственно. АДФ и АТФ в комплексе с Mg^{2+} использовали для имитации промежуточных структурных состояний актомиозина $A \cdot M^{\wedge} \cdot АДФ$ и $A \cdot M^{**} \cdot АДФ$ соответственно (Roopnarine, Thomas, 1996; Goody, Hofmann, 1980), где $M^{\wedge}$ и M^{**} — отличные от

Таблица 1. Степени поляризации флуоресценции молекул 1,5-IAEDANS, связанных с Cys707 субфрагмента-1 миозина, при моделировании промежуточных стадий АТФазного цикла в отсутствие и в присутствии 20 мМ BDM

Нуклеотид	Степень поляризации			
	в отсутствие BDM		в присутствии BDM	
	$P_{\parallel}$	$P_{\perp}$	$P_{\parallel}$	$P_{\perp}$
—	0.432 ± 0.003	-0.004 ± 0.006	0.450 ± 0.002	-0.011 ± 0.006
АДФ	0.437 ± 0.004	0.201 ± 0.010	0.468 ± 0.004	0.014 ± 0.011
АТФ	0.346 ± 0.003	0.307 ± 0.019	0.452 ± 0.002	0.005 ± 0.008

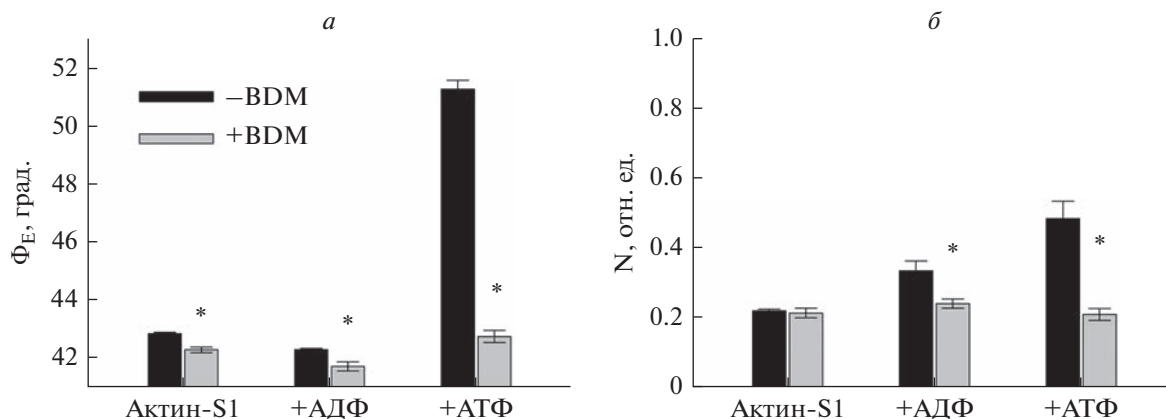


Рис. 2. Влияние 20 мМ ВДМ на величину угла ориентации диполей излучения флуорофоров относительно оси мышечного волокна Φ_E (а) и количество неориентированных флуорофоров N (б) для зонда 1,5-IAEDANS, связанного с S1 в Cys707 в теневом волокне при моделировании основных состояний АТФазного цикла в отсутствие нуклеотида и в присутствии АДФ или АТФ. Данные получены в отсутствие регуляторных белков тропомиозина и тропонина. (*): здесь и далее изменения параметров по сравнению с состоянием в отсутствие ВДМ достоверны при $P < 0.05$. Поскольку флуоресцентный краситель жестко связан с SH1-спиралью миозина, то изменения параметра Φ_E отражают наклон SH1-спирали миозина относительно оси мышечного волокна и изменение ориентации или конформации всей головки миозиновой молекулы, а изменения параметра N — характер связывания головки миозина с актином (чем больше количество неориентированных флуорофоров, тем слабее связывание миозина с актином).

первоначальных конформационных состояний головки миозина, Φ_n — неорганический фосфат.

АДФ и АТФ значительно изменяли параметры поляризованной флуоресценции. Добавление АДФ к мышечному волокну вызывало небольшое снижение величины Φ_E , что можно объяснить поворотом SH1-спирали миозина по направлению к оси мышечного волокна и “обратным движением” поперечного мостика к оси мышечного волокна (Takezawa et al., 1999).

При моделировании перехода актомиозина от сильного к слабому связыванию (от состояния в отсутствие нуклеотида и в присутствии АДФ к состоянию в присутствии АТФ), величины Φ_E и N увеличивались соответственно до 51.3 град. (рис. 2а) и 0.486 отн. ед. (рис. 2б), что говорит о повороте диполей излучения красителя вместе с областью их связывания (SH1-спиралью) от оси мышечного волокна и об увеличении подвижности флуорофоров. Достоверно известно, что головка миозина в АТФазном цикле значительно изменяет свою ориентацию относительно оси волокна (Burghardt et al., 1997), и изменения величин Φ_E и N, по-видимому, некоторым образом отражают изменение азимутальной ориентации всего моторного домена миозина и силы его взаимодействия с актином, а не только движение SH1-спирали, с которой связаны флуорофоры.

Стоит отметить, что в присутствии каждого из нуклеотидов или аналогов АТФ в мышечном волокне присутствует некоторая разнородность в конформациях головок миозина, то есть одновременно наблюдается смесь миозиновых головок в сильной и слабой формах взаимодействия с актином, одна из

которых является преобладающей (Nesmelov et al., 2008). Мы предполагаем, что изменения параметров флуоресценции S1-AEDANS свидетельствуют о смещении равновесия в сторону одного из преобладающих состояний — сильно- или слабосвязанного конформационного состояния головок миозина. Результаты исследований трехмерной структуры S1 обнаружили, что максимальные изменения в конформации головок миозина происходят в регуляторном домене, так называемом “рычаге”, при переходе миозина из структурного состояния $M^{**} \cdot \text{АДФ} \cdot \Phi_n$ в состояние $M^{\wedge} \cdot \text{АДФ}$ (Volkman, Hanein, 2000).

Согласно данным, полученным в настоящей работе, область моторного домена миозина, содержащая краситель, то есть SH1-спираль, поворачивается при переходе от сильной к слабой форме связывания на 8.4 град. (рис. 2а). Амплитуда этого изменения может колебаться в зависимости от качества препаратов мышечных белков, мышечных волокон и белкового состава в пределах 4–11 град. (Borovikov et al., 2009). Выявленные тенденции будут использованы нами далее для характеристики влияния ингибитора миозина ВДМ на конформационные перестройки S1.

Влияние ингибитора миозина ВДМ на параметры поляризованной флуоресценции зондов 1,5-IAEDANS, связанных с S1 миозина в скелетном мышечном волокне. При добавлении 20 мМ ВДМ к мышечному волокну параметры поляризованной флуоресценции 1,5-IAEDANS существенно изменялись (табл. 1, рис. 2). Величины степени поляризации флуоресценции при ориентации волокна параллельно ($P_{\parallel}$) и перпендикулярно ($P_{\perp}$) плоскости поляризации света возбуждения были существенно выше и ниже соот-

ветственно тех значений, которые наблюдались нами в отсутствие BDM. Изменения флуоресценции при добавлении BDM сопровождались наклоном диполей излучения зондов 1,5-IAEDANS, связанных с S1, к оси мышечного волокна: величина Φ_E снижалась с 42.9 до 42.3 град. (рис. 2а), тогда как величина N, свидетельствующая о подвижности головок миозина, не изменялась (рис. 2б). При добавлении АДФ к мышечному волокну также происходило снижение величины Φ_E в присутствии BDM с 42.3 до 41.8 град, величина N снижалась с 0.337 до 0.244 отн. ед. (рис. 2а, 2б). Таким образом, в отсутствие и в присутствии АДФ при добавлении 20 мМ BDM наблюдались изменения, характерные для увеличения фракции головок миозина, образующих с актином сильную форму связывания, с большой областью актин-миозинового взаимодействия и с наклоном головок миозина по направлению к оси мышечного волокна. При моделировании перехода в слабую форму связывания миозина с актином (в присутствии АТФ) BDM приводил к существенному снижению величин Φ_E с 51.3 до 42.8 град и N с 0.486 до 0.213 отн. ед. (рис. 2). Если в отсутствие BDM при переходе головки миозина в конформационное состояние слабого связывания с актином SH1-спираль S1 поворачивалась от оси мышечного волокна на 8.4 град., то в присутствии BDM это изменение составляло всего лишь 1.0 град. Подвижность головки миозина, оцениваемая по величине N, не изменялась. Следовательно, данные измерения поляризованной флуоресценции от зондов 1,5-IAEDANS, связанных с SH1-спиралью миозина, свидетельствуют о значительном влиянии BDM на взаимодействие между миозином и актином, которое выражается в увеличении фракции сильносвязанных с актином миозиновых головок при моделировании как сильного, так и слабого связывания этого белкового комплекса и значительном подавлении конформационных перестроек миозиновых головок в АТФазном цикле.

BDM, как известно, снижает АТФазную активность миозина. Снижение АТФазной активности в присутствии BDM может быть напрямую связано с “замораживанием” конформации головок миозина, наблюдаемых нами при моделировании перехода между сильной и слабой формами связывания актомиозина. То есть ингибиторное действие BDM обусловлено не тем, что этот реагент ингибирует связывание миозина с актином, а тем, что он, наоборот, потенцирует расщепление фосфата в активном центре миозина и переводит часть головок миозина из слабой формы связывания в промежуточную или сильную форму, однако при этом выделение неорганического фосфата снижается.

В дополнительно проведенном эксперименте (рис. 3) было исследовано влияние BDM на конформационные перестройки миозина при моделировании дополнительных промежуточных стадий

АТФазного цикла $A \cdot M' \cdot \text{АДФ}$ и $A \cdot M^{**} \cdot \text{АДФ} \cdot \Phi_n$ (в присутствии AMPPNP и АТРγS). При сравнении с данными, полученными в отсутствие BDM, можно выявить существенное увеличение величин Φ_E и N в присутствии AMPPNP и АТРγS (рис. 3а, б), что указывает на поворот SH1-спирали от оси мышечного волокна и образование конформации миозина, характерной для слабой формы связывания с актином. Следовательно, последовательная инкубация мышечного волокна в растворах AMPPNP, АТРγS и АТФ приводит к постепенному переходу головок миозина в слабую форму связывания и не вызывает задерживания миозина в сильной форме связывания, как это наблюдалось при переходе из состояния с АДФ сразу в состояние с АТФ.

Влияние BDM на конформационное состояние S1 миозина в скелетном мышечном волокне, содержащем тропонин и тропомиозин дикого типа или тропомиозин с аминокислотной заменой R90P. В настоящей работе тонкие нити теневых волокон были реконструированы с помощью рекомбинантного тропомиозина дикого типа Trp2.2 или мутантного тропомиозина, имеющего аминокислотную замену R90P, обнаруженную при врожденной диспропорции мышечных волокон человека (CFTD) (Lawlor et al., 2010).

BDM был добавлен к теневым волокнам, содержащим тропомиозин, тропонин и S1-AEDANS в отсутствие и в присутствии АТФ с последовательным переводом комплекса актин-миозин от сильной к слабой форме связывания, как это было описано выше. Измеряли поляризованную флуоресценцию зондов 1,5-IAEDANS, связанных с S1, и оценивали влияние BDM в норме и при моделировании в мышечном волокне патологического состояния регуляторного комплекса тропомиозин-тропонин, который может формироваться в мышцах у человека, несущего мутацию R90P в гене TPM2. Согласно полученным данным (рис. 4а), BDM снижал величину Φ_E с 44.9 до 43.8 град. в присутствии тропомиозина дикого типа и не изменял этот параметр при других моделируемых состояниях. Такое снижение угла описывалось нами ранее (см. выше) при добавлении BDM к теневым волокнам, содержащим только S1, и указывает на увеличение фракции головок миозина в сильной форме связывания с актином.

Это предположение подтверждается снижением параметра N, которое свидетельствует о снижении подвижности SH1-спирали миозина и об увеличении жесткости связывания миозина с актином. Тем не менее, в мышечном волокне с реконструированной регуляторной системой, BDM не оказывал влияния на конформационное состояние миозина при моделировании слабой формы связывания в присутствии АТФ, а только снижал параметр N. Таким образом, эффект BDM практически нивелируется в присутствии тропомиозина и тропонина. Когда в тонкую нить встраивался тропомиозин с заменой R90P, то при низкой концентрации ионов кальция

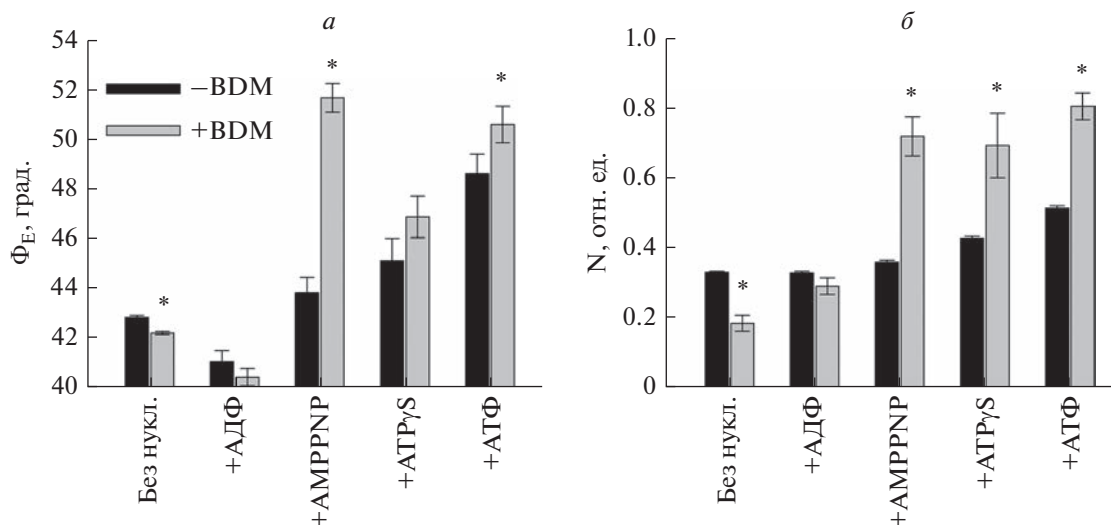


Рис. 3. Влияние 20 мМ ВДМ на величины Φ_E и N для S1, связанного с 1,5-AEDANS в теневом волокне при последовательном моделировании ряда состояний АТФазного цикла в отсутствие нуклеотида и в присутствии АДФ, АМРРNP, АТРγS или АТФ. Данные получены в отсутствие регуляторных белков тропомиозина и тропонина.

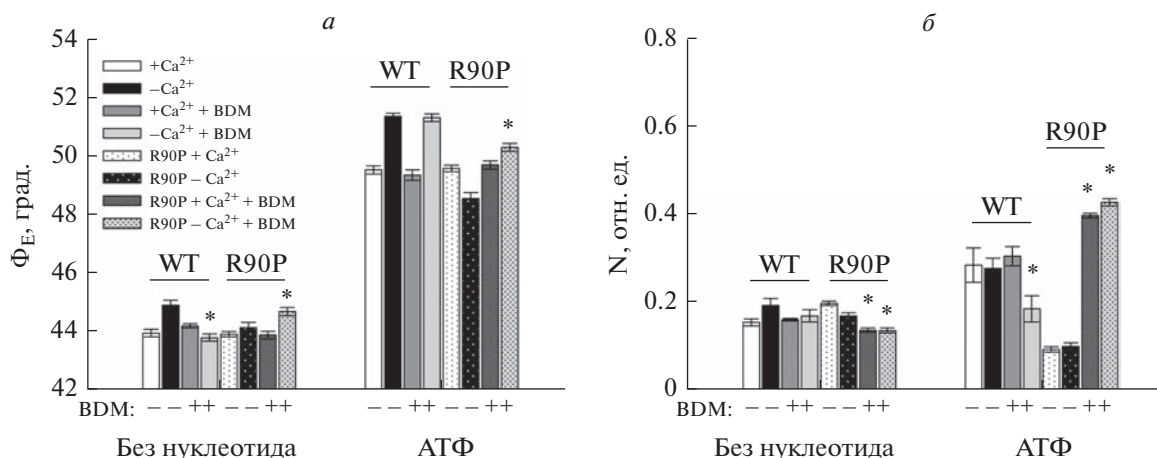


Рис. 4. Влияние 20 мМ ВДМ на величины угла Φ_E (a) и параметра N (b) для S1, связанного с 1,5-IAEDANS, в теневом волокне, содержащем тропонин, а также тропомиозин дикого типа (WT) или тропомиозин с заменой R90P при моделировании сильного (в отсутствие нуклеотида) и слабого (в присутствии АТФ) связывания актомиозина. Данные получены при высокой ($+Ca^{2+}$) и низкой ($-Ca^{2+}$) концентрациях ионов кальция.

головки миозина образовывали с актином все больше сильных форм связывания, что подробно было описано в предыдущей работе (Borovikov et al., 2021). Такое патологическое увеличение головок миозина в сильной форме связывания с актином при деактивирующих условиях может являться одной из причин снижения эффективной работы миозиновых поперечных мостиков и приводить к мышечной слабости, наблюдаемой при CFTD. ВДМ в присутствии мутантного тропомиозина, тропонина и АТФ увеличивал величины Φ_E с 48.5 до 50.3 град и N — с 0.100 до 0.428 отн. ед. при низких концентрациях ионов кальция (рис. 4a), т.е. смягчал последствия мутации,

позволяя головкам миозина образовывать с актином больше слабых форм и увеличивая конформационные изменения головок при переходе между сильной и слабой формами взаимодействия. Так, если Φ_E увеличивался на 4.3 град в отсутствие ВДМ, то в его присутствии эта величина составляла уже 5.6 град. В присутствии тропомиозина дикого типа величина Φ_E увеличивалась на 6.5 град в отсутствие ВДМ и на 7.5 град. в присутствии ВДМ.

Таким образом, ВДМ приводил к частичному восстановлению конформационных перестроек S1, нарушенных вследствие замены R90P в тропомиозине: величина Φ_E в присутствии ВДМ приближает-

ся к тем величинам, которые мы наблюдали в присутствии тропомиозина дикого типа, а увеличение величины N свидетельствует о возможности образования слабых форм связывания в присутствии АТФ.

ОБСУЖДЕНИЕ

BDM относится к классу оксимов, которые являются перспективными фармакологическими агентами для регуляции многочисленных клеточных процессов. Связываясь с миозином непосредственно рядом с его активным центром, BDM способен изменять степень фосфорилирования этого мышечного белка и модулировать его АТФазную активность. Изучение кинетики связывания (Heigmann et al., 1992) показало, что взаимодействие между BDM и γ -фосфатной группой АТФ в АТФ-связывающем сайте миозина потенцирует стадию расщепления, сдвигая равновесие от состояния $M^{\wedge} \cdot \text{АТФ}$ к состоянию $M^{**} \cdot \text{АДФ} \cdot \text{Фн}$, а далее стерическим образом замедляет стадию высвобождения Фн и образование комплекса $M^{**} \cdot \text{АДФ}$ (McKillop, 1994; Heigmann et al., 1992). Из этого следует, что актомиозин задерживается в состоянии $A \cdot M^{**} \cdot \text{АДФ} \cdot \text{Фн}$, т.е. в промежуточном состоянии между слабой и сильной формами связывания. Таким образом, ингибиторный эффект BDM состоит в замедлении высвобождения неорганического фосфата из активного центра миозина, что является одной из причин снижения активности миозиновой АТФазы и сократительной функции в присутствии BDM (Higuchi, Takemori, 1989).

Наши данные подтверждают, что главный эффект BDM заключается в потенцировании расщепления АТФ в активном центре миозина. В первой части работы мы моделировали три состояния АТФазного цикла: $A \cdot M$, $A \cdot M^{\wedge} \cdot \text{АДФ}$ и $A \cdot M^{*} \cdot \text{АТФ}$. Если BDM ускоряет процесс расщепления АТФ в активном центре головки миозина, то при моделировании слабого связывания в присутствии АТФ можно было ожидать появления головок миозина в промежуточной или сильной форме связывания. Нами установлено, что инкубация мышечного волокна в растворе, содержащем BDM в присутствии АТФ, провоцирует смещение равновесия актин-миозиновых состояний к образованию конформации сильного связывания в цикле гидролиза АТФ. Следовательно, процесс перехода миозиновых головок в слабую форму связывания с актином ингибируется.

Противоречивыми данными стали результаты, полученные при моделировании сильных форм связывания $A \cdot M$ и $A \cdot M^{\wedge} \cdot \text{АДФ}$ (в отсутствие и в присутствии АДФ). Добавление BDM инициировало переход большего числа головок миозина в сильную форму связывания с актином, что не соответствует роли BDM как ингибитора миозина. Тем не менее, сразу в нескольких экспериментах при добавлении BDM к мышечным волокнам, содержащим S1-AEDANS, SH1-спираль миозина наклонялась по на-

правлению к оси мышечного волокна, что, несомненно, указывает на образование конформации головки миозина, характерной для сильного связывания с актином. Однако стоит отметить, что результаты кинетических исследований были получены при моделировании перехода миозина от конформации с АТФ в конформацию с АДФ.

Специфика нашего исследования заключается в том, что сначала моделируются состояния сильного связывания, а затем переход в слабое связывание. Такая последовательность продиктована тем, что в присутствии АТФ количество головок миозина, связанных с актином, резко снижается вследствие падения сродства миозина к актину и дальнейшие измерения флуоресценции затрудняются. Можно предположить, что головки миозина после воздействия на них АТФ и BDM сложнее бы осуществляли переход к сильной форме связывания с актином.

Промежуточное состояние $A \cdot M^{**} \cdot \text{АДФ} \cdot \text{Фн}$, в котором, как предполагается, задерживается миозин в присутствии BDM, можно смоделировать с помощью аналогов АТФ AMPPNP или АТР γ S. Во второй части работы нами было промоделировано 5 состояний АТФазного цикла: $A \cdot M$, $A \cdot M^{\wedge} \cdot \text{АДФ}$, $A \cdot M' \cdot \text{АДФ}$, $A \cdot M^{**} \cdot \text{АДФ} \cdot \text{Фн}$ и $A \cdot M^{*} \cdot \text{АТФ}$, т.е. проведена последовательная инкубация мышечных волокон в растворах АДФ, AMPPNP, АТР γ S и АТФ.

Ранее с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (Komatsu et al., 2017) было обнаружено, что BDM изменяет микроокружение вокруг фосфатных групп AMPPNP при связывании с головкой миозина, предполагая взаимодействие между BDM и фосфатными группами AMPPNP. Теоретические подходы позволяют предполагать, что BDM располагается близко к γ -сульфату АТР γ S и может способствовать расщеплению фосфоэфирных связей АТФ в активном центре миозина. Другими словами, оксимная группа BDM может непосредственно дефосфорилировать АТФ с образованием АДФ и фосфорилоксима. Мы наблюдали увеличение числа головок миозина в слабой форме связывания под действием BDM в состояниях с AMPPNP и АТР γ S, и при таком последовательном переходе головки миозина эффективно переходили в состояние слабого связывания с актином, в отличие от результатов, полученных при инкубации волокон сначала в АДФ, а потом сразу в АТФ.

В мышечных волокнах с реконструированной регуляторной системой характер действия BDM изменился. Этот реагент уже не влиял на образование слабой формы связывания миозина с актином, но увеличивал фракцию сильно связанных головок миозина при низкой концентрации ионов кальция в саркомере, таким образом стимулируя эффективные конформационные перестройки миозиновых поперечных мостиков в АТФазном цикле.

Действие BDM на конформацию миозина может быть использовано для восстановления актин-мио-

зинового взаимодействия в присутствии мутаций в мышечных белках, связанных с врожденными миопатиями, что показано нами на примере тропомиозина с заменой R90P, встроенного в мышечное волокно. Патологическое действие мутации R90P связано с увеличением АТФазной активности миозина и относительного количества головок миозина, которые находятся в конформации сильного связывания, при моделировании различных стадий цикла гидролиза АТФ (Borovikov et al., 2021). Одним из главных эффектов мутации являлось снижение амплитуды движения головок миозина (или SH1-спирали миозина) в цикле гидролиза АТФ. Добавление BDM к мышечным волокнам, содержащим мутантный тропомиозин, частично нормализовало конформационные перестройки миозина, нарушенные в присутствии мутантного тропомиозина, позволяя головкам миозина эффективнее переходить между конформациями слабого и сильного связывания с актином. Из данных следует, что BDM может быть использован для восстановления нормальной регуляции взаимодействия миозина с актином и должен быть протестирован в дальнейшем на других модельных системах и в модельных животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-04-00523).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с лабораторными животными были проведены по правилам, одобренным Комиссией по биоэтической этике Института цитологии РАН (№ F18-00380, 12.10.2017–31.10.2022).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Andreev O.A., Takashi R., Borejdo J. 1995. Fluorescence polarization study of the rigor complexes formed at different degrees of saturation of actin filaments with myosin subfragment-1. *J. Muscle Res. Cell Motil.* V. 16. P. 353.
- Borejdo J., Assulin O., Ando T., Putnam S. 1982. Cross-bridge orientation in skeletal muscle measured by linear dichroism of an extrinsic chromophore. *J. Mol. Biol.* V. 158. P. 391. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90205-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90205-4)
- Borovikov Y.S., Andreeva D.D., Avrova S.V., Sirenko V.V., Simonyan A.O., Redwood C.S., Karpicheva O.E. 2021. Molecular mechanisms of the deregulation of muscle contraction induced by the R90P mutation in Tpm3.12 and the weakening of this effect by BDM and W7. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 6318. <https://doi.org/10.3390/ijms22126318>
- Borovikov Y.S., Dedova I.V., dos Remedios C.G., Vikhoreva N.N., Vikhorev P.G., Avrova S.V., Hazlett T.L., Van Der Meer B.W. 2004. Fluorescence depolarization of actin filaments in re-constructed myofibers: the effect of S1 or pPDM-S1 on movements of distinct areas of actin. *Biophys. J.* V. 86. P. 3020. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74351-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74351-9)
- Borovikov Y.S., Karpicheva O.E., Avrova S.V., Redwood C.S. 2009. Modulation of the effects of tropomyosin on actin and myosin conformational changes by troponin and Ca^{2+} . *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1794. P. 985. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.014>
- Borovikov Y.S., Rysev N.A., Avrova S.V., Karpicheva O.E., Borys D., Moraczewska J. 2017. Molecular mechanisms of deregulation of the thin filament associated with the R167H and K168E substitutions in tropomyosin Tpm 1.1. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 614. P. 28. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.12.004>
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* V. 72. P. 248. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Burghardt T.P., Garamszegi S.P., Ajtai K. 1997. Probes bound to myosin Cys-707 rotate during length transients in contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 94. P. 9631. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9631>
- Fiske C.H., Subbarow Y. 1925. Determination of inorganic phosphate. *J. Biol. Chem.* V. 66. P. 375.
- Herrmann C., Wray J., Travers F., Barman T. 1992. Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPases. An example of an uncompetitive inhibitor. *Biochemistry.* V. 31. P. 12227. <https://doi.org/10.1021/bi00163a036>
- Higuchi H., Takemori S. 1989. Butanedione monoxime suppresses contraction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle. *J. Biochem.* V. 105. P. 638. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122717>
- Karpicheva O.E., Sirenko V.V., Rysev N.A., Simonyan A.O., Borys D., Moraczewska J., Borovikov Y.S. 2017. Deviations in conformational rearrangements of thin filaments and myosin caused by the Ala155Thr substitution in hydrophobic core of tropomyosin. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1. P. 1790. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.09.008>
- Komatsu H., Koseki Y., Kanno T., Aoki S., Kodama T. 2017. 2,3-Butanedione 2-monoxime inhibits skeletal myosin II by accelerating ATP cleavage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 490. P. 849. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.130>
- Lawlor M.W., Dechene E.T., Roumm E., Geggel A.S., Moghadaszadeh B., Beggs A.H. 2010. Mutations of tropomyosin 3 (TPM3) are common and associated with type 1 myofiber hypotrophy in congenital fiber type disproportion. *Hum. Mutat.* V. 31. P. 176. <https://doi.org/10.1002/humu.21157>
- Lee B.K., Jeung K.W., Choi S.S., Park S.W., Yun S.W., Lee S.M., Kim N.Y., Heo T., Min Y.I. 2015. Effects of the administration of 2,3-butanedione monoxime during conventional cardiopulmonary resuscitation on ischaemic contracture and resuscitability in a pig model of out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation.* V. 87. P. 26. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2014.11.011>

- Margossian S., Lowey S.* 1982. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzym.* V. 85. P. 55.
- McKillop D.F., Fortune N.S., Ranatunga K.W., Geeves M.A.* 1994. The influence of 2,3-butanedione 2-monoxime (BDM) on the interaction between actin and myosin in solution and in skinned muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* V. 15. P. 309.
<https://doi.org/10.1007/BF00123483>
- Nesmelov Y.E., Agafonov R.V., Burr A.R., Weber R.T., Thomas D.D.* 2008. Structure and dynamics of the force-generating domain of myosin probed by multifrequency electron paramagnetic resonance. *Biophys. J.* V. 95. P. 247.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.124305>
- Okamoto Y., Sekine T.* 1985. A streamlined method of subfragment one preparation from myosin. *J. Biol. Chem.* V. 98. P. 1143.
- Potter J.D.* 1982. Preparation of troponin and its subunits. *Methods Enzym.* V. 85. P. 241.
- Reedy M.K., Holmes K.C., Tregear R.T.* 1965. Induced changes in orientation of the cross-bridges of glycerinated insect flight muscle. *Nature.* V. 207. P. 1276.
<https://doi.org/10.1038/2071276a0>
- Robinson P., Lipscomb S., Preston L.C., Altin E., Watkins H., Ashley C.C., Redwood C.S.* 2007. Mutations in fast skeletal troponin I, troponin T, and beta-tropomyosin that cause distal arthrogryposis all increase contractile function. *FASEB J.* V. 21. P. 896.
<https://doi.org/10.1096/fj.06-6899com>
- Roopnarine O., Thomas D.D.* 1996. Orientation of intermediate nucleotide states of indane dione spin- labeled myosin heads in muscle fibers. *Biophys. J.* V. 70. P. 2795.
- Spudich J.A., Watt S.* 1971. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* V. 246. P. 4866.
- Takezawa Y., Kim D.S., Ogino M., Sugimoto Y., Kobayashi T., Arata T., Wakabayashi K.* 1999. Backward movements of cross-bridges by application of stretch and by binding of MgADP to skeletal muscle fibers in the rigor state as studied by X-ray diffraction. *Biophys. J.* V. 76. P. 1770.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77338-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77338-8)
- Tregear R.T., Mendelson R.A.* 1975. Polarization from a helix of fluorophores and its relation to that obtained from muscle. *Biophys. J.* V. 15. P. 455.
- Volkman N., Hanein D.* 2000. Actomyosin: law and order in motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* V. 12. P. 26.
[https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(99\)00053-8](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)00053-8)
- Wheeler T.J., Chien S.* 2012. Protection of rat cardiac myocytes by fructose-1,6-bisphosphate and 2,3-butanedione. *PLoS One.* V. 7. P. e35023.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035023>

Influence of 2,3-Butanedione-Monoxime on the Interaction of Myosin with Actin in Healthy and in Congenital Myopathy

D. D. Andreeva^a, N. A. Rysev^a, Y. S. Borovikov^a, and O. E. Karpicheva^a, *

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

*e-mail: olexiya6@yandex.ru

Congenital myopathies are a heterogeneous group of human skeletal muscle disorders characterized by muscle hypotonia and weakness. Myopathies have a wide range of clinical phenotypes, which makes it extremely difficult to develop approaches to their treatment. There are several pharmacological agents in clinical use or under clinical investigation for the treatment of cardiomyopathies whose mechanism of action can be used to treat congenital myopathies as well. One such agent is 2,3-butanedione-monoxime (BDM), a noncompetitive inhibitor of myosin ATPase activity used to suppress acute myocardial injury. The molecular mechanisms of inhibition of myosin by BDM in skeletal muscle have not been studied, therefore the aim of this work was to estimate the effect of BDM on the interaction of myosin with actin in the modeling of several ATPase stages in skeletal muscle fiber, in order to assess the prospects for the use of BDM for the treatment of congenital myopathies. We found that BDM enhances the rigidity of myosin binding to actin when modeling weak binding forms of these muscle proteins, which can slow down the transition of actomyosin from the AM · ADP · Pi to the AM · ADP state and is one of the reasons for the decrease in myosin ATPase activity in the presence of BDM. When modeling successive stages of the ATPase cycle using ADP, AMPPNP, ATPγS, and ATP, the myosin heads gradually switch to a state of weak interaction with actin. In the presence of the regulatory proteins tropomyosin and troponin in the muscle fiber, BDM does not affect the formation of a weak form of actomyosin binding, but increases the number of myosin heads essential for force generation. BDM can be used to increase the efficiency of myosin conformational rearrangements in the presence of tropomyosin with the *R90P* mutation associated with congenital myopathy, since this reagent increases the number of myosin heads in the muscle fiber capable of effective conformational rearrangements in the ATPase cycle and partially inhibits the pathological effects of the mutation.

Keywords: actin-myosin interaction, regulation of muscle contraction, muscle fiber, polarized fluorescence, inhibitor of myosin ATPase activity, 2,3-butanedione-monoxime, congenital myopathies

УДК 576.524:577.112.6

О ВАРИАТИВНОСТИ КЛЕТОЧНОГО АДГЕЗИВНОГО ОТВЕТА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ РОДСТВЕННЫХ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ

© 2023 г. В. П. Иванова*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

*E-mail: valet@iephb.ru

Поступила в редакцию 14.07.2022 г.

После доработки 30.08.2022 г.

Принята к публикации 04.09.2022 г.

В работе изучена роль коротких пептидов FGER и GER, содержащих общий трипептидный фрагмент, в регуляции адгезивного ответа клеток CHO-K1. Оба пептида увеличивали клеточную адгезию, как на необработанном пластике, так и на желатине, адсорбированном на пластике, но не влияли на скорость прикрепления клеток к адсорбированному на пластике поли-L-лизину. Пептид GER больше стимулировал клеточную адгезию на необработанном пластике. Пептид FGER увеличивал скорость прикрепления клеток к желатину в более широком диапазоне концентраций по сравнению с таковой на необработанном пластике. Отмечена вариативность процесса распластывания клеток на разных субстратах под влиянием исследованных пептидов. На необработанном пластике оба пептида практически в равной степени стимулировали распластывание клеток. На желатине пептид FGER сохранял способность стимулировать распластывание клеток, а пептид GER частично ингибировал распластывание по сравнению с таковым на необработанном пластике. Установлено, что включение дополнительного N-концевого гидрофобного аминокислотного остатка Phe к трипептидному фрагменту GER изменяет регуляторную активность пептида на модели клеточной адгезии в зависимости от стадии взаимодействия клеток с субстратом и (или) от свойств поверхности прикрепления. Обсуждается структурно-функциональная активность исследованных пептидов в отношении различных структурных компонентов адгезионных структур.

Ключевые слова: родственные короткие пептиды, адгезия, распластывание, клетки CHO-K1

DOI: 10.31857/S0041377123010054, **EDN:** GOYZIE

Клеточная адгезия — динамический процесс, определяющий не только связь клеток с внеклеточным матриксом (ВКМ), но и вовлечение молекул адгезии в процессы межклеточной сигнализации (Bergier, Yamada, 2007). На разных стадиях формирования адгезионных структур изменяется состав этих образований. Неизменным остается наличие в клеточно-матриксных адгезиях интегриновых рецепторов, которые обеспечивают связывание ВКМ с цитоскелетом клетки.

Интегрины представляют собой гетеродимерные трансмембранные рецепторы, состоящие из α - и β -субъединиц (Barczyk et al., 2010; Pan et al., 2016). К настоящему времени известно 24 вида интегриновых рецепторов. Гетерогенность интегриновых рецепторов определяет вариативность адгезивного ответа у клеток при прочих равных условиях. Молекула интегринов состоит из внеклеточного домена, осуществляющего связывание с лигандом, трансмембранного домена, определяющего разделение α - и β -трансмембранных участков рецептора в плоско-

сти мембраны, и короткого цитоплазматического домена, регулирующего связывание рецептора с белками цитоскелета и сигнальными системами (Luo et al., 2004; Morse et al., 2014). Активность интегринов регулируется двояким образом: во-первых, за счет связывания лиганда (белков ВКМ) с рецептором, которое приводит к активации посредством конформационных изменений в эктодомене (outside-in signaling); во-вторых, за счет ассоциации внутриклеточных адаптерных белков цитоскелета с цитоплазматическим доменом рецептора, которая завершается усилением аффинности интегринового рецептора (inside-out signaling) (Li et al., 2016; Иванова, 2021).

Правильное функционирование рецепторов необходимо для адекватного реагирования клетки на действие внешних факторов. Как известно, в основе многих биологических процессов, осуществляемых белками, лежит специфическое взаимодействие между белками и лигандами в функционально значимых зонах. Белок-белковые взаимодействия опосредуются специфическими местами связывания (Reichmann et al., 2007). Как правило, к ним относятся определенные пептидные сегменты, определяю-

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс; FGER — пептид Phe-Gly-Glu-Arg; GER — пептид Gly-Glu-Arg.

щие селективность взаимодействия. Ключевую роль в межбелковых контактах играют линейные пептидные структуры, способные связываться как со структурированными доменами, так и с неструктурированными участками белков (Petsalaki, Russell, 2008; Tompa et al., 2009). Чаще всего сайты связывания белков включают в свой состав крупные аминокислотные остатки (Tyr, Arg и Trp) (Reichmann et al., 2007; London et al., 2013).

Взросший интерес к поиску пептидных препаратов, способных имитировать сайты связывания (или другие функциональные центры белков) связан с реальной возможностью регуляции функций белков посредством направленного изменения межбелкового интерфейса с помощью синтетических пептидов (Eichler, 2008; London et al., 2013; Apostolopoulos et al., 2021). Не менее важна регуляторная роль пептидных молекул, не имеющих структурного сходства с межбелковыми сайтами связывания, в модуляции эффективности межбелковых контактов.

Регуляторные пептиды относятся к группе полифункциональных соединений (Ашмарин, Каразеева, 1996; Замятнин, 2004), т.е. обладают широким спектром физиологической активности и могут воздействовать на разные мишени. Связано это, прежде всего, с относительной простотой строения коротких пептидных соединений, содержащих от 2 до 8 аминокислотных остатков. Ввиду малой длины последовательности пептиды не образуют полноценной вторичной структуры. Возможно наличие определенных изгибов в аминокислотной цепи (β -изгибы или неполные спиралевидные обороты), влияющих на пространственную структуру пептида, чаще всего приводящую к флуктуации пространственной ориентации боковых радикалов аминокислотных остатков, входящих в состав пептида (Костецкий, Артемьев, 2000). Если в состав пептида не входят остатки Cys, способные образовывать дисульфидные связи, то пептид, в этом случае, не содержит внутримолекулярного пространственного стабилизатора. Большая часть биологически активных пептидов характеризуется подвижной конформацией, изменяющейся в зависимости от условий микроокружения, в первую очередь от величины pH среды. Пространственная подвижность регуляторных пептидов, с одной стороны, обуславливает их полифункциональность, с другой — создает трудности при отборе пептидов, регуляторное действие которых должно ограничиваться только одной клеточной мишенью.

Цель представленной работы заключалась в изучении вариативности воздействия коротких пептидов с общим структурным ядром GER (Gly-Glu-Arg) и FGER (Phe-Gly-Glu-Arg) на адгезию эпителиоподобных клеток в зависимости от стадии клеточного адгезивного ответа и использованных полимерных носителей с различными характеристиками в качестве поверхности прикрепления.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. В работе использовали эпителиоподобную линию клеток CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary cells, клетки яичника китайского хомячка), полученную из “Коллекции культур клеток позвоночных” (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

Для проведения экспериментов клетки культивировали в среде ДЕМЕМ/F12, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 50 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Gibco, США) в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Клетки, достигшие монослоя, промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS; Sigma, США) и суспендировали в питательной среде.

Оценка адгезии клеток. Влияние пептидов GER и FGER, синтезированных на кафедре химии природных соединений СПбГУ, на адгезию клеток линии CHO-K1 оценивали по описанному ранее методу (Yakuwa et al., 1989). Клетки инкубировали с пептидами или без пептидов (контроль). Пептиды вносили в клеточную суспензию в полной питательной среде в концентрациях от 10⁻¹⁰ до 10⁻⁵ М перед экспериментом. Клеточную суспензию (10⁶ кл./мл) переносили в 96-луночные планшеты (Corning, США), предварительно обработанные или нет раствором желатина (здесь и далее: 20 мкг/мл в PBS, 18 ч при 4°C,) или поли-L-лизина (0.01%). Клетки выдерживали 1 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Прикрепившиеся клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым (0.3% в метаноле). Связанный краситель экстрагировали этанолом. Оптическую плотность полученного экстракта измеряли на анализаторе “Униплан” (Пикон, Россия) при длине волны 570 нм. По величине оптической плотности судили об изменении количества прикрепившихся клеток. Результаты выражали в % от контроля.

Оценка распластывания. Изучали процесс распластывания клеток на чашках Петри (Corning, США), покрытых или нет раствором желатина (см. выше), в которые вносили клетки (2 × 10⁵ кл./мл) в питательной среде, содержащей 0.2% сыворотки. Пептиды в концентрации от 10⁻¹⁰ до 10⁻⁵ М вносили в клеточную суспензию перед посевом клеток на чашки Петри. Клетки выдерживали 45 мин при 37°C в CO₂-инкубаторе. Подсчет клеток после их фиксации проводили под микроскопом Axiovert 40C (Carl Zeiss, Германия), используя объектив 20×. Распластанной считали клетку с выраженными отростками, нераспластанной — клетку округлой формы. Учитывали количество распластных клеток (%) при подсчете не менее 200 клеток в каждом варианте.

Статистическая обработка результатов. Результаты представлены в виде средних значений и их ошибок. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента для сравнения контрольных и экспериментальных групп.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе исследовали влияние коротких пептидов: трипептида GER и тетрапептида FGER, отличающегося от трипептида наличием дополнительного аминокислотного остатка Phe на N-конце молекулы, на адгезивную способность эпителиоподобных клеток CHO-K1. Оценивали клеточный ответ под действием пептидов на разных субстратах клеток: культуральном пластике и на пластике, покрытом поли-L-лизинном (синтетическим поликатионом) или желатином (природным биodeградируемым полимером). Последний является продуктом денатурации коллагена I типа, одного из основных компонентов ВКМ, определяющих взаимодействие резидентных клеток.

Установлено, что пептид GER при всех использованных концентрациях увеличивал число прикрепившихся клеток к необработанному пластику, при этом максимальный эффект наблюдали при концентрациях 10^{-10} – 10^{-8} М ($P < 0.05$ или $P < 0.01$) (рис. 1а). Менее выраженный эффект отмечали при культивировании клеток с пептидом GER в дозах 10^{-7} – 10^{-5} М ($P < 0.01$ или $P < 0.05$).

Пептид FGER по сравнению с трипептидом GER стимулировал процесс прикрепления изученных клеток на необработанном пластике менее эффективно (рис. 1б). Культивирование клеток с пептидом FGER приводило к увеличению числа прикрепившихся клеток при концентрациях 10^{-10} – 10^{-9} М ($P < 0.01$) и 10^{-7} – 10^{-6} М ($P < 0.05$ или $P < 0.01$). Необходимо отметить, что усиление клеточной адгезии на культуральном пластике под действием пептида FGER в диапазоне концентраций от 10^{-9} до 10^{-5} М сохранялось приблизительно на одном уровне.

Хорошо известно, что изменение физико-химических параметров субстрата влияет на степень клеточной адгезии (Maheshwari et al., 2000; Yeung et al., 2005; Wells, 2008). Адсорбция поли-L-лизина или желатина на культуральном пластике по-разному влияла на способность клеток, обработанных исследованными пептидами, прикрепляться к твердой поверхности (рис. 1). Пептиды GER и FGER, внесенные в питательную среду, не влияли на адгезию эпителиоподобных клеток к синтетическому поликатиону поли-L-лизину.

Оба изученных пептида увеличивали количество прикрепившихся клеток к желатину в широком диапазоне концентраций (кроме концентрации 10^{-5} М) по сравнению с контрольными клетками, не обработанными пептидами (рис. 1). При этом по абсолютным значениям пептид GER стимулировал клеточную адгезию на желатине больше, чем пептид FGER (за исключением концентрации 10^{-7} М) по сравнению с контрольными клетками.

Показано, что пептид GER в дозах от 10^{-10} до 10^{-8} М ($P < 0.01$ или $P < 0.001$) стимулировал клеточную адгезию на желатине практически так же (по величине), как и на необработанном пластике, а в дозах 10^{-7} и 10^{-6} М ($P < 0.01$ или $P < 0.001$) незначительно усиливал адгезию на желатине по сравнению с необработанным пластиком (рис. 1а). Количество прикрепившихся клеток на желатине под действием пептида FGER увеличивалось по сравнению с таковым на необработанном пластике. При этом пептид стимулировал клеточную адгезию на желатине в концентрации от 10^{-10} до 10^{-6} М ($P < 0.01$ или $P < 0.001$) (рис. 1б).

Для интерпретации полученных данных введено понятие прироста прикрепленных (распластанных) клеток на определенном субстрате относительно соответствующих контрольных значений (использовали средние значения). Отношение прироста прикрепленных (распластанных) клеток на желатине к аналогичному показателю на необработанном пластике позволяет более четко оценить степень влияния типа субстрата на изменение числа прикрепленных (распластанных) клеток под воздействием пептидов.

Сравнивая значения прироста обработанных пептидами прикрепившихся клеток к желатину и к необработанному пластику, обнаружили следующее. Максимальное усиление адгезии клеток к желатину под влиянием пептида GER отмечали при концентрациях 10^{-7} (в 2.03 раза) и 10^{-6} М (в 1.41 раза) по сравнению с таковым на необработанном пластике. При обработке клеток пептидом FGER максимальное увеличение количества прикрепленных клеток к желатину обнаружено при концентрациях пептида 10^{-9} (в 1.83 раза), 10^{-7} (в 1.94 раза) и 10^{-6} М (в 1.76 раза). Это означает, что на желатине пептид GER наиболее эффективно действовал в дозах 10^{-7} и 10^{-6} М, а пептид FGER – в дозах 10^{-9} , 10^{-7} и 10^{-6} М в сравнении с необработанным пластиком.

Из данных, представленных на рис. 2, видно, что пептиды GER и FGER участвуют в регуляции процессов расплывания эпителиоподобных клеток линии CHO-K1. Оба исследованных пептида стимулировали расплывание клеток на необработанном пластике во всем диапазоне исследованных концентраций. Не обнаружено зависимости доза–эффект для обоих пептидов, данные об увеличении числа распластанных клеток на необработанном пластике колебались в пределах близких значений для каждого из исследованных пептидов. Вместе с тем, наибольшее увеличение количества клеток, распластанных на пластике, выявлено под действием пептида GER в дозах 10^{-9} (в 1.29 раза), 10^{-7} (в 1.35 раза) и 10^{-5} М (в 1.29 раза), а под действием пептида FGER – при концентрациях 10^{-8} и 10^{-7} М (в 1.31 раза) по сравнению с контрольными клетками.

Процесс расплывания клеток CHO-K1 на пластике, покрытом желатином, после обработки клеток пептидом GER отличался от такового после культивирования клеток с пептидом FGER (рис. 2а, б). Пептид GER практически не влиял на процессы

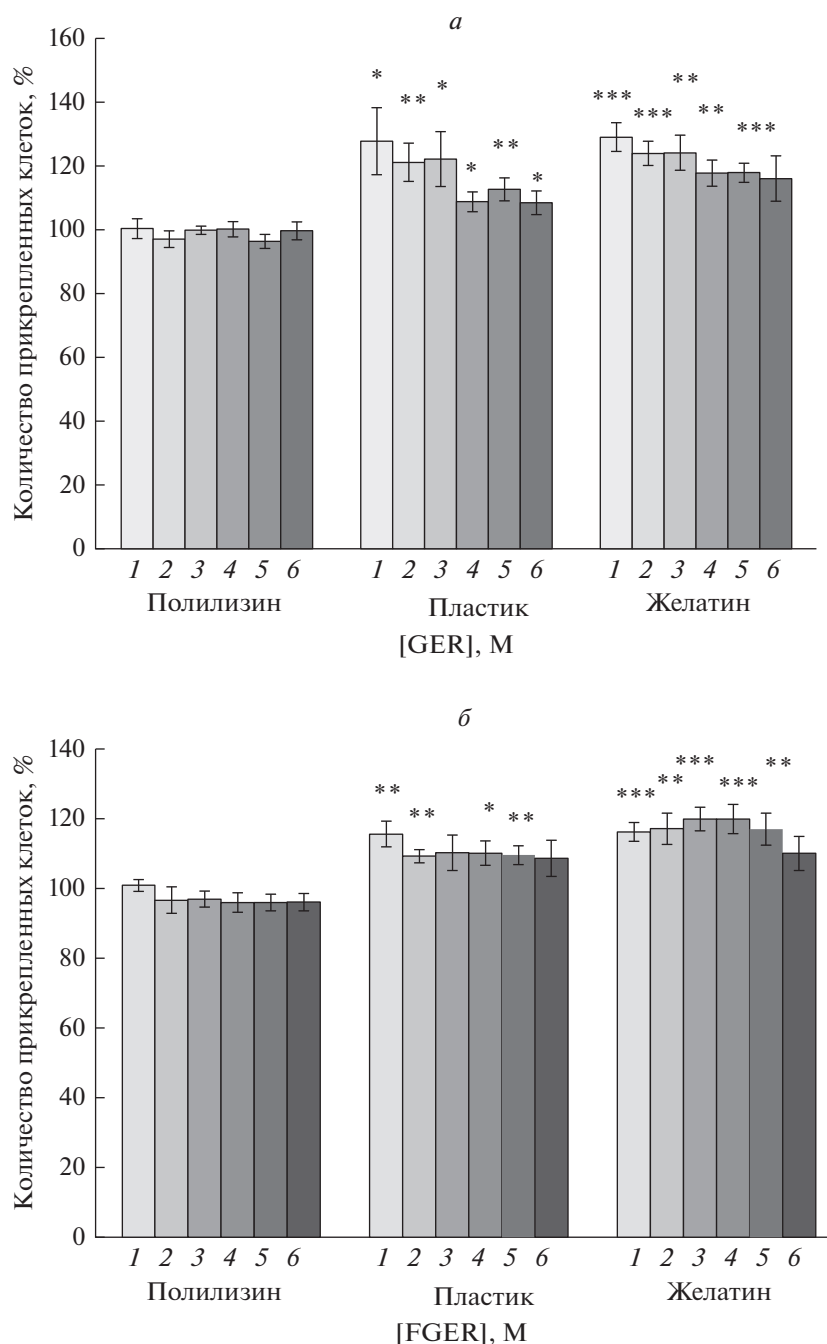


Рис. 1. Влияние пептидов GER (а) и FGER (б) на адгезию клеток CHO-K1 на необработанном пластике и на пластике, покрытом поли-L-лизинном или желатином. Концентрация пептидов (М): 10^{-10} (1), 10^{-9} (2), 10^{-8} (3), 10^{-7} (4), 10^{-6} (5), 10^{-5} (6). Представлены данные в % от контроля (клеток, не обработанных пептидами). Пептиды вносили в питательную среду с 10% сыворотки перед началом эксперимента. Через 1 ч культивирования при 37°C прикрепившиеся клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым. По величине оптической плотности экстрагированного красителя судили об изменении числа прикрепившихся клеток. Достоверность отличий от контроля показана одной ($P < 0.05$), двумя ($P < 0.01$) или тремя ($P < 0.001$) звездочками (по *t*-критерию Стьюдента). В каждом варианте сделано от 5 до 7 независимых измерений.

клеточного распластывания на желатине при концентрациях 10^{-10} – 10^{-8} М и только при концентрации 10^{-7} ($P < 0.01$) и 10^{-6} М ($P < 0.05$) увеличивал количество распластных клеток по сравнению с контрольными клетками. Пептид FGER во всем

диапазоне использованных концентраций увеличивал число распластных клеток на желатине ($P < 0.01$ или $P < 0.001$) по сравнению с контролем.

Интересно отметить, что прирост распластных клеток на желатине под действием пептида FGER су-

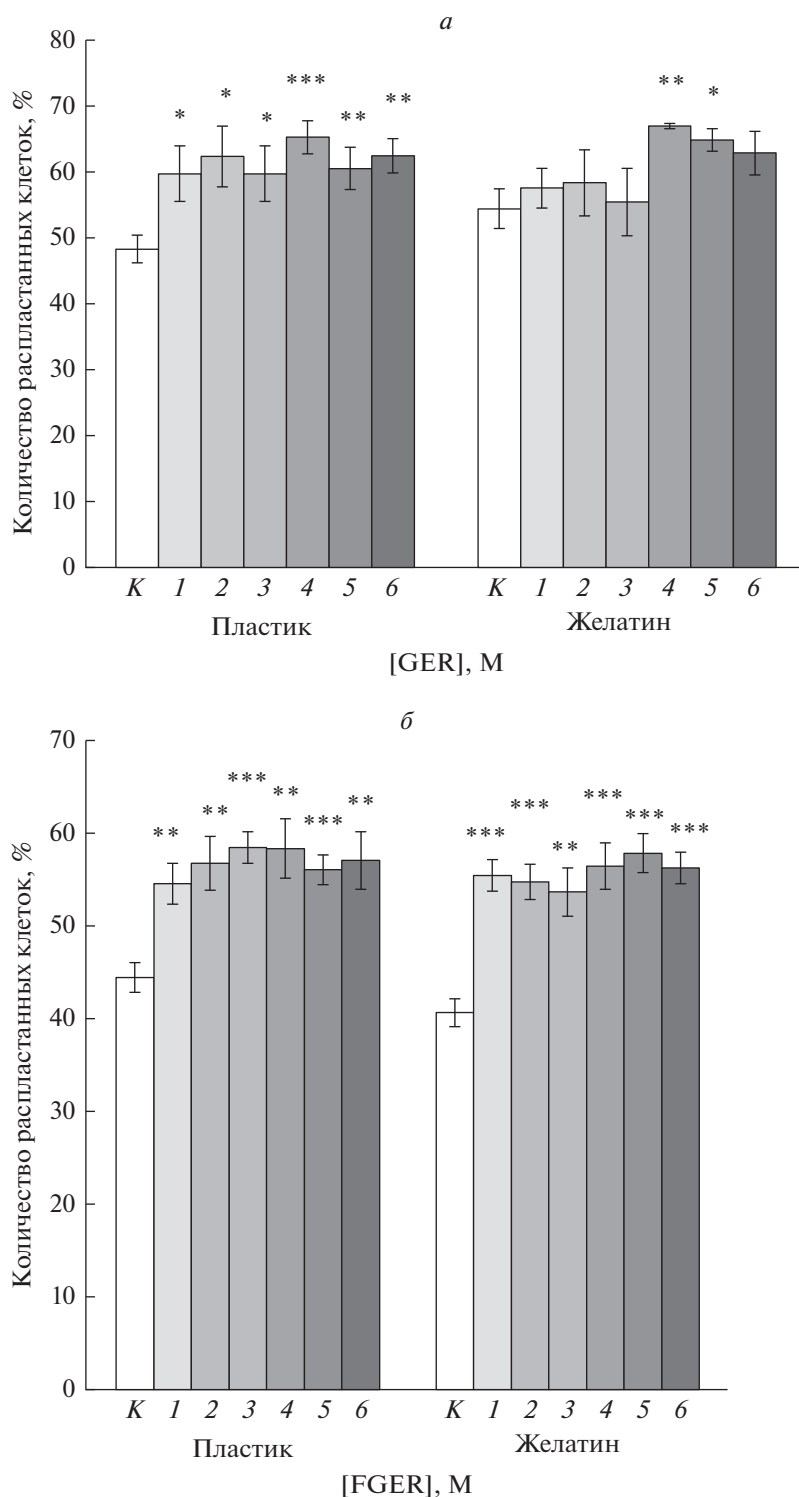


Рис. 2. Влияние пептидов GER (*a*) и FGER (*б*) на распластывание клеток CHO-K1 на необработанном пластике или на пластике, покрытом желатином. Концентрация пептидов (М): 10^{-10} (1), 10^{-9} (2), 10^{-8} (3), 10^{-7} (4), 10^{-6} (5), 10^{-5} (6). Контроль (К) – клетки, не обработанные пептидами. Данные представлены в % (см. Материал и методика).

Пептиды вносили в питательную среду с 0.2% сыворотки перед началом эксперимента. Подсчет распластавшихся клеток проводили через 45 мин культивирования при 37°C. Достоверность отличий от контроля показана одной ($P < 0.05$), двумя ($P < 0.01$) или тремя ($P < 0.001$) звездочками (по *t*-критерию Стьюдента). В каждом варианте сделано от 4 до 6 независимых измерений.

щественно возрастает в дозах 10^{-10} (в 1.46 раза), 10^{-6} (в 1.48 раза) и 10^{-5} М (в 1.23 раза) по сравнению с аналогичными значениями на необработанном пластике (рис. 2б). В то же время пептид GER уменьшал прирост распластанных клеток на желатине в концентрациях 10^{-7} (в 1.35 раза) и 10^{-6} М (в 1.17 раза) по сравнению с приростом распластанных клеток на необработанном пластике после внесения пептида в культуральную среду (рис. 2а).

В результате проведенного анализа показано, что изученные пептиды GER и FGER стимулировали клеточную адгезию как на необработанном пластике, так и на желатине, адсорбированном на пластике. На желатине отчетливой зависимости между увеличением количества прикрепленных клеток и использованной концентрацией пептидов при их добавлении в клеточную суспензию не выявлено. Установлено, что степень влияния пептидов GER и FGER на распластывание клеток существенно зависела от свойств субстрата. Так, на культуральном пластике пептиды GER и FGER стимулировали распластывание клеток, в то же время на желатине пептид FGER сохранял свою активность, а пептид GER частично ее утрачивал.

ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточная адгезия является многофакторным процессом, в котором ключевую роль играют трансмембранные интегриновые рецепторы, обеспечивая взаимосвязь между внеклеточными лигандами (компонентами ВКМ) и цитоскелетом клетки (Humphries et al., 2004; Harburger, Calderwood, 2009; Barczyk et al., 2010; Byron, Frame, 2016). Свойства субстрата оказывают непосредственное влияние на поведение культивируемых клеток, изменяя их рост, дифференцировку и метаболизм (Yamada et al., 2003; Dubin-Thaler et al., 2004; Zemljic et al., 2007; Kim et al., 2011).

Полученные нами данные о регуляции пептидами GER и FGER адгезивной способности эпителиоподобных клеток линии CHO-K1 на стадии прикрепления и распластывания клеток свидетельствуют о вовлечении в этот процесс молекул адгезии интегринов. Косвенным подтверждением этого положения являются данные об отсутствии влияния исследованных пептидов на адгезию клеток к поли-L-лизину. Возможно, это связано с неспецифическим характером образующихся электростатических связей между повторяющимися NH_2 -группами поликатиона и фосфатными группами фосфолипидных молекул клеточных мембран в процессе прикрепления клеток к положительно заряженному поли-L-лизину (Cuvelier et al., 2007; Reuter et al., 2009).

Установлено, что пептиды GER и FGER увеличивали клеточную адгезию как на культуральном пластике, так и на пластике, покрытом природным полимером желатином. Вместе с тем скорость прикрепления клеток на желатине существенно возрастала после

воздействия исследованными пептидами. При этом пептид GER в большей степени стимулировал процессы клеточной адгезии на желатине в концентрации 10^{-7} М, а пептид FGER – в концентрации 10^{-9} и 10^{-7} М, если сравнивать с клеточной адгезией на необработанном пластике.

Степень влияния пептидов GER и FGER на распластывание клеток существенно зависела от свойств субстрата. Если на необработанном пластике оба пептида практически в равной степени стимулировали распластывание клеток, то на желатине только пептид FGER сохранил эффект стимулирования процессов распластывания, а пептид GER частично ингибировал распластывание клеток по сравнению с таковым на необработанном пластике.

Известно, что скорость прикрепления клеток к субстрату зависит от продолжительности первичных контактов клеток с адгезивной поверхностью. Можно предположить, что на необработанной пластиковой поверхности продолжительность первичных контактов клеток после их обработки пептидами значительно больше, чем на желатине. Это обуславливает большую начальную скорость прикрепления обработанных пептидами клеток на желатине. Второй возможной причиной относительного уменьшения скорости прикрепления клеток на пластике после действия пептидов может быть увеличение у клеток периода адаптации к условиям микроокружения, что может быть связано, главным образом, с синтезом молекул ВКМ (например, фибронектина для эпителиальных клеток) (Filenius et al., 2003; Xu, Mosher, 2011) и экспрессией интегриновых рецепторов (более шести, самый распространенный интегрин – $\alpha_5\beta_1$), для которых лигандом является фибронектин (Takada et al., 2007; Xu, Mosher, 2011; Иванова, 2017). Клетки, посеянные на желатин, экспрессируют интегрины $\alpha_5\beta_1$ и $\alpha_v\beta_3$, связывающиеся с желатином в качестве лиганда (Plow 2000; Heino, 2007).

Пептиды GER и FGER могут по-разному влиять на активность интегринов. Например, пептиды могут взаимодействовать аллостерически с разными участками рецепторной молекулы, приводя к различным конформационным перестройкам рецептора. В результате этих процессов может изменяться степень рецепторного взаимодействия с лигандами, замедляя или ускоряя лиганд-рецепторное связывание (Cavalcanti-Adam et al., 2007). Доля лиганд-связанных рецепторов, в свою очередь, может определять степень кластеризации интегринов (Hantgan et al., 2003; Selhuber-Unkel et al., 2008). Это означает, что чем больше количество лиганд-связанных интегринов имеется в клеточной мембране, тем крупнее формирующиеся кластеры рецепторов, и наоборот.

На стадии формирования первичных адгезионных структур во время прикрепления клеток к субстрату, по-видимому, размеры формирующихся рецепторных кластеров (Maheshwari et al., 2000) не оказывают определяющего влияния на клеточный

ответ. Общее количество клеточных контактов с субстратом возрастает независимо от размеров первичных адгезионных комплексов, основой которых являются кластеры интегринов. Это означает, что на первом этапе прикрепления клеток к субстрату пептиды GER и FGER приблизительно в равной степени влияют на клеточный ответ.

При переходе клетки к распластыванию размеры формирующихся адгезионных структур определяют процесс их созревания. Часть мелких адгезионных комплексов распадается, другие укрупняются и рекрутируют дополнительные белки с различными свойствами. Можно предположить, что пептид GER при высеве клеток на желатин ограничивает либо процесс кластеризации интегринов, либо частично ингибирует процессы перехода более мелких по размеру адгезионных структур в более крупные образования. Именно с этими процессами может быть связано относительное ингибирование клеточного распластывания на желатине после обработки клеток пептидом GER.

Пептид FGER, аллостерически взаимодействуя с определенными короткими сайтами рецептора, не только не ограничивал процессы лигирования рецепторов, но, напротив, ускорял их, вероятно, за счет увеличения скорости диффузии рецепторов в плоскости клеточной мембраны (Lepzelter, Zaman, 2010). В конечном итоге, пептид FGER увеличивал скорость укрупнения кластеров интегринов, а значит и адгезионных структур при высеве клеток на желатин.

Приблизительно равный эффект стимулирования распластывания клеток на культуральном пластике у исследованных пептидов (рис. 2) может быть связан не только с сохранением числа адгезионных контактов клетки с субстратом, сформированных на этапе прикрепления клеток, но и с возможным сходным влиянием пептидов на силу связывания адгезионных структур с субстратом (Wolfenson et al., 2014).

Кроме того, пептиды GER и FGER могут влиять на активность интегриновых рецепторов опосредованно через регуляцию функций других белков, вовлеченных в структурирование адгезионных структур (Flier, Sonnenberg, 2001; Morse et al., 2014), что приведет к реорганизации цитоскелета, которая в свою очередь обеспечит деформацию клеточной мембраны, т.е. позволит клетке распластываться на субстрате. Например, пептиды GER и FGER могут по-разному регулировать у клеток процесс рекрутирования талина, одного из адаптерных белков, в интегриновые кластеры в зависимости от использованного субстрата.

Связывание головного домена талина с NPXY-фрагментом цитоплазматического домена β -субъединицы интегринов осуществляется на начальных стадиях формирования адгезионных структур и формирует первичную адгезионную платформу для вовлечения дополнительных актин-связывающих бел-

ков, таких как винкулин и др. (Ziegler et al., 2008; Moser et al., 2009; Critchley, 2009; Иванова, 2021), основное значение которых заключается в формировании дополнительных связей с F-актином цитоскелета. Можно предположить, что влияние пептидов GER и FGER может варьировать на стадии вовлечения в формирующиеся адгезионные структуры актин-связывающих белков в зависимости от субстрата. Так, пептид FGER, аллостерически взаимодействуя с интегринами, может ускорять связывание талина с β -субъединицей рецептора, которое в свою очередь ускорит связывание талина с молекулами винкулина. В конечном итоге, это приведет к увеличению количества связей между адаптерными белками и F-актином, а значит и ускорению ассоциации интегринов с актиновыми филаментами. В этом случае условия для клеточного распластывания на желатине под воздействием пептида FGER будут оптимальными.

Возможно, изменение пространственной структуры рецепторов под влиянием пептида GER при высеве клеток на желатин приводило к ограничению числа молекул талина, связавшихся с β -субъединицей интегринов, может быть, в результате маскировки фрагмента NPXY у части популяции рецепторов. Соответственно, уменьшение количества молекул талина, связавшихся с рецепторами, обусловит сокращение рекрутированных в адгезионные структуры молекул винкулина, что, безусловно, замедлит ассоциацию интегринов с цитоскелетом. Как результат, распластывание клеток, обработанных пептидом GER, на желатине будет замедляться.

Активность пептидов определяется их структурой. Как уже упоминалось, исследованные трипептид GER и тетрапептид FGER содержат общий трипептидный фрагмент. Оба пептида в качестве C-концевой аминокислоты содержат одинаковый остаток (Arg). В качестве N-концевого аминокислотного остатка трипептид содержит неполярный остаток Gly без бокового радикала, а тетрапептид — неполярный остаток Phe, содержащий в боковом радикале бензольное кольцо (Шульц, Ширмер, 1982; Кантор, Шиммель, 1984).

Известно, что все элементы пептидной связи (CO—NH) располагаются в одной плоскости и препятствуют вращению вокруг нее пептидной цепи. Осевое вращение остова пептидной цепи возможно вокруг связи, которая соединяет α -углеродный атом и карбонильный углерод пептидной связи во втором с N-конца аминокислотном звене, или связи, которая соединяет α -углеродный атом и NH-группу пептидной связи в 3-ем с N-конца аминокислотном остатке. Такой поворот изменяет направление хода пептидной цепи, т.е. по месту осевого поворота происходит изгиб основной цепи в пространстве (Кантор, Шиммель, 1984; Щербак, 2005).

Концевые аминокислотные остатки пептидов не участвуют в осевом вращении остова пептидной цепи. В случае пептида FGER более вероятно осевое

вращение вокруг связи между α -углеродным атомом и карбонилем пептидной связи остатка Gly и менее вероятно осевое вращение между α -углеродным атомом и карбонилем пептидной связи остатка Glu ввиду стерических ограничений из-за больших размеров боковых радикалов у остатков Glu и Arg у тетрапептида. Можно предположить, что пептид FGER в среде инкубации может находиться в изогнутой в результате осевого вращения форме, а также в виде биологически активных конформеров с характерными перегибами пептидной цепи без изменения оси вращения по пептидным связям. Что касается пептида GER, то ввиду очень короткой пептидной цепи осевой поворот пептидной цепи по месту расположения остатка Glu мало вероятен. Однако сохраняется возможность перегибов пептидной цепи без изменения оси вращения вокруг пептидных связей.

Выявленные различия в действии пептидов GER и FGER на адгезивный ответ клеток, по-видимому, обусловлены их структурными различиями. Тетрапептид, контактируя с определенным участком рецептора, может фиксировать свой N-конец с помощью гидрофобного радикала остатка Phe с любым гидрофобным аминокислотным остатком рецептора, одновременно C-концевая аминокислота пептида Arg может взаимодействовать электростатически через положительно заряженную гуанидиновую группу с боковыми радикалами отрицательно заряженных аминокислотных остатков (Glu или Asp), локализованных в интегринах рецептора. Кроме того, отрицательно заряженный остаток Glu в пептиде может также связываться электростатически с положительно заряженными аминокислотными остатками рецептора.

В отличие от тетрапептида, пептид GER на N-конце содержит остаток Gly, который из-за отсутствия бокового радикала характеризуется высокой подвижностью в плоскости основной пептидной цепи, что может уменьшать скорость фиксации остатка Gly у пептида с рецептором. Ориентация боковых радикалов у аминокислотных остатков (Glu и Arg) определяет взаимодействие этого пептида с каким-либо участком интегрина.

Кроме вклада в связывающую активность исследованных пептидов боковых радикалов аминокислотных остатков, входящих в состав этих пептидов, не менее важна способность пептидов изменять свою пространственную конфигурацию. Как уже упоминалось, тетрапептид FGER, в отличие от пептида GER, может формировать более разнообразный спектр конформеров с изогнутой конформацией, обеспечивая тем самым большую вариативность взаимодействия пептида с рецептором в зависимости от условий микроокружения. Это создает условия для проявления большей активности пептида FGER по сравнению с пептидом GER на модели адгезивного ответа клеток линии CHO-K1.

При взаимодействии пептидов с молекулами рецепторов возможны два варианта ориентации пептидов относительно аминокислотной последовательности интегрина — параллельная или антипараллельная. В обоих случаях ввиду конформационной изменчивости пептидов возможно взаимодействие как пары заряженных аминокислотных остатков, так и одного из двух указанных остатков (или Arg, или Glu) у исследованных пептидов с противоположно заряженными остатками аминокислот, локализованных в последовательности интегрина. Неполярный остаток Phe у пептида FGER может формировать дополнительно гидрофобную связь с неполярными аминокислотными остатками рецептора. Возможно, пептиды взаимодействуют с участками, расположенными в карманоподобных структурах рецепторов, содержащих кластеры из полярных и гидрофобных аминокислотных остатков. В любом случае такие локальные взаимодействия могут привести к изменению заряда или ориентации боковых радикалов у аминокислотных остатков в рецепторной молекуле, а значит к мозаичным изменениям конформации, которые в зависимости от условий окружения могут маскировать или демаскировать в интегринных эпитопы связывания, тем самым ослаблять или усиливать активность интегриновых рецепторов.

Суммируя вышесказанное, можно заключить, что исследованные в работе пептиды могут участвовать в регуляции межбелковых взаимодействий на разных ступенях адгезивного ответа клеток в зависимости от имеющихся условий окружения. Пептиды могут связываться с одним и тем же или сходным по строению сайтом в молекуле рецептора, вызывая сходный биологический эффект, например, при адгезии и распластывании на необработанном пластике, или с сайтами, расположенными в разных участках рецептора, приводя к разнонаправленному влиянию на адгезивный ответ, например, при распластывании клеток на желатине. Не исключено также, что пептиды могут взаимодействовать с несколькими участками рецептора одновременно, обуславливая суммарное усиление или ослабление адгезивного ответа клеток.

В период пост-пептидного связывания с определенными участками рецептора (или других компонентов адгезии) могут происходить краткосрочные или долговременные изменения структурной ориентации рецепторов, вызванные локальными диссоциациями во вторичной или третичной структурах рецептора, обусловленные образованием электростатических и (или) гидрофобных связей с регуляторными пептидами. Т.е. можно говорить о существовании механизма регуляции межбелковых взаимодействий, включая лиганд-рецепторные связи, через изменение пространственной структуры участников взаимодействия с помощью коротких регуляторных пептидов. В этом случае регуляторные пептиды (в том числе GER и FGER) можно отнести к группе низкомолекулярных аллостерических мо-

дуляторов, способных при определенных внешних условиях изменять межбелковый интерфейс связывающихся белков.

Регуляторные пептиды с подобными функциональными характеристиками являются перспективными для использования в терапии заболеваний, связанных с патологией межбелковых контактов, таких как вирусные и бактериальные инфекции, а также аутоиммунные и онкологические заболевания.

БЛАГОДАРНОСТИ

Клетки СНО-К1 получены из “Коллекции культур клеток позвоночных” (в ЦКП Института цитологии РАН, Санкт-Петербург), поддержанной Министерством науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-683).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН № 075-01052-22-00.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не было экспериментов с участием животных или людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ашмарин И.П., Каразеева Е.П. 1996. Нейропептиды. В кн.: Нейрохимия. М.: Институт биомед. химии РАМН. С. 296. (Ashmarin I.P., Karazeeva E.P. 1996. Neuropeptides. In: Neurochemistry. Moscow: IBCH RAMS. P. 296.)
- Замятнин А.А. 2004. Биохимические проблемы олигопептидной регуляции. Биохимия. Т. 69. № 11. С. 1565. (Zamyatnin A.A. 2004. Biochemical problems of regulation by oligopeptides. Biochemistry (Moscow). V. 69. P. 1276.)
- Иванова В.П. 2017. Фибронектины: структурно-функциональные связи. Журн. эвол. биохим. физиол. Т. 53. № 6. С. 398. (Ivanova V.P. 2017. Fibronectins: structural-functional relationships. J. Evol. Biochem. Physiol. (Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii). V. 53. P. 450.)
- Иванова В.П. 2021. Талин: структурно-функциональные связи. Цитология. Т. 63. № 1. С. 3. (Ivanova V.P. 2021. Talin: structural and functional relationships. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 15. P. 416.)
- Кантор Ч., Шиммель П. 1984. Биофизическая химия. М.: Мир. Т. 1. 336 с. (Cantor C., Schimmel P. 1980. Biophysical Chemistry. San Francisco: W.H. Freeman and Co. Part 1. 367 p.)
- Костецкий П.В., Артемьев И.В. 2000. Конформационный анализ RGD-содержащего антиадгезивного пептида цикло(ArgGlyAspPhe-D-Val). Биохимия. Т. 65. № 9. С. 1231. (Kostetsky P.V., Artemjev I.V. 2000. Conformational analysis of the biologically active RGD-containing anti-adhesive peptide cyclo(ArgGlyAspPhe-D-Val). Biochemistry (Moscow) (Biokhimiya). V. 65. P. 1041.)
- Шульц Г., Ширмер Р. 1982. Принципы структурной организации белков. М.: Мир. 360 с. (Schulz G., Schirmer R. 1979. Principles of protein structure. N.Y.-Heidelberg-Berlin: Springer-Verlag. 332 p.)
- Щербак И.Г. 2005. Биологическая химия. СПб: СПбГМУ. 480 с. (Scherbak I.G. 2005. Biological chemistry. St. Petersburg: SPbSMU. 480 p.)
- Apostolopoulos V., Bojarska J., Chai T.T., Elnagdy S., Kaczmarek K., Matsoukas J., New R., Parang K., Lopez O.P., Parhiz H., Perera C.O., Pickholz M., Remko M. 2021. A global review on short peptides: frontiers and perspectives. Molecules. V. 26. P. 430. <https://doi.org/10.3390/molecules.26020430>
- Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D. 2010. Integrins. Cell Tiss. Res. V. 339. P. 269.
- Berrier A.L., Yamada K.M. 2007. Cell-matrix adhesion. J. Cell Physiol. V. 213. P. 565.
- Byron A., Frame M.C. 2016. Adhesion protein networks reveal functions proximal and distal to cell-matrix contacts. Curr. Opin. Cell. Biol. V. 39. P. 93.
- Cavalcanti-Adam E.A., Volberg T., Micoulet A., Kessler H., Geiger B., Spatz J.P. 2007. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. Biophys. J. V. 92. P. 2964.
- Critchley D.R. 2009. Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. Annu. Rev. Biophys. V. 38. P. 235.
- Cuvelier D., Thery M., Chu Y.S., Dufour S., Thiery J.P., Bornens M., Nassoy P., Mahadevan L. 2007. The universal dynamics of cell spreading. Curr. Biol. V. 17. P. 694.
- Dubin-Thaler B.J., Giannone G., Döbereiner H.G., Sheetz M.P. 2004. Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. Biophys. J. V. 86. P. 1794.
- Eichler J. 2008. Peptides as protein binding site mimetics. Curr. Opin. Chem. Biol. V. 12. P. 707.
- Filenius S., Tervo T., Virtanen I. 2003. Production of fibronectin and tenascin isoforms and their role in the adhesion of human immortalized corneal epithelial cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. V. 44. P. 3317.
- Flier van der A., Sonnenberg A. 2001. Function and interactions of integrins. Cell Tiss. Res. V. 305. P. 285.
- Hantgan R.R., Lyles D.S., Mallett T.C., Rocco M., Nagaswami C., Weisel J.W. 2003. Ligand binding promotes the entropy-driven oligomerization of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. J. Biol. Chem. V. 278. P. 3417.
- Harburger D.S., Calderwood D.A. 2009. Integrin signalling at a glance. J. Cell Sci. V. 122. P. 159.
- Heino J. 2007. The collagen family members as cell adhesion proteins. BioEssays. V. 29. P. 1001.
- Humphries M.J., Travis M.A., Clark K., Mould A.P. 2004. Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins. Biochem. Soc. Trans. V. 32. P. 822.
- Kim S.H., Turnbull J., Guimond S. 2011. Extracellular matrix and cell signaling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. J. Endocrinol. V. 29. P. 139.
- Lepzelter D., Zaman M.H. 2010. Clustered diffusion of integrins. Biophys. J. V. 99. P. L106.

- Li Z., Lee H., Zhu C. 2016. Molecular mechanisms of mechanotransduction in integrin-mediated cell-matrix adhesion. *Exp. Cell Res.* V. 349. P. 85.
- London N., Raveh B., Schueler-Furman O. 2013. Druggable protein-protein interactions – from hot spots to hot segments. *Curr. Opin. Chem. Biol.* V. 17. P. 952.
- Luo B.H., Springer T.A., Takagi J. 2004. A specific interface between integrin transmembrane helices and affinity for ligand. *PLoS Biol.* V. 2. e153. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020153>
- Maheshwari G., Brown G., Lauffenburger D.A., Wells A., Griffith L.G. 2000. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J. Cell Sci.* V. 113. P. 1677.
- Morse E.M., Brahme N.N., Calderwood D.A. 2014. Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry.* V. 53. P. 810.
- Moser M., Legate K.R., Zent R., Fässler R. 2009. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science.* V. 324. P. 895.
- Pan L., Zhao Y., Yuan Z., Qin G. 2016. Research advances on structure and biological functions of integrins. *Springer Plus.* V. 5. 1094. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2502-0>
- Petsalaki E., Russell R.B. 2008. Peptide-mediated interactions in biological systems: new discoveries and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* V. 19. P. 344.
- Plow E.E., Haas T.A., Zhang L., Loftus J., Smith J.W. 2000. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* V. 275. P. 21785.
- Reichmann D., Rahat O., Cohen M., Neuvirth H., Schreiber G. 2007. The molecular architecture of protein-protein binding sites. *Curr. Opin. Struct. Biol.* V. 17. P. 67.
- Reuter M., Schwieger C., Meister A., Karlsson G., Blume A. 2009. Poly-L-lisines and poly-L-arginines induce leakage of negatively charged phospholipid vesicles and translocate through the lipid bilayer upon electrostatic binding to the membrane. *Biophys. Chem.* V. 144. P. 27.
- Selhuber-Unkel C., Lopez-Garcia M., Kessler H., Spatz J.P. 2008. Cooperativity in adhesion cluster formation during initial cell adhesion. *Biophys. J.* V. 95. P. 5424.
- Takada Y., Ye X., Simon S. 2007. The integrins. *Genome Biol.* V. 8. 215. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-215>
- Tompa P., Fuxreiter M., Oldfield C.J., Simon I., Dunker A.K., Uversky V.N. 2009. Close encounters of the third kind: disordered domains and the interactions of proteins. *Bioessays.* V. 31. P. 328.
- Wells R.G. 2008. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology.* V. 47. P. 1394.
- Wolfenson H., Iskratsch T., Sheetz M.P. 2014. Early events in cell spreading as a model for quantitative analysis of biomechanical events. *Biophys. J.* V. 107. P. 2508.
- Xu J., Mosher D. 2011. Fibronectin and other adhesive glycoproteins. In: *The extracellular matrix: an overview.* Berlin: Springer-Verlag. P. 41.
- Yakuwa N., Inoue T., Watanabe T., Takashi K., Sendo F. 1989. A novel neutrophil adherence test effectively reflects the activated state of neutrophils. *Microbiol. Immunol.* V. 33. P. 834.
- Yamada K.M., Pankov R., Cukierman E. 2003. Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz. J. Med. Biol. Res.* V. 36. P. 959.
- Yeung T., Georges P.C., Flanagan L.A., Marg B., Ortis M., Funaki M., Zahir N., Ming W., Weaver V., Janmey P.A. 2005. Effects of substance stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure and adhesion. *Cell Motil. Cytoskeleton.* V. 60. P. 24.
- Zemljic J.S., Znidarcic T., Svetina S., Batista U. 2007. The effect of substrate and adsorbed proteins on adhesion, growth and shape of CaCo-2 cells. *Cell Biol. Int.* V. 31. P. 1097.
- Ziegler W.H., Gingras A.R., Critchley D.R., Emsley J. 2008. Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin. *Biochem. Soc. Trans.* V. 36. P. 235.

On the Variativity of Cell Adhesive Response under the Action of Related Short Peptides

V. P. Ivanova*

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia

**e-mail: valet@iephb.ru*

Analysis of the participation of short peptides GER and FGER containing common tripeptide fragment in the regulation of adhesive response of CHO-K1 cells was conducted. Both peptides stimulated cell adhesion both to untreated plastic and to gelatin-coated plastic, but did not change cell attachment to poly-L-lysine-coated plastic. Tripeptide GER had larger stimulation effect on cell adhesion to untreated plastic. Peptide FGER increased the rate of cell attachment to gelatin in a wider range of concentrations as compared to adhesion to untreated plastic. Variativity of cell spreading to different substrates under peptide action was demonstrated. On untreated plastic both investigated peptides practically in equal extent stimulated cell spreading. On gelatin peptide FGER kept the stimulation effect on cell spreading, but peptide GER partly inhibited cell spreading as compared to cell spreading on untreated plastic. It was established that insertion of additional N-terminal hydrophobic amino acid residue Phe to tripeptide fragment GER changes the regulatory activity of peptide at the cell adhesion model depending on the stage of cell connection with substrate and/or on substrate properties. The structural-functional activity of investigated short peptides on the instance of different structural components of adhesive structures is discussed.

Keywords: related short peptides, adhesion, spreading, CHO-K1 cells

ДВОЙНОЕ КОВАЛЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ БИЛИВЕРДИНА В БЛИЖНЕ-ИНФРАКРАСНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКАХ ПРЕДОТВРАЩАЕТ ИХ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ ДЕГРАДАЦИЮ

© 2023 г. Ольга В. Степаненко¹ *, Олеся В. Степаненко¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: sov@incras.ru

Поступила в редакцию 24.08.2022 г.

После доработки 22.09.2022 г.

Принята к публикации 23.09.2022 г.

В настоящей работе мы проанализировали как двойное ковалентное связывание лиганда биливердина (BV) в ближне-инфракрасном флуоресцентном белке iRFP670, содержащем два ключевых остатка цистеина, влияет на устойчивость биомаркера к протеолитической деградации. Ранее выявлено, что ковалентное присоединение BV одновременно к двум ключевым остаткам цистеина является причиной наибольшего квантового выхода флуоресценции BV-содержащих ближне-инфракрасных флуоресцентных белков (NIR-FP) с двумя ключевыми остатками цистеина по сравнению с остальными BV-содержащими NIR-FP. Наши данные указывают на то, что ковалентное связывание BV в NIR-FP с двумя ключевыми остатками цистеина одновременно с двумя участками полипептидной цепи, которая, помимо этого, формирует узел типа восьмерки, приводит к экранированию в них многих сайтов расщепления протеолитическими ферментами трипсином и химотрипсином. Как следствие, при ковалентном связывании BV в NIR-FP одновременно с двумя ключевыми остатками цистеина не только стабилизируется их структура, но и может возрастать их устойчивость к протеолитической деградации, что определяет клеточную стабильность биомаркеров и важно для их использования в качестве флуоресцентных меток в клетке.

Ключевые слова: бактериальные фитохромы, ближне-инфракрасные флуоресцентные белки, двойное ковалентное связывание биливердина

DOI: 10.31857/S0041377123010108, **EDN:** GLEWOB

Генетически кодируемые белковые флуоресцентные маркеры успешно используются для изучения биологических процессов посредством селективного мечения ими целевых клеточных белков (Chernov et al., 2017; Rodriguez et al., 2017). Среди них ближне-инфракрасные (NIR) биомаркеры могут прижизненно использоваться в экспериментах на модельных животных, поскольку спектры поглощения и флуоресценции этих белков попадают в “окно прозрачности” биологических тканей, характеризующееся минимальным поглощением света компонентами клеток и водой (Weissleder, 2001). Мечение отдельных клеток с использованием NIR-биомаркеров позволило изучать биологические процессы в модельных животных, такие как метастазирование и канцерогенез (Yu et al., 2014), процессы регенерации, развитие паразитарных и вирусных инфекций, процессы, связанные с нарушением липидного метаболизма. Совместное использование спектрально различных мономерных вариантов

NIR-биомаркеров (Matlashov et al., 2020) и NIR-биосенсоров ключевых клеточных процессов на их основе (Komatsu et al., 2011; Shcherbakova et al., 2018a; Qian et al., 2019; Subach et al., 2019) с биомаркерами и биосенсорами видимого диапазона на основе GFP-подобных белков и с оптогенетическими инструментами на основе родопсинов и криптохромов, активность которых регулируется светом в сине-зеленой области спектра, значительно расширяет возможности изучения биологических процессов внутри клетки (Shcherbakova et al., 2018a). Использование NIR-биомаркеров с передовыми методами получения изображений (фотоакустической томографией, двух-фотонной микроскопией, регистрацией кривых затухания флуоресценции) позволяет достичь субмиллиметрового разрешения в глубоких тканях модельных животных (Li et al., 2018).

Большинство доступных в настоящее время ближне-инфракрасных (NIR) биомаркеров разработаны на основе ближне-инфракрасных флуоресцентных белков (NIR-FP), состоящих из двух доменов — PAS (Per-ARNT-Sim) и GAF (cGMP PDE/AC/FhlA), которые вместе образуют так назы-

Принятые сокращения: NIR — ближне-инфракрасные; FP — флуоресцентные белки; BV — биливердин; GdnHCl — гидрохлорид гуанидина.

ваемый хромофор-связывающий домен полноразмерных бактериальных фитохромов (Rodriguez et al., 2017; Shcherbakova et al., 2018b). Природным лигандом бактериальных фитохромов и большинства NIR-биомаркеров на их основе является биливердин IX α (BV). Данный тетрапиррол синтезируется в клетках млекопитающих в достаточном количестве в результате деградации гема (Kapitulnik, Maines, 2012). Важной характеристикой NIR-биомаркеров при их использовании является яркость в клетке, которая определяется молекулярной яркостью белка и его стабильностью в клетке. Среди BV-содержащих NIR-FP наибольшим квантовым выходом флуоресценции и устойчивостью к химическим денатурантам обладают те из них, в которых присутствуют одновременно два ключевых остатка цистеина: консервативный для бактериальных фитохромов Cys15 в N-концевом участке PAS-домена (Cys^{PAS}) и Cys256, введенный в GAF-домен в положение, эквивалентное сайту связывания хромофора фоторецепторов растений и цианобактерий (Cys^{GAF}) (Stepanenko et al., 2022). Как было показано, Cys^{GAF}, наряду с Cys^{PAS} может выступать сайтом ковалентного связывания BV в NIR-FP (Shcherbakova et al., 2015; Stepanenko et al., 2016).

При кристаллографическом исследовании структуры мономерного белка miRFP670, который содержит два ключевых остатка цистеина, было выявлено ковалентное присоединение BV одновременно к этим двум остаткам (Baloban et al., 2017). Предполагают, что именно это и является причиной наибольшего квантового выхода флуоресценции и увеличения стабильности структуры (Stepanenko et al., 2017a) BV-содержащих NIR-FP с двумя ключевыми остатками цистеина по сравнению с остальными BV-содержащими NIR-FP. Эти предположения нашли подтверждение при анализе спектральных свойств биомаркера iRFP682 (Buhrke et al., 2019) и в наших недавних исследованиях спектральных свойств целого ряда NIR-FP, в которых BV связан одновременно с Cys^{PAS} и Cys^{GAF} (Cys^{GAF}-BV-Cys^{PAS}) (Stepanenko et al., 2022). Использование специальной методики для обогащения препаратов NIR-FP молекулами белка, содержащими хромофор Cys^{GAF}-BV-Cys^{PAS}, позволило нам надежно определить спектральные характеристики этого вида молекул NIR-FP. Тем не менее, связывание BV одновременно с двумя цистеиновыми остатками NI FP до сих пор не было подтверждено наиболее прямым методом масс-спектропии.

Мы предположили, что ковалентное присоединение BV одновременно к двум ключевым остаткам цистеина в NIR-FP может делать их малочувствительными к действию протеолитических ферментов. На примере iRFP670 мы провели анализ устойчивости NIR-FP с двумя ключевыми остатками цистеина к действию протеолитических ферментов. Эти исследования позволили нам установить причины не-

эффективности метода масс-спектропии в отношении NIR-FP, в которых BV одновременно присоединен ковалентно к двум остаткам цистеина. Нами выявлены структурные элементы, определяющие высокую устойчивость этих NIR-FP к протеолитическому расщеплению.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалы. Гидрохлорид гуанидина (GdnHCl), компоненты буферных растворов и трипсин из поджелудочной железы быка производства Sigma (США) использованы без дополнительной очистки. Химотрипсин и сурфактант ProteaseMAXTM (усилитель трипсина) были приобретены у Promega (США).

Выделение и очистка белков. Ген целевого белка iRFP670 с полигистидиновой меткой на N-конце клонирован в вектор pBAD/His-B (Invitrogen, США) по сайтам BglII и EcoRI, которым трансформировали штамм бактерий *Escherichia coli* LMG 194. Белок iRFP670 получен и очищен, как описано ранее (Stepanenko et al., 2016, 2019). Белок iRFP670 в апо- (т.е. в отсутствие хромофора) и холоформе (т.е. в комплексе с BV) получен при экспрессии только гена целевого белка и совместно с геном гемоксигеназы (НО) с вектора pWA23h-НО соответственно. Фермент НО обеспечивает синтез BV. Для экспрессии биомаркеров в апоформе использовали среду RM (состав (мМ): 48 Na₂HPO₄, 22 KH₂PO₄, 19 NH₄Cl, 8.5 NaCl, 2% казеиновых кислот, 1 MgCl₂ и 1 тиамин), содержащую ампицилин. В состав культуральной среды для экспрессии целевого белка в холоформе входили ампицилин и канамицин. Для индукции экспрессии генов, кодирующих iRFP670 и НО, использовали арабинозу и рамнозу соответственно. Клеточный лизат очищали с помощью афинной хроматографии на колонках His-GraviTrap (GE Healthcare, Швеция) и ион-обменной хроматографии на колонке MonoQ (GE Healthcare, Швеция). Чистоту полученных препаратов белка контролировали электрофоретически (Laemmli, 1970).

Биохимические измерения. Ковалентное связывание BV с iRFP670 анализировали по цинк-индуцированной флуоресценции BV и путем окрашивания кумасси синим образцов белка, разделенных с помощью SDS-PAGE-электрофореза (Berkelman, Lagarias, 1986). Содержание NIR-FP с ковалентно присоединенным BV оценивали с помощью программы для обработки изображений ImageJ по общей интенсивности полос, визуализируемых при окрашивании кумасси синим.

Образцы, обработанные протеазой, анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле Tricine-SDS (16/6%), используемого для разделения пептидов в широком диапазоне молекулярных масс (Schagger, 2006). В качестве маркеров использовали пептиды с известной молекулярной массой до 40 кДа. Образцы белка инкубировали с

Таблица 1. Молекулярная масса пептидов, полученных при полном расщеплении iRFP670 в холоформе и апоформе химотрипсином (расщепление по остаткам F, Y и W) и трипсином (расщепление по остаткам K и R)

Протеаза	Мол. масса пептида, кДа
iRFP670 в холоформе	
Химотрипсин	7.13 ^a , * (A-BV-B); 5.04 ^b (A); 4.34; 3.48; 2.69; 2.26; 2.09 ^b , * (B-BV); 2.08; 1.80; 1.74; 1.58; 1.46; 1.12; 1.02; 0.96; 0.82; 0.79; 0.62; 0.6; 0.35; 0.32; 0.26; 0.17
Трипсин	3.31; 2.79 ^a , * (A-BV-B); 2.49; 2.40; 2.38; 2.33; 2.12; 1.99; 1.88 ^b , * (B-BV); 1.40; 1.25; 1.18; 1.03; 0.99; 0.96; 0.91 ^b (A); 0.91; 0.77; 0.68; 0.66; 0.65; 0.62; 0.60; 0.52; 0.50; 0.47; 0.39; 0.38; 0.37; 0.25; 0.17; 0.15
iRFP670 в апоформе	
Химотрипсин, полное расщепление	5.04 ^b (A); 4.34; 3.48; 2.69; 2.26; 2.08; 1.80; 1.74; 1.58; 1.51 ^c (B); 1.46; 1.12; 1.02; 0.96; 0.82; 0.79; 0.62; 0.6; 0.35; 0.32; 0.26; 0.17
Химотрипсин, частичное расщепление	6.41 или 4.97 ^d

(^a) – BV, ковалентно связанный с двумя цистеинами – Cys^{PAS} в пептиде А и Cys^{GAF} в пептиде Б (A-BV-B); (^b) – пептид А содержит Cys^{PAS} (А); (^c) пептид Б содержит Cys^{GAF}, к которому ковалентно пришит BV в белке в холоформе (B-BV); (^d) – пептид Б содержит Cys^{GAF} (Б); (^e) – пептид Б, образующийся, если полипептидная цепь не расщепляется по сайтам Y213, F247. Нумерация соответствует выравниванию последовательностей iRFP670 относительно RpBphP2 (4E04 file в базе данных PDB (Bellini, Papiz, 2012)); (*) – соответствующие пептиды содержат ковалентно присоединенный BV и могут быть идентифицированы по Zn-индуцированной флуоресценции.

протеазой в соотношении 20 : 1 в течение ночи при 37°C для трипсина и 50°C для химотрипсина (оптимальная температура для активности фермента). Некоторые образцы предварительно инкубировали с мочевиной в концентрации 5 М при 50°C в течение 30 мин перед добавлением протеазы. В качестве альтернативы образцы предварительно инкубировали с 0.2, 0.1 и 0.025% препарата ProteaseMAXTM при 37°C в течение 7 ч без мочевины или с добавлением 2 М мочевины. Подготовленные таким образом образцы смешивали с протеазами в соотношении 20 : 1 и инкубировали в течение ночи при 4, 20, 37 или 50°C.

Анализ пространственной структуры белка. Для анализа расположения сайтов протеолитического расщепления в iRFP670 использовали рентгеноструктурные данные PAS-GAF-доменов бактериального фитохрома RpBphP2 (файл 4E04.ent (Bellini, Papiz, 2012)), депонированные в базе данных PDB (Dutta et al., 2008).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мономерные (Baloban et al., 2017) и димерные (Stepanenko et al., 2022) NIR-FP с двумя ключевыми цистеиновыми остатками в доменах PAS и GAF содержат в своем составе две формы хромофора примерно в эквимолярном соотношении: BV, ковалентно связанный через атом C3² с Cys^{GAF} и BV, одновременно связанный ковалентно через атом C3¹ с Cys^{GAF} и через атом C3² с Cys^{PAS} (Cys^{GAF}-BV-Cys^{PAS}). Показанная нами ранее возможность получения NIR-FP с увеличенным содержанием хромофора Cys^{GAF}-BV-Cys^{PAS} с использованием метода селективной денатурации мономеров с Cys^{GAF}-BV в составе исходных NIR-FP указывает на то, что скрепле-

ние доменов PAS и GAF через одновременное связывание цистеиновых остатков в них с хромофором стабилизирует структуру NI-FP. На стабильность биомаркера в клетке помимо стабильности его структуры будет влиять его устойчивость к действию протеолитических ферментов. Поэтому мы проанализировали влияние протеаз, трипсина и химотрипсина, на структуру NIR-FP, содержащих оба ключевых цистеиновых остатка в доменах PAS и GAF, на примере белка iRFP670.

Устойчивость iRFP670 в холоформе к протеолизу. Белок iRFP670 имеет 33 и 22 сайта расщепления трипсином и химотрипсином соответственно (рис. 1). Белок после воздействия протеаз анализировали с использованием метода Tricine-SDS-электрофореза в полиакриламидном геле, позволяющего разделить пептиды в широком диапазоне молекулярных масс (Schagger, 2006). При расчете размеров пептидов, полученных при расщеплении iRFP670 протеазами, мы учитывали присутствие двух видов хромофоров в мономерах этого белка – Cys^{GAF}-BV и Cys^{GAF}-BV-Cys^{PAS} (табл. 1). Следует отметить, что пригодные для анализа методом масс-спектрометрии пептиды, учитывая ограничения метода (мелкие пептиды лучше выявляются), можно ожидать при полном расщеплении iRFP670 трипсином (пептиды 2.79, 1.88 и 0.91 кДа, содержащие ключевые цистеиновые остатки; см. табл. 1). Однако анализ образцов iRFP670, обработанных как трипсином, так и химотрипсином, не позволил выявить методом масс-спектрометрии искомые пептиды (данные не представлены).

Мы обнаружили, что электрофореграммы iRFP670 в холоформе после обработки протеазами содержали только полосы, соответствующие целевому

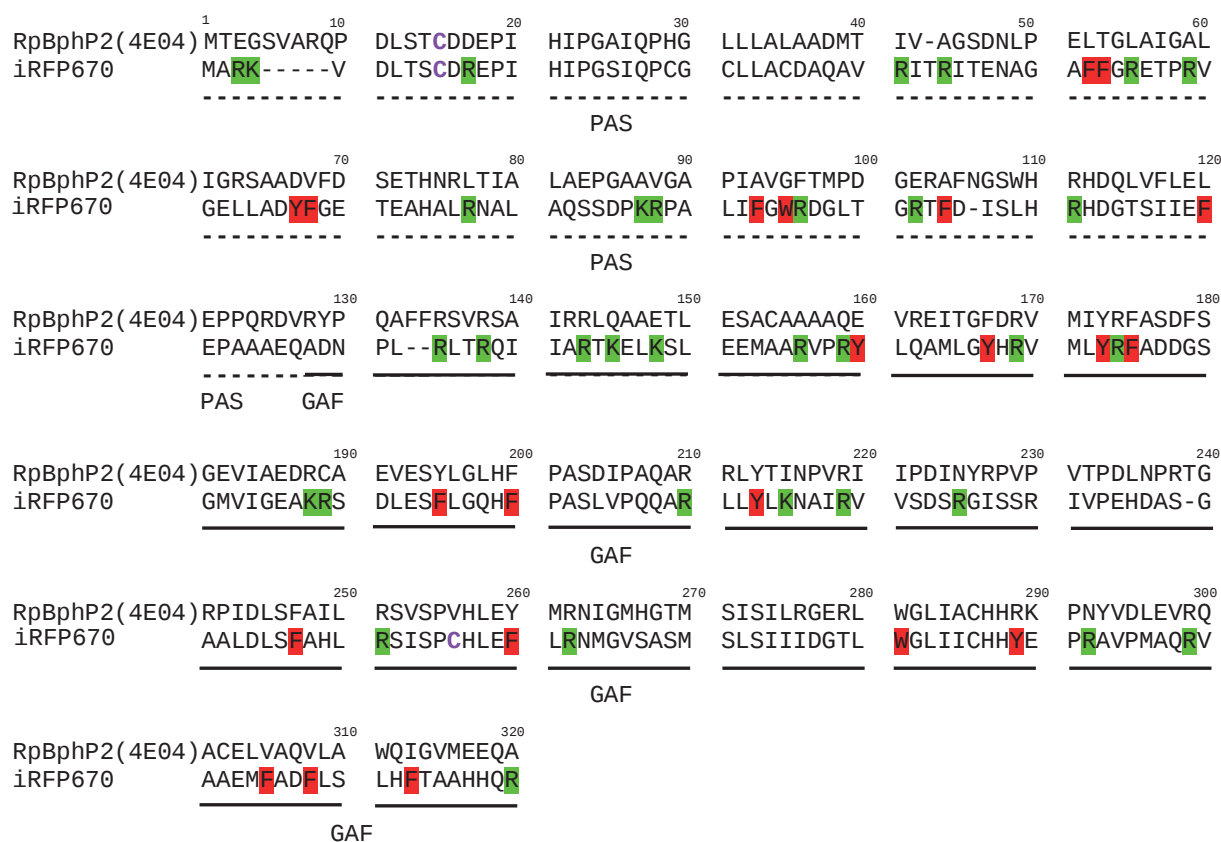


Рис. 1. Выравнивание аминокислотной последовательности iRFP670 относительно последовательности *RpBphP2*-PAS-GAF дикого типа. Пурпурным цветом выделены консервативные остатки Cys (C) в домене PAS (Cys15) и уникальный остаток Cys в домене GAF белка iRFP670 (Cys256). Аминокислоты Phe, Tyr и Trp, предшествующие расщепляемой химотрипсином амидной связи, и Lys и Arg, предшествующие расщепляемой трипсином амидной связи, выделены красным и зеленым соответственно.

нерасщепленному белку (рис. 2). Предварительная инкубация биомаркера в денатурирующих условиях (5 М мочевины) для дестабилизации его структуры (Proctor, Cunningham, 1988; Mine et al., 2004) не способствовала расщеплению белка протеазами (рис. 2). Это свидетельствует о высокой устойчивости iRFP670 в холоформе к действию протеаз.

Условия для расщепления iRFP670. Нам удалось подобрать условия, при которых наблюдается лишь частичный гидролиз iRFP670. Мы обнаружили, что частичное расщепление iRFP670 происходит при его обработке химотрипсином, но не трипсином, в присутствии агента ProteaseMAX™ Surfactant (Trypsin Enhancer) (Shin et al., 2009; Diaz-Gonzalez et al., 2015; Krey et al., 2015) (рис. 2). Считается, что этот препарат увеличивает эффективность ряда протеолитических ферментов за счет дестабилизации структуры анализируемых белков и увеличения их растворимости (Diaz-Gonzalez et al., 2015). В растворе iRFP670, расщепленного химотрипсином, присутствуют в основном пептиды с молекулярной массой около 14–15 кДа и выше (рис. 3). Эти пептиды содержат в своем составе ковалентно присоединенный хромофор,

о чем свидетельствует Zn-индуцированная флуоресценция соответствующих им электрофоретических полос (рис. 3). Также можно предполагать, что в анализируемом растворе присутствуют следовые количества пептидов с молекулярной массой около 12 и 7–10 кДа с ковалентно присоединенным хромофором в их составе (рис. 3).

Основываясь на кристаллографических данных о структуре фитохромов, мы провели анализ расположения сайтов расщепления химотрипсином в iRFP670, чтобы понять причины его частичного протеолиза (табл. 2, рис. 4). Мы обнаружили, что часть потенциальных сайтов расщепления химотрипсином в последовательности белка может быть стерически недоступна для действия протеазы. Так, недоступность сайта расщепления Y213 может быть связана с его расположением вблизи от одного из пересечений полипептидной цепи белка, формирующей узел (рис. 4).

Сайт расщепления F247 находится вблизи другого пересечения полипептидной цепи в петле, через которую протягивается N-концевой сегмент белка (рис. 4). Следует заметить, что эти два сайта расщеп-

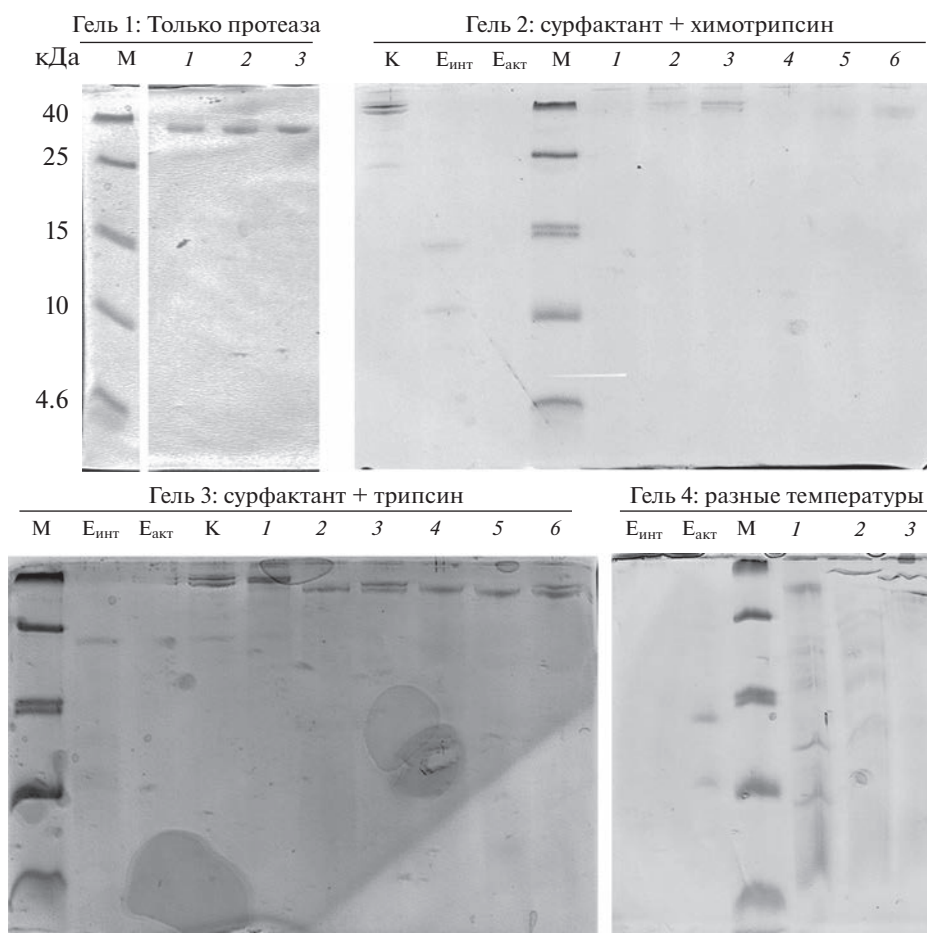


Рис. 2. Расщепление iRFP670 в холоформе в разных условиях. Tricine-SDS-электрофорез образцов белка с последующим окрашиванием кумасси синим. Проверены следующие условия: гель 1 (дорожки 1 и 2) – расщепление белка химотрипсином при 50°C без и с предварительной инкубацией образцов в присутствии 5 М мочевины; дорожка 3 – расщепление белка трипсином при 37°C. Гель 2 (дорожки 1, 2 и 3 – расщепление белка химотрипсином при 50°C с предварительной инкубацией образцов в присутствии 2 М мочевины и сурфактанта ProteaseMAX™ в концентрациях 0.2, 0.1, и 0.025%; дорожки 4, 5 и 6 – расщепление белка химотрипсином при 50°C с предварительной инкубацией образцов в присутствии сурфактанта ProteaseMAX™ в концентрациях 0.2, 0.1, и 0.025%; дорожки 1, 2 и 3 – расщепление белка трипсином при 37°C с предварительной инкубацией образцов в присутствии сурфактанта ProteaseMAX™ в концентрациях 0.2, 0.1 и 0.025%; дорожки 4, 5, и 6 – расщепление белка трипсином в 37°C с предварительной инкубацией образцов в присутствии сурфактанта ProteaseMAX™ в концентрациях 0.2, 0.1 и 0.025%. Гель 3 (дорожки 1, 2 и 3) – расщепление белка трипсином при 37°C с предварительной инкубацией образцов в присутствии 2 М мочевины и сурфактанта ProteaseMAX™ в концентрациях 0.2, 0.1 и 0.025%; дорожки 4, 5, и 6 – расщепление белка трипсином в 37°C с предварительной инкубацией образцов в присутствии сурфактанта ProteaseMAX™ в концентрациях 0.2, 0.1 и 0.025%. Гель 4 (дорожки 1, 2 и 3) – расщепление белка химотрипсином при 4, 37 и 50°C с предварительной инкубацией образцов в присутствии 0.2% сурфактанта. М – маркерные пептиды, К – контрольные образцы исходного белка. Активность протеаз (E_{акт}) подтверждается их саморасщеплением при оптимальной температуре. Растворы протеаз, активность которых блокировали (добавлением ингибитора PMSF в концентрации 1 мМ при 4°C) содержат только пептиды с мол. массой около 14 и 10 кДа для химотрипсина и 23.3 кДа для трипсина, что соответствует интактным субъединицам фермента (E_{инт}).

ления находятся с N-конца от ключевого остатка Cys^{GAF}. Расчет показывает, что если гидролиз по сайтам Y213 и F247 не происходит, то в анализируемом растворе iRFP670 после его обработки химотрипсином должны присутствовать пептиды с ковалентно присоединенным хромофором с молекулярной массой 6.99 (пептид Б с ковалентно присоединенным хромофором: Б-BV) и 12.04 кДа (пептид А и пептид Б, связанные через ковалентно присоединенный хромофор: Б-BV-A) (табл. 2). Доступ протеазы к сайту расщепления F260, расположенному с С-конца от Cys^{GAF}, может быть ограничен из-за ковалентного

связывания BV в биомаркере (рис. 4), что приведет к появлению в анализируемом растворе пептидов с ковалентно присоединенным хромофором размером 9.24 (пептид Б-BV) и 14.28 кДа (пептид Б-BV-A) (табл. 2).

Еще один сайт расщепления W281 с С-конца от Cys^{GAF} находится глубоко внутри глобулы белка в домене GAF (рис. 4). В случае отсутствия гидролиза полипептидной цепи iRFP670 по всем перечисленным сайтам, включая Y213, F247, F260 и W281, размер ожидаемых фрагментов белка составит 10.18 кДа (пептид Б-BV) и 15.22 кДа (пептид Б-BV-A) (табл. 2).

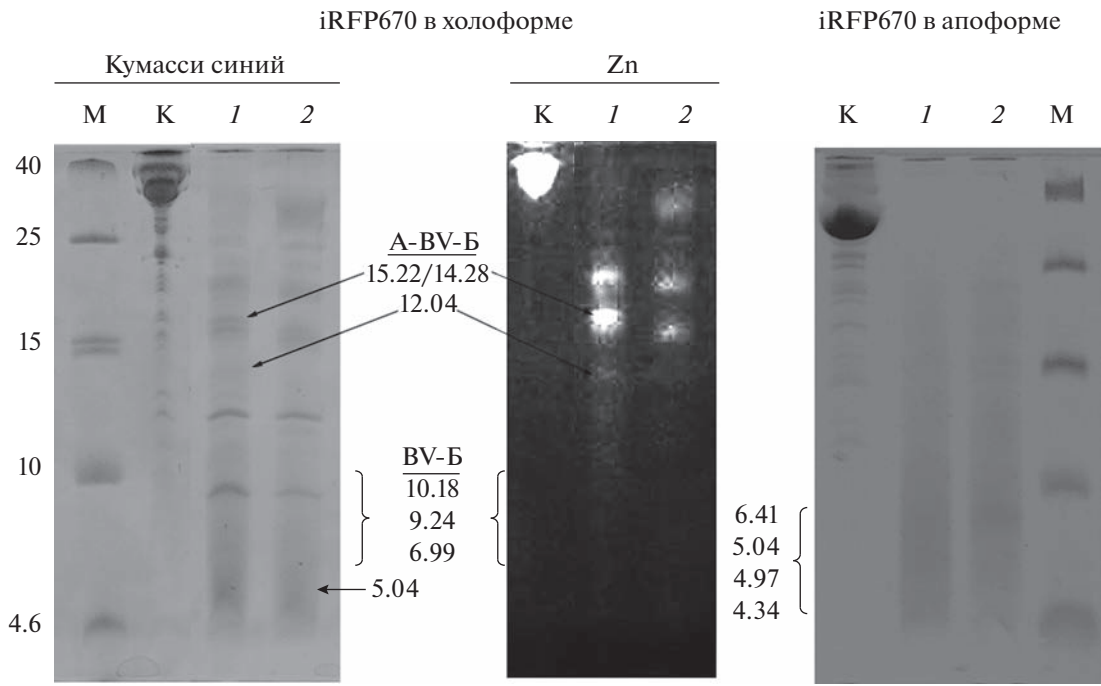


Рис. 3. Расщепление белка iRFP670 в холоформе (две панели слева) и апоформе (правая панель) химотрипсином. Tricine-SDS-электрофорез образцов белка с последующим окрашиванием кумасси синим и регистрацией цинк-индуцированной флуоресценции (Zn). В лунки загружали следующие образцы: М – маркерные пептиды, К – контрольные образцы исходного белка, дорожки 1 и 2 – образцы iRFP670, расщепленные при 4 и 20°C. Между панелями указаны ожидаемые размеры обнаруженных пептидов и характер связывания с ними биливердина (BV) (см. также табл. 2).

Следует заметить, что при расщеплении мономеров iRFP670, содержащих хромофор Cys^{GAF}-BV, должен образовываться пептид с ключевым остатком Cys^{PAS} который не несет ковалентно присоединенного хромофора, его молекулярная масса составляет порядка 5.04 кДа (табл. 1). Основываясь на проведенном структурном анализе, присутствие на электрофореграмме iRFP670

Таблица 2. Расчетный размер BV-содержащих пептидов, полученных при частичном и полном расщеплении iRFP670 в холоформе химотрипсином (расщепление по остаткам F, Y и W)

Мол. масса пептида с BV, кДа		Последовательность пептида Б* при полном расщеплении, или в случае, когда некоторые сайты расщепления пропускаются протеазой
A-BV-Б ^a	BV-Б	
Частичное расщепление ^б		
12.04	6.99	PASLVPQQARLLY ₂₁₃ LKNAIRVVSDSRGISSRIVPEHDASGAALDLSF ₂₄₇ AHLRSISPCys ^{GAF} HLEF ₂₆₀ ^б
14.28	9.24	PASLVPQQARLLY ₂₁₃ LKNAIRVVSDSRGISSRIVPEHDASGAALDLSF ₂₄₇ AHLRSISPCys ^{GAF} HLEF ₂₆₀ LR NMGVSASMSLSIIIDGTLW ₂₈₁
15.22	10.18	PASLVPQQARLLY ₂₁₃ LKNAIRVVSDSRGISSRIVPEHDASGAALDLSF ₂₄₇ AHLRSISPCys ^{GAF} HLEF ₂₆₀ LR NMGVSASMSLSIIIDGTLW ₂₈₁ GLIICHNY ₂₈₉
Полное расщепление		
7.13	2.09	AHLRSISPCys ^{GAF} HLEF ₂₆₀

(^а) – пептид А содержит Cys^{PAS} (размер 5.04 кДа, последовательность: MARKVDLTSCys^{PAS}DREPIHIPGSIQPCGCLLACDAQAVR-ITRITENAGAF₅₂). Пептид Б содержит Cys^{GAF}; (^б) – сайты расщепления, пропущенные протеазой, выделены жирным шрифтом; (^в) – нумерация соответствует выравниванию последовательности iRFP670 относительно R_pB_{rh}P2 (файл 4E04 в базе данных PDB (Bellini, Papiz, 2012)); (*) – часть потенциальных сайтов расщепления химотрипсином в последовательности белка может быть стерически недоступна для действия протеазы, что приводит к формированию пептида Б разной молекулярной массы, в то время как молекулярная масса пептида А не изменяется.

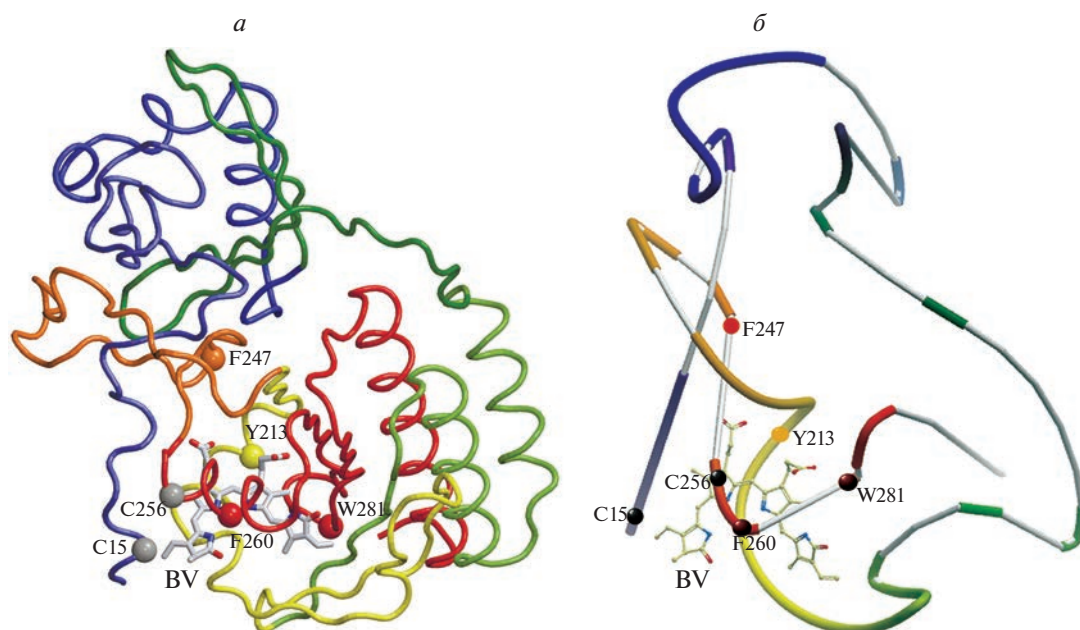


Рис. 4. Расположение сайтов протеолитического расщепления в структуре iRFP670, потенциально недоступных для химотрипсина. *а* – Пространственная структура белка. *б* – Схематическое изображение структуры белка показывает топологию узла. Рисунок создан на основе рентгеноструктурных данных доменов PAS и GAF белка *RpBphP2* из *Rhodospseudomonas palustris* (PDB: файл 4e04 (Bellini, Papiz, 2012)) с помощью графических программных пакетов VMD (Visual Molecular Dynamics) (Hsin et al., 2008), Raster3D (Merritt, Bacon, 1997) и ICM Pro (Abagyan et al., 1994). Показаны сайты расщепления химотрипсином Y213, F247, F260, и W281 (в виде Ван-дер-Ваальсовых сфер показаны атомы CA соответствующих остатков). Изображен связанный биливердин (BV).

после его обработки химотрипсином интенсивных Zn-позитивных полос, соответствующих пептидам с размером 14–15 кДа, и едва выраженных Zn-позитивных полос, соответствующих пептидам с размером 12 и 7–10 кДа, а также Zn-негативной полосы, соответствующей пептиду размером 5 кДа, можно интерпретировать в пользу практически полного ингибирования расщепления мономерного белка с хромофором Cys^{GAF}-BV-Cys^{PAS}, но не мономера с Cys^{GAF}-BV, расщепление которого, по всей видимости, идет до конца (рис. 3). Полученные нами данные хорошо согласуются с данными из литературы о наличии в димерных и мономерных NIR-FP с двумя ключевыми остатками цистеина двух видов хромофора (Baloban et al., 2017; Stepanenko et al., 2017b). Большой размер хромофор-содержащих пептидов, полученных при расщеплении iRFP670 химотрипсином, также хорошо укладывается в предположение о возможности одновременного ковалентного присоединения BV к остаткам цистеина в обоих доменах в NIR-FP.

Анализ влияния химотрипсина на структуру апо-белка iRFP670 (не связанного с хромофором) в присутствии ProteaseMAXTM Surfactant показал, что в растворе белка после такого воздействия присутствуют короткие пептиды, размером между 4.6 и 10 кДа (рис. 3). Согласно анализу аминокислотной последовательности iRFP670 в этот диапазон попадает только пептид А с молекулярной массой 5.04

кДа (табл. 1). При полном гидролизе протеазой всей остальной полипептидной цепи белка образуются пептиды молекулярной массы не более 4.34 кДа (табл. 1). В случае неполного гидролиза апо-белка iRFP670 из-за недоступности сайтов расщепления Y213 и F247, или только F247, находящихся у пересекющихся участков полипептидной цепи в составе узла, могут формироваться пептиды молекулярной массы 6.41 и 4.97 кДа (варианты пептида Б) соответственно (табл. 1). Такая ситуация, вероятно, и реализуется в нашем случае (рис. 3).

Подводя итоги, заметим, что частичный гидролиз iRFP670 может быть достигнут только с помощью химотрипсина, действие которого усиливается поверхностно-активным веществом ProteaseMAXTM (Trypsin Enhancer). Следует отметить, что и в этом случае эффективность расщепления белка низка, так что концентрация и размер образующихся пептидов не позволяют обнаружить их масс-спектрометрическим методом. Мы считаем это важным результатом, показывающим, что NIR-FP, содержащие хромофор в форме Cys^{GAF}-BV-Cys^{PAS}, слабо чувствительны к исследуемым протеазам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные указывают на возможную функцию узла в составе полипептидной цепи хромофор-связывающего домена фитохромов, заключаю-

щуюся в повышении устойчивости этих белков против протеолитической деградации. В совокупности со стабилизирующим действием узла, одновременное ковалентное связывание BV с обоими доменами NIR-биомаркеров с двумя ключевыми остатками цистеина может вносить вклад в устойчивость этих белков к действию различных, в том числе клеточных, протеаз.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в соответствии с Государственным заданием Министерства науки и высшего образования РФ (FMFU-2021-0001).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют, что в проведенных экспериментах люди или животные в качестве объектов не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abagyan R., Totrov M., Kuznetsov D.* 1994. ICM-A New Method for protein modeling and design: applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *J. Comput. Chem.* V. 15. P. 488.
- Baloban M., Shcherbakova D.M., Pletnev S., Pletnev V.Z., Lagarias J.C., Verkhusha V.V.* 2017. Designing brighter near-infrared fluorescent proteins: insights from structural and biochemical studies. *Chem. Sci.* V. 8. P. 4546. <https://doi.org/10.1039/c7sc00855d>
- Bellini D., Papiz M.Z.* 2012. Dimerization properties of the RpBphP2 chromophore-binding domain crystallized by homologue-directed mutagenesis. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* V. 68. P. 1058. <https://doi.org/10.1107/S0907444912020537>
- Berkelman T.R., Lagarias J.C.* 1986. Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* V. 156. P. 194. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90173-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90173-9)
- Buhrke D., Tavraz N.N., Shcherbakova D.M., Sauthof L., Moldenhauer M., Velazquez Escobar F., Verkhusha V.V., Hildebrandt P., Friedrich T.* 2019. Chromophore binding to two cysteines increases quantum yield of near-infrared fluorescent proteins. *Sci. Rep.* V. 9. P. 1866. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38433-2>
- Chernov K.G., Redchuk T.A., Omelina E.S., Verkhusha V.V.* 2017. Near-Infrared fluorescent proteins, biosensors, and optogenetic tools engineered from phytochromes. *Chem. Rev.* V. 117. P. 6423. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00700>
- Diaz-Gonzalez F., Milano M., Olguin-Araneda V., Pizarro-Cerda J., Castro-Cordova P., Tzeng S.C., Maier C.S., Sarker M.R., Paredes-Sabja D.* 2015. Protein composition of the outermost exosporium-like layer of *Clostridium difficile* 630 spores. *J. Proteomics.* V. 123. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.035>
- Dutta S., Burkhardt K., Swaminathan G.J., Kosada T., Henrick K., Nakamura H., Berman H.M.* 2008. Data deposition and annotation at the worldwide protein data bank. *Methods Mol. Biol.* V. 426. P. 81. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-058-8_5
- Hsin J., Arkhipov A., Yin Y., Stone J.E., Schulten K.* 2008. Using VMD: an introductory tutorial. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* Chapter 5: Unit 5.7.
- Kapitulnik J., Maines M.D.* 2012. The role of bile pigments in health and disease: effects on cell signaling, cytotoxicity, and cytoprotection. *Front. Pharmacol.* V. 3. P. 136. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00136>
- Komatsu N., Aoki K., Yamada M., Yukinaga H., Fujita Y., Kamioka Y., Matsuda M.* 2011. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol. Biol. Cell.* V. 22(23). P. 4647. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-01-0072>
- Krey J.F., Sherman N.E., Jeffery E.D., Choi D., Barr-Gillespie P.G.* 2015. The proteome of mouse vestibular hair bundles over development. *Sci. Data.* V. 2. P. 150047. <https://doi.org/10.1038/sdata.2015.47>
- Laemmli U.K.* 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* V. 227. P. 680. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Li L., Shemetov A.A., Baloban M., Hu P., Zhu L., Shcherbakova D.M., Zhang R., Shi J., Yao J., Wang L.V., Verkhusha V.V.* 2018. Small near-infrared photochromic protein for photoacoustic multi-contrast imaging and detection of protein interactions in vivo. *Nat. Commun.* V. 9. P. 2734. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05231-3>
- Matlashov M.E., Shcherbakova D.M., Alvelid J., Baloban M., Pennacchiotti F., Shemetov A.A., Testa I., Verkhusha V.V.* 2020. A set of monomeric near-infrared fluorescent proteins for multicolor imaging across scales. *Nat. Commun.* V. 11. P. 239. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13897-6>
- Merritt E.A., Bacon D.J.* 1997. Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods Enzymol.* V. 277. P. 505. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)77028-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)77028-9)
- Mine Y., Ma F., Lauriau S.* 2004. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J. Agric. Food Chem.* V. 52(5). P. 1088. <https://doi.org/10.1021/jf0345752>
- Proctor V.A., Cunningham F.E.* 1988. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* V. 26. P. 359. <https://doi.org/10.1080/10408398809527473>
- Qian Y., Piatkevich K.D., Mc Larney B., Abdelfattah A.S., Mehta S., Murdock M.H., Gottschalk S., Molina R.S., Zhang W., Chen Y., Wu J., Drobizhev M., Hughes T.E., Zhang J., Schreiter E. et al.* 2019. A genetically encoded near-infrared fluorescent calcium ion indicator. *Nat. Methods.* V. 16. P. 171. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0294-6>
- Rodriguez E.A., Campbell R.E., Lin J.Y., Lin M.Z., Miyawaki A., Palmer A.E., Shu X., Zhang J., Tsien R.Y.* 2017. The growing and glowing toolbox of fluorescent and photoactive proteins. *Trends Biochem. Sci.* V. 42. P. 111. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.010>
- Schagger H.* 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* V. 1. P. 16. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>

- Shcherbakova D.M., Baloban M., Pletnev S., Malashkevich V.N., Xiao H., Dauter Z., Verkhusha V.V.* 2015. Molecular basis of spectral diversity in near-infrared phytochrome-based fluorescent proteins. *Chem. Biol.* V. 22. P. 1540. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.10.007>
- Shcherbakova D.M., Cox Cammer N., Huisman T.M., Verkhusha V.V., Hodgson L.* 2018a. Direct multiplex imaging and optogenetics of Rho GTPases enabled by near-infrared FRET. *Nat. Chem. Biol.* V. 14. P. 591. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0044-1>
- Shcherbakova D.M., Stepanenko O.V., Turoverov K.K., Verkhusha V.V.* 2018b. Near-infrared fluorescent proteins: multiplexing and optogenetics across scales. *Trends Biotechnol.* V. 36. P. 1230. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.06.011>
- Shin J.B., Pagana J., Gillespie P.G.* 2009. Twist-off purification of hair bundles. *Methods Mol. Biol.* V. 493. P. 241. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-523-7_14
- Stepanenko O.V., Baloban M., Bublikov G.S., Shcherbakova D.M., Stepanenko O.V., Turoverov K.K., Kuznetsova I.M., Verkhusha V.V.* 2016. Allosteric effects of chromophore interaction with dimeric near-infrared fluorescent proteins engineered from bacterial phytochromes. *Sci. Rep.* V. 6. P. 18750. <https://doi.org/10.1038/srep18750>
- Stepanenko O.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Stepanenko O.V.* 2022. Impact of double covalent binding of BV in NIR FPs on their spectral and physicochemical properties. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. P. 7347. <https://doi.org/10.3390/ijms23137347>
- Stepanenko O.V., Stepanenko O.V., Bublikov G.S., Kuznetsova I.M., Verkhusha V.V., Turoverov K.K.* 2017a. Stabilization of structure in near-infrared fluorescent proteins by binding of biliverdin chromophore. *J. Mol. Str.* V. 1140. P. 22. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.10.095>
- Stepanenko O.V., Stepanenko O.V., Kuznetsova I.M., Shcherbakova D.M., Verkhusha V.V., Turoverov K.K.* 2017b. Interaction of biliverdin chromophore with near-infrared fluorescent protein BphP1-FP engineered from bacterial phytochrome. *Int. J. Mol. Sci.* V. 18. P. 1009. <https://doi.org/10.3390/ijms18051009>
- Stepanenko O.V., Stepanenko O.V., Shpironok O.G., Fonin A.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K.* 2019. Near-Infrared markers based on bacterial phytochromes with phycocyanobilin as a chromophore. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 6067. <https://doi.org/10.3390/ijms20236067>
- Subach O.M., Barykina N.V., Anokhin K.V., Piatkevich K.D., Subach F.V.* 2019. Near-infrared genetically encoded positive calcium indicator based on GAF-FP bacterial phytochrome. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 3488. <https://doi.org/10.3390/ijms20143488>
- Weissleder R.* 2001. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* V. 19. P. 316. <https://doi.org/10.1038/86684>
- Yu D., Gustafson W.C., Han C., Lafaye C., Noirclerc-Savoye M., Ge W.P., Thayer D.A., Huang H., Kornberg T.B., Royant A., Jan L.Y., Jan Y.N., Weiss W.A., Shu X.* 2014. An improved monomeric infrared fluorescent protein for neuronal and tumour brain imaging. *Nat. Commun.* V. 5. P. 3626. <https://doi.org/10.1038/ncomms4626>

Double Covalence Bonding of Biliverdin in Near-Infrared Fluorescent Protein Prevents Their Proteolytic Degradation

Olga V. Stepanenko^{a, *} and Olesya V. Stepanenko^a

^a*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia*

^{*}*e-mail: sov@incras.ru*

In the present work, we analyze how the double covalent binding of biliverdin ligand (BV) in the near-infrared fluorescent protein iRFP670, containing two key cysteine residues, affects the stability of this biomarker to proteolytic degradation. It has been previously found that the covalent attachment of BV simultaneously with two cysteine residues is the cause of the highest fluorescence quantum yield of BV-containing near-infrared fluorescent proteins (NIR FPs) with two key cysteine residues compared to other BV-containing NIR FPs. Our data indicate that the covalent binding of BV in NIR-FP with two key cysteine residues simultaneously with two regions of the polypeptide chain, which, in addition, forms a figure-of-eight knot, leads to screening of many cleavage sites by the proteolytic enzymes trypsin and chymotrypsin in them. As a result, the covalent binding of BV in NIR FPs simultaneously with two cysteine residues not only stabilizes their structure, but their resistance to proteolytic degradation can also increase, which determines the cellular stability of biomarkers and is important for their use as fluorescent tag in the cell.

Keywords: bacterial phytochromes, near-infrared fluorescent proteins, double covalent biliverdin binding