

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ISSN 0041-3771

ЦИТОЛОГИЯ

TSITOLOGIYA

2023. Том 65

2023. Vol. 65

2



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

СОДЕРЖАНИЕ

Том 65, номер 2, 2023

Коактиватор транскрипции VOB1 (OVF1, OCA-B) в аутоиммунных заболеваниях <i>А. Н. Томилин, Н. Г. Еременко</i>	113
Активация эндогенных мезенхимных стромальных клеток как подход к регенерации тканей <i>О. В. Паюшина, Д. А. Цомартова, Е. В. Черешнева, М. Ю. Иванова, Т. А. Ломановская, М. С. Павлова, С. Л. Кузнецов</i>	119
Ростовые и молекулярные характеристики клеток глиобластом человека линий A172 и R1, резистентных к действию темозоломида <i>А. А. Пиневиц, Н. Л. Вартанян, А. В. Карташев, Л. Н. Киселева, И. В. Смирнов, Ж. Ю. Сидорова, С. П. Свитина, М. П. Самойлович</i>	131
Активность металлопротеиназ в двух линиях мезенхимных стволовых клеток плаценты от одного донора, различающихся адипогенным дифференцировочным потенциалом и характером репликативного старения <i>И. В. Воронкина, Л. В. Смагина, А. М. Кольцова, А. С. Мусорина, Г. Г. Полянская</i>	146
Влияние гипоксии и макромолекулярных краудеров на продукцию внеклеточного матрикса мезенхимными стромальными клетками эндометрия человека <i>И. Е. Перевозников, Р. Е. Ушаков, Е. Б. Бурова</i>	157
Разработка метода трехмерного культивирования мезенхимных стволовых (стромальных) клеток человека с использованием матрицы из целлюлозы <i>И. К. Кунеев, Ю. С. Иванова, Ю. А. Нащекина, Е. К. Патронова, А. В. Соколова, А. П. Домнина</i>	170
Криопротекторные характеристики дипептида L-карнозина (β -аланил-L-гистидина) <i>А. А. Мокрушин</i>	181
GFAP- и виментин-иммунопозитивные структуры эпифиза человека <i>Д. А. Суфиева, Е. А. Фёдорова, В. С. Яковлев, Д. Э. Коржевский, И. П. Григорьев</i>	191
Перициты как необходимый клеточный элемент в Transwell-модели ГЭБ <i>in vitro</i> <i>А. И. Мосягина, Е. Д. Хилажева, А. В. Моргун</i>	200
Изменение популяции незрелых нейронов пириформной коры экспериментальных животных в отдаленном периоде после стресса раннего периода жизни <i>А. Б. Салмина, Ю. А. Успенская, Ю. А. Панина, Я. В. Горина, О. Л. Лопатина</i>	206

Contents

Vol. 65, No. 2, 2023

Transcriptional coactivator BOB1 (OBF1, OCA-B) in autoimmune diseases <i>A. N. Tomilin, N. G. Yeremenko</i>	113
Activation of endogenous mesenchymal stromal cells as an approach to tissue regeneration <i>O. V. Payushina, D. A. Tsomartova, Ye. V. Chereshneva, M. Yu. Ivanova, T. A. Lomanovskaya, M. S. Pavlova, S. L. Kuznetsov</i>	119
Growth and molecular characteristics of temozolomide-resistant human A172 and R1 glioblastoma cells <i>A. A. Pinevich, N. L. Vartanyan, A. V. Kartashev, L. N. Kiseleva, I. V. Smirnov, Z. U. Sidorova, S. P. Svitina, M. P. Samoilovich</i>	131
Metalloproteinase's activity of two placenta-derived stem cells lines from a donor differing in the adipogenic differentiation potential and nature of replicative senescence <i>I. V. Voronkina, L. V. Smagina, A. M. Koltsova, A. S. Musorina, G. G. Poljanskaya</i>	146
An impact of hypoxia and macromolecular crowders on extracellular matrix deposition by human endometrial mesenchymal stromal cells <i>I. E. Perevoznikov, R. E. Ushakov, E. B. Burova</i>	157
Development of method for three-dimensional cultivation of human mesenchymal stem/stromal cells using cellulose scaffolds <i>I. K. Kuneev, J. S. Ivanova, Y. A. Nashchekina, E. K. Patronova, A. V. Sokolova, A. P. Domnina</i>	170
Cryoprotective characteristics of L-carnosine dipeptide (β -alanyl-L-histidine) <i>A. A. Mokrushin</i>	181
GFAP- and vimentin-containing structures in human pineal gland <i>D. A. Sufieva, E. A. Fedorova, V. S. Yakovlev, D. E. Korzhevskii, I. P. Grigorev</i>	191
Pericytes as an essential part in Transwell models of the BBB <i>in vitro</i> <i>A. I. Mosiagina, E. D. Khilazheva, A. V. Morgun</i>	200
Changes in the population of immature neurons in the pyriform cortex of experimental animals after early life stress <i>A. B. Salmina, Yu. A. Uspenskaya, Yu. A. Panina, Ya. V. Gorina, O. L. Lopatina</i>	206

УДК 571.27

КОАКТИВАТОР ТРАНСКРИПЦИИ **ВОВ1 (ОВF1, ОСА-В)** В АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

© 2023 г. А. Н. Томилин¹ *, Н. Г. Еременко²

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Университет Нанта, Нант, 44035 Франция

*E-mail: a.tomilin@incras.ru

Поступила в редакцию 27.11.2022 г.

После доработки 05.12.2022 г.

Принята к публикации 06.12.2022 г.

Аутоиммунные заболевания, несмотря на значительные усилия биомедицины на протяжении уже нескольких десятилетий, продолжают оставаться по большей части неизлечимыми и, более того, плохо понятными с точки зрения молекулярных механизмов их возникновения и развития. Общеизвестно, что в основе этих заболеваний лежит сбой в работе адаптивной иммунной системы, главным атрибутом которой являются аутореактивные В- и Т-лимфоциты. Ряд экспериментальных данных, накопленных за последние несколько лет, свидетельствуют о ключевой роли транскрипционного коактиватора **ВОВ1** в появлении аутореактивных лимфоцитов. Постулировано, что **ВОВ1** влияет на транскрипцию и локальный эпигенетический статус хроматина опосредованно, а именно через селективное взаимодействие с ДНК-связывающими **POU**-доменными транскрипционными факторами – экспрессирующимся во всех клетках **ОСТ1**, и специфическим для В-клеток **ОСТ2**, стабилизируя связывание этих **ОСТ**-факторов с ДНК. В обзоре приведены последние сведения о проаутоиммунной активности **ВОВ1**, обозначены перспективы использования этого белка в качестве мишени при разработке фармацевтических препаратов, нацеленных на лечение ряда аутоиммунных заболеваний.

Ключевые слова: **ВОВ1**, **ОСА-В**, **ОВF1**, *Pou2af1*, **ОСТ1**, **ОСТ2**, аутоиммунные заболевания, аутореактивные Т- и В-клетки

DOI: 10.31857/S0041377123020116, **EDN:** NEQCUA

Серия недавних исследований высветила новый аспект функционирования коактиватора транскрипции **ВОВ1 (ОВF1, ОСА-В)**, связанный с развитием аутоиммунных патологий человека, некоторые из которых являются летальными. Это обстоятельство подчеркивает важность детального изучения биологической роли этого белка (как у пациентов, страдающих аутоиммунными заболеваниями, так и на животных моделях), а также молекулярных механизмов его работы. Особенности функционирования **ВОВ1** совместно с ДНК-связывающими белками **POU**-доменного семейства **ОСТ1** и **ОСТ2** были недавно нами освещены (Yeremenko et al., 2021). В текущем обзоре приводятся обновленные сведения о биологической роли **ВОВ1** в различных компартаментах адаптивной иммунной системы.

РОЛЬ **ВОВ1** В В-КЛЕТКАХ

Первые свидетельства важной биологической роли **ВОВ1** были получены при изучении фенотипа

мышей, нокаутированных по гену *Pou2af1*, который кодирует этот белок. Было показано, что у таких мышей в лимфатических узлах и селезенке не развиваются герминативные центры (ГЦ) и, как следствие, не продуцируются антитела переключенных классов (Kim et al., 1996; Nielsen et al., 1996; Schubart et al., 1996). Недавние исследования продемонстрировали, что **ВОВ1** вместе с **ОСТ2** и **MEF2B** необходим для экспрессии **VCL6**, главного регулятора развития В-клеток в ГЦ (Hellmuth et al., 2019). Интерпретация фенотипа нокаута по *Pou2af1* осложняется тем, что **ВОВ1** необходим для развития В-клеток на нескольких стадиях (Brunner, Wirth, 2006; Teitell, 2003). Для того, чтобы ответить на вопрос, являются ли дефекты, наблюдаемые на поздних стадиях развития В-клеток у **ВОВ1**-дефицитных мышей, следствием нарушенного раннего развития В-клеток и на какой конкретно стадии развития В-клеток экспрессия **ВОВ1** необходима для формирования ГЦ, была создана линия мышей, которая позволила удалить **ВОВ1** на разных стадиях развития В-клеток. Посредством условного нокаута, с помощью специфических для В-клеточных стадий Cre-линий мышей, были проанализированы последствия утери функ-

Принятые сокращения: ГЦ – герминативный центр, СД1 – сахарный диабет 1 типа.

ции VOB1 в пре-В-клетках, зрелых В-клетках или В-клетках ГЦ (Betzler et al., 2021). Такой подход показал, что VOB1 необходим как для раннего (антиген-независимого), так и для более позднего (антиген-зависимого) развития В-клеток, и что для эффективного формирования ГЦ экспрессия VOB1 необходима на протяжении всего онтогенеза В-клеток. Таким образом, неспособность формировать ГЦ является автономным дефектом В-лимфоцитов ГЦ и не может быть объяснена исключительно дефектами раннего созревания В-клеток (Betzler et al., 2021).

В своей недавней работе Song с соавторами построили комплексную геномную карту сайтов связывания VOB1, OST1 и OST2 (Song et al., 2021). Путем интеграции данных ChIP-seq со специфическими метками гистонов и сравнительного РНК-секвенирования VOB1-дефицитных и В-клеток дикого типа, сайты связывания ДНК трех транскрипционных факторов были ассоциированы со статусом активности хроматина, а также была создана карта прямых генов-мишеней VOB1. Большинство VOB1- и OST1-связывающих сайтов находились в промоторных областях, тогда как многие OST2-связывающие сайты располагались в энхансерах. Детальное картирование геномных сайтов связывания OST1, OST2 и VOB1 в В-клетках показало, что почти все сайты связывания VOB1 (~8000) перекрываются с сайтами связывания OST1 и/или OST2 (~13000 и 32000 соответственно), что соответствует концепции, согласно которой VOB1 при связывании ДНК зависит от OST-факторов. На основании полученных результатов был сделан основной вывод о том, что VOB1 стабилизирует связывание этих факторов на ДНК и способствует экспрессии многочисленных ключевых генов В-клеток ГЦ (например, *FOXO1*, *AID*, *MEF2B* и *BACH2*). Важно отметить, что в списке прямых мишеней VOB1 был и *BCL6* – один из главных транскрипционных факторов программы экспрессии генов В-клеток ГЦ. Авторы предложили модель, согласно которой VOB1, посредством OST1 и OST2, координирует программу развития В-клеток в ГЦ через активацию генов запуска и поддержания этой программы и репрессию генов выхода из нее (Song et al., 2021).

РОЛЬ VOB1 В Т-КЛЕТКАХ

Результаты исследований роли VOB1 в Т-клетках, проводившихся на различных нокаутных моделях мышей, далеко не всегда однозначны и, нередко, противоречивы. VOB1 не экспрессируется в развивающихся и наивных Т-клетках, однако его экспрессия обнаруживается после стимуляции Т-клеточных рецепторов антигенами или при обработке РМА/иономицином (Moriuchi and Moriuchi, 2001; Sauter and Matthias, 1997; Zwilling et al., 1997). Также было показано, что у *Pou2af1*-дефицитных мышей заметно редуцировано число CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (Brunner et al., 2007), и что VOB1 контролирует ба-

ланс между Th1- и Th2-опосредованным иммунным ответом посредством OST1-зависимого связывания с промоторами генов *IFN γ* и *IL2* (Brunner et al., 2007). Последующее изучение мышей с избирательным нокаутом VOB1 в Т-клетках показало противоположные результаты. Так, Ломбард-Ваднаис и соавторы предположили, что, несмотря на экспрессию, VOB1 не действует как транскрипционный коактиватор в активированных Т-клетках, включая субпопуляцию фолликулярных Т-хелперов (T_{FH}), и что отсутствие экспрессии VOB1 именно в В-клетках ответственно за большую часть Т-клеточно-ассоциированных фенотипических проявлений, ранее выявленных у *Pou2af1*^{-/-} мышей (Lombard-Vadnaï et al., 2022). Эти данные резко контрастируют с результатами другой группы, которая проанализировала последствия удаления VOB1 в Т-клетках методом условного нокаута в присутствии иммунокомпетентных В-лимфоцитов. Нокаут VOB1 в CD4⁺ Т-клетках, а также в T_{FH} клетках привел к нарушению образования ГЦ, демонстрируя, что нарушение реакции ГЦ, описанное для мышей дефицитных по VOB1 в зародышевой линии, не может быть отнесено исключительно к В-клеточному компартменту. Более того, было показано, что VOB1 необходим для дифференцировки T_{FH}-клеток, играющих важную роль в формировании ГЦ (Betzler et al., 2022).

Опуская достаточно обширную литературу, в совокупности, можно указать, что большинство результатов указывают на ключевую роль VOB1 в биологии CD4⁺ Т-клеток (Yamashita et al., 2016). В 2015 г. была опубликована важная работа, которая показала, что в CD4⁺ Т-клетках комплекс VOB1/OST1 регулирует транскрипцию нескольких ключевых иммуномодулирующих генов-мишеней, включая *IL-2*, *IFN γ* , *IL-17A* и *IL-21* (Shakya et al., 2015). В отсутствии VOB1 практически не образуются какие-либо клетки памяти, а те, которые образуются, слабо реагируют на повторную встречу с антигеном. Авторы предположили, что механически VOB1 удаляет ингибирующие модификации хроматина путем рекрутирования гистонлизиндеметилазы Jmjd1a (Kdm3a), предотвращая репрессию генов-мишеней и поддерживая локально открытую структуру хроматина, обеспечивая таким образом иммунологическую память (Shakya et al., 2015). Последующее исследование той же группы с использованием различных генетических подходов и инструментов (условного нокаута VOB1 в Т-клетках, его эктопической экспрессии, а также репортерной линии VOB1-B-mCherry, демонстрирующей высокую экспрессию VOB1 в центральных CD4⁺ Т-клетках памяти) показало, что повышенная экспрессия VOB1 является прогностическим признаком клеток с повышенной жизнеспособностью и потенциалом запоминания. Также это исследование подтвердило, что VOB1 необходим и достаточен для формирования CD4⁺ Т-клеток памяти *in vivo* (Sun et al., 2022).

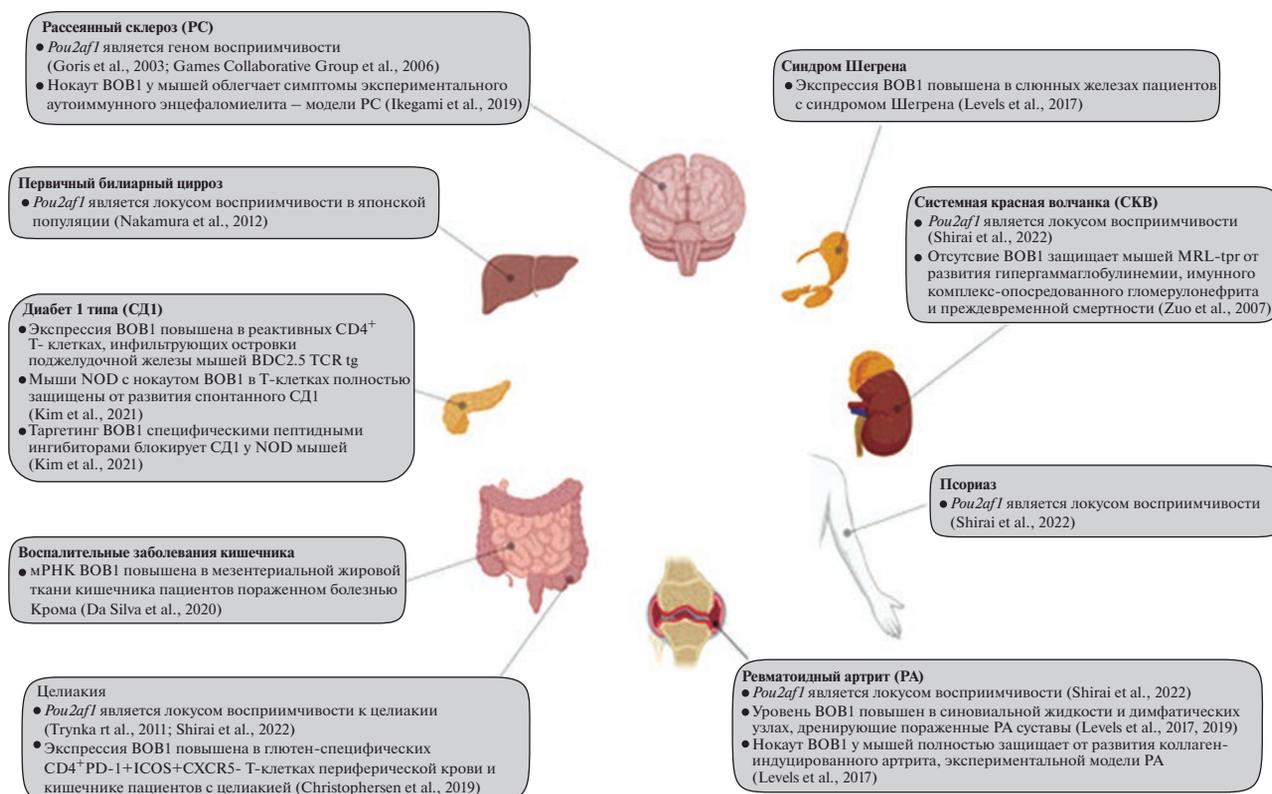


Рис. 1. Доказательства участия *VOB1* в развитии аутоиммунных заболеваний человека (рисунок подготовлен с помощью программного пакета BioRender.com).

VOB1 В АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Серия недавних исследований высветила новый аспект биологии *VOB1*, а именно его ключевую роль в развитии аутоиммунных заболеваний. Важно подчеркнуть, что ген *Pou2af1* высоко консервативен у млекопитающих и человека, и к настоящему времени накапливаются многочисленные доказательства того, что генетические варианты либо в самом локусе *Pou2af1* либо вблизи него ассоциированы с различными аутоиммунными заболеваниями человека, такими как рассеянный склероз, целиакия, первичный билиарный цирроз, ревматоидный артрит, болезнь Грейвса, сахарный диабет 1 типа (СД1), псориаз и системная красная волчанка (Games Collaborative et al., 2006; Goris et al., 2003; Nakamura et al., 2012; Shirai et al., 2022; Trynka et al., 2011) (рис. 1).

Помимо генетической ассоциации было показано, что повышенная экспрессия *VOB1* в тканях-мишенях ассоциирована с системными аутоиммунными нарушениями (Levels et al., 2017; Levels et al., 2019; McDonough et al., 2019; da Silva et al., 2020). В частности, scRNA-seq анализ показал, что повышенные уровни экспрессии *VOB1* является признаком аутореактивных Т-клеток, инфильтрирующих синовиальную мембрану в случае ревматоидного артрита (Rao et al., 2017), кишечный эпителий – в случае целиакии (Christophersen et al., 2019), а также поджелу-

дочную железу – в случае СД1 (<http://www.im-mngen.org/databrowser/index.html>). В то же время, нокаут гена *Pou2af1* защищает мышей от развития болезни в ряде моделей индуцируемых и спонтанных аутоиммунных заболеваний (Sun et al., 2003; Zuo et al., 2007; Levels et al., 2017; Ikegami et al., 2019; McDonough et al., 2019; Kim et al., 2020).

Поскольку (1) стойкое воздействие антигена является типичным признаком аутоиммунных реакций, а (2) Т-клетки памяти могут способствовать развитию аутоиммунного воспаления, тот факт, что *VOB1* необходим для формирования памяти у Т-клеток и иммунного ответа при повторном контакте с тем же антигеном, требует переоценки роли этого белка в развитии аутоиммунных заболеваний, опосредованных Т-клетками. Поскольку уровень *VOB1* сильно повышен в аутореактивных $CD4^+$ Т-клетках, избирательно атакующих β -клетки поджелудочной железы при СД1, было высказано предположение, что условный Т-специфический нокаут *Pou2af1* должен защищать мышей от развития СД1. Действительно, недавнее исследование продемонстрировало, что предрасположенные к диабету NOD/ShiLtJ мыши полностью защищены от спонтанного СД1 при нокауте *Pou2af1* в Т-клетках (Kim et al., 2020). Эта защита связана либо с уменьшением инфильтрации островков поджелудочной железы Т-клетками с

аутореактивными специфическими рецепторами, либо с их анергией, либо же со снижением экспрессии провоспалительных цитокинов и хемокинов, включая IFN γ и CCL1 (Kim et al., 2020), которые ранее были определены как прямые мишени BOB1 (Shakya et al., 2015). Пептидный ингибитор белка BOB1 нормализовал уровень глюкозы, уменьшил инфильтрацию Т-клеток и экспрессию провоспалительных цитокинов у мышей NOD с ново-приобретенным диабетом (Kim et al., 2020), подтверждая тем самым идею о том, что BOB1 является мощным регулятором аутоиммунных процессов и перспективной мишенью для фармакологического ингибирования.

Таким образом, основываясь на многочисленных свидетельствах, можно предположить, что постоянное воздействие аутоантигена(ов) в контексте хронического воспаления повышает экспрессию регулятора транскрипции BOB1, который, взаимодействуя с факторами транскрипции OCT1 и OCT2 через еще не полностью определенные механизмы, индуцирует аутоиммунный ответ, способствуя дальнейшему усилению хронических воспалительных процессов в аутоиммунных очагах. Исследование механизмов, лежащих в основе работы BOB1/OCT1(2) в контексте развития аутоиммунных заболеваний, может стать в будущем основой для поиска потенциальных терапевтических мишеней при разработке методов лечения этих заболеваний.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-14-00369).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При подготовке работы не проводились какие-либо исследования с использованием животных или людей в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Betzler A.C., Fiedler K., Hoffmann T.K., Fehling H.J., Wirth T., Brunner C. 2022. BOB.1/OBF.1 is required during B-cell ontogeny for B-cell differentiation and germinal center function. *Eur. J Immunol.* V. 52. P. 404.
- Betzler A.C., Fiedler K., Kokai E., Wirth T., Hoffmann T.K., Brunner C. 2021. Impaired Peyer's patch development in BOB.1/OBF.1-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* V. 51. P. 1860.
- Brunner C., Sindrilaru A., Girkontaite I., Fischer K.D., Sunderkotter C., Wirth T. 2007. BOB.1/OBF.1 controls the balance of TH1 and TH2 immune responses. *EMBO J.* V. 26. P. 3191.
- Brunner C., Wirth T. 2006. Btk expression is controlled by Oct and BOB.1/OBF.1. *Nucleic Acids Res.* V. 34. P. 1807.
- Christoffersen A., Lund E.G., Snir O., Sola E., Kanduri C., Dahal-Koirala S., Zuhlke S., Molberg O., Utz P.J., Rohani-Pichavant M., Simard J.F., Dekker C.L., Lundin K.E.A., Sollid L.M., Davis M.M. 2019. Distinct phenotype of CD4(+) T cells driving celiac disease identified in multiple autoimmune conditions. *Nat. Med.* V. 25. P. 734.
- da Silva F.A.R., Pascoal L.B., Dotti I., Setsuko Ayrizono M.L., Aguilar D., Rodrigues B.L., Arroyes M., Ferrer-Picon E., Milanski M., Velloso L.A., Fagundes J.J., Salas A., Leal R.F. 2020. Whole transcriptional analysis identifies markers of B, T and plasma cell signaling pathways in the mesenteric adipose tissue associated with Crohn's disease. *J. Transl. Med.* V. 18. P. 44.
- Games Collaborative G., Ban M., Booth D., Heard R., Stewart G., Goris A., Vandenbroeck K., Dubois B., Laaksonen M., Ilonen J., Alizadeh M., Edan G., Babron M. C., Brassat D., Clanet M. et al. 2006. Linkage disequilibrium screening for multiple sclerosis implicates JAG1 and POU2AF1 as susceptibility genes in Europeans. *J. Neuroimmunol.* V. 179. P. 108.
- Goris A., Sawcer S., Vandenbroeck K., Carton H., Billiau A., Setaakis E., Compston A., Dubois B. 2003. New candidate loci for multiple sclerosis susceptibility revealed by a whole genome association screen in a Belgian population. *J. Neuroimmunol.* V. 143. P. 65.
- Hellmuth J.C., Chu C.-S., Singh R., Skrabanek L.A., Doane A., Elemento O., Roeder R.G., Melnick A. 2019. An OCT2/OCA-B/MEF2B ternary complex controls the activity and architecture of an essential locus control region for normal and malignant germinal center B-cells. *Blood.* V. 134. Suppl. 1. P. 24.
- Ikegami I., Takaki H., Kamiya S., Kamekura R., Ichimiya S. 2019. Bob1 enhances RORgammat-mediated IL-17A expression in Th17 cells through interaction with RORgammat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 514. P. 1167.
- Kim H.P., Shakya A., Shen Z., German C., Ibarra A., Jafek J.L., Lin N.-P., Evavold B.D., Chou D.H.-C., Jensen P.E., He X., Tantin D. 2020. Targeting OCA-B/Pou2af1 blocks type-1 diabetes and reduces infiltration of activated, islet-reactive T cells. In bioRxiv.
- Kim U., Qin X.F., Gong S., Stevens S., Luo Y., Nussenzweig M., Roeder R. G. 1996. The B-cell-specific transcription coactivator OCA-B/OBF-1/Bob-1 is essential for normal production of immunoglobulin isotypes. *Nature.* V. 383. P. 542.
- Levels M.J., Fehres C.M., van Baarsen L.G.M., van Uden N.O.P., Germar K., O'Toole T.G., Blijdorp I.C.J., Semmelink J.F., Doorenspleet M.E., Bakker A.Q., Krasavin M., Tomilin A., Brouard S., Spits H., Baeten D.L.P., Yeremenko N.G. 2019. BOB.1 controls memory B-cell fate in the germinal center reaction. *J. Autoimmun.* V. 101. P. 131.
- Levels M.J., Van Tok M.N., Cantaert T., Canete J.D., Kroese F.G., Germar K., Spits H., Baeten D.L., Yeremenko N.G. 2017. The transcriptional coactivator Bob1 is associated with pathologic B cell responses in autoimmune tissue inflammation. *Arthritis Rheumatol.* V. 69. P. 750.

- Lombard-Vadnais F., Lacombe J., Chabot-Roy G., Ferron M., Lesage S. 2022. OCA-B does not act as a transcriptional coactivator in T cells. *Immunol. Cell Biol.* V. 100. P. 338.
- McDonough J.E., Ahangari F., Li Q., Jain S., Verleden S.E., Herazo-Maya J., Vukmirovic M., DeLuijs G., Tzouveleakis A., Tanabe N., Chu F., Yan X., Verschakelen J., Homer R. J., Manatakis D.V., et al. 2019. Transcriptional regulatory model of fibrosis progression in the human lung. *JCI Insight.* V. 4. e131597.
- Moriuchi M., Moriuchi H. 2001. Octamer transcription factors up-regulate the expression of CCR5, a coreceptor for HIV-1 entry. *J. Biol. Chem.* V. 276. P. 8639.
- Nakamura M., Nishida N., Kawashima M., Aiba Y., Tanaka A., Yasunami M., Nakamura H., Komori A., Nakamuta M., Zeniya M., Hashimoto E., Ohira H., Yamamoto K., Onji M., Kaneko S. et al. 2012. Genome-wide association study identifies TNFSF15 and POU2AF1 as susceptibility loci for primary biliary cirrhosis in the Japanese population. *Am. J. Hum. Genet.* V. 91. P. 721.
- Nielsen P.J., Georgiev O., Lorenz B., Schaffner W. 1996. B lymphocytes are impaired in mice lacking the transcriptional co-activator Bob1/OCA-B/OBF1. *Eur. J. Immunol.* V. 26. P. 3214.
- Rao D.A., Gurish M.F., Marshall J.L., Slowikowski K., Fonseka C.Y., Liu Y., Donlin L.T., Henderson L.A., Wei K., Mizoguchi F., Teslovich N.C., Weinblatt M.E., Massarotti E.M., Coblyn J.S., Helfgott S.M. et al. 2017. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature.* V. 542. P. 110.
- Sauter P., Matthias P. 1997. The B cell-specific coactivator OBF-1 (OCA-B, Bob-1) is inducible in T cells and its expression is dispensable for IL-2 gene induction. *Immunobiology.* V. 198. P. 207.
- Schubart D.B., Rolink A., Kosco-Vilbois M.H., Botteri F., Matthias P. 1996. B-cell-specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob1 required for immune response and germinal centre formation. *Nature.* V. 383. P. 538.
- Shakya A., Goren A., Shalek A., German C. N., Snook J., Kuchroo V.K., Yosef N., Chan R.C., Regev A., Williams M.A., Tantin D. 2015. Oct1 and OCA-B are selectively required for CD4 memory T cell function. *J. Exp. Med.* V. 212. P. 2115.
- Shirai Y., Nakanishi Y., Suzuki A., Konaka H., Nishikawa R., Sonehara K., Namba S., Tanaka H., Masuda T., Yaga M., Satoh S., Izumi M., Mizuno Y., Jo T., Maeda Y. et al. 2022. Multi-trait and cross-population genome-wide association studies across autoimmune and allergic diseases identify shared and distinct genetic component. *Ann. Rheum. Dis.* V. 81. P. 1301.
- Song S., Cao C., Choukrallah M.A., Tang F., Christofori G., Kohler H., Wu F., Fodor B.D., Frederiksen M., Willis S.N., Jackson J.T., Nutt S.L., Dirnhofer S., Stadler M.B., Matthias P. 2021. OBF1 and Oct factors control the germinal center transcriptional program. *Blood.* V. 137. P. 2920.
- Sun W., Kim H., Perovanovic J., Hughes E., Du J., Ibarra A., Scott J.H., Williams M.A., Tantin D. 2022. Transcription coactivator OCA-B/Pou2af1 is necessary and sufficient to promote T cell-intrinsic CD4 memory. *BioRxiv.* <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.09.21.508912v1>.
- Sun J., Matthias G., Mihatsch M.J., Georgopoulos K., Matthias P. 2003. Lack of the transcriptional coactivator OBF-1 prevents the development of systemic lupus erythematosus-like phenotypes in Aiolos mutant mice. *J. Immunol.* V. 170. P. 1699.
- Teitell M.A. 2003. OCA-B regulation of B-cell development and function. *Trends Immunol.* V. 24. P. 546.
- Trynka G., Hunt K.A., Bockett N.A., Romanos J., Mistry V., Szperl A., Bakker S.F., Bardella M.T., Bhaw-Rosun L., Castillejo G., de la Concha E.G., de Almeida R.C., Dias K.R., van Diemen C.C., Dubois P.C. et al. 2011. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat. Genet.* V. 43. P. 1193.
- Yamashita K., Kawata K., Matsumiya H., Kamekura R., Jitsukawa S., Nagaya T., Ogasawara N., Takano K., Kubo T., Kimura S., Shigehara K., Himi T., Ichimiya S. 2016. Bob1 limits cellular frequency of T-follicular helper cells. *Eur. J. Immunol.* V. 46. P. 1361.
- Yeremenko N., Danger R., Baeten D., Tomilin A., Brouard S. 2021. Transcriptional regulator BOB.1: Molecular mechanisms and emerging role in chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* V. 20. P. 102833.
- Zuo J., Ge H., Zhu G., Matthias P., Sun J. 2007. OBF-1 is essential for the generation of antibody-secreting cells and the development of autoimmunity in MRL-lpr mice. *J. Autoimmun.* V. 29. P. 87.
- Zwilling S., Dieckmann A., Pfisterer P., Angel P., Wirth T. 1997. Inducible expression and phosphorylation of coactivator BOB.1/OBF.1 in T cells. *Science.* V. 277. P. 221.

Transcriptional Coactivator BOB1 (OBF1, OCA-B) in Autoimmune Diseases

A. N. Tomilin^{a,*} and N. G. Yeremenko^b

^aInstitute of Cytology RAS, St-Petersburg, 194064 Russia

^bUniversity of Nantes, Nantes, 44035 France

*e-mail: a.tomilin@incras.ru

Despite significant efforts in biomedicine for several decades, autoimmune diseases continue to remain largely incurable and, moreover, poorly understood in terms of the molecular mechanisms underlying their onset and progression. It is generally accepted that autoimmune pathologies result from a malfunction of the adaptive immune system in genetically susceptible individuals leading to the appearance of autoreactive B- and T-lymphocytes. However, the exact molecular pathways that drive the activation of autoreactive lymphocytes, leading to the amplification

and perpetuation of self-directed immune responses are largely unknown. A number of experimental data accumulated over the past few years indicate a key role of BOB1, namely its imbalanced expression, in the onset of autoreactive lymphocytes. It has been postulated that the coactivator BOB1 affects transcription and local chromatin state indirectly, via selective interaction with DNA-binding POU-domain transcription factors – ubiquitous OCT1 and B-cell-specific OCT2, stabilises the binding of the OCT factors to DNA. The review lists the latest evidences of an important role of BOB1 in pathogenesis of autoimmune diseases and positions this protein as a promising target in the treatment of these diseases.

Keywords: BOB1, OCA-B, OBF1, POU2AF1, OCT1, OCT2, autoimmune diseases, autoreactive T- и B-cells

УДК 611.018.21:612.014.467:616.03.93

АКТИВАЦИЯ ЭНДОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КАК ПОДХОД К РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ

© 2023 г. О. В. Паюшина¹, *, Д. А. Цомартова¹, Е. В. Черешнева¹, М. Ю. Иванова¹,
Т. А. Ломановская¹, М. С. Павлова¹, С. Л. Кузнецов¹

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России,
Москва, 119991 Россия

*E-mail: payushina@mail.ru

Поступила в редакцию 16.09.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 31.10.2022 г.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК), оказывающие комплексное прорегенеративное влияние на поврежденные ткани, представляют собой перспективный ресурс для клеточной терапии широкого спектра заболеваний. Однако трансплантация пациенту аутологичных или донорских МСК сопряжена с рядом проблем, таких как вариабельность свойств клеток в зависимости от источника и условий культивирования, снижение их терапевтического потенциала и вероятность приобретения иммуногенности либо туморогенности в ходе экспансии *in vitro*, инвазивность процедуры выделения. Одним из способов избежать этих проблем может служить воздействие на эндогенные МСК путем стимуляции их направленной миграции в тканевые дефекты без необходимости извлечения из организма, размножения *in vitro* и обратного введения пациенту. В настоящем обзоре рассмотрены подходы к активации мобилизации МСК из тканевых ниш и (или) стимуляции их миграции в целевую область, которые могут рассматриваться в качестве более безопасной, а возможно, и более эффективной альтернативы трансплантации МСК.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, регенеративная медицина, мобилизация, миграция, хемоаттрактанты

DOI: 10.31857/S0041377123020062, **EDN:** LWRDIV

Мезенхимные стромальные клетки (МСК), способные к дифференцировке в клеточные компоненты тканей мезенхимного происхождения и продукции разнообразных биологически активных веществ, играют важнейшую роль в регенерации различных тканей и органов и представляют собой один из наиболее перспективных ресурсов для клеточной терапии широкого спектра заболеваний. Способность МСК стимулировать выживание и пролиферацию клеток поврежденной ткани, усиливать ангиогенез, подавлять избыточное воспаление и развитие фиброза, а в некоторых случаях и непосредственно замещать утраченные клетки, дифференцируясь в соответствующем направлении, позволяет с успехом использовать их для лечения многих патологических состояний (Uder et al., 2018; Andrzejewska et al., 2019). В частности, в клинических испытаниях получены обнадеживающие результаты введения донорских или аутологичных МСК пациентам с нейродегенеративными и аутоиммунными заболеваниями, реакцией “трансплантат против хо-

зяина”, инфарктом миокарда, воспалительными заболеваниями кишечника, респираторными заболеваниями, включая COVID-19, и рядом других патологий (Uder et al., 2018; Levy et al., 2020; Zhou et al., 2021).

Однако клиническое использование МСК сопряжено с рядом трудностей и ограничений, из-за которых терапевтическая эффективность их трансплантации во многих случаях оказывается ниже ожидаемой. Серьезную проблему представляет вариабельность свойств МСК в зависимости от их тканевого источника, индивидуальных характеристик донора, методов выделения и условий культивирования (Levy et al., 2020; Zhou et al., 2021). Как правило, получение достаточного для трансплантации числа клеток требует их размножения в культуре, которое может снижать их терапевтический потенциал вследствие клеточного старения (Zhou et al., 2021). Жизнеспособность и прорегенеративные свойства МСК могут снижаться также при криоконсервации клеточных культур и их последующем оттаивании (Levy et al., 2020) или при прохождении через инъекционную иглу в процессе введения пациенту (Lang et al., 2017). Несмотря на низкую иммуногенность МСК, при использовании аллогенных клеток она может повыситься под влия-

Принятые сокращения. КСФ – колониестимулирующий фактор; Г-КСФ и ГМ-КСФ – соответственно гранулоцитарный и гранулоцитарно-макрофагальный КСФ.

нием провоспалительных факторов реципиента, что приведет к отторжению трансплантированных клеток иммунной системой (Zhou et al., 2021). Более того, экспансия МСК в культуре способна не только снизить их терапевтическую эффективность, но и создать определенные риски для пациента.

Так, было показано, что в процессе культивирования *in vitro* МСК приобретают прокоагулянтную активность вследствие экспрессии ими тканевого фактора, который при последующем системном введении клеток взаимодействует с факторами свертывания крови реципиента, что может привести к тромбозам (Tatsumi et al., 2013). Не исключена и спонтанная трансформация культивируемых МСК с приобретением ими туморогенности (Pan et al., 2014). И, наконец, к недостаткам использования МСК можно добавить инвазивность процедур их получения из наиболее клинически значимых источников, таких как костный мозг и жировая ткань.

В настоящем обзоре рассмотрено использование присущей МСК тропности к тканевым дефектам как один из способов избежать этих проблем. МСК практически повсеместно распространены по организму, локализуясь в различных органах по ходу кровеносных сосудов, в положении перицитов или адвентициальных клеток (Gomez-Salazar et al., 2020). При повреждении тканей они способны выходить в кровоток и направленно мигрировать в область дефекта для участия в регенеративном процессе путем регуляторного влияния на резидентные клетки (Fujita R. et al., 2015; Lin et al., 2017). Способность МСК находить и восстанавливать поврежденные ткани дает основания для разработки методов регенеративной медицины с использованием эндогенных клеток, без необходимости их извлечения из организма, размножения *in vitro* и обратного введения пациенту. Такой подход, предполагающий активацию мобилизации МСК из тканевых ниш и (или) стимуляцию их миграции в целевую область, позволяет обойти многие вышеперечисленные трудности и может рассматриваться в качестве более безопасной, а возможно, и более эффективной альтернативы трансплантации МСК.

МОБИЛИЗАЦИЯ МСК В КРОВОТОК

Имеющиеся в литературе данные о присутствии МСК в периферической крови здорового организма неоднозначны. Так, одни авторы обнаруживают в кровотоке человека клетки с характеристиками МСК (Mansilla et al., 2006; Wiegner et al., 2018; Lin et al., 2019), тогда как другие сообщают об их крайней малочисленности (Kuznetsov et al., 2007; Churchman et al., 2020) или полном отсутствии (Bui et al., 2010; Hoogduijn et al., 2014). Аналогичные разноречивые данные получены и для животных, таких как лошади (Koerner et al., 2006; Spaas et al., 2013) и свиньи (Heino et al., 2012; Calle et al., 2018). Возможно, эти противоречия связаны с неодинаковыми

методами оценки содержания МСК либо с индивидуальными различиями.

Известно, в частности, что у пожилых людей численность циркулирующих МСК меньше, чем у молодых (Iso et al., 2012). Повреждение различных тканей и органов во многих случаях сопровождается появлением в периферической крови значительного числа МСК, что может свидетельствовать об их мобилизации из тканевых ниш для последующей миграции в зону поражения. Появление или повышение содержания циркулирующих МСК отмечено у пациентов с дыхательной недостаточностью, подвергающихся экстракорпоральной мембранной оксигенации (Bui et al., 2010; Patry et al., 2020), с ожогами кожи (Mansilla et al., 2006), раковыми опухолями (van der Velden et al., 2018), множественным склерозом (Emamnejad et al., 2019), заболеваниями сердца (Iso et al., 2012; Marketou et al., 2015), повреждениями костей (Hoogduijn et al., 2014; Churchman et al., 2020). Выход МСК в кровоток был показан и в экспериментах на животных — на модели повреждения роговицы у мышей (Lan et al., 2012), а также хронической гипоксии (Rochefort et al., 2006) и разрыва передней крестообразной связки (Maerz et al., 2017) у крыс. В то же время у людей с заболеваниями печени, легких и отторжением трансплантированного сердца появления МСК в крови обнаружено не было (Hoogduijn et al., 2014). Более того, некоторые авторы сообщают о снижении численности циркулирующих МСК у пациентов с отравлением сернистым ипритом (Ghazanfari et al., 2019) и множественными травмами (Wiegner et al., 2018), хотя подобные изменения могут отражать не подавление мобилизации МСК, а их усиленную миграцию в область повреждения.

Таким образом, выход МСК в кровоток, спонтанный или индуцированный повреждением тканей, в принципе возможен, хотя и не всегда бывает достаточно эффективен. С учетом неоднократно показанной способности циркулирующих МСК к миграции в зону дефекта под влиянием выделяемых поврежденной тканью хемоаттрактантов (Fujita R. et al., 2015; Inuma et al., 2015; Jin et al., 2018) стимуляция их мобилизации в периферическую кровь может быть использована для усиления регенеративного процесса.

Повреждение тканей сопровождается выбросом в кровь различных цитокинов, хемокинов и прочих регуляторных молекул, в том числе гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) (Struzyna et al., 1995; Bradley et al., 2017), субстанции Р (Hong et al., 2009; Lan et al., 2012), трансформирующего фактора роста β (TGF- β) (Wan et al., 2012), фактора стромального происхождения-1 (SDF-1) (Lan et al., 2012; Patry et al., 2018; Emamnejad et al., 2019), фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) (Hong et al., 2009; Patry et al., 2018). Все эти вещества способны воздействовать на находящиеся в тканевых нишах МСК, регулируя их выход в кровоток.

Так, SDF-1, иначе называемый хемокином CXCL12, экспрессируется микроокружением костного мозга и других тканей, и его связывание с рецептором CXCR4 на поверхности МСК способствует удержанию последних в ткани. Мобилизации МСК в кровь можно достичь с помощью фармакологического агента AMD3100 (периксафора), который, являясь антагонистом CXCR4, обратимо блокирует взаимодействие клеток с SDF-1, что приводит к их выходу из ниши (Liu et al., 2018). В то же время циркулирующий SDF-1, высвобождающийся из поврежденных тканей, является хемотактическим стимулом для МСК и, вероятно, привлекает их в кровотоки. В частности, имеются данные, что мобилизация МСК в кровь при повреждении роговицы (Lan et al., 2012) и множественном склерозе (Emamnejad et al., 2019) сопровождается повышением уровня SDF-1 в сыворотке.

Известно, что содержание МСК в крови повышается в ответ на гипоксию, и этот эффект опосредован фактором, индуцируемым гипоксией (HIF-1), который активирует экспрессию гена *CXCL12*, кодирующего SDF-1 (Liu et al., 2011). По-видимому, с влиянием на ось SDF-1/CXCR4 связан также эффект Г-КСФ, способность которого вызывать выход МСК в кровь была неоднократно продемонстрирована в экспериментах (Deng et al., 2011; Garcia et al., 2015; Wu et al., 2017), а также гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), обладающего еще более высокой по сравнению с Г-КСФ способностью мобилизовать МСК из костного мозга в кровь (Kim et al., 2018a). В экспериментах *in vitro* было показано, что нокаут гена *CXCR4* в МСК отменяет индуцированную обоими факторами миграцию этих клеток (Kim et al., 2018a).

Выход МСК в кровь может быть вызван и субстанцией Р, индуцирующей их хемотактическую миграцию посредством активации сигнальных путей киназ ERK и Akt (Dubon, Park, 2016). Внутривенное введение этого вещества экспериментальным животным является достаточным для мобилизации МСК (Hong et al., 2009). К аналогичному результату приводит и введение в кровь TGF- β (Wan et al., 2012), эффект которого опосредован теми же сигнальными путями и межклеточными взаимодействиями через N-кадгерин (Dubon et al., 2018). В экспериментах по анализу индуцированной SDF-1, субстанцией Р и TGF- β миграции МСК *in vitro* был показан сложный характер взаимодействия между этими хемотактическими стимулами. Так, все три вещества стимулировали миграцию МСК, однако предварительная обработка клеток субстанцией Р подавляла их ответ на TGF- β . При этом предобработка TGF- β снижала последующий ответ на SDF-1, но не на субстанцию Р. Молекулярные механизмы, лежащие в основе этих взаимодействий, не вполне ясны и требуют дальнейшего изучения (Nam et al., 2020).

Вероятно, в мобилизации МСК играет роль и VEGF. Показано, что инъекция этого фактора подопытным крысам с последующим введением им AMD3100 позволяет значительно повысить содержание клеток с характеристиками МСК в периферической крови (Meeson et al., 2019). Предполагается, что мобилизующий эффект гипоксии отчасти также связан с усилением продукции VEGF, стимулирующего образование в костном мозге синусоидных капилляров и тем самым облегчающего выход клеток в кровотоки (Liu et al., 2011).

Таким образом, введение в организм вышеупомянутых факторов, стимуляция их продукции тканями пациента или воздействие на активируемые ими сигнальные пути могут рассматриваться как способы активации регенеративного потенциала эндогенных МСК за счет их выхода из тканевых ниш в периферическую кровь с вероятной последующей миграцией в поврежденный орган. В частности, отмечено повышение содержания МСК в крови больных, получавших паратгормон для лечения постменопаузального остеопороза (Tang et al., 2019), который, как ранее было показано в экспериментах по трансплантации животным экзогенных МСК, способен индуцировать экспрессию как SDF-1 клетками поврежденной костной ткани, так и его рецептора CXCR4 на МСК (Sheyn et al., 2016). Эффективным подходом оказалось сочетание блокирования CXCR4 с помощью AMD3100 с введением в организм Г-КСФ (Chen et al., 2021) или инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1), стимулирующего пролиферацию МСК и тем самым повышающего их численность в крови после мобилизации (Kumar, Ponnazhagan, 2012). Средства, имитирующие гипоксию, также могут быть использованы для стимуляции выхода МСК в кровотоки.

Так, в экспериментах на лабораторных грызунах с этой целью были успешно использованы хлорид кобальта в сочетании с AMD3100 (Liu et al., 2018) и ингибитор пролилгидроксилазы диметилкоксалилглицин (Ge et al., 2016). Интересно, что подобного эффекта удастся добиться и противоположным путем – с помощью гипербарической оксигенации, предположительно за счет усиления продукции NO, изменения состояния микроокружения или прямого митогенного влияния кислорода на МСК (Dhar et al., 2012). Еще один подход к мобилизации МСК – воздействие на липидные медиаторы, например, блокирование рецептора сфингозин-1-фосфата (Selma et al., 2018) или системная активация β 3-адренорецепторов, изменяющая профиль эндоканнабиноидов и N-ацетилэтанолламинов в костном мозге (Fellous et al., 2020). Для повышения содержания МСК в периферической крови могут быть также использованы биологически активные вещества растительного происхождения (Furumoto et al., 2014; Fujita K. et al., 2015) или физические методы, такие как электроакупунктура (Liu et al. 2016; Vieira et al., 2021).

Результаты экспериментов на животных свидетельствуют о перспективности мобилизации МСК в периферическую кровь как способа лечения заболеваний различных органов и систем. В частности, было установлено, что стимуляция выхода МСК в кровоток защищает почки от токсического поражения цисплатином (Chen et al., 2021), улучшает заживление ран при сахарном диабете (Furumoto et al., 2014) и переломов костей (Kumar, Ponnazhagan, 2012; Meeson et al., 2019). Способность мобилизованных из костного мозга в кровь эндогенных МСК усиливать образование костной ткани была также продемонстрирована на экспериментальных моделях дефектов черепа критического размера (Selma et al., 2018) и спондилолиза позвоночника (Fellous et al., 2020). На модели болезни Альцгеймера у мышей показано, что мобилизованные МСК мигрируют в мозг и участвуют в нейрогенезе, замещая погибшие нейроны (Wu et al., 2017). В другом исследовании было отмечено улучшение неврологических функций и усиление ангиогенеза в зоне поражения после введения крысам с ишемическим инсультом Г-КСФ, причем результат был сопоставим с таковым при трансплантации экзогенных МСК (Balseanu et al., 2014). Вероятно, имеющиеся данные о благотворном влиянии субстанции Р на заживление химических ожогов роговицы (Hong et al., 2009) и состояние мышей с ревматоидным артритом (Hong, Son, 2014), а также о повышении минеральной плотности костной ткани у пациентов с остеопорозом после лечения паратгормоном (Tang et al., 2019) тоже можно связать со способностью этих веществ стимулировать мобилизацию МСК в кровоток, хотя не исключены и иные механизмы наблюдаемых терапевтических эффектов.

ПРИВЛЕЧЕНИЕ МСК В ОБЛАСТЬ ПОРАЖЕНИЯ

О способности циркулирующих МСК к направленной миграции в область тканевого дефекта свидетельствуют результаты не только экспериментов по системному введению меченых МСК животным с экспериментальными моделями различных патологических состояний (Zhang et al., 2011; Hu et al., 2013; Maerz et al., 2017; Oh et al., 2018; Li et al., 2021), но и анализа присутствия МСК в крови и эндокардиальных биоптатах пациентов с воспалительной кардиомиопатией (Schmidt-Lucke et al., 2015). В последнем случае было показано значительное снижение численности циркулирующих МСК на выходе из сердца, коррелирующее с выраженностью воспаления сердечной мышцы и содержанием МСК в биоптатах.

Механизмы трансэндотелиальной миграции МСК в целом сходны с известными для лейкоцитов и включают последовательные стадии задержки клетки в сосуде, активации хемокинами, прочной адгезии к эндотелию и проникновения сквозь стенку сосуда (Nitzsche et al., 2017). В то же время процесс прохо-

ждения МСК через стенку сосуда более длителен по сравнению с диапедезом лейкоцитов, не предваряется существенной латеральной миграцией и может происходить как непосредственно сквозь эндотелиальные клетки, так и по щелям между ними (Teo et al., 2012). Есть данные, что задержка МСК в сосуде может быть опосредована взаимодействием их мембранных молекул, таких как галектин-1 или CD24, с Р-селектином на поверхности эндотелиальных клеток, а прочная адгезия – интегрином CD49d ($\alpha 4\beta 1$), который связывается с молекулой адгезии сосудистых клеток VCAM-1 на эндотелии (Ullah et al., 2019).

Показана также важная роль фукозилированной формы CD44, взаимодействующей с Е-селектином на эндотелии, в обеспечении первой стадии выхода МСК из сосуда, а именно их роллинга вдоль его внутренней поверхности. Временная индукция экспрессии этой молекулы на МСК была достаточна для хоминга внутривенно введенных клеток в костный мозг (Sackstein et al., 2008). Впрочем, учитывая органо- и тканеспецифичность фенотипа эндотелиальных клеток, можно предположить, что МСК используют неодинаковые молекулы адгезии для выхода из сосудов в различных органах (Khaldoyanidi, 2008). И, наконец, следует отметить, что на завершающем этапе трансэндотелиальной миграции, а именно при преодолении базальной мембраны, ключевую роль играют продуцируемые МСК матриксные металлопротеиназы (ММП), в частности, ММП-2, МТ1-ММП и ММП-9, экспрессия которых усиливается под влиянием провоспалительных цитокинов TGF- $\beta 1$, интерлейкина (ИЛ)-1 β и фактора некроза опухолей TNF- α (Ries et al., 2007). При этом воспалительное микроокружение поврежденной ткани может стимулировать миграцию МСК и другими способами. Так, для провоспалительного цитокина ИЛ-17 показана способность усиливать адгезию МСК к эндотелию через индукцию экспрессии активатора плазминогена урокиназного типа, без влияния на ММП (Krstić et al., 2015).

Основным хемоаттрактантом для МСК служит SDF-1, содержание которого при повреждении различных тканей повышается не только в крови, но и в области дефекта (Lan et al., 2012; Hu et al., 2013; Iinuma et al., 2015; Schmidt-Lucke et al., 2015; Maerz et al., 2017; Jin et al., 2018). По некоторым данным, он стимулирует продукцию эндотелиальными клетками фактора роста тромбоцитарного происхождения (PDGF), в результате чего активируются сигнальные пути PDGFRA/PI3K/Akt, PDGFRA/MAPK/Grb2 и PDGFRA/Jak2/Stat, направляющие трансэндотелиальную миграцию МСК (Popielarczyk et al., 2019). Известны и другие хемотактические стимулы, привлекающие МСК в патологически измененные ткани. Так, их миграция в опухоли направляется хемоаттрактантным белком для моноцитов (MCP)-1, секретлируемым опухолевыми клетками (Dwyer et al., 2007; Bayo et al., 2016; Pavon et al., 2018). Этот же белок, известный также под названием CCL-2, опо-

средует миграцию МСК в область костной ткани при заживлении переломов (Ishikawa et al., 2014) и у животных с индуцированным эктопическим остеогенезом (Wang et al., 2018), а также в сердце при дилатационной кардиомиопатии (Guo et al., 2013). Судя по результатам исследований на экспериментальных моделях *in vivo*, факторами хоминга МСК в поврежденные ткани могут быть также MCP-3/CCL7 (Schenk et al., 2007), воспалительный белок макрофагов 1α (MIP- 1α /CCL3) (Wang et al., 2018), вторичный хемокин лимфоидной ткани (SLC/CCL21) (Sasaki et al., 2008), TGF- β (Deng et al., 2017), а в экспериментах *in vitro* было показано, что хемоаттрактантами для МСК являются и многие другие цитокины, хемокины и факторы роста, в частности костные морфогенетические белки (BMP-2, -4 и -7), фактор роста эпидермиса (EGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), IGF-1 и -2, фракталкин, ИЛ-8 и прочие (Vanden Berg-Foels, 2014).

Очевидно, мобилизация МСК в кровь и привлечение в поврежденную ткань представляют собой этапы единого процесса их направленной миграции, поэтому терапевтического эффекта можно достичь не только стимулируя выход МСК из тканевых ниш, но и воздействуя на целевую область. Так, в экспериментах на животных был отмечен усиленный хоминг МСК в поврежденное сердце (Sasaki et al., 2007) и легкое (Hannoush et al., 2011) после локальной инъекции SDF-1, а также в область хрящевого дефекта после введения в нее FGF-2 (Chuma et al., 2004).

Активно развивается такой подход, как имплантация в поврежденную область различных носителей, обеспечивающих постепенное выделение заключенных в них цитокинов или хемокинов. Это позволяет в течение длительного времени поддерживать высокую локальную концентрацию хемоаттрактантов, способствуя тем самым эффективной миграции МСК. В частности, было показано, что инъекция в поврежденный межпозвоноковый диск гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты, содержащего SDF-1, повышает число мигрирующих в эту область МСК в большей степени, чем инъекция одного SDF-1 (Pereira et al., 2014). Привлечение МСК в тканевые дефекты у экспериментальных животных удавалось также усилить с помощью гидрогелей различного состава, содержащих TGF- β (Lee et al., 2010) или субстанцию P (Kim et al., 2016; 2018b). Дальнейшее повышение эффективности доставки хемоаттрактантов может быть достигнуто путем их включения в состав наночастиц, суспендированных в гидрогеле (Mi et al., 2017; Fan et al., 2020). Кроме того, хемоаттрактанты могут быть заключены в скаффолды с губчатой или сетчатой структурой – например, желатиновые губки (Deng et al., 2017; Cai et al., 2018), пористые конструкции из коллагена (Chen et al., 2015) или сетки из поликапролактоновых волокон (Shao et al., 2012). Такие скаффолды не только при-

влекают МСК, но и служат субстратами для их адгезии, обеспечивая удержание клеток в месте дефекта.

Альтернативой локальному введению хемоаттрактантов (на носителях или без них) являются физические воздействия на целевую область, индуцирующие продукцию эндогенных хемотактических факторов для МСК. Показано, например, что обработка мышечной ткани ультразвуком низкой интенсивности стимулирует выработку простагландинов H2 и E2, что ведет к усилению хоминга циркулирующих в крови МСК (Lorsung et al., 2020). С помощью ультразвукового воздействия удавалось также усилить тропность МСК к миокарду (Jang et al., 2020) и почкам (Burks et al., 2018), причем в последнем случае вызванные ультразвуком изменения в тканевом микроокружении не только активировали миграцию МСК, но и усиливали экспрессию противовоспалительных цитокинов. Еще один пример привлечения клеток в ткань путем физического воздействия на последнюю – механическое растяжение кожи, ведущее к усиленному образованию в ней хемокинов, прежде всего SDF-1, и, как следствие, стимулирующее направленную миграцию МСК (Zhou et al., 2013).

Кроме того, усилить хоминг МСК в поврежденную ткань возможно путем активации в них сигнальных путей, вовлеченных в регуляцию миграции, с помощью фармакологических агентов, в частности, биологически активных веществ растительного происхождения (Maeda, 2020). Например, есть данные, что имплантация скаффолдов с заключенным в них каннабидиолом в дефект лучевой кости крысы способствует его закрытию за счет усиленной миграции МСК (Kamali et al., 2019). Аналогичный эффект показан для флавоноида циннамтанина В-1, нанесенного на поверхность кожной раны у мыши (Fujita K. et al., 2015).

Применение вышеупомянутых подходов к привлечению эндогенных МСК в тканевые дефекты позволило усилить регенерацию тканей при экспериментальном поражении опорно-двигательного аппарата, в частности, на моделях остеоартрита (Kim et al., 2016), травматических дефектов кости (Deng et al., 2017; Mi et al., 2017) и суставного хряща (Chuma et al., 2004; Chen et al., 2015), а также у животных с кожными ранами на фоне диабета (Kim et al., 2018b), с повреждениями миокарда (Sasaki et al., 2007), легкого (Hannoush et al., 2011), периодонта (Cai et al., 2018), пульпы зуба (Yang et al., 2015). Более того, в одной из работ имплантация экспериментальным крысам полученного с помощью трехмерной печати скаффолда, содержащего SDF-1 и BMP-7, позволила без трансплантации экзогенных клеток сформировать структуру, анатомически и гистологически подобную зубу с периодонтом и минерализованной костной тканью, что открывает перспективы для разработки метода регенерации утраченных зубов вместо их протезирования (Kim et al., 2010).

СОЧЕТАНИЕ МОБИЛИЗАЦИИ И ПРИВЛЕЧЕНИЯ МСК

Таким образом, каждый из рассмотренных подходов к терапевтическому использованию эндогенных МСК, а именно стимуляция их выхода в кровь и привлечение хемоаттрактантами в поврежденную ткань, в экспериментальных исследованиях дает обнадеживающие результаты. Возникает вопрос, нельзя ли повысить эффективность использования регенеративного потенциала МСК путем сочетания системного введения мобилизующих факторов с локальным воздействием на область поражения. Данные на этот счет неоднозначны. Так, в работе Ко и соавторов (Ko et al., 2012) под кожу мышей имплантировали скаффолд из полилактида и желатина, загруженный SDF-1, а внутривенно инъецировали субстанцию Р для мобилизации МСК в кровотоки. Через 2 нед. в имплантате было обнаружено более высокое содержание клеток с фенотипом МСК, чем при введении только SDF-1 или только субстанции Р.

На модели инфаркта миокарда, вызванного переязкой левой передней нисходящей артерии у крыс, было показано, что мобилизации МСК в кровь с помощью Г-КСФ недостаточно для их приживления в области инфаркта, однако при ее сочетании с локальной трансплантацией фибробластов, трансфицированных геном *CXCL12*, наблюдалась направленная миграция МСК в зону инфаркта, сопровождавшаяся улучшением функций сердца (Askari et al., 2003). В то же время в эксперименте на крысах с закрытой травмой легкого, которым был системно введен Г-КСФ и локально в область повреждения — SDF-1, степень восстановления гистологической структуры органа не отличалась от наблюдаемой при отдельном введении хемоаттрактанта или мобилизующего агента (Hannoush et al., 2011). Авторы не оценивали эффективность миграции МСК в поврежденное легкое, однако содержание в нем кроветворных родоначальных клеток костномозгового происхождения при сочетании Г-КСФ и SDF-1 было выше, чем при введении только одного из этих факторов, что косвенно свидетельствует об отсутствии прямой связи между численностью клеток, заселяющих орган, и полнотой регенерации.

Очевидно, восстановление поврежденных тканей под влиянием МСК и прочих стволовых или родоначальных клеток, резидентных или мигрирующих из других тканевых источников — сложный и далеко не полностью изученный процесс, зависящий от многих переменных. В этой связи целесообразность одновременного применения мобилизующих факторов и хемоаттрактантов для направления МСК в поврежденную ткань остается не вполне ясной. Вопрос об оптимальном протоколе воздействия на эндогенные МСК, позволяющем наиболее полно использовать их терапевтический потенциал, требует дополнительных исследований с учетом особенностей

различных тканей и конкретных патологических состояний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты многих экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что воздействие на эндогенные МСК посредством цитокинов, хемокинов, различных фармакологических агентов или физических факторов с целью активировать присущую им способность к направленной миграции из тканевых ниш в область повреждения может рассматриваться как перспективный подход к клеточной терапии многих заболеваний, в целом сопоставимый по своей эффективности с трансплантацией размноженных *in vitro* аутологичных или аллогенных клеток. Преимущества этого подхода перед трансплантацией МСК обусловлены как отсутствием технических трудностей и ограничений, связанных с процессами выделения и культивирования клеток, так и с меньшей вероятностью неблагоприятных последствий для пациента, которые могли бы быть вызваны изменением свойств клеток в процессе их наращивания *in vitro* (например, приобретением ими иммуногенности, туморогенности, прокоагулянтной активности, а также контаминацией клеточной культуры).

Однако использование эндогенных МСК в качестве терапевтического ресурса также имеет свои проблемы и ограничения. В частности, содержание МСК в организме пациента может оказаться недостаточным для эффективной регенерации поврежденной ткани, особенно у людей старшего возраста со свойственной им тенденцией к уменьшению популяции МСК. Кроме того, патологический процесс может нарушить способность МСК отвечать на мобилизационные и хемотактические стимулы или снизить их способность к продукции прорегенеративных факторов. И, наконец, существует проблема негативного влияния воспалительного и гипоксического микроокружения поврежденной ткани на жизнеспособность мигрирующих в нее клеток. Эта проблема актуальна и при трансплантации экзогенных МСК, однако в этом случае она может быть отчасти решена с помощью прекондиционирования или генетической модификации вводимых клеток. Очевидно, использование эндогенных МСК исключает подобные пути повышения их выживаемости в очаге патологии. Для преодоления этой проблемы необходим поиск способов регуляторного воздействия на сигнальные пути в МСК пациента, контролируемые их выживание, чувствительность к хемокинам и функциональную активность, либо восстановления нормального состояния тканевого микроокружения.

Есть основания надеяться, что прогресс в данной области исследований, а также дальнейшее изучение механизмов направленной миграции МСК в поврежденные ткани и оказываемых ими регенеративных эффектов, будут способствовать успешному переносу результатов экспериментальных исследований

терапевтического потенциала эндогенных МСК в клиническую практику.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет бюджетных средств Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы не проводили экспериментов с участием животных или людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Andrzejewska A., Lukomska B., Janowski M.* 2019. Concise review: mesenchymal stem cells: from roots to boost. *Stem Cells*. V. 37. P. 855. <https://doi.org/10.1002/stem.3016>
- Askari A.T., Unzek S., Popovic Z.B., Goldman C.K., Forudi F., Kiedrowski M., Rovner A., Ellis S.G., Thomas J.D., DiCorleto P.E., Topol E.J., Penn M.S.* 2003. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*. V. 362. P. 697. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14232-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14232-8)
- Balseanu A.T., Buga A.M., Catalin B., Wagner D.C., Boltze J., Zagrean A.M., Reymann K., Schaebitz W., Popa-Wagner A.* 2014. Multimodal approaches for regenerative stroke therapies: combination of granulocyte colony-stimulating factor with bone marrow mesenchymal stem cells is not superior to G-CSF alone. *Front. Aging Neurosci.* V. 23. P. 130. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00130>
- Bayo J., Real A., Fiore E.J., Malvicini M., Sganga L., Bolontrade M., Andriani O., Bizama C., Fresno C., Podhajcer O., Fernandez E., Gidekel M., Mazzolini G.D., Garcia M.G.* 2016. IL-8, GRO and MCP-1 produced by hepatocellular carcinoma microenvironment determine the migratory capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells without affecting tumor aggressiveness. *Oncotarget*. V. 8. P. 80235. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10288>
- Bradley M.J., Vicente D.A., Bograd B.A., Sanders E.M., Leonhardt C.L., Elster E.A., Davis T.A.* 2017. Host responses to concurrent combined injuries in non-human primates. *J. Inflamm. (Lond.)*. V. 14. P. 23. <https://doi.org/10.1186/s12950-017-0170-7>
- Bui K.C., Senadheera D., Wang X., Hendrickson B., Friedlich P., Lutzko C.* 2010. Recovery of multipotent progenitors from the peripheral blood of patients requiring extracorporeal membrane oxygenation support. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* V. 181. P. 226. <https://doi.org/10.1164/rccm.200812-1901OC>
- Burks S.R., Nagle M.E., Bresler M.N., Kim S.J., Star R.A., Frank J.A.* 2018. Mesenchymal stromal cell potency to treat acute kidney injury increased by ultrasound-activated interferon- γ /interleukin-10 axis. *J. Cell. Mol. Med.* V. 22. P. 6015. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13874>
- Cai X., Yang F., Walboomers X.F., Wang Y., Jansen J.A., van den Beucken J.J.J.P., Plachokova A.S.* 2018. Periodontal regeneration via chemoattractive constructs. *J. Clin. Periodontol.* V. 45. P. 851. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12928>
- Calle A., Barrajón-Masa C., Gómez-Fidalgo E., Martín-Lluch M., Cruz-Vigo P., Sánchez-Sánchez R., Ramírez M.Á.* 2018. Iberian pig mesenchymal stem/stromal cells from dermal skin, abdominal and subcutaneous adipose tissues, and peripheral blood: *in vitro* characterization and migratory properties in inflammation. *Stem Cell Res. Ther.* V. 9. P. 178. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0933-y>
- Chen P., Tao J., Zhu S., Cai Y., Mao Q., Yu D., Dai J., Ouyang H.* 2015. Radially oriented collagen scaffold with SDF-1 promotes osteochondral repair by facilitating cell homing. *Biomaterials*. V. 39. P. 114. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.049>
- Chen Z., Ren X., Ren R., Wang Y., Shang J.* 2021. The combination of G-CSF and AMD3100 mobilizes bone marrow-derived stem cells to protect against cisplatin-induced acute kidney injury in mice. *Stem Cell Res. Ther.* V. 12. P. 209. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02268-y>
- Chuma H., Mizuta H., Kudo S., Takagi K., Hiraki Y.* 2004. One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. V. 12. P. 834. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2004.07.003>
- Churchman S.M., Jones E.A., Roshdy T., Cox G., Boxall S.A., McGonagle D., Giannoudis P.V.* 2020. Transient existence of circulating mesenchymal stem cells in the deep veins in humans following long bone intramedullary reaming. *J. Clin. Med.* V. 9. P. 968. <https://doi.org/10.3390/jcm9040968>
- Deng J., Zou Z.M., Zhou T.L., Su Y.P., Ai G.P., Wang J.P., Xu H., Dong S.W.* 2011. Bone marrow mesenchymal stem cells can be mobilized into peripheral blood by G-CSF *in vivo* and integrate into traumatically injured cerebral tissue. *Neurol. Sci.* V. 32. P. 641. <https://doi.org/10.1007/s10072-011-0608-2>
- Deng M., Mei T., Hou T., Luo K., Luo F., Yang A., Yu B., Pang H., Dong S., Xu J.* 2017. TGF β 3 recruits endogenous mesenchymal stem cells to initiate bone regeneration. *Stem Cell Res. Ther.* V. 8. P. 258. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0693-0>
- Dhar M., Neilsen N., Beatty K., Eaker S., Adair H., Geiser D.* 2012. Equine peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: isolation, identification, trilineage differentiation and effect of hyperbaric oxygen treatment. *Equine Vet. J.* V. 44. P. 600. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00536.x>
- Dubon M.J., Yu J., Choi S., Park K.S.* 2018. Transforming growth factor β induces bone marrow mesenchymal stem cell migration via noncanonical signals and N-cadherin. *J. Cell. Physiol.* V. 233. P. 201. <https://doi.org/10.1002/jcp.25863>
- Dubon M.J., Park K.S.* 2016. The mechanisms of substance P-mediated migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cell-like ST2 cells. *Int. J. Mol. Med.* V. 37. P. 1105. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2496>

- Dwyer R.M., Potter-Beirne S.M., Harrington K.A., Lowery A.J., Hennessy E., Murphy J.M., Barry F.P., O'Brien T., Kerin M.J. 2007. Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin. Cancer. Res.* V. 13. P. 5020. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0731>
- Emamnejad R., Sahraian M., Shakiba Y., Salehi Z., Masoomi A., Imani D., Najafi F., Laribi B., Shirzad H., Izad M. 2019. Circulating mesenchymal stem cells, stromal derived factor (SDF)-1 and IP-10 levels increased in clinically active multiple sclerosis patients but not in clinically stable patients treated with beta interferon. *Mult. Scler. Relat. Disord.* V. 35. P. 233. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.08.013>
- Fan W., Yuan L., Li J., Wang Z., Chen J., Guo C., Mo X., Yan Z. 2020. Injectable double-crosslinked hydrogels with kartogenin-conjugated polyurethane nano-particles and transforming growth factor β 3 for *in situ* cartilage regeneration. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* V. 110. P. 110705. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110705>
- Fellous T.G., Redpath A.N., Fleischer M.M., Gandhi S., Hartner S.E., Newton M.D., François M., Wong S.P., Gowers K.H.C., Fahs A.M., Possley D.R., Bonnet D., Urquhart P., Nicolaou A., Baker K.C. et al. 2020. Pharmacological tools to mobilise mesenchymal stromal cells into the blood promote bone formation after surgery. *NPJ Regen. Med.* V. 5. P. 3. <https://doi.org/10.1038/s41536-020-0088-1>
- Fujita K., Kuge K., Ozawa N., Sahara S., Zaiki K., Nakaaji K., Hamada K., Takenaka Y., Tanahashi T., Tamai K., Kaneda Y., Maeda A. 2015. Cinnamtannin B-1 promotes migration of mesenchymal stem cells and accelerates wound healing in mice. *PLoS One.* V. 10. P. e0144166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144166>
- Fujita R., Tamai K., Aikawa E., Nimura K., Ishino S., Kikuchi Y., Kaneda Y. 2015. Endogenous mesenchymal stromal cells in bone marrow are required to preserve muscle function in mdx mice. *Stem Cells.* V. 33. P. 962. <https://doi.org/10.1002/stem.1900>
- Furumoto T., Ozawa N., Inami Y., Toyoshima M., Fujita K., Zaiki K., Sahara S., Akita M., Kitamura K., Nakaaji K., Hamada K., Tamai K., Kaneda Y., Maeda A. 2014. Mallotus philippinensis bark extracts promote preferential migration of mesenchymal stem cells and improve wound healing in mice. *Phytomedicine.* V. 21. P. 247. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.003>
- Garcia N.P., de Leon E.B., da Costa A.G., Tarragô A.M., Pimentel J.P., Fraportti L., de Araujo F.F., Campos F.M., Teixeira-Carvalho A., Martins-Filho O.A., Malheiro A. 2015. Kinetics of mesenchymal and hematopoietic stem cells mobilization by G-CSF and its impact on the cytokine microenvironment in primary cultures. *Cell. Immunol.* V. 293. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.09.006>
- Ge T., Yu Q., Liu W., Cong L., Liu L., Wang Y., Zhou L., Lin D. 2016. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from dimethylallyl glycine-preconditioned mice: evaluation of the feasibility of dimethylallyl glycine as a mobilization agent. *Mol. Med. Rep.* V. 13. P. 3498. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4945>
- Ghazanfari T., Ghaffarpour S., Kariminia A., Salehi E., Hashemi S.M., Ardestani S.K., Gohari Moghadam K., Mirsharif E.S., Dilmaghanian R., Fadaei A., Faghihzadeh S. 2019. Circulating mesenchymal stem cells in sulfur mustard-exposed patients with long-term pulmonary complications. *Toxicol. Lett.* V. 312. P. 188. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.05.015>
- Gomez-Salazar M., Gonzalez-Galofre Z.N., Casamitjana J., Crisan M., James A.W., Péault B. 2020. Five decades later, are mesenchymal stem cells still relevant? *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 8. P. 148. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00148>
- Guo J., Zhang H., Xiao J., Wu J., Ye Y., Li Z., Zou Y., Li X. 2013. Monocyte chemotactic protein-1 promotes the myocardial homing of mesenchymal stem cells in dilated cardiomyopathy. *Int. J. Mol. Sci.* V. 14. P. 8164. <https://doi.org/10.3390/ijms14048164>
- Hannoush E.J., Sifri Z.C., Elhassan I.O., Mohr A.M., Alzate W.D., Offin M., Livingston D.H. 2011. Impact of enhanced mobilization of bone marrow derived cells to site of injury. *J. Trauma.* V. 71. P. 283. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e318222f380>
- Heino T.J., Alm J.J., Moritz N., Aro H.T. 2012. Comparison of the osteogenic capacity of minipig and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* V. 30. P. 1019. <https://doi.org/10.1002/jor.22049>
- Hong H.S., Lee J., Lee E., Kwon Y.S., Lee E., Ahn W., Jiang M.H., Kim J.C., Son Y. 2009. A new role of substance P as an injury-inducible messenger for mobilization of CD29(+) stromal-like cells. *Nat Med.* V. 15. P. 425. <https://doi.org/10.1038/nm.1909>
- Hong H.S., Son Y. 2014. Substance P ameliorates collagen II-induced arthritis in mice via suppression of the inflammatory response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 453. P. 179. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.090>
- Hoogduijn M.J., Versteegen M.M., Engela A.U., Korevaar S.S., Roemeling-van Rhijn M., Merino A., Franquesa M., de Jonge J., Ijzermans J.N., Weimar W., Betjes M.G., Baan C.C., van der Laan L.J. 2014. No evidence for circulating mesenchymal stem cells in patients with organ injury. *Stem Cells Dev.* V. 23. P. 2328. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0269>
- Hu C., Yong X., Li C., Lü M., Liu D., Chen L., Hu J., Teng M., Zhang D., Fan Y., Liang G. 2013. CXCL12/CXCR4 axis promotes mesenchymal stem cell mobilization to burn wounds and contributes to wound repair. *J. Surg. Res.* V. 183. P. 427. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.01.019>
- Iinuma S., Aikawa E., Tamai K., Fujita R., Kikuchi Y., Chino T., Kikuta J., McGrath J.A., Uitto J., Ishii M., Iizuka H., Kaneda Y. 2015. Transplanted bone marrow-derived circulating PDGFR α + cells restore type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse skin graft. *J. Immunol.* V. 194. P. 1996. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400914>
- Ishikawa M., Ito H., Kitaori T., Murata K., Shibuya H., Furu M., Yoshitomi H., Fujii T., Yamamoto K., Matsuda S. 2014. MCP/CCR2 signaling is essential for recruitment of mesenchymal progenitor cells during the early phase of fracture healing. *PLoS One.* V. 9. P. e104954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104954>
- Iso Y., Yamaya S., Sato T., Poole C.N., Isoyama K., Mimura M., Koba S., Kobayashi Y., Takeyama Y., Spees J.L., Suzuki H. 2012. Distinct mobilization of circulating CD271+ mesen-

- chymal progenitors from hematopoietic progenitors during aging and after myocardial infarction. *Stem Cells Transl. Med.* V. 1. P. 462.
<https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0051>
- Jang K.W., Tu T.W., Rosenblatt R.B., Burks S.R., Frank J.A. 2020. MR-guided pulsed focused ultrasound improves mesenchymal stromal cell homing to the myocardium. *J. Cell. Mol. Med.* V. 24. P. 13278.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.15944>
- Jin W., Liang X., Brooks A., Futrega K., Liu X., Doran M.R., Simpson M.J., Roberts M.S., Wang H. 2018. Modelling of the SDF-1/CXCR4 regulated in vivo homing of therapeutic mesenchymal stem/stromal cells in mice. *Peer J.* V. 6. P. e6072.
<https://doi.org/10.7717/peerj.6072>
- Kamali A., Oryan A., Hosseini S., Ghanian M.H., Alizadeh M., Baghaban Eslaminejad M., Baharvand H. 2019. Cannabidiol-loaded microspheres incorporated into osteoconductive scaffold enhance mesenchymal stem cell recruitment and regeneration of critical-sized bone defects. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* V. 101. P. 64.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.070>
- Khaldooyani S. 2008. Directing stem cell homing. *Cell Stem Cell.* V. 6. P. 198.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.02.012>
- Kim J., Kim N.K., Park S.R., Choi B.H. 2018a. GM-CSF enhances mobilization of bone marrow mesenchymal stem cells via a CXCR4-mediated mechanism. *Tiss. Eng. Regen. Med.* V. 16. P. 59.
<https://doi.org/10.1007/s13770-018-0163-5>
- Kim J.E., Lee J.H., Kim S.H., Jung Y. 2018b. Skin regeneration with self-assembled peptide hydrogels conjugated with substance P in a diabetic rat model. *Tissue Eng. Part A.* V. 24. P. 21.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2016.0517>
- Kim K., Lee C.H., Kim B.K., Mao J.J. 2010. Anatomically shaped tooth and periodontal regeneration by cell homing. *J. Dent. Res.* V. 89. P. 842.
<https://doi.org/10.1177/0022034510370803>
- Kim S.J., Kim J.E., Kim S.H., Kim S.J., Jeon S.J., Kim S.H., Jung Y. 2016. Therapeutic effects of neuropeptide substance P coupled with self-assembled peptide nanofibers on the progression of osteoarthritis in a rat model. *Biomaterials.* V. 74. P. 119.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.09.040>
- Ko I.K., Ju Y.M., Chen T., Atala A., Yoo J.J., Lee S.J. 2012. Combined systemic and local delivery of stem cell inducing/recruiting factors for in situ tissue regeneration. *FASEB J.* V. 26. P. 158.
<https://doi.org/10.1096/fj.11-182998>
- Koerner J., Nesic D., Romero J. D., Brehm W., Mainil-Varlet P., Grogan S.P. 2006. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* V. 24. P. 1613.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0264>
- Krstić J., Obradović H., Jauković A., Okić-Đorđević I., Trivunović D., Kukulj T., Mojsilović S., Ilić V., Santibañez J.F., Bugarski D. 2015. Urokinase type plasminogen activator mediates Interleukin-17-induced peripheral blood mesenchymal stem cell motility and transendothelial migration. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1853. P. 431.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.025>
- Kumar S., Ponnazhagan S. 2012. Mobilization of bone marrow mesenchymal stem cells *in vivo* augments bone healing in a mouse model of segmental bone defect. *Bone.* V. 50. P. 1012.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.01.027>
- Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Leet A.I., Ziran N., Gronthos S., Robey P.G. 2007. Circulating connective tissue precursors: extreme rarity in humans and chondrogenic potential in guinea pigs. *Stem Cells.* V. 25. P. 1830.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0140>
- Lan Y., Kodati S., Lee H.S., Omoto M., Jin Y., Chauhan S.K. 2012. Kinetics and function of mesenchymal stem cells in corneal injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* V. 53. P. 3638.
<https://doi.org/10.1167/iovs.11-9311>
- Lang H.M., Schnabel L.V., Cassano J.M., Fortier L.A. 2017. Effect of needle diameter on the viability of equine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Vet. Surg.* V. 46. P. 731.
<https://doi.org/10.1111/vsu.12639>
- Lee C.H., Cook J.L., Mendelson A., Moiola E.K., Yao H., Mao J.J. 2010. Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: a proof of concept study. *Lancet.* V. 376. P. 440.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60668-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60668-X)
- Levy O., Kuai R., Siren E.M.J., Bhere D., Milton Y., Nissar N., De Biasio M., Heinelt M., Reeve B., Abdi R., Alturki M., Faltalah M., Almalik A., Alhasan A.H., Shah K. et al. 2020. Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies. *Sci. Adv.* V. 6. P. eaba6884.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aba6884>
- Li Y., Dong Y., Ran Y., Zhang Y., Wu B., Xie J., Cao Y., Mo M., Li S., Deng H., Hao W., Yu S., Wu Y. 2021. Three-dimensional cultured mesenchymal stem cells enhance repair of ischemic stroke through inhibition of microglia. *Stem Cell Res. Ther.* V. 12. P. 358.
<https://doi.org/10.1186/s13287-021-02416-4>
- Lin W., Xu L., Lin S., Shi L., Wang B., Pan Q., Lee W.Y.W., Li G. 2019. Characterisation of multipotent stem cells from human peripheral blood using an improved protocol. *J. Orthop. Translat.* V. 19. P. 18.
<https://doi.org/10.1016/j.jot.2019.02.003>
- Lin W., Xu L., Zwingenberger S., Gibon E., Goodman S.B., Li G. 2017. Mesenchymal stem cells homing to improve bone healing. *J. Orthop. Translat.* V. 9. P. 19.
<https://doi.org/10.1016/j.jot.2017.03.002>
- Liu L., Yu Q., Fu S., Wang B., Hu K., Wang L., Hu Y., Xu Y., Yu X., Huang H. 2018. CXCR4 antagonist AMD3100 promotes mesenchymal stem cell mobilization in rats preconditioned with the hypoxia-mimicking agent cobalt chloride. *Stem Cells Dev.* V. 27. P. 466.
<https://doi.org/10.1089/scd.2017.0191>
- Liu L., Yu Q., Hu K., Wang B., Zhang Y., Xu Y., Fu S., Yu X., Huang H. 2016. Electro-acupuncture promotes endogenous multipotential mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood. *Cell. Physiol. Biochem.* V. 38. P. 1605.
<https://doi.org/10.1159/000443101>
- Liu L., Yu Q., Lin J., Lai X., Cao W., Du K., Wang Y., Wu K., Hu Y., Zhang L., Xiao H., Duan Y., Huang H. 2011. Hypoxia-inducible factor-1 α is essential for hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood. *Stem Cells Dev.* V. 20. P. 1961.
<https://doi.org/10.1089/scd.2010.0453>

- Lorsung R.M., Rosenblatt R.B., Cohen G., Frank J.A., Burks S.R. 2020. Acoustic radiation or cavitation forces from therapeutic ultrasound generate prostaglandins and increase mesenchymal stromal cell homing to murine muscle. *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 8. P. 870. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00870>
- Maeda A. 2020. Recruitment of mesenchymal stem cells to damaged sites by plant-derived components. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8. P. 437. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00437>
- Maerz T., Fleischer M., Newton M.D., Davidson A., Salisbury M., Altman P., Kurdziel M.D., Anderson K., Bedi A., Baker K.C. 2017. Acute mobilization and migration of bone marrow-derived stem cells following anterior cruciate ligament rupture. *Osteoarthritis Cartilage.* V. 25. P. 1335. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2017.03.004>
- Mansilla E., Marín G.H., Drago H., Sturla F., Salas E., Gardiner C., Bossi S., Lamonega R., Guzmán A., Nuñez A., Gil M.A., Piccinelli G., Ibar R., Soratti C. 2006. Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant. Proc.* V. 38. P. 967. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.02.053>
- Marketou M.E., Parthenakis F.I., Kalyva A., Pontikoglou C., Maragkoudakis S., Kontaraki J.E., Zacharis E.A., Patrianakos A., Chlouverakis G., Papadaki H.A., Vardas P.E. 2015. Circulating mesenchymal stem cells in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc. Pathol.* V. 24. P. 149. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2015.02.005>
- Meeson R., Sanghani-Keri A., Coathup M., Blunn G. 2019. VEGF with AMD3100 endogenously mobilizes mesenchymal stem cells and improves fracture healing. *J. Orthop. Res.* V. 37. P. 1294. <https://doi.org/10.1002/jor.24164>
- Mi L., Liu H., Gao Y., Miao H., Ruan J. 2017. Injectable nanoparticles/hydrogels composite as sustained release system with stromal cell-derived factor-1 α for calvarial bone regeneration. *Int. J. Biol. Macromol.* V. 101. P. 341. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.098>
- Nam D., Park A., Dubon M.J., Yu J., Kim W., Son Y., Park K.S. 2020. Coordinated regulation of mesenchymal stem cell migration by various chemotactic stimuli. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 8561. <https://doi.org/10.3390/ijms21228561>
- Nitzsche F., Müller C., Lukomska B., Jolkkonen J., Deten A., Boltze J. 2017. Concise review: MSC adhesion cascade—insights into homing and transendothelial migration. *Stem Cells.* V. 35. P. 1446. <https://doi.org/10.1002/stem.2614>
- Oh E.J., Lee H.W., Kalimuthu S., Kim T.J., Kim H.M., Baek S.H., Zhu L., Oh J.M., Son S.H., Chung H.Y., Ahn B.C. 2018. *In vivo* migration of mesenchymal stem cells to burn injury sites and their therapeutic effects in a living mouse model. *J. Control. Release.* V. 279. P. 79. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.020>
- Pan Q., Fouraschen S.M., de Ruiter P.E., Dinjens W.N., Kwekkeboom J., Tilanus H.W., van der Laan L.J. 2014. Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). V. 239. P. 105. <https://doi.org/10.1177/1535370213506802>
- Patry C., Doniga T., Lenz F., Vieregutz T., Weiss C., Tönshoff B., Kalenka A., Yard B., Krebs J., Schaible T., Beck G., Rafat N. 2020. Increased mobilization of mesenchymal stem cells in patients with acute respiratory distress syndrome undergoing extracorporeal membrane oxygenation. *PLoS One.* V. 15. P. e0227460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227460>
- Patry C., Stamm D., Betzen C., Tönshoff B., Yard B.A., Beck G.C., Rafat N. 2018. CXCR-4 expression by circulating endothelial progenitor cells and SDF-1 serum levels are elevated in septic patients. *J. Inflamm. (Lond.)* V. 15. P. 10. <https://doi.org/10.1186/s12950-018-0186-7>
- Pavon L.F., Sibov T.T., de Souza A.V., da Cruz E.F., Malheiros S.M.F., Cabral F.R., de Souza J.G., Bouffleur P., de Oliveira D.M., de Toledo S.R.C., Marti L.C., Malheiros J.M., Paiva F.F., Tannús A., de Oliveira S.M. et al. 2018. Tropism of mesenchymal stem cell toward CD133+ stem cell of glioblastoma *in vitro* and promote tumor proliferation *in vivo*. *Stem Cell Res. Ther.* V. 9. P. 310. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1049-0>
- Pereira C.L., Gonçalves R.M., Peroglio M., Pattappa G., D'Este M., Eglin D., Barbosa M.A., Alini M., Grad S. 2014. The effect of hyaluronan-based delivery of stromal cell-derived factor-1 on the recruitment of MSCs in degenerating intervertebral discs. *Biomaterials.* V. 35. P. 8144. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.017>
- Popielarczyk T.L., Huckle W.R., Barrett J.G. 2019. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells home via the PI3K-Akt, MAPK, and Jak/Stat signaling pathways in response to platelet-derived growth factor. *Stem Cells Dev.* V. 28. P. 1191. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0003>
- Ries C., Egea V., Karow M., Kolb H., Jochum M., Neth P. 2007. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood.* V. 109. P. 4055. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-051060>
- Rochefort G.Y., Delorme B., Lopez A., Héroult O., Bonnet P., Charbord P., Eder V., Domenech J. 2006. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells.* V. 24. P. 2202. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0164>
- Sackstein R., Merzaban J.S., Cain D.W., Dagia N.M., Spencer J.A., Lin C.P., Wohlgemuth R. 2008. *Ex vivo* glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat. Med.* V. 14. P. 181. <https://doi.org/10.1038/nm1703>
- Sasaki M., Abe R., Fujita Y., Ando S., Inokuma D., Shimizu H. 2008. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J. Immunol.* V. 180. P. 2581. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2581>
- Sasaki T., Fukazawa R., Ogawa S., Kanno S., Nitta T., Ochi M., Shimizu K. 2007. Stromal cell-derived factor-1 α improves infarcted heart function through angiogenesis in

- mice. *Pediatr. Int.* V. 49. P. 966.
<https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.2007.02491.x>
- Schenk S., Mal N., Finan A., Zhang M., Kiedrowski M., Popovic Z., McCarthy P.M., Penn M.S.* 2007. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells.* V. 25. P. 245.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0293>
- Schmidt-Lucke C., Escher F., Van Linthout S., Kühl U., Miteva K., Ringe J., Zobel T., Schultheiss H.P., Tschöpe C.* 2015. Cardiac migration of endogenous mesenchymal stromal cells in patients with inflammatory cardiomyopathy. *Mediators Inflamm.* V. 2015. P. 308185.
<https://doi.org/10.1155/2015/308185>
- Selma J.M., Das A., Awojodu A.O., Wang T., Kaushik A.P., Cui Q., Song H., Ogle M.E., Olingy C.E., Pendleton E.G., Tehrani K.F., Mortensen L.J., Botchwey E.A.* 2018. Novel lipid signaling mediators for mesenchymal stem cell mobilization during bone repair. *Cell. Mol. Bioeng.* V. 11. P. 241.
<https://doi.org/10.1007/s12195-018-0532-0>
- Shao Z., Zhang X., Pi Y., Wang X., Jia Z., Zhu J., Dai L., Chen W., Yin L., Chen H., Zhou C., Ao Y.* 2012. Polycaprolactone electrospun mesh conjugated with an MSC affinity peptide for MSC homing in vivo. *Biomaterials.* V. 33. P. 3375.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.033>
- Sheyn D., Shapiro G., Tawackoli W., Jun D.S., Koh Y., Kang K.B., Su S., Da X., Ben-David S., Bez M., Yalon E., Antebi B., Avalos P., Stern T., Zelzer E. et al.* 2016. PTH induces systemically administered mesenchymal stem cells to migrate to and regenerate spine injuries. *Mol. Ther.* V. 24. P. 318.
<https://doi.org/10.1038/mt.2015.211>
- Spaas J.H., De Schauwer C., Cornillie P., Meyer E., Van Soom A., Van de Walle G.R.* 2013. Culture and characterisation of equine peripheral blood mesenchymal stromal cells. *Vet. J.* V. 195. P. 107.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.05.006>
- Struzyna J., Pojda Z., Braun B., Chomiczka M., Sobiczewska E., Wrembel J.* 1995. Serum cytokine levels (IL-4, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF) in burned patients. *Burns.* V. 21. P. 437.
[https://doi.org/10.1016/0305-4179\(95\)00018-7](https://doi.org/10.1016/0305-4179(95)00018-7)
- Tang Y., Xia H., Kang L., Sun Q., Su Z., Hao C., Xue Y.* 2019. Effects of intermittent parathyroid hormone 1-34 administration on circulating mesenchymal stem cells in postmenopausal osteoporotic women. *Med. Sci. Monit.* V. 25. P. 259.
<https://doi.org/10.12659/MSM.913752>
- Tatsumi K., Ohashi K., Matsubara Y., Kohori A., Ohno T., Kakedachi H., Horii A., Kanegae K., Utoh R., Iwata T., Okano T.* 2013. Tissue factor triggers procoagulation in transplanted mesenchymal stem cells leading to thromboembolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 431. P. 203.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.134>
- Teo G.S., Ankrum J.A., Martinelli R., Boetto S.E., Simms K., Sciuto T.E., Dvorak A.M., Karp J.M., Carman C.V.* 2012. Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor- α -activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms. *Stem Cells.* V. 30. P. 2472.
<https://doi.org/10.1002/stem.1198>
- Uder C., Brückner S., Winkler S., Tautenhahn H.M., Christ B.* 2018. Mammalian MSC from selected species: Features and applications. *Cytometry A.* V. 93. P. 32.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.23239>
- Ullah M., Liu D.D., Thakor A.S.* 2019. Mesenchymal stromal cell homing: mechanisms and strategies for improvement. *iScience.* V. 15. P. 421.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.004>
- Vanden Berg-Foels W.S.* 2014. *In situ* tissue regeneration: chemoattractants for endogenous stem cell recruitment. *Tissue Eng. Part B Rev.* V. 20. P. 28.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2013.0100>
- Van der Velden D.L., Houthuijzen J.M., Roodhart J.M.L., van Werkhoven E., Voest E.E.* 2018. Detection of endogenously circulating mesenchymal stem cells in human cancer patients. *Int. J. Cancer.* V. 143. P. 2516.
<https://doi.org/10.1002/ijc.31727>
- Vieira C.P., McCarrel T.M., Grant M.B.* 2021. Novel methods to mobilize, isolate, and expand mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 5728.
<https://doi.org/10.3390/ijms22115728>
- Wan M., Li C., Zhen G., Jiao K., He W., Jia X., Wang W., Shi C., Xing Q., Chen Y.F., Jan De Beur S., Yu B., Cao X.* 2012. Injury-activated transforming growth factor beta controls mobilization of mesenchymal stem cells for tissue remodeling. *Stem Cells.* V. 30. P. 2498.
<https://doi.org/10.1002/stem.1208>
- Wang M., Chen F., Wang J., Chen X., Liang J., Yang X., Zhu X., Fan Y., Zhang X.* 2018. Calcium phosphate altered the cytokine secretion of macrophages and influenced the homing of mesenchymal stem cells. *J. Mater. Chem. B.* V. 6. P. 4765.
<https://doi.org/10.1039/c8tb01201f>
- Wiegner R., Rudhart N.E., Barth E., Gebhard F., Lampl L., Huber-Lang M.S., Brenner R.E.* 2018. Mesenchymal stem cells in peripheral blood of severely injured patients. *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.* V. 44. P. 627.
<https://doi.org/10.1007/s00068-017-0849-8>
- Wu C.C., Wang I.F., Chiang P.M., Wang L.C., Shen C.J., Tsai K.J.* 2017. G-CSF-mobilized bone marrow mesenchymal stem cells replenish neural lineages in Alzheimer's disease mice via CXCR4/SDF-1 chemotaxis. *Mol. Neurobiol.* V. 54. P. 6198.
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-0122-x>
- Yang J.W., Zhang Y.F., Wan C.Y., Sun Z.Y., Nie S., Jian S.J., Zhang L., Song G.T., Chen Z.* 2015. Autophagy in SDF-1 α -mediated DPSC migration and pulp regeneration. *Biomaterials.* V. 44. P. 11.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.12.006>
- Zhang D., Jiang M., Miao D.* 2011. Transplanted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in mouse. *PLoS One.* V. 6. P. e16789.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016789>
- Zhou S.B., Wang J., Chiang C.A., Sheng L.L., Li Q.F.* 2013. Mechanical stretch upregulates SDF-1 α in skin tissue and induces migration of circulating bone marrow-derived stem cells into the expanded skin. *Stem Cells.* V. 31. P. 2703.
<https://doi.org/10.1002/stem.1479>
- Zhou T., Yuan Z., Weng J., Pei D., Du X., He C., Lai P.* 2021. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *J. Hematol. Oncol.* V. 14. P. 24.
<https://doi.org/10.1186/s13045-021-01037-xa>

Activation of Endogenous Mesenchymal Stromal Cells as an Approach to Tissue Regeneration

O. V. Payushina^a, *, D. A. Tsomartova^a, Ye. V. Cheresheva^a, M. Yu. Ivanova^a, T. A. Lomanovskaya^a,
M. S. Pavlova^a, and S. L. Kuznetsov^a

^a*Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University),
Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: payushina@mail.ru*

Mesenchymal stromal cells (MSCs) which have a complex pro-regenerative effect on damaged tissues represent a promising resource for cell therapy for a wide range of diseases. However, transplantation of autologous or donor MSCs to a patient is associated with a number of problems, such as variability of cell properties depending on their source and cultivation conditions, a decrease in their therapeutic potential and the possibility of acquiring immunogenicity or tumorigenicity during *in vitro* expansion, and the invasiveness of the isolation procedure. One of the ways to avoid these problems can be the impact on endogenous MSCs by stimulating their directed migration into tissue defects, without the need for extraction from the body, *in vitro* cultivation and reintroduction to the patient. This review discusses approaches to activating the mobilization of MSCs from tissue niches and/or stimulating their migration to the target area, which can be considered as a safer, and possibly more effective alternative to MSC transplantation.

Keywords: mesenchymal stromal cells, regenerative medicine, mobilization, migration, chemoattractants

РОСТОВЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИЙ A172 И R1, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ДЕЙСТВИЮ ТЕМОЗОЛОМИДА

© 2023 г. А. А. Пиневи^{1, 2, *}, Н. Л. Варганян¹, А. В. Карташев¹, Л. Н. Киселева¹, И. В. Смирнов¹, Ж. Ю. Сидорова^{3, 4}, С. П. Свитина³, М. П. Самойлович^{1, 2}

¹Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова, Санкт-Петербург, 197758 Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

³Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург, 191024 Россия

⁴Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ “Курчатовский институт”, Санкт-Петербург, 188300 Россия

*E-mail: agniapinevich@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2022 г.

После доработки 07.11.2022 г.

Принята к публикации 08.11.2022 г.

Рецидивирование глиобластом обусловлено исходной и приобретенной в результате терапии резистентностью опухолевых клеток. Широко ведутся исследования по поиску маркеров, которые позволили бы предсказывать уровень резистентности клеток глиобластом к терапии. Сложность проблемы связана с высокой гетерогенностью индивидуальных опухолей и клеточного состава каждой опухоли. В представленной работе проведено сравнительное изучение однократного действия темозоломида в форме Темодала® на известную линию глиобластомы A172 и новую линию R1. В высокочувствительной к темозоломиду линии A172 после воздействия 0.1 мМ химиопрепарата сохранились отдельные клетки, которые возобновляли пролиферацию. Для глиобластомы R1 доза темозоломида, после которой выживали единичные клетки, возобновлявшие пролиферацию, составила 1.0 мМ. Популяции, полученные в результате пролиферации таких клеток, были обозначены как резистентные. В резистентных клетках A172 и R1 исследовали экспрессию генов, ответственных за устойчивость к химиопрепаратам и прогрессию опухолей (*MGMT*, *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2*), наличие фермента *MGMT*, экспрессию генов ростовых факторов (*VEGF*, *HGF*), а также продукцию цитокинов *IL-6* и *IL-8* и экспрессию кодирующих их генов. В клетках A172 был подтвержден метилированный статус промотора гена *MGMT*, а также отсутствие экспрессии соответствующего гена. Впервые показано, что глиобластома R1 гетерогенна по статусу метилирования промотора гена *MGMT* и присутствию самого фермента. В популяциях резистентных клеток A172 и R1 уровень метилирования промотора гена *MGMT* был ниже, чем в исходных клетках, а экспрессия гена усилена, что может быть причиной большей устойчивости таких клеток к химиопрепаратам. Экспрессия большинства генов, связанных с устойчивостью к химиотерапии и более агрессивным течением заболевания, генов ростовых факторов и интерлейкинов в резистентных клетках A172 была выше, чем в интактных клетках. В резистентных клетках R1 экспрессия большинства тех же генов (за исключением *ABCC1* и *VEGF*, уровень экспрессии которых менялся незначительно) была, напротив, ниже, чем в исходной линии. Полученные результаты подтверждают значимость *MGMT* в формировании резистентности клеток глиобластом к темозоломиду. Прогностическая ценность остальных исследованных показателей пока представляется неоднозначной.

Ключевые слова: глиобластома, A172, R1, резистентные клетки, темозоломид, *MGMT*, множественная лекарственная устойчивость, *IL-6*, *IL-8*, Темодал®

DOI: 10.31857/S0041377123020086, **EDN:** NDBVPD

Глиобластомы представляют собой наиболее распространенные злокачественные опухоли нервной системы человека, отличающиеся высокой резистентностью к лечебным воздействиям. Стандартная терапия пациентов с глиобластомой включает максимальную хирургическую резекцию в сочетании с лучевой терапией и (или) химиотерапию темозоломидом (Braun, Ahluwalia, 2017; Lu et al., 2018; Тягунова и др., 2022). Несмотря на проводимую терапию, неизбежно возникают рецидивы глиобластомы, приводящие к низкому уровню выживаемости, медиана которого составляет около 14 мес.

Рецидивирование глиобластом обусловлено как свойственной исходной популяции резистентно-

стью опухолевых клеток, так и резистентностью, приобретенной в результате терапии. До сих пор лечение пациентов с рецидивирующей глиобластомой не приводит к желаемым результатам, и почти 90% рецидивов глиобластомы не отвечают на повторный курс химиотерапии (Oliva et al., 2010). Основным препаратом первой линии химиотерапии пациентов с первичной глиобластомой в настоящее время является темозоломид. Это цитостатический препарат алкилирующего типа действия, механизм которого состоит в присоединении метильной группы к молекуле ДНК, что приводит к нарушению ее структуры и гибели клетки (Юкальчук и др., 2016; Thomas et al., 2017; Strobel et al., 2019). Изначальный уровень чувствительности к этому препарату и его вариации в ходе лечения индивидуальны для каждого пациента.

Известно, что глиобластомы отличаются высокой степенью гетерогенности, каждая опухоль несет в себе черты уникальности. Опухоли, возникшие у разных пациентов, различаются по морфологии, фенотипу и генетическим особенностям клеток (Кит и др., 2017; Mirzayans, Muggay, 2020). При этом каждая из них сформирована неоднородными клеточными популяциями. Учитывая эти особенности глиобластом, актуальным является как изучение реакций на темозоломид различных клеточных линий, так и исследование свойств клеточных популяций, которые являются потомками единичных, наиболее резистентных к препарату клеток в исходной гетерогенной клеточной линии.

В исследование нами были взяты две линии глиобластом человека: A172 и R1. Линия A172 хорошо изучена, используется в лабораторной практике уже с 70-х годов прошлого века и относится к числу чувствительных к темозоломиду (Giard et al., 1973). Линия R1 получена и охарактеризована недавно (Киселева и др., 2017), и действие на нее темозоломида не известно. Однако ранее мы показали, что линия R1 чувствительна к фотемустину, химиопрепарату второй линии терапии глиобластом (Киселева и др., 2018). Клетки R1, так же, как и клетки линии A172, обладали существенно более высокой чувствительностью к этому препарату, чем линии T98G и T2, о которых известно, что они высоко резистентны к действию темозоломида.

Цель настоящей работы заключалась в изучении действия темозоломида на линии глиобластом A172

и R1 и характеристике потомков наиболее резистентных к препарату клеток исходных линий, включающая исследование экспрессии ряда генов, ответственных за устойчивость к химиопрепаратам и прогрессию опухолей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные линии. Клетки глиобластомы линии A172 были получены из коллекции клеточных культур Научно-исследовательского института гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава РФ (Санкт-Петербург). Клеточная линия R1 была выделена из операционного материала пациента в Петербургском институте ядерной физики им. Б.П. Константинова национального исследовательского центра “Курчатовский институт” (Санкт-Петербург). Обе линии были охарактеризованы ранее (Киселева и др., 2016, 2017, 2018).

Культивирование клеточных линий. Клетки культивировали в вентилируемых пластиковых флаконах площадью 12.5 см², а также в 12-, 24- и 96-луночных планшетах (Jet Biofil, Китай; Sarstedt, Германия) в среде α MEM (БиолоТ, Россия), содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) и 0.5% гентамицина (БиолоТ, Россия) при 37°C и 6% CO₂. Пересев клеток проводили с помощью 0.25%-ного раствора трипсина с версеном (БиолоТ, Россия).

Морфологические исследования. Клетки фиксировали ледяным карбинолом, окрашивали по Май-Грюнвальду–Гимзе и фотографировали с помощью инвертированного микроскопа Nikon Diaphot, оборудованного камерами Nikon D60 и Nikon D5600 (Nikon, Япония).

Обработка клеточных линий темозоломидом. Для обработки клеток глиобластом использовали водорастворимый препарат Темодал® (Бакстер Онкология ГмбХ, Германия), действующим веществом которого является темозоломид. Непосредственно перед внесением в клеточные культуры Темодал® растворяли в деионизированной воде и стерилизовали фильтрованием. Клетки глиобластом в логарифмической фазе роста культивировали в ростовой среде, содержащей 0.1–3 мМ темозоломида, в 24-луночных планшетах в течение 24 ч, после чего дважды отмывали ростовой средой. После отмывания клетки из каждой лунки 24-луночного планшета пересевали в 12 лунок 96-луночных планшетов, считая число клеток и посевную дозу на кондуктометрическом счетчике Z1 Coulter Counter (Beckman Coulter, США). Каждые 3–4 сут после удаления препарата и посева проводили замену 1/2 ростовой среды в каждой лунке. В течение первых 14 сут культивирования считали число клеток каждые 4–5 сут и впоследствии каждые 7 сут вплоть до 28 сут. Клетки, продолжившие или возобновившие пролиферацию после обработки препаратом, на 28 сут культивиро-

Принятые сокращения: ABCB1 (MDR1) – член 1 подсемейства В АТФ-связывающей кассеты (белок множественной лекарственной устойчивости 1); ABCG2 (BCRP) – член 2 подсемейства G АТФ-связывающей кассеты (белок резистентности рака молочной железы); ASAH1 – кислая церамидаза; CXCR1 – альфа-рецептор интерлейкина 8; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; HGF – гепатоцитарный ростовой фактор; IL – интерлейкин; MGMT – O-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза; MSP – метил-специфическая полимеразная цепная реакция; STAT3 – сигнальный белок и активатор транскрипции 3; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных для амплификации генов

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>GAPDH</i>	GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC	CATGAGTCCTTCCACGATACC
<i>VEGF</i>	AGGGCAGAATCATCACGAAGT	AGGGTCTCGATTGGATGGCA
<i>HGF</i>	GCTATCGGGGTAAGACTTACA	CGTAGCGTACCTCTGGATTGC
<i>IL-6</i>	ACTCACCTCTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG
<i>IL-8</i>	ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC	AACCCTCTGCACCCAGTTTTTC
<i>MGMT</i>	ACCGTTTGCGACTTGGTACTT	GACCCTGCTCACAACCAGAC
<i>ABCB1 (MDR1)</i>	TTGCTGCTTACATTCAGGTTTCA	AGCCTATCTCCTGTCGCATTA
<i>ABCC1 (MRP1)</i>	CTSTATCTCTCCCGACATGACC	AGCAGACGATCCACAGCAAAA
<i>ABCG2 (BCRP)</i>	GTTTTGTGTTTATGATGGTCTGTTG	ATGCTGCAAAGCCGTAATCC
<i>ASAH1</i>	ATTGGCCCCAGCCTACTTTAT	CCCTGCTTAGCATCGAGTTCAT

вания последовательно пересекали в лунки 24-, 12-луночных планшетов и флаконы площадью 12.5 см². Все эксперименты проводили в трех повторностях.

Время удвоения численности популяций резистентных клеток (td) рассчитывали по формуле: $td = \frac{\ln 2 \times N_0}{dN/dt}$, где N_0 – исходное число клеток (посевная доза), dN – прирост числа клеток, а dt – время (ч) от посева до снятия культуры (Гриффитс, 1989).

Иммуноцитохимическое выявление MGMT. Клетки культивировали в камерах для клеток на стекле BD Falcon CultureSlides (BD Biosciences, США) и фиксировали 4%-ным забуференным формальдегидом в течение 10 мин. Демаскирование антигена проводили путем термической инкубации при 95–99°C в 0.01M цитратном буфере (pH 6.0) в течение 20 мин. Клетки последовательно инкубировали с первичными антителами против MGMT (О-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы) и мечеными антителами Dako EnVision+ System-HRP Labelled polymer (Dako, Дания) по 30 мин во влажной камере при комнатной температуре. Ферментную метку визуализировали с помощью хромогена EnVision™ FLEX DAB+ (Dako, Дания) и субстратного буфера EnVision™ FLEX. Контрастное окрашивание ядер проводили в гематоксилине Майера (БиоВитрум, Россия) в течение 2 мин. Изображения получали при помощи сканера Leica SCN 400 (Leica Microsystems, Германия) с использованием программы Aperio Image Scope (Leica Microsystems, Германия) и микроскопа Axio Imager A2, оборудованного камерой AxioCam HRc (Carl Zeiss, Германия).

Исследование активности генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. РНК выделяли с помощью TRIzol Reagent согласно рекомендациям производителя (Thermo Fisher Scientific, США). В реакции обратной транскрипции использовали 500 нг РНК. Этапы выполнения анализа описаны нами ранее (Киселева и др., 2016). Последовательности праймеров представлены в табл. 1.

Праймеры синтезированы фирмой Люмипроб РУС (Россия).

Уровень экспрессии генов представляли в виде разницы между пороговым циклом исследуемого гена и гена сравнения GAPDH (ΔCt , где Ct – пороговый цикл, соответствующий числу циклов амплификации, необходимых для достижения порогового значения флуоресценции). Для сравнения уровня экспрессии генов в клетках до и после воздействия темозоломида использовали метод относительного количественного определения генов (метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$); $2^{-\Delta\Delta Ct}$ представляет собой кратность разницы между экспрессией гена в интактных и резистентных к темозоломиду клетках (Livak, Schmittgen, 2001).

Определение статуса метилирования гена MGMT. В качестве метода анализа статуса метилирования CpG-островков промоторных участков гена MGMT была использована метил-специфическая полимеразная цепная реакция (MSP) (Herman et al., 1996; Kristensen, Hansen, 2009). Выделение ДНК проводили с помощью набора для выделения геномной ДНК из клеток, тканей и крови производства ООО Биолабмикс (Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Для проведения бисульфитной конверсии проб ДНК использовали набор EZ DNA Methylation-Gold® (Zymo Research, США). После получения конвертированной и очищенной ДНК проводили амплификацию с праймерами, специфичными для метилированных и неметилированных участков ДНК промоторных областей гена MGMT (Christians et al., 2012): 5'-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC-3' (прямой праймер) и 5'-GCACTCTTCCGAAAACGAAACG-3' (обратный праймер) для обнаружения метилированных матриц (длина продукта 81 п.н.); 5'-TTTGTGTTTTGATGTTTTGTAGGTTTTTGT-3' (прямой праймер) и 5'-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAACA-3' (обратный праймер) для обнаружения неметилированных матриц (длина продукта 93 п.н.).

ПЦР проводили в общем объеме 12 мкл, содержащем ПЦР-буфер, 1.1 mM MgCl₂, 0.2 mM смеси дезокси-нуклеотидтрифосфатов, по 10 пмоль соответству-

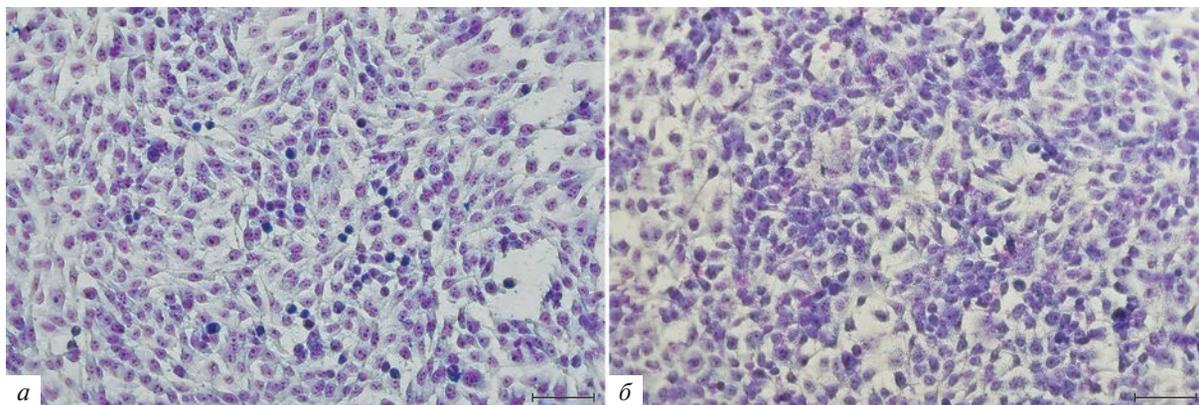


Рис. 1. Интактные клетки линий A172 (а) и R1 (б). Окраска по Май-Грюнвальду–Гимзе. Масштабные отрезки: 100 мкм.

ющего прямого и обратного праймера, 1 ед. Taq-полимеразы и 2 мкл ДНК-матрицы, обработанной бисульфитом. Программа ПЦР составляла 95°C в течение 3 мин, затем 40 циклов 95°C по 50 с, 60°C – 50 с, 72°C – 50 с и заключительный этап: 72°C в течение 3 мин. После проведения 40 циклов ПЦР полученный амплификат анализировали с помощью электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле. Фрагменты ДНК визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете после окрашивания геля бромистым этидием в концентрации 1 мкг/мл. Наличие амплификата, полученного при проведении ПЦР с праймерами для метилированных участков ДНК, свидетельствовало о наличии aberrантного метилирования. Наличие ПЦР-продукта, полученного при проведении ПЦР с праймерами для неметилированных участков ДНК, и отсутствие амплификата с праймерами для метилированных участков ДНК свидетельствовало об отсутствии aberrантного метилирования.

Концентрацию интерлейкинов IL-6 и IL-8 в среде культивирования клеток определяли с помощью наборов Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ и Интерлейкин-8-ИФА-БЕСТ (ООО Вектор-Бест, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистический анализ выполняли при помощи программного обеспечения Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics 22.

Использованные реактивы: среда α MEM, гентамицин, раствор 0.25%-ного трипсина с версеном, деионизированная вода, фосфатно-солевой буферный раствор (БиолоТ, Россия), эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, США), Темодал® (Бакстер Онкология ГмбХ, Германия), формальдегид, гематоксилин Майера (БиоВитрум, Россия), поликлональные кроличьи антитела к MGMT (Abcam, Великобритания), антитела Dako EnVision+ System-HRP Labelled polymer, хромоген EnVision™ FLEX DAB+, субстратный буфер EnVision™ FLEX (Dako, Дания), TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, США), Taq-полимераза, 10× ПЦР-буфер, MgCl₂ (Силекс, Рос-

сия), праймеры (НПК, Россия; Синтол, Россия), трифосфаты (SibEnzyme, Россия), акриламид, бисакриламид, TEMED (AppliChem, Германия), персульфат аммония (Panreac, Испания).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клеточные линии глиобластом A172 и R1 были представлены фибробластоподобными отростчатыми клетками (рис. 1). Подробная морфологическая характеристика интактных культур A172 и R1 была проведена ранее (Киселева и др., 2016; 2017).

Воздействие темозоломида на клетки линии A172. Для обработки клеток глиобластомы линии A172 темозоломидом был выбран диапазон концентраций 0.1–1 мМ (рис. 2). В течение 4 сут после воздействия препарата клетки продолжали пролиферировать. После 4-суточного культивирования, за счет гибели клеток их количество стало уменьшаться. К 14 сут во всех культурах A172, подвергнутых действию темозоломида, число живых клеток не превышало 6% от исходной посевной дозы. Наконец, к 21 сут в культурах A172, обработанных 0.25–1 мМ темозоломида не было выявлено живых клеток. В течение следующих 7 сут жизнеспособные клетки в этих культурах обнаружены не были. Таким образом, концентрация темозоломида свыше 0.25 мМ оказалась летальной для клеток линии A172. В то же время, в культуре A172, испытавшей воздействие темозоломида в дозе 0.1 мМ, к 14 сут оставались одиночные клетки, численность которых составляла 3.8% от исходной посевной дозы. За следующую неделю (14–21 сут культивирования) количество клеток увеличилось вдвое, а к 28 сут за счет пролиферации клеток произошло восстановление численности популяции до исходных значений. Одиночные клетки, восстановившие способность к пролиферации, представляют собой резистентные к темозоломиду клетки линии A172. Время удвоения таких резистентных клеток между 14 и 21 сут культивирования увеличивалось в 4 раза,

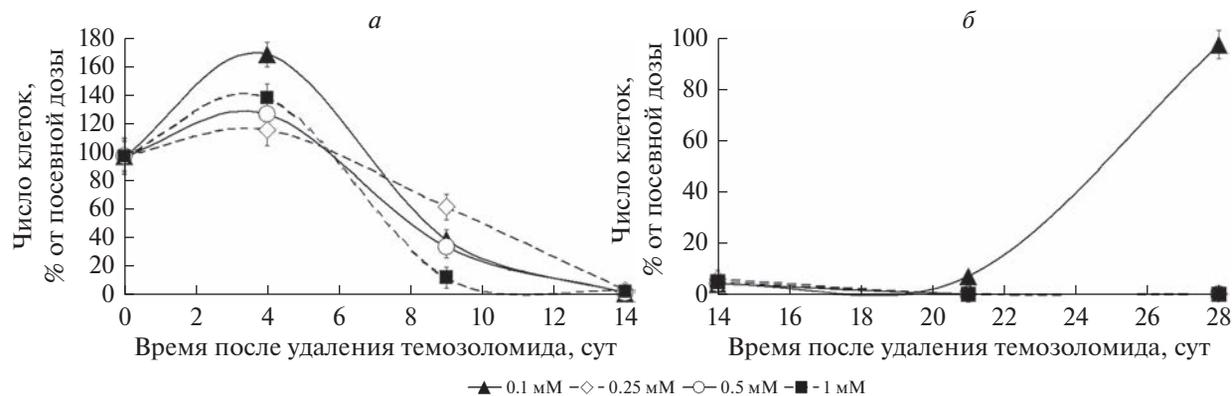


Рис. 2. Изменения численности клеток линии A172 на ранних (а) и поздних (б) сроках после обработки темозоломидом в разных концентрациях.

а между 21 и 28 сут уменьшалось в 3.5 раза по сравнению с интактной культурой (рис. 3).

Воздействие темозоломида на клетки линии R1. Чувствительность линии R1 к воздействию темозоломида ранее изучена не была, поэтому для обработки клеток был выбран более широкий диапазон (0.25–3 мМ) концентраций препарата (рис. 4). В отличие от клеток A172, в культурах R1 непосредственно после удаления темозоломида не происходило роста численности клеточной популяции. Вплоть до 9-х сут культивирования число клеток R1 продолжало уменьшаться; количество сохранившихся клеток находилось в обратной зависимости от использованной дозы препарата. Дальнейшая динамика гибели и восстановления клеток линии R1 также определялась концентрацией темозоломида. Начиная с 9 сут, клетки R1, обработанные 0.25 и 0.5 мМ препарата, возобновляли пролиферацию, и до конца культивирования их количество увеличивалось в 8–10 раз по сравнению с исходной посевной дозой. После использования темозоломида в концентрации 1 мМ пролиферация и рост численности клеток R1 начался с 14-х сут культивирования. Клетки R1, обработанные 2 мМ темозоломида, возобновили пролиферацию к 21-м сут, и за 1 нед. их численность достигла значений посевной дозы; в течение следующей недели была отмечена массовая гибель этих клеток, что привело к гибели культуры к 28-м сут. Наконец, в культурах R1, обработанных 3 мМ темозоломида, к 14-м сут не оставалось живых клеток и при дальнейшем наблюдении не было признаков пролиферации.

Таким образом, резистентные к темозоломиду клетки, возобновившие устойчивую пролиферацию, были получены при обработке глиобластомы R1 препаратом в концентрации 1 мМ. Наименьшее время удвоения эти клетки демонстрировали между 14 и 21 сут культивирования (рис. 3), однако оно превышало таковое у интактных клеток в 4 раза. Между 21 и 28 сут культивирования происходило дальнейшее замедление пролиферации таких резистентных клеток почти в 9 раз по сравнению с интактной культурой.

Уровень экспрессии генов в клетках A172 и R1. В интактных и резистентных к темозоломиду клетках A172 и R1 исследовали экспрессию генов, опосредующих различные механизмы резистентности опухолей к лекарственной терапии. Определяли статус метилирования промотора гена *MGMT*, а также уровень экспрессии этого гена. В клетках A172 было показано наличие метилирования промотора гена *MGMT*. Статус метилирования промотора гена *MGMT* в клетках линии R1 ранее не был определен.

По нашим данным в популяции клеток R1 присутствуют клетки как с метилированным, так и с неметилированным промотором гена *MGMT* (рис. 5а). Определение активности гена *MGMT* подтвердило полученные результаты, показав практически полное отсутствие экспрессии *MGMT* в клетках A172 и лишь незначительную экспрессию этого гена в клетках R1. При этом в резистентных клетках обеих линий экспрессия *MGMT* существенно возрастала. В клетках A172 она увеличилась примерно в 50 раз, а в клетках R1 увеличилась незначительно (рис. 5б). Усиление экспрессии сопровождалось снижением числа клеток, несущих метилированный промотор гена *MGMT* (рис. 5а). Иммуноцитохимическое исследование интактных клеток показало, что популя-

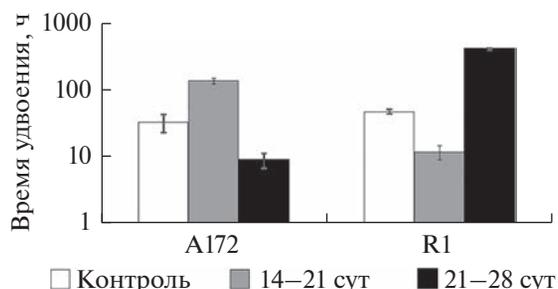


Рис. 3. Время удвоения интактных и обработанных темозоломидом клеток глиобластом линий A172 и R1. Указано время (сут) после обработки темозоломидом.

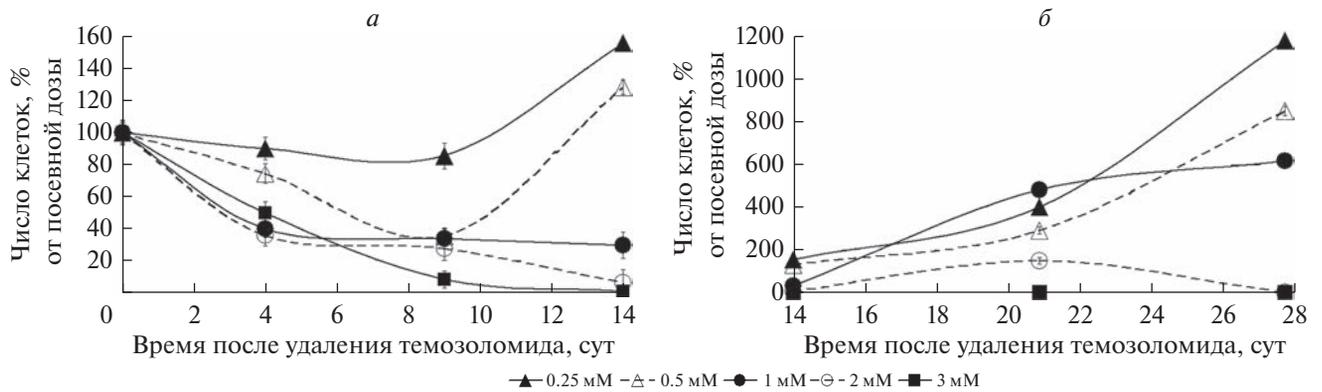


Рис. 4. Изменения численности клеток линии R1 на ранних (а) и поздних (б) сроках после обработки темозоломидом в разных концентрациях.

ция клеток линии R1 была неоднородной по наличию MGMT, в то время как в клетках линии A172 фермент обнаружен не был (рис. 5в, г).

В клетках линий A172 и R1 исследовали активность генов множественной лекарственной устойчивости: *ABCB1 (MDR1)*, *ABCC1 (MRP1)* и *ABCG2 (BCRP)*. Более всего в обеих линиях была выражена экспрессия гена *ABCC1 (BCRP)*, в резистентных клетках она практически не изменялась. Активность генов *ABCB1 (MDR1)* и *ABCG2 (BCRP)* в клетках A172 и R1 была выражена слабо, однако в резистентных клетках A172 экспрессия этих генов возрастала более чем в 10 раз, а в резистентных клетках R1, напротив, еще более снижалась (рис. 6).

По экспрессии генов *IL-6* и *IL-8* клетки линий A172 и R1 существенно различались. Клетки A172 характеризовались умеренной активностью этих генов, тогда как клеткам R1 была свойственна чрезвычай-

чайно высокая экспрессия *IL-6* и, особенно, *IL-8*. В резистентных к темозоломиду клетках этих линий мы наблюдали выраженное, но разнонаправленное, изменение активности обоих этих генов, которое проявлялось в усилении экспрессии генов *IL-6* и *IL-8* в клетках A172 и ослаблении их активности в клетках линии R1 (рис. 7).

Количественное определение цитокинов *IL-6* и *IL-8* было проведено в среде культивирования интактных и резистентных клеток A172 и R1. Полученные результаты согласуются с данными по экспрессии соответствующих генов, подтверждая высокую продукцию *IL-6* и *IL-8* интактными клетками R1 и снижение ее в резистентных клетках. В клетках A172 отмечена обратная ситуация (рис. 8).

Клетки A172 и R1 характеризовались близкими значениями экспрессии гена *VEGF*. В резистентной популяции клеток линии A172 активность этого гена десятикратно возрастала, в резистентных клетках R1 оставалась неизменной (рис. 9). Ген *HGF* практически не экспрессировался в интактных клетках A172 и проявлял низкую активность в интактных клетках R1. В резистентных клетках A172 экспрессия гена *HGF* возрастала, а в клетках R1, напротив, существенно снижалась (рис. 9). В табл. 2 представлены обобщенные результаты изучения экспрессии генов в исследованных линиях глиобластом, а также в высоко резистентной к темозоломиду линии T98G, подробная характеристика которой была дана нами ранее (Пиневиц и др., 2022).

Таблица 2. Экспрессия генов в клетках глиобластом человека, интактных (инт.) и резистентных (рез.) к действию темозоломида

Ген	Уровень экспрессии гена в клетках линии глиобластомы человека					
	A172		R1		T98G	
	инт.	рез.	инт.	рез.	инт.	рез.
<i>ABCB1 (MDR1)</i>	±	+	±	±	±	±
<i>ABCC1 (MRP1)</i>	++	++	++	++	++	+++
<i>ABCG2 (BCRP)</i>	±	+	+	±	++	++
<i>MGMT</i>	-	+	+	+	+	+
<i>IL-6</i>	+	++	+++	+	+	++
<i>IL-8</i>	+	++	+++	++	+	++
<i>VEGF</i>	++	+++	++	++	++	++
<i>HGF</i>	-	+	+	-	-	-

Примечание. Уровень экспрессии гена: высокий (+++), средний (++) , слабый (+), почти отсутствует (±), экспрессии нет (-).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время приведены убедительные доказательства того, что первичная и рецидивирующая глиобластомы существенно различаются между собой как морфологически, так и молекулярно-генетически (Kim et al., 2015; Marucci et al., 2015; Campos et al., 2016). Клетки глиобластом, избегающие гибели под воздействием лучевой и лекарственной терапии, эво-

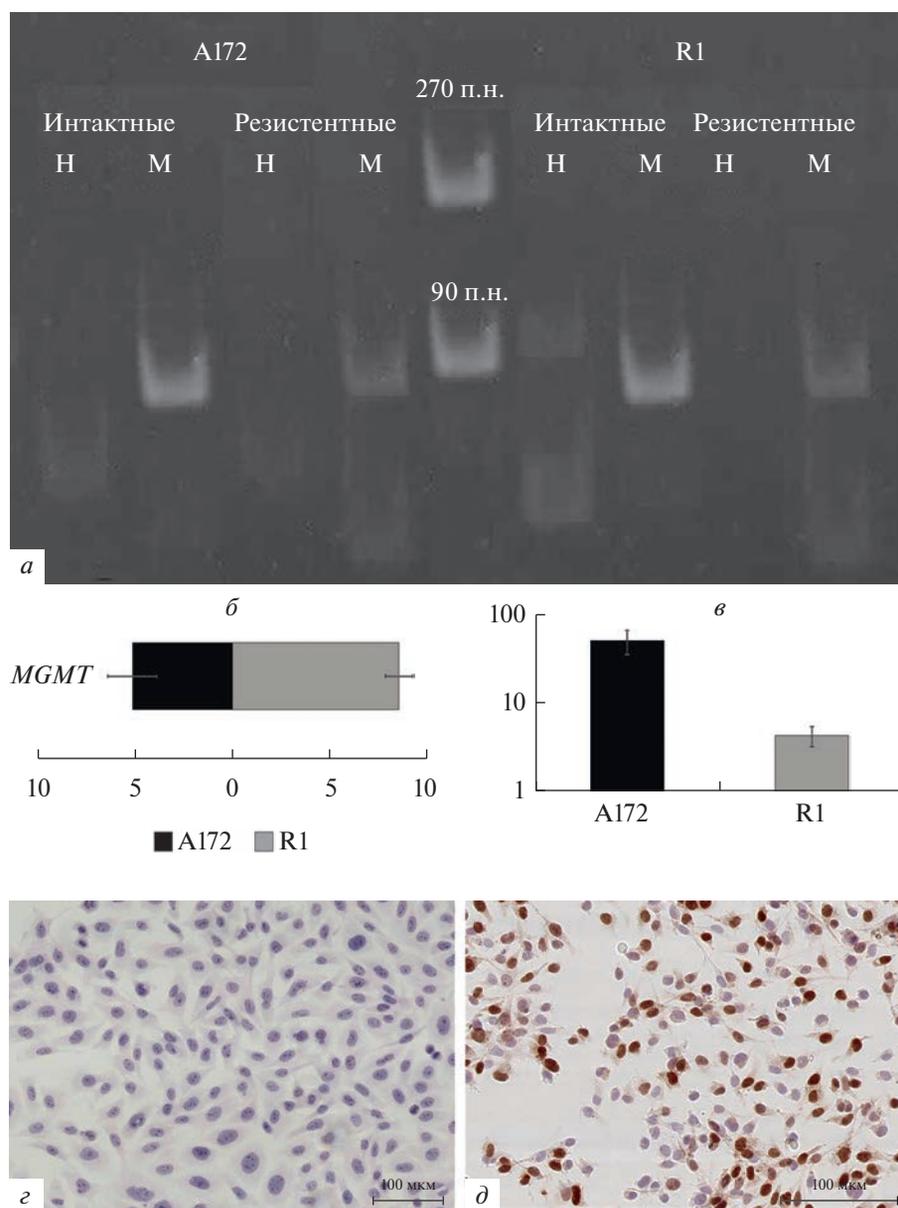


Рис. 5. Анализ метилирования CpG-островков промоторных областей гена *MGMT* в интактных и резистентных к темозоломиду клетках A172 и R1. *a*: дорожки Н и М – амплификат, полученный с праймерами для неметилированных и метилированных участков ДНК соответственно. *б* – Относительный уровень экспрессии гена *MGMT* в интактных клетках линий A172 и R1; по горизонтали – ΔCT (разница между пороговым циклом исследуемого гена и гена сравнения *GAPDH*); горизонтальные отрезки – стандартное отклонение. *в* – Изменение экспрессии гена *MGMT* в резистентных к темозоломиду клетках A172 и R1; по вертикали – $2^{-\Delta\Delta CT}$ (кратность разницы между экспрессией гена в резистентных и интактных клетках); за 1 ед. принят уровень активности гена *MGMT* в интактных клетках; вертикальные отрезки – стандартное отклонение. *з*, *д* – Иммуноцитохимическое определение наличия белка *MGMT* в интактных клетках A172 и R1 соответственно; масштабные отрезки: 100 мкм.

люционируют и приобретают свойства, определяющие их устойчивость к дальнейшему лечению.

Феномен формирования резистентности глиобластом к терапии и механизмы, задействованные в этом процессе, изучаются очень активно (Daniel et al., 2019; Xia et al., 2021). В качестве клеточных моделей в подобных исследованиях принято использовать клеточные линии глиобластом, различающиеся

между собой по ряду определенных параметров. Считается, что разнообразие клеточных линий в какой-то мере отражает чрезвычайно высокое разнообразие вариантов этого заболевания (Li et al., 2022; Zhu et al., 2022) и позволяет получить более достоверные результаты.

В лабораторной практике используется целый спектр линий глиобластом человека, как высоко

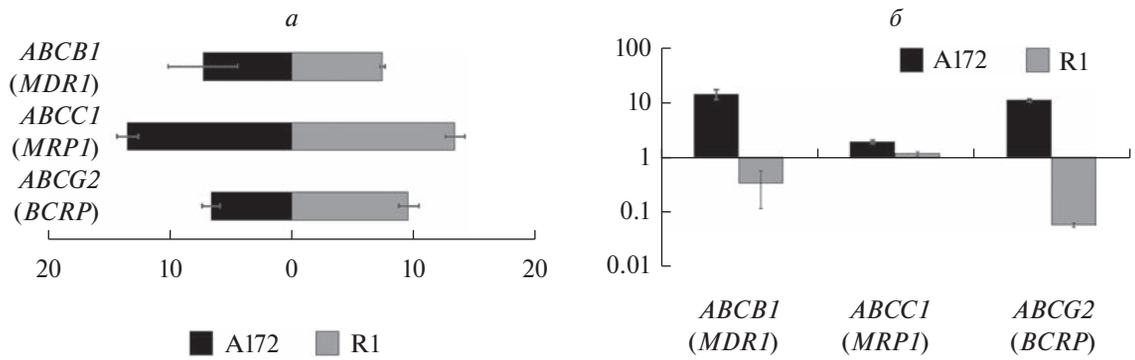


Рис. 6. Относительный уровень экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в intactных клетках линий A172 и R1. *а* – Значения ΔСТ; горизонтальные отрезки – стандартное отклонение. *б* – Изменение экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в резистентных к темозоломиду клетках A172 и R1; по вертикали – значение 2^{-ΔΔСТ}. Другие объяснения см. в подписи к рис. 5.

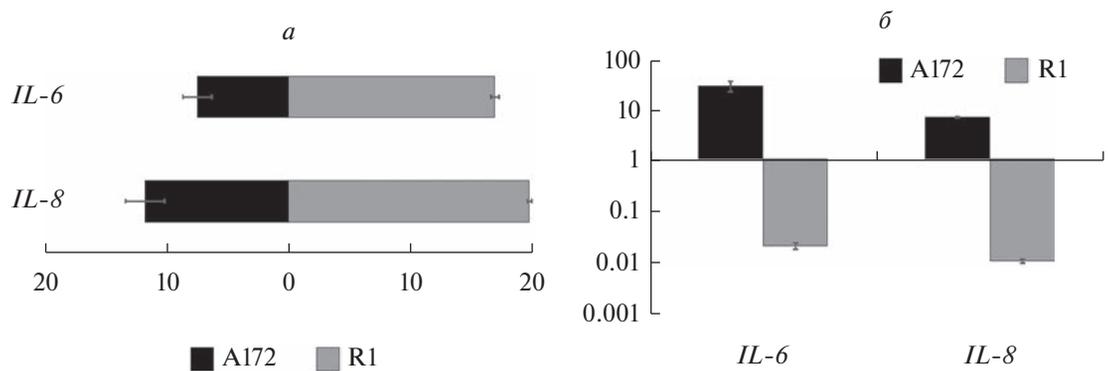


Рис. 7. Относительный уровень экспрессии генов интерлейкинов (*IL-6*, *IL-8*) в intactных клетках линий A172 и R1. *а* – Значения ΔСТ; горизонтальные отрезки – стандартное отклонение. *б* – Изменение экспрессии генов интерлейкинов в резистентных к темозоломиду клетках A172 и R1; по вертикали – значение 2^{-ΔΔСТ}. Другие объяснения см. в подписи к рис. 5.

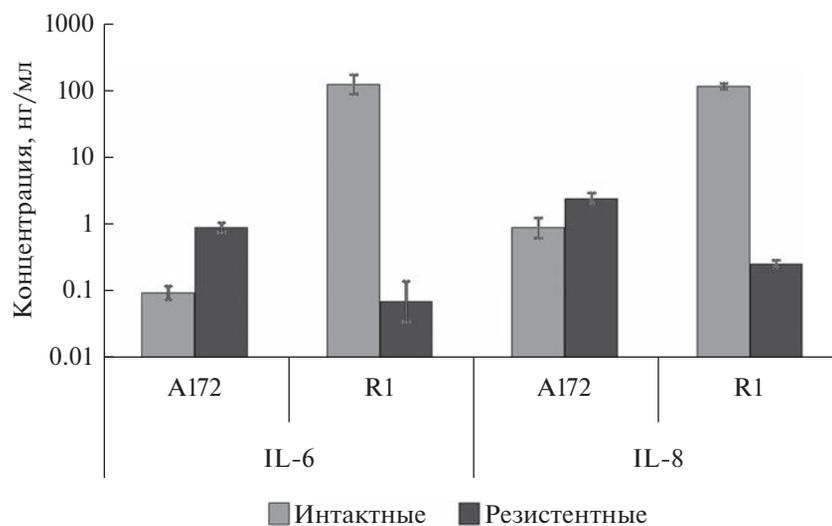


Рис. 8. Концентрация цитокинов IL-6, IL-8 в среде культивирования intactных и резистентных к темозоломиду клеток линий глиобластом человека A172 и R1. Вертикальные отрезки – стандартное отклонение.

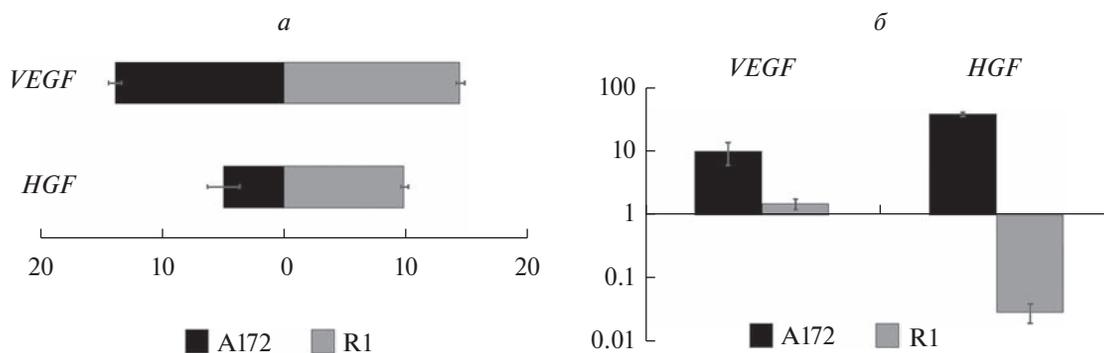


Рис. 9. Относительный уровень экспрессии генов ростовых факторов в интактных клетках линий A172 и R1. *a* – Значение ΔCT ; горизонтальные отрезки – стандартное отклонение. *б* – Изменение экспрессии генов ростовых факторов в резистентных к темозоломиду клетках A172 и R1; по вертикали – значение $2^{-\Delta\Delta CT}$. Другие объяснения см. в подписи к рис. 5.

резистентных к темозоломиду (LN-18 и T98G), так и более чувствительных к этому препарату (A172, U87, U251 и U373) (Lee, 2016; Kinashi et al., 2020; Soni et al., 2022). Кроме того, пытаясь приблизить клеточные модели к реальной опухоли, исследователи используют первичные клеточные линии, выделенные из операционного материала пациентов, а также резистентные варианты постоянных линий, получаемые при воздействии на них химиопрепаратами или облучением. Подобные модели представляют особый интерес для изучения приобретенной резистентности и тестирования препаратов, предназначенных для лечения рецидивов заболевания. Так, известные линии, чувствительные к действию темозоломида (например, A172, SNB-19, U87, U251 и U373) используют для генерации клеток с резистентностью, приобретенной в результате повторных воздействий этого препарата. Однако результаты, полученные в разных лабораториях, существенно различаются между собой (Lee, 2016).

В настоящей работе мы обратились к изучению потомства наиболее резистентных к темозоломиду клеток, присутствующих в исходных линиях глиобластом A172 и R1. Линия глиобластомы A172 широко известна, тогда как линия, R1, напротив, получена недавно, мало известна и в отношении действия темозоломида ранее не была исследована. Клетки линий A172 и R1 были однократно обработаны темозоломидом в широком диапазоне доз. В качестве источника темозоломида был использован препарат Темодал® в лекарственной форме лиофилизата для приготовления инфузионного раствора. Преимущества такого подхода описаны нами ранее (Пиневич и др., 2022).

Как и ожидалось, клетки A172 оказались высоко чувствительными к действию темозоломида. Летальная доза препарата составила для них 0.25 мМ. Однако при воздействии 0.1 мМ препарата отдельные устойчивые клетки линии смогли избежать гибели и восстановили способность к пролиферации, сформировав популяцию потомков наиболее резистентных

клеток. Клетки линии R1 показали более высокую устойчивость к этому препарату. Летальная доза для них составила 2 мМ. Резистентные клетки, устойчиво возобновившие пролиферацию после действия препарата, были получены при обработке глиобластомы R1 темозоломидом в дозе 1 мМ.

Популяции, сформировавшиеся из единичных клеток, выживших после воздействия темозоломида, были определены нами как резистентные. Морфологически резистентные клетки обеих линий мало отличались от исходных клеток. При этом пролиферативная активность резистентных клеток A172 была выше, чем интактных, а у резистентных клеток R1, напротив, была снижена. Резистентные и интактные клетки A172 и R1 были исследованы нами в отношении экспрессии в них ряда генов, активность которых сопряжена с лекарственной устойчивостью и прогрессированием опухолей.

Одной из основных характеристик, определяющих чувствительность опухолевых клеток к темозоломиду, является статус фермента MGMT. Активность этого фермента определяет потенциальную возможность репарации индуцированных темозоломидом повреждений ДНК (Pegg, Wyers, 1992). Кроме того, общепринятой считается значимость белка p53, супрессора образования злокачественных опухолей (Lee, 2016; Tiek et al., 2018; Rabe et al., 2020). Так, для резистентных линий LN-18 и T98G характерна высокая экспрессия MGMT, а ген, кодирующий белок p53, несет мутации. В клетках более чувствительной к темозоломиду линии A172 экспрессия гена MGMT практически отсутствует, а промотор этого гена метилирован, при этом клетки характеризуются наличием p53 дикого типа (Hermisson et al., 2006; Perazzoli et al., 2015; Lee, 2016; Kinashi et al., 2020; Soni et al., 2022).

Мы подтвердили статус промотора гена MGMT в клетках A172 как метилированного, а также почти полное отсутствие экспрессии соответствующего гена. В линии R1 таким статусом обладает лишь часть клеток, что позволяет гену MGMT экспрессировать-

ся. В резистентных вариантах обеих изучаемых линий отмечены значимые изменения этих показателей. Уровень метилирования в них снижался, а экспрессия *MGMT*, напротив, возрастала, особенно в резистентных клетках A172. Подобные изменения функционирования гена *MGMT* были описаны в ряде работ (Feldheim et al., 2022). Однако некоторым исследователям не удалось наблюдать изменения со стороны этого гена под воздействием химиопрепаратов (Lee, 2016).

MGMT признан основным и пока единственным предиктивным маркером в лечении пациентов с глиобластомой (Louis et al., 2016; Мацко и др., 2019). С низкой экспрессией гена *MGMT* в клетках опухоли ассоциируется более длительная продолжительность жизни больных с первичной глиобластомой, при условии проведения стандартной химиотерапии (Negi et al., 2005; Matsko, Imaunitov, 2015). Показано, что уровень мРНК этого фермента в целом ниже у пациентов с высокой продолжительностью жизни (Мацко и др., 2019).

Один из важнейших молекулярных механизмов, лежащих в основе формирования резистентности опухоли, связан с функционированием транспортных белков – ABC-транспортёров, осуществляющих выброс химиопрепаратов из клеток против градиента концентрации с затратой энергии АТФ, что приводит к быстрому уменьшению внутриклеточного уровня препаратов ниже терапевтической концентрации (Borst et al., 2000; Kathawala et al., 2015).

Семейство ABC-транспортёров включает в себя 49 различных белков, однако значимость в развитии резистентности глубоко изучена только для трех из них: белка множественной лекарственной резистентности 1 (*MDR1*, также известного как Р-гликопротеин или *ABCB1*), *MDR*-ассоциированного белка 1 (*MRP1*, *ABCC1*) и белка резистентности рака молочной железы (*BCRP*, *ABCG2*) (Gottesman et al., 2002). Эти белки экспрессируются в опухолевых и стволовых опухолевых клетках и усиливают их резистентность к химиопрепаратам, в том числе темозоломиду (Peignan et al., 2011; Coyle et al., 2015; de Gooijer et al., 2018; Wang et al., 2019).

В наших исследованиях в отношении одного из генов – *ABCC1* (*MRP1*) – изменения экспрессии в резистентных клетках не отмечено, тогда как в отношении экспрессии двух других генов были получены противоположные результаты. В резистентных клетках A172 было отмечено существенное повышение активности *ABCB1* (*MDR1*) и *ABCG2* (*BCRP*), а в резистентных клетках R1, напротив, – выраженное снижение по сравнению с интактными клетками.

Важная роль в процессе канцерогенеза, в том числе глиомагенеза, отводится ИЛ, в том числе ИЛ-6 и ИЛ-8 (Christofides et al., 2015; Goutnik, Lucke-Wold, 2022). Иммуногистохимические исследования показали, что клетки глиобластом могут экспрессировать оба этих цитокина (Christofides et al., 2015; Shan et al.,

2015; Sharma et al., 2018). Уже давно проводится параллель между уровнем экспрессии ИЛ-6 и ИЛ-8 и степенью злокачественности глиомы (Rolhion et al., 2001; Brat et al., 2005; Samaras et al., 2009), однако многие вопросы до сих пор остаются не выясненными. ИЛ-6 играет важную роль в процессах регуляции клеточного цикла (Xu et al., 2014). Он способствует пролиферации опухолевых клеток по пути JAK/STAT (Mostofa et al., 2017), активируя белок STAT3, ответственный за рост, пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. Выявлена корреляция между уровнем мРНК ИЛ-6 и степенью злокачественности глиомы (Wang et al., 2009). Повышенный уровень сывороточного ИЛ-6 наблюдается у значительного числа пациентов и коррелирует с плохим прогнозом и повышенной агрессивностью заболевания (Tchirkov et al., 2007; Christofides et al., 2015).

Высокая экспрессия ИЛ-8 ассоциирована с плохим прогнозом при раке поджелудочной железы, молочной железы, яичников, легкого, простаты и мочевого пузыря (Ha et al., 2017). При глиобластоме наблюдается аналогичная тенденция (Sharma et al., 2017). Показано, что ИЛ-8 усиливает пролиферацию и инвазию опухолевых клеток, кроме того он является мощным ангиогенным фактором (Sharma et al., 2018). Zhang с соавторами (2015) наблюдали высокую экспрессию ИЛ-8 примерно в 80% образцов ткани опухоли. При этом было показано, что ИЛ-8 усиливает рост глиомы, связываясь аутокринным способом с рецептором CXCR1 на поверхности клеток (Sharma et al., 2017). В настоящее время ИЛ-6 и ИЛ-8 рассматривают в качестве возможных прогностических маркеров течения заболевания (Shan et al., 2015; Bunevicius et al., 2018; Shrivastava et al., 2022).

Мы показали, что клетки A172 обладают невысоким уровнем секреции ИЛ-6 и ИЛ-8, что согласуется с данными других исследователей (Yuhás et al., 2015). Однако в клетках R1, ранее не изученных в этом отношении, был выявлен чрезвычайно высокий уровень экспрессии как генов, так и белков ИЛ-6 и ИЛ-8. Нам не известны работы, в которых клеточные линии глиобластом демонстрировали бы подобный высокий уровень ИЛ-6 и ИЛ-8. При этом в резистентных клетках R1 он был существенно ниже, чем в интактных. В клетках линии A172 с изначально более низким уровнем экспрессии как генов, так и белков ИЛ-6 и ИЛ-8, эти показатели, напротив, значимо возрастали. Таким образом, в клетках линий A172 и R1, восстановивших пролиферацию после обработки темозоломидом, нами были выявлены разнонаправленные изменения продукции ИЛ-6 и ИЛ-8 и экспрессии кодирующих их генов.

Аналогичная тенденция прослеживалась и в отношении экспрессии гена фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF*), роль которого в стимулировании роста опухолей хорошо документирована (Vimalraj, 2022), а также гена гепатоцитарного ростового фактора (*HGF*), участвующего в процессах регуляции

клеточного цикла, дифференцировки, морфогенеза и апоптоза (Phan et al., 2015; Varzaman et al., 2022).

Таким образом, в потомстве наиболее резистентных к темозоломиду клеток линий A172 и R1 мы наблюдали увеличенную экспрессию гена *MGMT*, что может служить причиной более высокой устойчивости этих клеток к препарату. Однако в отношении прочих исследованных генов в клетках линий A172 и R1 были отмечены разнонаправленные тенденции. В резистентных клетках A172 экспрессия большинства исследованных генов, связанных с устойчивостью к химиотерапии и более агрессивным течением заболевания, ожидаемо увеличивалась, а в резистентных клетках R1, напротив, снижалась.

Полученные нами результаты подтверждают значимость *MGMT* в формировании резистентности к темозоломиду. Однако прогностическая ценность прочих обсуждаемых показателей представляется неоднозначной. Ранее было показано, что разработанные специфические ингибиторы MDR1 (ABCВ1), зо-суковидар и тариквидар, не дали преимуществ в терапии рака молочной железы в комбинации с антрациклинами и таксанами (Pusztai et al., 2005; Ruff et al., 2009). Неудачу этого подхода, по мнению Волкова (2021), можно объяснить тем, что выброс химиопрепаратов ABC-переносчиками не играет определяющей роли, а также возможностью компенсировать блокировку одного белка-транспортера активностью других. Ценность предиктивной значимости экспрессии IL-6 и IL-8 также остается неоднозначной. Для уточнения этого вопроса несомненна ценность клеточной линии R1, клетки которой на высоком уровне экспрессируют IL-6 и IL-8.

Итак, нами проведено сравнительное изучение действия темозоломида на хорошо известную линию глиобластомы A172 и на новую линию R1. Исследование клеточных популяций, которые явились потомками наиболее резистентных к темозоломиду клеток, показало, что они обладают молекулярным профилем, существенно отличающимся от молекулярного профиля исходных линий глиобластом A172 и R1.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания “Изучение резистентных опухолевых клеток на культурах глиобластом при моделировании стереотаксической радиохирургии рецидивирующей глиобластомы” ФГБУ “РНЦРХТ им. акад. А.М. Гранова” (Санкт-Петербург, Россия).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Процедуры проводили в соответствии с нормативными требованиями научно-исследовательского этического комитета Российского научного центра радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют, что у них нет конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.А. Пиневиц, Н.Л. Вартамян, А.В. Карташев, М.П. Самойлович: идея работы, ее планирование. А.А. Пиневиц, М.П. Самойлович: культивирование клеток. Н.Л. Вартамян: выделение РНК, проведение ПЦР. Л.Н. Киселева: иммуноцитохимия. Ж.Ю. Сидорова, С.П. Свитина: определение статуса метилирования гена *MGMT*. И.В. Смирнов: иммуноферментный анализ. А.А. Пиневиц, Н.Л. Вартамян, М.П. Самойлович: обработка результатов, написание текста, подготовка иллюстраций. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Волков Н.М. 2021. Резистентность к химиотерапии – исчерпаны ли возможности? Практическая онкология. Т. 22. № 2. С. 99. (Volkov N.M. 2021. Cancer resistance to chemotherapy – are all possibilities exhausted? Pract. Oncol. V. 22. № 2. P. 105.)
- Гриффитс Б. 1989. Культура животных клеток. Методы. С. 56. (Griffiths B. 1989. Animal cell culture. Methods. P. 56.)
- Киселева Л.Н., Карташев А.В., Вартамян Н.Л., Пиневиц А.А., Самойлович М.П. 2016. Характеристика клеточных линий A172 и T98G. Цитология. Т. 58. № 5. С. 349. (Kiseleva L.N., Kartashev A.V., Vartanyan N.L., Pinevich A.A., Samoilovich M.P. 2016. A172 and T98G cell lines characteristics. Cell Tiss. Biol. V. 10. № 5. P. 341.)
- Киселева Л.Н., Карташев А.В., Вартамян Н.Л., Пиневиц А.А., Самойлович М.П. 2018. Действие фотемустина на клетки линий глиобластом человека. Цитология. Т. 60. № 1. С. 21. (Kiseleva L.N., Kartashev A.V., Vartanyan N.L., Pinevich A.A., Samoilovich M.P. 2018. The effect of fotemustine on human glioblastoma cell lines. Cell Tiss. Biol. V. 12. № 2. P. 93.)
- Киселева Л.Н., Карташев А.В., Вартамян Н.Л., Пиневиц А.А., Филатов М.В., Самойлович М.П. 2017. Характеристика новых клеточных линий глиобластом человека. Цитология. Т. 59. № 10. С. 669. (Kiseleva L.N., Kartashev A.V., Vartanyan N.L., Pinevich A.A., Filatov M.V., Samoilovich M.P. 2017. Characterization of new human glioblastoma cell lines. Cell Tiss. Biol. V. 12. № 1. P. 1.)
- Кит О.И., Водолажский Д.И., Расторгуев Э.Е., Франци-янец Е.М., Поркишеян Д.Х., Панина С.Б. 2017. Мультиформная глиобластома: патогенез и молекулярные маркеры. Вопросы онкологии. Т. 63. № 5. С. 694. (Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Rastorguev E.E., Frantsiyants E.M., Porkshayan D.Kh., Panina S.B. 2017. Glioblastoma multiforme: pathogenesis and molecular markers. Voprosy Oncologii. V. 63. № 5. P. 694.)
- Мацко М.В., Мацко Д.Е., Волков Н.М., Улитин А.Ю., Моссеенко В.М., Имянитов Е.Н., Иевлева А.Г. 2019. Морфологические и молекулярно-генетические особенности первичных глиобластом у пациентов с необычно высокой продолжительностью жизни. Сибирский онкол. журнал. Т. 18. № 3. С. 34. (Matsko M.V., Matsko D.E.,

- Volkov N.M., Ulitin A.Yu., Moiseenko V.M., Imyanitov E.N., Iyevleva A.G. 2019. Morphologic and molecular features of primary glioblastoma in patients surviving more than 3 years. *Siberian J. Oncol.* V. 18. № 3. P. 34.)
- Пиневиц А.А., Бодэ И.И., Вартамян Н.Л., Киселева Л.Н., Карташев А.В., Самойлович М.П. 2022. Клетки глиобластом человека линий T2 и T98G, резистентные к действию темозоломида. *Цитология.* Т. 64. № 2. С. 126. (Pinevich A.A., Bode I.I., Vartanyan N.L., Kiseleva L.N., Kartashev A.V., Samoilovich M.P. 2022. Temozolomide-resistant human T2 and T98G glioblastoma cells. *Cell Tiss. Biol.* V. 16. № 4. P. 126.)
- Тягунова Е.Е., Захаров А.С., Костин Р.К., Шлапакова Т.И., Тягунова Т.Е., Захарова Ю.А., Малюгин Д.А. 2022. Особенности химио- и радиотерапии пациентов с глиобластомой. *Медицинский альманах.* № 1(70). С. 49. (Tyagunova E.E., Zakharov A.S., Kostin R.K., Shlapakova T.I., Tyagunova T.E., Zakharova Y.A., Malugin D.A. 2022. Features of chemo- and radiotherapy for patients with glioblastoma. *Medicinskij Al'manah.* № 1(70). P. 49.)
- Юкальчук Д.Ю., Пономаренко Д.М., Снетков Е.В., Юкальчук Т.Н., Шевчук А.В., Демченкова М.В., Шелехов А.В. 2016. Применение парентеральной формы препарата Темодал® (темозоломид) в терапии глиобластом. *Эффективная фармакотерапия.* Т. 8. С. 46. (Yukalchuk D.Yu., Ponomarenko D.M., Snetkov Ye.V., Yukalchuk T.N., Shevchuk A.V., Demchenkova M.V., Shelekhov A.V. 2016. Use of parenteral Temodal® (temozolomide) in therapy of glioblastoma. *Effectivnaya pharmacoterapiya.* V. 8. P. 46.)
- Barzaman K., Vafaei R., Samadi M., Kazemi M.H., Hosseinzadeh A., Merikhian P., Moradi-Kalbolandi S., Eisa-vand M.R., Dinvari H., Farahmand L. 2022. Anti-cancer therapeutic strategies based on HGF/MET, EpCAM, and tumor-stromal cross talk. *Cancer Cell Int.* V. 22. P. 259. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02658-z>
- Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. 2000. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* V. 92. P. 1295–1302. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.16.1295>
- Brat D.J., Bellail A.C., Van Meir E.G. 2005. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol.* V. 7. P. 122–133. <https://doi.org/10.1215/S1152851704001061>
- Braun K., Ahluwalia S. 2017. Treatment of glioblastoma in older adults. *Curr. Oncol. Rep.* V. 19. P. 81. <https://doi.org/10.1007/s11912-017-0644-z>
- Bunevicius A., Radziunas A., Tamasauskas S., Tamasauskas A., Laws E.R., Iervasi G., Bunevicius R., Deltuva V. 2018. Prognostic role of high sensitivity C-reactive protein and interleukin-6 in glioma and meningioma patients. *Neurooncol.* V. 138. P. 351. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-2803-y>
- Campos B., Olsen L.R., Urup T., Poulsen H.S. 2016. A comprehensive profile of recurrent glioblastoma. *Oncogene.* V. 35. P. 5819. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.85>
- Christians A., Hartmann C., Benner A., Meyer J., von Deimling A., Weller M., Wick W., Weiler M. 2012. Prognostic value of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in a prospective trial on newly diagnosed glioblastoma. *PLoS One.* V. 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033449>
- Christofides A., Kosmopoulos M., Piperi C. 2015. Pathophysiological mechanisms regulated by cytokines in gliomas. *Cytokine.* V. 71. P. 377. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.008>
- Coyle B., Kessler M., Sabnis D.H., Kerr I.D. 2015. ABCB1 in children's brain tumors. *Biochem. Soc. Trans.* V. 43. P. 1018. <https://doi.org/10.1042/BST20150137>
- Daniel P., Sabri S., Chaddad A., Meehan B., Jean-Claude B., Rak J., Abdulkarim B.S. 2019. Temozolomide induced hypermutation in glioma: evolutionary mechanisms and therapeutic opportunities. *Front. Oncol.* V. 9. P. 41. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00041>
- Feldheim J., Kessler A.F., Feldheim J.J., Schulz E., Wend D., Lazaridis L., Kleinschnitz C., Glas M., Ernestus R.-I., Brandner S., Monoranu C.M., Löhr M., Hagemann C. 2022. Effects of long-term temozolomide treatment on glioblastoma and astrocytoma WHO grade 4 stem-like cells. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. P. 5238. <https://doi.org/10.3390/ijms23095238>
- Giard D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosik H., Parks W.P. 1973. *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Nat. Cancer Inst.* V. 51. P. 1417. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>
- de Gooijer M.C., de Vries N.A., Buckle T., Buil L.C.M., Beijnen J.H., Boogerd W., van Tellingen O. 2018. Improved brain penetration and antitumor efficacy of temozolomide by inhibition of ABCB1 and ABCG2. *Neoplasia.* V. 20. P. 710. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.05.001>
- Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer.* V. 2. P. 48. <https://doi.org/10.1038/nrc706>
- Goutnik M., Lucke-Wold B. 2022. Commentary: evaluating potential glioma serum biomarkers, with future applications. *World J. Clin. Oncol.* V. 13. P. 412. <https://doi.org/10.5306/wjco.v13.i5.412>
- Ha H., Debnath B., Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Theranostics.* V. 7. P. 1543. <https://doi.org/10.7150/thno.15625>
- Hegi M.E., Diserens A.-C., Gorlia T., Hamou M.-F., de Tribolet N., Weller M., Kros J.M., Hainfellner J.A., Mason W., Mariani L., Bromberg J.E.C., Hau P., Mirimanoff R.O., Cairncross J.G., Janzer R.C., Stupp R. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* V. 352. P. 997. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Herman J.G., Graff J.R., Myöhänen S., Nelkin B.D., Baylin S.B. 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93. P. 9821. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9821>
- Hermisson M., Klumpp A., Wick W., Wischhusen J., Nagel G., Roos W., Kaina B., Weller M. 2006. O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *J. Neurochem.* V. 96. P. 7666. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03583.x>
- Kathawala R.J., Gupta P., Ashby C.R., Chen Z.-S. 2015. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist.*

- Updat. V. 18. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.drug.2014.11.002>
- Kim H., Zheng S., Amini S.S., Virk S.M., Mikkelsen T., Brat D.J., Grimsby J., Sougnez C., Muller F., Hu J., Sloan A.E., Cohen M.L., Van Meir E.G., Scarpace L., Laird P.W., et al. 2015. Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. *Genome Res.* V. 25. P. 16.
<https://doi.org/10.1101/gr.180612.114>
- Kinashi Y., Ikawa T., Takahashi S. 2020. The combined effect of neutron irradiation and temozolomide on glioblastoma cell lines with different MGMT and P53 status. *Appl. Radiat. Isot.* V. 163. P. 109204.
<https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2020.109204>
- Kristensen L.S., Hansen L.L. 2009. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment. *Clin. Chem.* V. 55. P. 1471.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.121962>
- Lee S.Y. 2016. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis.* V. 3. P. 198.
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007>
- Li Z., Li M., Xia P., Lu Z. 2022. HOTTIP mediated therapy resistance in glioma cells involves regulation of EMT-related miR-10b. *Front. Oncol.* V. 12. P. 873561.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.873561>
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Delta Delta C(T) method. *Methods.* V. 25. P. 402.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., Ohgaki H., Wiestler O.D., Kleihues P., Ellison D.W. 2016. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol.* V. 131. P. 803.
<https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Lu V.M., Jue T.R., McDonald K.L., Rovin R.A. 2018. The survival effect of repeat surgery at glioblastoma recurrence and its trend: a systematic review and meta-analysis. *World Neurosurg.* V. 115. P. 453.
<https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.04.016>
- Marucci G., Fabbri P.V., Morandi L., Biase D.D., Oto E.D., Tallini G., Sturiale C., Franceschi E., Frezza G.P., Foschinin M.P. 2015. Pathological spectrum in recurrences of glioblastoma multiforme. *Pathologica.* V. 107. P. 1.
- Matsko M.V., Imaynitov E.N. 2015. Predictive role of O6-methylguanine DNA methyltransferase status for the treatment of brain tumors. *Epigen. Terr. Cancer.* P. 251.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-9639-2_9
- Mirzayans R., Murray D. 2020. Intratumor heterogeneity and therapy resistance: contributions of dormancy, apoptosis reversal (anastasis) and cell fusion to disease recurrence. *Int. J. Mol. Sci.* V. 15. P. 1308.
<https://doi.org/10.3390/ijms21041308>
- Mostofa A.G.M., Punganuru S.R., Madala H.R., Al-Obaide M., Srivenugopal K.S. 2017. The process and regulatory components of inflammation in brain oncogenesis. *Bio-molecules.* P. 7. P. 34.
<https://doi.org/10.3390/biom7020034>
- Oliva C.R., Nozell S.E., Diers A., McCluggage 3rd S.G., Sarkaria J.N., Markert J.M., Darley-Usmar V.M., Bailey S.M., Gillespie G.Y., Landar A., Griguer C.E. 2010. Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* V. 285. P. 39759.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.147504>
- Pegg A.E., Byers T.L. 1992. Repair of DNA containing O6-alkylguanine. *FASEB J.* V. 6. P. 2302.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.6.6.1544541>
- Peignan L., Garrido W., Segura R., Melo R., Rojas D., Carcamo J.G., San Martin R., Quezada C. 2011. Combined use of anticancer drugs and an inhibitor of multiple drug resistance-associated protein-1 increases sensitivity and decreases survival of glioblastoma multiforme cells in vitro. *Neurochem. Res.* V. 36. P. 1397.
<https://doi.org/10.1007/s11064-011-0464-8>
- Perazzoli G., Prados J., Ortiz R., Caba O., Cabeza L., Berdasco M., Gonzalez B., Melguizo C. 2015. Temozolomide resistance in glioblastoma cell lines: implication of MGMT, MMR, P-glycoprotein and CD133 expression. *PLoS One.* V. 10. P. e0140131.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140131>
- Phan L.M., Fuentes-Mattei E., Wu W., Velazquez-Torres G., Sircar K., Wood C.G., Hai T., Jimenez C., Cote G.J., Ozsari L., Hofmann M.-C., Zheng S., Verhaak R., Pagliaro L., Cortez M.A. et al. 2015. Hepatocyte growth factor/cMET pathway activation enhances cancer hallmarks in adrenocortical carcinoma. *Cancer Res.* V. 75. P. 4131.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3707>
- Pusztai L., Wagner P., Ibrahim N., Rivera E., Theriault R., Booser D., Symmans F.W., Wong F., Blumenschein G., Fleming D.R., Rouzier R., Boniface G., Hortobagyi G.N. 2005. Phase II study of tariquidar, a selective P-glycoprotein inhibitor, in patients with chemotherapy-resistant, advanced breast carcinoma. *Cancer.* V. 104. P. 682.
<https://doi.org/10.1002/cncr.21227>
- Rabe M., Dumont S., Alvarez-Arenas A., Janati H., Belmonte-Beitia J., Calvo G.F., Thibault-Carpentier C., Sery Q., Chauvin C., Joalland N., Briand F., Blandin S., Scotet E., Pecqueur C., Clairambault J. et al. 2020. Identification of a transient state during the acquisition of temozolomide resistance in glioblastoma. *Cell Death Dis.* V. 11. P. 19.
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-2200-2>
- Rolhion C., Penault-Llorca F., Kemeny J.L., Lemaire J.J., Julien C., Labit-Bouvier C., Finat-Duclos F., Verrelle P. 2001. Interleukin-6 overexpression as a marker of malignancy in human gliomas. *J. Neurosurg.* V. 94. P. 97.
<https://doi.org/10.3171/jns.2001.94.1.0097>
- Ruff P., Vorobiof D.A., Jordaan J.P., Demetriou G.S., Moodley S.D., Nosworthy A.L., Werner I.D., Raats J., Burgess L.J. 2009. A randomized, placebo-controlled, double-blind phase 2 study of docetaxel compared to docetaxel plus zosuquidar (LY335979) in women with metastatic or locally recurrent breast cancer who have received one prior chemotherapy regimen. *Cancer Chemother. Pharmacol.* V. 64. P. 763.
<https://doi.org/10.1007/s00280-009-0925-9>
- Samaras V., Piperi C., Levidou G., Zisakis A., Kavantzias N., Themistocleous M.S., Boviatsis E.I., Barbatis C., Lea R.W., Kalofoutis A., Korkolopoulou P. 2009. Analysis of interleukin (IL)-8 expression in human astrocytomas: associations with IL-6, cyclooxygenase-2, vascular endothelial growth factor, and microvessel morphometry. *Hum. Immunol.* V. 70. P. 391.
<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.03.011>

- Shan Y., He X., Song W., Han D., Niu J., Wang J.* 2015. Role of IL-6 in the invasiveness and prognosis of glioma. *Int. J. Clin. Exp. Med.* V. 8. P. 9114.
- Sharma I., Singh A., Sharma K.C., Saxena S.* 2017. Gene expression profiling of chemokines and their receptors in low and high grade astrocytoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* V. 18. P. 1307.
<https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.5.1307>
- Sharma I., Singh A., Siraj F., Saxena S.* 2018. IL-8/CXCR1/2 signalling promotes tumor cell proliferation, invasion and vascular mimicry in glioblastoma. *J. Biomed. Sci.* V. 25. P. 62.
<https://doi.org/10.1186/s12929-018-0464-y>
- Shrivastava R., Gandhi P., Gothwal R.* 2022. The road-map for establishment of a prognostic molecular marker panel in glioma using liquid biopsy: current status and future directions. *Clin. Transl. Oncol.* V. 24. P. 1702.
<https://doi.org/10.1007/s12094-022-02833-8>
- Soni V., Adhikari M., Lin L., Sherman J.H., Keidar M.* 2022. Theranostic potential of adaptive cold atmospheric plasma with temozolomide to checkmate glioblastoma: an in vitro study. *Cancers.* V. 14. P. 3116.
<https://doi.org/10.3390/cancers14133116>
- Strobel H., Baisch T., Fitzel R., Schilberg K., Siegelin M.D., Karpel-Massler G., Debatin K.-M., Westhoff M.-A.* 2019. Temozolomide and other alkylating agents in glioblastoma therapy. *Biomedicines.* V. 7. P. 69.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines7030069>
- Tchirkov A., Khalil T., Chautard E., Mokhtari K., Veronese L., Irthum B., Vago P., Kemeny J.-L., Verrelle P.* 2007. Interleukin-6 gene amplification and shortened survival in glioblastoma patients. *Br. J. Cancer.* V. 96. P. 474.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603586>
- Thomas A., Tanaka M., Trepel J., Reinhold W.C., Rajapakse V.N., Pommier Y.* 2017. Temozolomide in the era of precision medicine. *Cancer Res.* V. 77. P. 823.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2983>
- Tiek D.M., Rone J.D., Graham G.T., Pannkuk E.L., Haddad B.R., Riggins R.B.* 2018. Alterations in cell motility, proliferation, and metabolism in novel models of acquired temozolomide resistant glioblastoma. *Sci. Rep.* V. 8. P. 7222.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-25588-1>
- Vimalraj S.* 2022. A concise review of VEGF, PDGF, FGF, Notch, angiopoietin, and HGF signalling in tumor angiogenesis with a focus on alternative approaches and future directions. *Int. J. Biol. Macromol.* V. 221. P. 1428.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.129>
- Wang D., Wang C., Wang L., Chen Y.* 2019. A comprehensive review in improving delivery of small-molecule chemotherapeutic agents overcoming the blood-brain/brain tumor barriers for glioblastoma treatment. *Drug Deliv.* V. 26. P. 551.
<https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1616235>
- Wang H., Lathia J.D., Wu Q., Wang K., Li Z., Heddleston J.M., Elyer C.E., Elderbroom J., Gallagher J., Schuschu J., MacSwords J., Cao Y., McLendon R.E., Wang X.-F., Hjelmeland A.B., Rich J.N.* 2009. Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. *Stem Cells.* V. 27. P. 2393.
<https://doi.org/10.1002/stem.188>
- Xia Q., Liu L., Li Y., Zhang P., Han D., Dong L.* 2021. Therapeutic perspective of temozolomide resistance in glioblastoma treatment. *Cancer Invest.* V. 39. P. 627.
<https://doi.org/10.1080/07357907.2021.1952595>
- Xu B., Yu D.-M., Liu F.-S.* 2014. Effect of siRNA induced inhibition of IL-6 expression in rat cerebral gliocytes on cerebral edema following traumatic brain injury. *Mol. Med. Rep.* V. 10. P. 1863.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2462>
- Yugas Y., Ashkenazi S., Berent E., Weizman A.* 2015. Immunomodulatory activity of ketamine in human astroglial A172 cells: possible relevance to its rapid antidepressant activity. *Neuroimmunol.* V. 282. P. 33.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.03.012>
- Zhang B., Shi L., Lu S., Sun X., Liu Y., Li H., Wang X., Zhao C., Zhang H., Wang Y.* 2015. Autocrine IL-8 promotes F-actin polymerization and mediate mesenchymal transition via ELMO1-NF- κ B-Snail signaling in glioma. *Cancer Biol. Ther.* V. 16. P. 898.
<https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1028702>
- Zhu Y., Chen Z., Kim S.N., Gan C., Ryl T., Lesjak M.S., Rode-merk J., Zhong R.D., Wrede K., Dammann P., Sure U.* 2022. Characterization of temozolomide resistance using a novel acquired resistance model in glioblastoma cell lines. *Cancers (Basel).* V. 14. P. 2211.
<https://doi.org/10.3390/cancers14092211>

Growth and Molecular Characteristics of Temozolomide-Resistant Human A172 and R1 Glioblastoma Cells

A. A. Pinevich^{a, b, *}, N. L. Vartanyan^a, A. V. Kartashev^a, L. N. Kiseleva^a, I. V. Smirnov^a, Z. U. Sidorova^{c, d}, S. P. Svitina^c, and M. P. Samoilovich^{a, b}

^aGranov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, 197758 Russia

^bSaint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia

^cRussian Scientific Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, 191024 Russia

^dKonstantinov Saint Petersburg Nuclear Physics Institute of National Research Centre “Kurchatov Institute”, Saint Petersburg, 188300 Russia

*e-mail: agniapinevich@gmail.com

Glioblastoma recurrence is caused by initial and acquired as a result of therapy resistance of tumor cells. Studies searching the markers that would allow predicting the level of glioblastoma cell resistance to therapy are in progress. The complexity of the problem is related to the high heterogeneity of individual tumors and the cellular content of

each tumor. In present work, a comparative study of the influence of single temozolomide (in Temodal® form) exposure on the well-known glioblastoma cell line A172 and a new one R1 was performed. In A172 (highly temozolomide-sensitive cell line) after treatment with 0.1 mM of this drug only individual cells persisted and resumed proliferation. In R1 glioblastoma cell line single cells survived and resumed proliferation after treatment with 1 mM temozolomide. The populations resulting from the proliferation of these cells were designated as resistant. The expression of MGMT, as well as genes responsible for resistance to chemotherapy and tumor progression (*MGMT*, *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2*), growth factor genes (*VEGF*, *HGF*), cytokines IL-6 and IL-8, and their encoding genes was examined in resistant A172 and R1 cells. In A172 cells, the methylated status of *MGMT* gene promoter was confirmed, as well as the absence of the corresponding gene expression. It was shown for the first time that glioblastoma R1 is heterogeneous by the methylation status of *MGMT* gene promoter and expression of the relevant enzyme. In A172 and R1 resistant cell populations, the level of *MGMT* gene promoter methylation was lower than in the intact cells, and *MGMT* gene expression was enhanced. We suspect that this may be the reason for greater resistance of such cells to chemotherapy. The expression of most genes associated with resistance to chemotherapy and a more aggressive course of the disease, genes of growth factors, and interleukins in resistant A172 cells was higher than in intact cells. In contrast, in resistant R1 cells, the expression of most of the same genes (with the exception of *ABCC1* and *VEGF*, for which the expression level changed insignificantly) was lower than in the intact cells. These results confirm the significance of MGMT in the formation of glioblastoma cell resistance to temozolomide. The prognostic value of the other studied parameters is still ambiguous.

Keywords: glioblastoma, A172, R1, resistant cells, temozolomide, MGMT, multiple drug resistance, IL-6, IL-8, Temodal®

УДК 576.5

АКТИВНОСТЬ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В ДВУХ ЛИНИЯХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПЛАЦЕНТЫ ОТ ОДНОГО ДОНОРА, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ АДИПОГЕННЫМ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ И ХАРАКТЕРОМ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ

© 2023 г. И. В. Воронкина¹, *, Л. В. Смагина¹, А. М. Кольцова², А. С. Мусорина², Г. Г. Полянская², **

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197022 Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: voronirina@list.ru

**E-mail: gpolanskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 15.09.2022 г.

После доработки 14.10.2022 г.

Принята к публикации 18.10.2022 г.

Проведено длительное культивирование 2-х линий МСК человека, выделенных из разных мест плаценты. Клеточная линия MSC-PL-1 характеризуется преждевременным старением по сравнению с линией MSC-PL-2. При индукции адипогенной дифференцировки в клетках обеих линий оказалось, что она не происходит на ранних и поздних пассажах в клетках MSC-PL-1 в отличие от клеток линии MSC-PL-2. Сравнительный анализ активностей матриксных металлопротеиназ (ММП) 1, 2 и 9 в процессе репликативного старения (РС) этих линий свидетельствует о межлинейных различиях. Так, в линии MSC-PL-2 происходит снижение уровней активности ММП-2 и -1 в процессе РС и не изменяется уровень активности ММП-9, а в линии MSC-PL-1, имеющей преждевременное РС, наблюдается увеличение уровня активности ММП-9 и -1 и снижение уровня активности ММП-2. Анализ активностей ММП-1 и -2 в процессе адипогенной дифференцировки в клетках MSC-PL-2 на раннем 6-м пассаже показал ряд различий между ними в течение 21 сут, но изменения обеих ММП носят волнообразный характер. Активность ММП-9 в течение 21 сут дифференцировки изменяется иначе. На позднем 16-м пассаже характер изменений активности всех 3-х ММП в течение 21 сут дифференцировки одинаковый. В связи с отсутствием адипогенной дифференцировки в клетках MSC-PL-1, проведен анализ активностей ММП -1, -2 и -9 при культивировании в индукционной среде в течение 21 сут на раннем (6) и позднем (13) пассажах. В обоих вариантах имеет место изменения активности 3-х ММП в процессе культивирования в индукционной среде, но эти изменения носят несинхронный характер. Активности всех 3-х ММП на 13-м пассаже снижаются относительно пассажа 6. В целом, полученные результаты свидетельствуют об участии ММП в широком диапазоне процессов в МСК.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки человека, репликативное старение, адипогенная дифференцировка, матриксные металлопротеиназы

DOI: 10.31857/S0041377123020128, **EDN:** NFBOSD

Мезенхимные стволовые клетки человека (МСК) широко используются для фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований. Линии МСК человека, будучи неиммортизированными диплоидными клеточными популяциями, являются удобной моделью для изучения биологических процессов, как в здоровом организме, так и при его патологических состояниях. В настоящее время наблюдается значительное расширение биомедицинских исследований с использованием МСК человека разного происхождения в связи с их регенеративными способностями. (Adak et al., 2021; Albu et al., 2021;

Eiro et al., 2021; Mannino et al., 2021; Moghadasi et al., 2021; Raposo et al., 2021; Reed, Escayg, 2021; Safary et al., 2021; Vilaca-Faria et al., 2021; Wangler et al., 2021; Xiao et al., 2021; Zhang et al., 2021).

Согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, статус МСК разного происхождения определяется рядом характеристик (Dominici et al., 2006; Sensebé et al., 2010). Тем не менее, линии МСК, выделенные из разных источников, различаются по ряду характеристик, важнейших для жизнедеятельности клеток. В частности, обнаружены межлинейные различия по ростовым характеристикам, по дифференцировочному потенциалу, по кариотипической нестабильности и по характеру репликативного старения (РС) (Тепляшин и др., 2005;

Принятые сокращения: ВКМ – внеклеточный матрикс; МСК – мезенхимные стволовые клетки; РС – репликативное старение; ММП – матриксные металлопротеиназы.

Stanko et al., 2014; Воронкина и др., 2016, 2020; Полянская, 2018; Li et al., 2018; Jin et al., 2019; Кольцова и др., 2020; Akpinar et al., 2021; Chen et al., 2021; Semenova et al., 2021; Shin et al., 2021; Sun et al., 2021; Tai et al., 2021; Yigitbilek et al., 2021). Сравнительное изучение характеристик МСК человека, определяющих статус МСК, а также других характеристик, ответственных за важнейшие клеточные процессы, необходимо как для понимания механизмов биологических процессов в клетке, так и для расширения возможностей использования МСК в регенеративной медицине. Такие исследования важны в связи с особенностями взаимодействия клеток с их уникальным микроокружением, характерным для конкретной ткани, которое регулирует пролиферацию, выживаемость, миграцию, старение, дифференцировочный потенциал и другие клеточные процессы, посредством межклеточных взаимодействий и различных биоактивных молекул. Причинами наблюдаемых межлинейных различий могут быть как генетические, так и эпигенетические факторы (Cox et al., 1972; Hooper, Subak-Sharpe, 1981; Шаровская и др., 2009; Gattazo et al., 2014; Choi et al., 2015; Нирицкий и др., 2018; Darnell et al., 2018; Niedernhofer et al., 2018).

Одним из направлений, исследующих функциональные особенности МСК, является выяснение роли матриксных металлопротеиназ (ММП) в процессах их дифференцировки и РС. Известно, что клетки в условиях *in vivo* и *in vitro* контактируют с сетью макромолекул, образующих внеклеточный матрикс (ВКМ), который состоит из разных белков, синтезируемых самими клетками. ВКМ является одним из важнейших регуляторов клеточных процессов и представляет собой микроокружение или нишу, в которой клетки существуют. Регуляция клеточных процессов осуществляется через взаимодействие ММП с белками ВКМ. ММП представляют семейство Са- и Zn-зависимых эндопептидаз, которые регулируют активность многих биологических молекул, расщепляя или блокируя их. ММП и их специфические ингибиторы влияют на клеточные процессы, в частности пролиферацию, апоптоз, дифференцировку, РС. Они участвуют в процессах ремоделирования тканей и развития органов, специфически модулируя сигнальные пути, посредством взаимодействия с субстратами разной природы, включая перестройки ВКМ (Nagase, Woessner, 1999; Page-McCaw et al., 2007; Kessenbrock et al., 2010). ММП синтезируются разными клетками – нормальными фибробластами, кератиноцитами, фагоцитами, лимфоцитами, а также трансформированными.

В настоящее время идет накопление экспериментальных данных по анализу участия разных ММП в регуляции дифференцировок и РС МСК человека (Mannello et al., 2006; Schneider et al., 2010; Sillat et al., 2012; Lynch, Pei, 2014; Gutierrez-Fernandez et al., 2015; Almalki, Agrawal, 2016; Noh et al., 2017). В связи с этим несколько лет назад нами начаты подробные сравнительные исследования роли таких ММП, как

ММП-1 (интерстициальная коллагеназа-1), ММП-2 (желатиназа А) и ММП-9 (желатиназа Б) в процессах РС и дифференцировки МСК человека разного происхождения. Показано наличие активностей этих ММП в процессе адипогенной и остеогенной дифференцировки в линиях МСК, выделенных из костного мозга (FetMSC), зачатка конечности (M-FetMSC) раннего эмбриона человека и полученных из них клеточных сфероидов. Сравнительный анализ динамики активностей этих металлопротеиназ в процессе адипогенной и остеогенной дифференцировок показал межлинейные различия, а также различия между монослойными культурами (2D) и клеточными сфероидами (3D) (Воронкина и др., 2016).

С целью изучения механизмов дифференцировки МСК проведено изучение динамики активностей ММП -1, -2, -8, -9, -13, а также анализ экспрессии маркеров хондрогенеза (коллагена 2 и агреккана) и некоторых компонентов ВКМ (декорина, версикана, коллагена I) в процессе хондрогенной дифференцировки клеток линии MSCWJ-1, выделенных из Вартонова студня пупочного канатика в условиях 2D и 3D. В клеточных сфероидах (3D) процесс хондрогенеза более активен, чем в монослойной культуре (2D) (Воронкина и др., 2018).

Проведено сравнительное изучение динамики активности ММП и ВКМ в процессе РС 3-х линий МСК человека, выделенных из Вартонова студня пупочного канатика (MSCWJ-1), кожи век взрослого донора (DF-2), и из эпикардальной жировой ткани (ADH-MSC), полученной от нездорового донора при аортокоронарном шунтировании (Воронкина и др., 2020). Полученные результаты свидетельствуют как о различиях между линиями по активности одной ММП, так и о различиях в одной линии разных ММП, а также о различиях по характеру изменений содержания коллагена 1 и фибронектина. Надо подчеркнуть, что все полученные нами результаты свидетельствуют в пользу роли микроокружения в наблюдаемых различиях. Косвенным подтверждением этого предположения могут быть результаты, полученные на клетках ADH-MSC. Важно отметить, что клетки ADH-MSC существенно отличались от двух других линий по цитогенетическим характеристикам, скорости старения, содержанию белков ВКМ и по активностям ММП (Мусорина и др., 2019). Возможно, что причиной такого расхождения является получение клеток от донора с заболеванием сердца, клетки которого имели не просто другое микроокружение в связи с иной их локализацией, но еще и нездоровое, связанное с больным органом, в котором они находились до перевода в состояние *in vitro*.

В связи с описанными результатами, необходимо было сравнить активности ММП параллельно в процессах РС и адипогенной дифференцировки в клетках линий МСК, выделенных из одной ткани, но имеющих разную локализацию. Такие линии можно получить из внезародышевого органа – плаценты.

Известно, что плацента человека имеет сложный клеточный состав. В связи с этим при получении конкретной линии необходимо четко определить область происхождения и метод выделения клеток из этой ткани (Parolini et al., 2008). Возможно, что разные области плаценты имеют физиологические особенности.

Таким образом, учитывая влияние конкретной ниши на характеристики МСК, в настоящей работе были исследованы 2 клеточные линии, выделенные из 2-х областей плаценты: из области, расположенной рядом с пупочным канатиком (линия MSC-PL-1), и из области, удаленной от него (MSC-PL-2). Линии были выделены ранее, а их характеристика свидетельствует о наличии различий между ними (Кольцова и др., 2020).

В настоящей работе стояли следующие задачи: 1) длительное культивирование клеток линий MSC-PL-1 и MSC-PL-2; 2) сравнительный анализ активности фермента β -галактозидазы, характеризующей процесс РС при длительном культивировании клеток; 3) индукция и анализ адипогенной дифференцировки клеток обеих линий при длительном культивировании; 4) анализ активностей ММП-1, -2 и -9 при адипогенной дифференцировке клеток обеих линий на раннем и поздних пассажах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. В работе использовали две линии МСК человека, полученных из 2-х областей плаценты: из области, расположенной в непосредственной близости к пупочному канатику (MSC-PL-1) и из области, удаленной от него (MSC-PL-2). Оба фрагмента содержали ткани из хориона и амниотической мембраны. Обе клеточные линии получены и охарактеризованы в ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных” ИИЦ РАН (Санкт-Петербург). Клетки исследуемых линий культивировали в ростовой среде, содержащей 90% среды DMEM/F12 (Биолот, Россия) и 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США). Обе линии культивировали в условиях 5% CO₂ при 37°C и влажности 90%. Микробиологический анализ подтвердил отсутствие бактериальной, грибковой и микоплазменной контаминации в полученных линиях.

Морфологический анализ клеток проводили с помощью инвертированного микроскопа NICON (Япония).

Оценка РС клеток. РС оценивали по активности фермента β -галактозидазы. Клетки исследуемых линий (по 30 тыс.) высевали на чашки Петри 3.5 мм (Nunc, Дания) и культивировали в течение 1 сут. Затем среду удаляли и окрашивали клетки с помощью набора реактивов Senescence β -galactosidase staining kit, согласно инструкции (Cell Signaling, США). У клеток, вступающих в фазу РС, цитоплазма имеет ярко-синюю окраску. Анализ клеток MSC-PL-1

проводили с помощью инвертированного микроскопа (NICON, Япония) на пассажах 6 и 13, а клеток MSC-PL-2 – на пассажах 6 и 18. Долю окрашенных клеток в процентах определяли путем подсчета не менее 1000 клеток в разных полях зрения на одну временную точку.

Индукция адипогенной дифференцировки. Использовали модифицированный метод (Reyes et al., 2001). Клетки (10000 кл./см²) высевали в адипогенную дифференцировочную среду (HyClone Thermo Scientific HyClone Product, США). Для идентификации адипогенной дифференцировки клетки промывали PBS без ионов Ca²⁺ и Mg²⁺, фиксировали в метаноле в течение 2 мин при –20°C. Фиксированные клетки промывали 50%-ным этанолом и окрашивали масляным красным (Oil Red O) в течение 10 мин. Далее клетки промывали 50%-ным этанолом, затем дистиллированной водой и заливали 70%-ным глицерином. Индукцию проводили в течение 21 сут, меняя среду каждые 3–4 сут. Визуализацию проводили с помощью микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal (Германия).

Зимография. Активность ММП в кондиционированной клетками среде определяли методом зимографии на желатине и казеине. Пробы среды брали на 1- (6 ч), 7-, 14- и 21-е сут культивирования и готовили для анализа, смешивая образцы среды с буфером для проб (Laemmli, 1970) без бета-меркаптоэтанола и нагревания, инкубируя при комнатной температуре в течение 30 мин. Количество белка в пробах определяли по Брэдфорд (Bradford, 1976). Гель для проведения электрофореза содержал 1 мг/мл желатина (для ММП-2 и ММП-9) или 0.5 мг/мл казеина (для ММП-1). Пробы наносили на 10%-ный полиакриламидный гель (ПААГ) в количестве, соответствующем 10 мкг белка на дорожку и разделяли с помощью электрофореза. После проведения электрофореза гель двукратно промывали в течение 15 мин в 2.5%-ном растворе Тритона X-100 и инкубировали в течение 12 ч (для желатина) или 18 ч (для казеина) в буферном растворе (50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, pH 7.4). Гель окрашивали Coomassie Brilliant Blue. Присутствие ММП, расщепляющих желатин, определяли по наличию неокрашенных полос на геле (Oliver et al., 1999). Для проведения количественного анализа содержания ММП-2 и ММП-9 гели сканировали, полученные изображения обрабатывали с помощью программы QuantiScan Version 2.1. Активность выражали в усл. ед., принятых в программе QuantiScan (произведение количества неокрашенных пикселей на интенсивность окраски). Все реактивы были от Sigma (Германия). Все эксперименты проводили на одном и том же пуле сыворотки. Значения активностей указанных ММП для образцов сред, кондиционированной клетками, получали путем вычитания значений активности ММП, полученных для чистой среды культивирования, содержащей сыворотку.

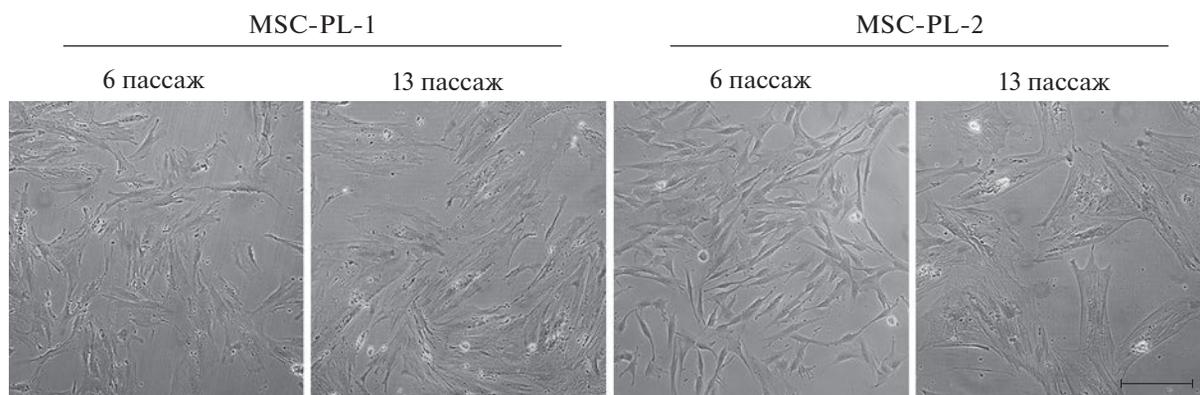


Рис. 1. Прижизненные фотографии клеток линий MSC-PL-1 и MSC-PL-2 на раннем (6) и позднем (13 или 16) пассажах. Инвертированный световой микроскоп Nikon Eclipse TS100, Япония. Масштабная линейка: 200 мкм.

Статистический анализ. Использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $P < 0.05$. В каждом варианте проводили 3 независимых эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологический анализ. Морфологический анализ клеток линий MSC-PL-1 (13 пассажей) и MSC-PL-2 (16 пассажей) в процессе длительного культивирования показал однородность клеточных популяций, состоящих из вытянутых фибробластоподобных клеток, средних по размеру на 6-м пассаже (рис. 1а, в). На пассажах 13 и 16 размеры клеток и их расплывчатость увеличивались (рис. 1б, г).

Процесс РС клеточных линий. Результаты анализа активности фермента β-галактозидазы при длительном культивировании линий MSC-PL-1 и MSC-PL-2 представлены в табл. 1, из которой следует, что в обеих линиях наблюдается активное РС, и доля стареющих клеток увеличивается. Так, в клетках MSC-PL-1 к 13 пассажу доля стареющих клеток увеличена почти в 5.5 раза, тогда как в клетках MSC-PL-2 число таких клеток только к 18 пассажу увеличено в 4.2 раза. Наблюдаемые межлинейные различия характера РС могут быть связаны с разной изначальной локализацией выделенных клеток в ткани плаценты, т.е. с их разным микроокружением (Parolini et al., 2008). Эти результаты совпадают с ранее проведенными исследова-

ниями, в которых еще дополнительно показаны существенные межлинейные различия по изменению пролиферативной активности в процессе РС (Кольцова и др. 2020).

Анализ адипогенной дифференцировки. Результаты адипогенной дифференцировки в клетках MSC-PL-1 и MSC-PL-2 представлены на рис. 2. Культивирование клеток в адипогенной среде способствовало образованию кластеров адипоцитов, показанных с помощью окрашивания красителем масляным красным.

Различия между линиями при индукции адипогенной дифференцировки выражаются в том, что в клетках линии MSC-PL-1 эта дифференцировка так и не происходит как на 6-м, так и на 13 пассажах; тогда как в линии MSC-PL-2 она присутствует и на 6-м и на 16 пассажах. Надо заметить, что в предыдущем сравнительном исследовании в клетках MSC-PL-1 на раннем пассаже адипогенная дифференцировка происходила, но отсутствовала на позднем пассаже (Кольцова и др., 2020). Клетки для анализа в обоих случаях были взяты из одной криозакладки, т.е. изначально из одной популяции. По-видимому, в процессе декриоконсервации и культивирования до 6-го пассажа в клетках возник ряд неконтролируемых изменений, повлекших изменение в дифференцировочном процессе.

Таблица 1. Доля клеток линий MSC-PL1 и MSC-PL2 с выраженной активностью β-галактозидазы (β-гал) в процессе культивирования

Пассаж	MSC-PL-1		MSC-PL-2	
	число клеток	доля окрашенных клеток, %	число клеток	доля окрашенных клеток, %
6	1609	7.60 ± 0.82	1607	12.20 ± 0.82
13	1635	40.00 ± 1.21		—
18	—	—	1603	51.80 ± 1.30

Даны средние значения и их ошибки при подсчете не менее 1000 клеток в разных полях зрения на одну временную точку.

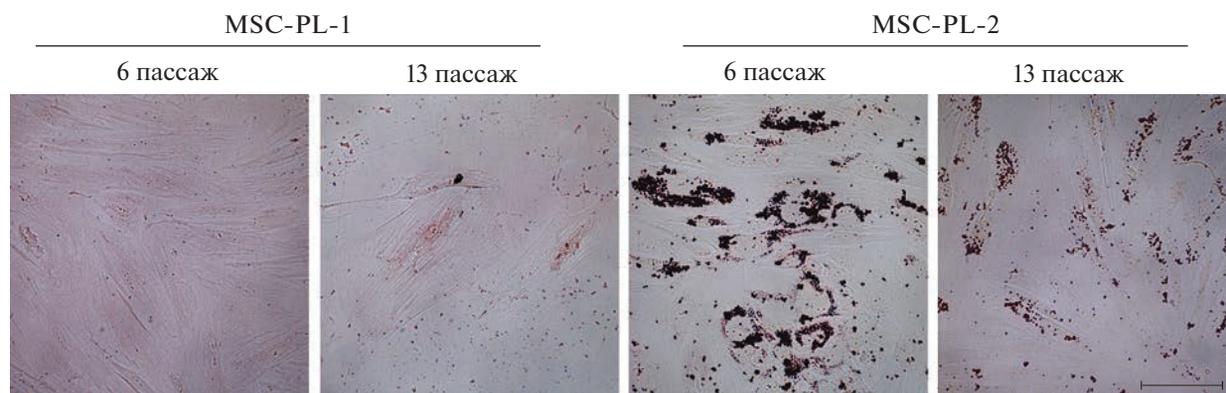


Рис. 2. Дифференцировка клеток линий MSC-PL-1 и MSC-PL-2 в адипогенном направлении на раннем (6) и позднем (13 или 16) пассажах при длительном культивировании. Показано окрашивание жировых включений масляным красным (адипогенез). Можно видеть, что у клеток MSC-PL-1 дифференцировки не происходит, в отличие от клеток MSC-PL-2. Масштабная линейка: 100 мкм.

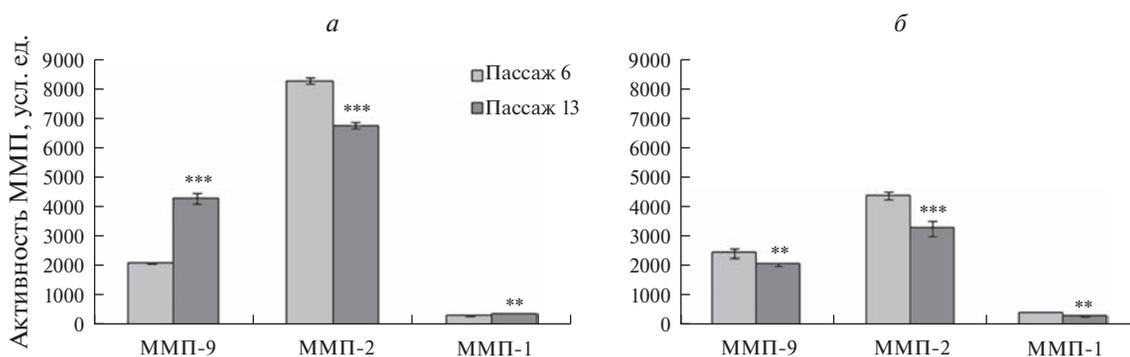


Рис. 3. Динамика активности ММП при репликативном старении клеток MSC-PL-1 (а) и MSC-PL-2 (б) на раннем пассаже (6-ом, светлые столбцы) и позднем пассаже (13- или 16-ом, темные столбцы) при длительном культивировании. Активность указана в усл. ед., принятых в программе QuantiScan. Представлены средние значения и стандартная ошибка среднего. Отличия 6 пассажа от 13 пассажа достоверны при *** $p < 0.01$; ** $p < 0.05$

В связи с полученными результатами необходимо отметить, что в настоящее время накапливаются данные о значительных колебаниях уровня потенциала трех стандартных направлений дифференцировки МСК человека. Так, показаны существенные колебания, вплоть до отсутствия конкретной дифференцировки, при изменении условий культивирования, в случаях разного возраста доноров и разных источников выделения МСК, а также в процессе РС. Причиной колебаний дифференцировочного потенциала могут быть изменения, происходящие как на уровне транскрипции определенных генов, так и на уровне трансляции (Park et al., 2005; Vonab et al., 2006; Zhang et al., 2006; Lo Surdo et al., 2013; Крылова и др., 2015; Bianchi et al., 2017; Кольцова и др., 2018, 2019; Monterubbianesi et al., 2019).

Динамика активности ММП в процессе РС клеточных линий. Результаты анализа активности ММП-1, -2 и -9 в клетках MSC-PL-1 представлены на рис. 3а. Показано, что в процессе РС происходит увеличение ($P < 0.01$) активности ММП-1 и -9 и снижение

активности ММП-2 ($P < 0.01$). Анализ активности ММП в клетках MSC-PL-2 показал снижение активности ММП-1 и -2 ($P < 0.05$) и отсутствие изменений активности ММП-9 в процессе РС (рис. 3б).

Таким образом, наблюдаются межлинейные различия между активностями исследованных ММП. Так, в клетках линии MSC-PL-2 активность ММП-1 и -2 в процессе РС снижается, а активность ММП-9 не изменяется. В клетках линии MSC-PL-1, претерпевающих преждевременное РС, наоборот, активность ММП-1 и -9 увеличивается, а активность ММП-2 снижается.

В предыдущей работе (Воронкина и др., 2020) в линиях МСК – MSCWJ и DF-2, полученных от здоровых доноров, наблюдали низкую активность ММП-9 без изменений, а в клетках линии АДН-МСК, полученную от нездорового донора из нездорового органа, в процессе РС активность ММП-9 была значительной. Таким образом, наблюдается сходство в активности ММП-9 между двумя аномальными линиями, имеющими преждевременное

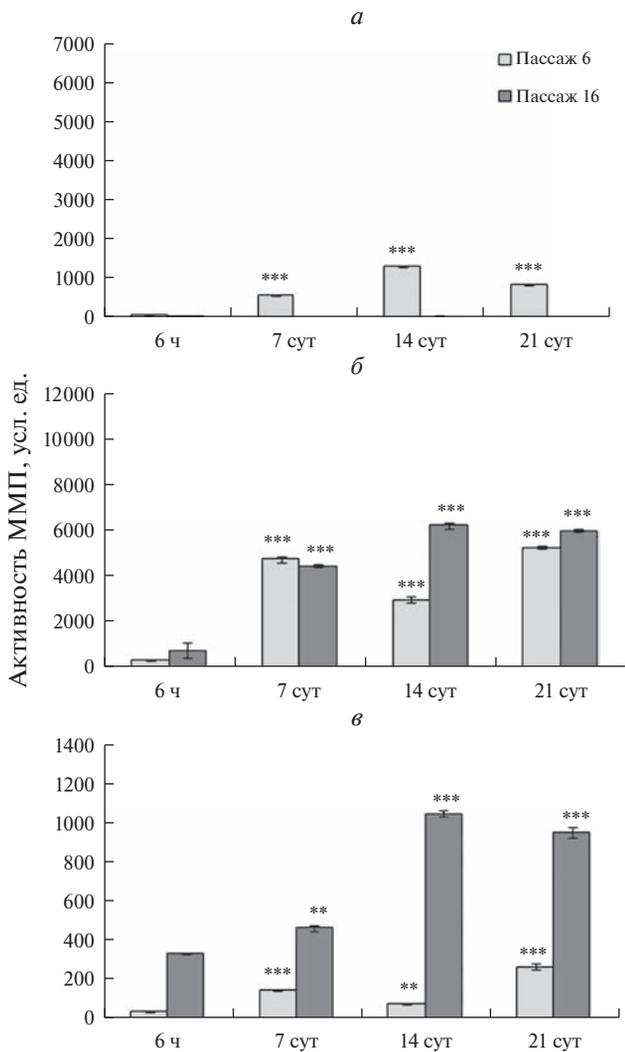


Рис. 4. Динамика активности ММП при нормальной дифференцировке клеток линии MSC-PL-2, взятых на раннем (6) и позднем (16) пассаже, в адипогенном направлении при длительном культивировании. ММП-9 (а), ММП-2 (б) и ММП-1 (в). Активность указана в усл. ед., принятых в программе QuantiScan. По горизонтали – время культивирования. Представлены средние значения и стандартная ошибка среднего. Отличия от 1 сут достоверны при *** $P < 0.01$ и ** $P < 0.05$.

РС и цитогенетические изменения на позднем пассаже (Мусорина и др., 2019; Воронкина и др., 2020; Кольцова и др., 2020). Возможно, что активность ММП-9 связана со стрессовой ситуацией в клеточных культурах, включая микроокружение клеток. В частности, известно, что ММП-9 участвует в патологических процессах в миокарде и является маркером сердечной недостаточности (Felkin et al., 2006; Yabluchanskiy et al., 2013).

Динамика активности ММП при адипогенной дифференцировке. В данном случае окончательный результат адипогенной дифференцировки свидетельствует, что в клетках MSC-PL-1 адипогенная диф-

ференцировка отсутствует как на 6-, так и на 13-м пассажах. Эти данные отличаются от результатов, полученных нами ранее (Кольцова и др. 2020). Комментарии по этому вопросу даны выше. В связи с этим, в настоящей работе авторы проводят сравнительный анализ активностей ММП-1, -2 и -9 в процессе адипогенной дифференцировки на 6-м и 16-м пассажах для линии MSC-PL-2. Результаты показаны на рис. 4. В процессе дифференцировки на 6-м пассаже активность ММП-9 увеличивается в течение 14 сут ($P < 0.01$) и далее к 21-м сут снижается ($P < 0.01$). Активность ММП-2 имеет волнообразный характер: в период от 6-ти ч до 7 сут увеличивается, снижается к 14 сут, а затем снова увеличивается ($P < 0.01$). Активность ММП-1 ведет себя так же: увеличивается к 7 сут, снижается к 14 сут и далее увеличивается к 21 сут ($P < 0.01$) (рис. 4а–в). Таким образом, изменения активности ММП-1 и -2 в процессе дифференцировки сходны, а изменение активности ММП-9 имеет иной характер.

В клетках MSC-PL-2 на 16-м пассаже увеличивается уровень активности ММП-9 в течение 14 сут ($P < 0.01$), затем снижается к 21 сут ($P < 0.01$). Активность ММП-2 увеличивается в течение 14 сут ($P < 0.01$), а затем незначительно снижается к 21 сут ($P < 0.05$) (рис. 4а, б, в). Таким образом, изменения активности 3-х ММП в течение дифференцировки на 16-м пассаже имеют сходный характер.

В литературе есть данные, также свидетельствующие об участии ММП -1, -2 и -9 в адипогенной дифференцировке (например: Bouloumié et al., 2001; Chavey et al., 2003; Воронкина и др., 2016).

Динамика активности ММП при культивировании в адипогенной индукционной среде (в отсутствие адипогенеза). Несмотря на отсутствие адипогенной дифференцировки в линии MSC-PL-1, было проведено исследование активности ММП при культивировании клеток в течение 21 сут в индукционной среде. По мнению авторов, полученные результаты могут отражать влияние других процессов, в частности, условия жизнедеятельности клеток в связи с заменой стандартной ростовой среды на индукционную (дифференцировочную), в процессе культивирования на которой происходят морфологические изменения, обусловленные деградацией клеточного монослоя к 21-м сут культивирования.

Данные по активности ММП в клетках линии MSC-PL-1 представлены на рис. 5. Показано, что на пассаже 6 изменения активности ММП-9 имеют волнообразный характер: в течение 14 сут наблюдается достоверное увеличение активности ($P < 0.01$), а далее до 21 сут имеет место достоверное снижение ($P < 0.01$). ММП-2 также волнообразно изменяет активность, но отлично от ММП-9: в период 6 ч–7 сут она увеличивается, после 7 сут не изменяется, а на 21 сут снижается ($P < 0.01$). Активность ММП-1 не

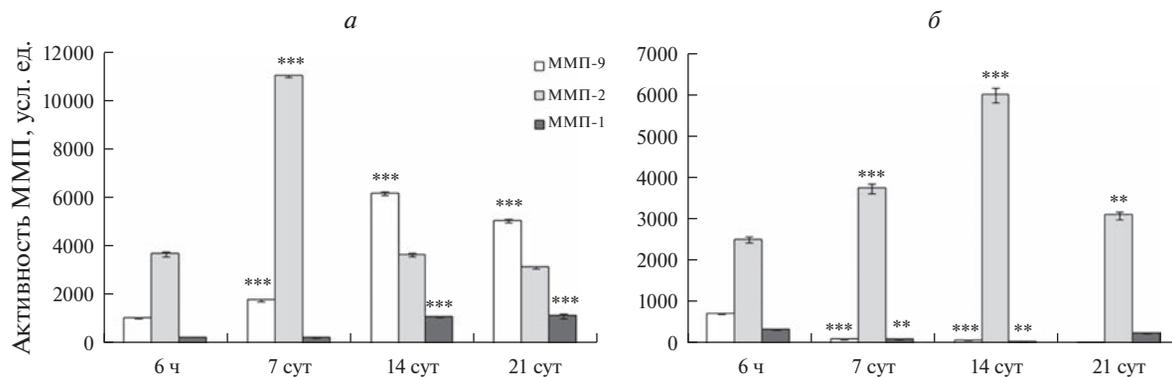


Рис. 5. Динамика активности ММП клеток MSC-PL-1, взятых на раннем (6-ой, *а*) и позднем (13-ый, *б*) пассаже, и находящихся в адипогенной дифференцировочной среде, при длительном культивировании. Другие объяснение те же, что и в подписи к рис. 4.

меняется на протяжении дифференцировки в течение 14 сут, а затем на 21 сут увеличивается ($P < 0.01$) (рис. 5*а*). Таким образом, изменения активности ММП-1, 2 и 9 носят несинхронный характер.

Для этой же линии – MSC-PL-1 на 13-м пассаже активность ММП-9 достоверно снижается на протяжении 21 сут ($P < 0.01$); активность ММП-2 увеличивается в течение 14 сут ($P < 0.01$) и затем снижается на 21 сут ($P < 0.01$); активность ММП-1 снижается в течение 14 сут и затем увеличивается на 21 сут ($P < 0.01$) (рис. 5*б*). Таким образом, на 13-м пассаже, также как и на 6-м, наблюдаются изменения активностей всех ММП, которые носят несинхронный характер. При сравнении активностей 3-х ММП между 6-м и 13-м пассажами при культивировании в дифференцировочной среде, в клетках MSC-PL-1 в целом наблюдается значимое снижение активностей всех 3-х ММП на 13-м пассаже по сравнению с 6-м пассажем. Этот результат вполне логичен, если учесть данные морфологического анализа о частичной деградации клеточного монослоя, связанного, по-видимому, с нарушением взаимодействия клеток с ВКМ на начальном этапе клеточной гибели.

Ранее был проведен анализ характеристик полученных линий при длительном культивировании, свидетельствующий о различиях по характеру РС, и по ростовым характеристикам (Кольцова и др., 2020). Кариотипический анализ показал, что на раннем пассаже обе линии имеют нормальный диплоидный кариотип с незначительным количеством неклональных хромосомных перестроек. На позднем 15-м пассаже клетки линии MSC-PL-2 также сохраняют нормальный кариотип. При культивировании линии MSC-PL-1 до пассажа 14 обнаружены, помимо неклональных перестроек, клональные, одна из которых –X, add(X)(p22.3) – является характерной чертой клеток линии MSC-PL-1 при РС (Кольцова и др., 2020). Полученные в настоящей работе результаты по разному изменению активностей 3-х ММП в этих линиях МСК в процессе РС расширяют полу-

ченные ранее данные о межлинейных различиях МСК.

В исследованиях клеток MSC-PL-1 и MSC-PL-2, наблюдаемые различия, по-видимому, связаны с физиологическими особенностями (например, кровообращение) той области органа (плаценты), из которой были выделены МСК. Надо подчеркнуть, что обе области не имели существенных различий по составу: обе содержали ткани из хориона и амниотической мембраны и имели зародышевое происхождение. Анализ ДНК профиля (STR) подтвердил однородность (сходство) обеих линий по STR профилю.

В целом, полученные результаты свидетельствуют об участии ММП в широком диапазоне клеточных процессов. Наблюдаемая динамика активностей ММП-9 и -2 безусловно связана с взаимодействием клеток и индукционной среды, в которой изначально присутствует сыворотка, содержащая эти ММП. Поэтому из наших результатов нельзя сделать однозначный вывод о присутствии и функционировании именно клеточных ММП-2 и -9. Но можно констатировать, что эти ММП, независимо от их происхождения, необходимы для процессов дифференцировки МСК. Из результатов по ММП-1 можно уверенно утверждать, что именно клеточная ММП-1 сопровождает процесс дифференцировки МСК, т.к. в индукционной среде она практически отсутствует.

БЛАГОДАРНОСТИ

“Коллекция культур клеток позвоночных” Центра коллективного пользования (ИНЦ РАН), в котором получены и охарактеризованы клеточные линии, поддерживается финансированием Минобрнауки Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-683).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания (№ АААА-А19-119020-190093-9) Института цитологии РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не было экспериментов с участием животных и людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воронкина И.В., Смагина Л.В., Бильдюг Н.Б., Мусорина А.С., Полянская Г.Г.* 2020. Динамика активности матричных металлопротеиназ и содержание белков внеклеточного матрикса в процессе репликативного старения линий мезенхимных стволовых клеток человека. Цитология. Т. 62. № 3. С. 210. (*Voronkina I.V., Smagina L.V., Bilydyug N.B., Musorina A.S., Poljanskaya G.G.* 2020. Dynamics of matrix metalloproteinase activity and extracellular matrix proteins content in the process of replicative senescence of human mesenchymal stem cells. *Cell Tiss. Biol. V. 14. P. 349.*) <https://doi.org/10.31857/S0041377120030086>
- Воронкина И.В., Смагина Л.В., Гин И.И., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Полянская Г.Г.* 2018. Анализ динамики активности матричных металлопротеиназ в процессе хондрогенной дифференцировки линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из Вартонова студня пупочного канатика человека. Цитология. Т. 60. № 9. С. 725. (*Voronkina I.V., Smagina L.V., Gin I.I., Krylova T.A., Musorina A.S., Poljanskaya G.G.* 2018. Analysis of matrix metalloproteinases activity dynamics during chondrogenic differentiation process of mesenchymal stem cell line derived from Wharton's jelly of human umbilical cord. *Tsitologiya. V. 60. № 9. P. 725.*) <https://doi.org/10.7868/S0041377118090084>
- Воронкина И.В., Смагина Л.В., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Полянская Г.Г.* 2016. Сравнительный анализ динамики активности матричных металлопротеиназ в процессе дифференцировки мезенхимных стволовых клеток человека, выделенных из разных тканей одного донора. Цитология. Т. 58. № 11. С. 865. (*Voronkina I.V., Smagina L.V., Krylova T.A., Musorina A.S., Poljanskaya G.G.* 2017. Analysis of matrix metalloproteinase activity during differentiation of mesenchymal stem cells isolated from different tissues of one donor. *Cell Tiss. Biol. V. 11. P. 95.*) <https://doi.org/10.1134/S1990519X17020092>
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Петросян М.А., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.* 2020. Получение и характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из разных областей плаценты одного донора. Цитология. Т. 62. № 9. С. 713. (*Koltsova A.M., Zenin V.V., Petrosyan M.A., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G.* 2021. Isolation and characterization of Mesenchymal Stem Cell Line Derived from different regions of the placenta of the same donor. *Cell Tiss. Biol. V. 15. P. 356.*) <https://doi.org/10.31857/S0041377120090035>
- Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.* 2019. Характеристика неиммортилизованной линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эпикардиальной жировой ткани человека. Цитология. Т. 61. № 4. С. 272. (*Musorina A.S., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G.* 2019. XCharacterization of a nonimmortalized mesenchymal stem cell line isolated from human epicardial adipose tissue. *Cell Tiss. Biol. V. 13. P. 247.*) <https://doi.org/10.1134/S0041377119040047>
- Нибирицкий П.П., Сагарадзе Г.Д., Ефименко А.Ю., Макаревич П.И., Ткачук В.А.* 2018. Ниша стволовой клетки. Цитология. 60. № 8. P. 575. <https://doi.org/10.31116/tsitol.2018.08.01> (*Nimiritsky P.P., Sagaradze G.D., Efimenko A.Yu., Makarevich P.I., Tkachuk V.A.* 2018. The stem cell niche. *Tsitologiya. V. 60. P. 955.*)
- Полянская Г.Г.* 2008. Типы клеточных культур. Образование, основные характеристики и изменчивость клеточных линий. В кн.: Методы культивирования клеток. Санкт-Петербург: Изд-во Политехнического университета. С. 22. (*Poljanskaya G.G.* 2008. Types of cell cultures. Formation, main characteristics and variability of cell lines. In: *Methods of cell cultivation. St. Petersburg: Publishing house of the Polytechnic University. P. 22.*)
- Полянская Г.Г.* 2018. Сравнительный анализ характеристик линий мезенхимных стволовых клеток человека, полученных в коллекции культур клеток позвоночных (обзор). Сб. "Клеточные культуры", ISSN 2077-6055. Санкт-Петербург. Изд-во Политехнического ун-та, вып. 34. С. 3. (*Poljanskaya G.G.* 2018. Comparative analysis of the lines of human mesenchymal stem cells derived in the collection of cell cultures of vertebrates (review). *Collection "Cell cultures", ISSN 2077-6055. St. Petersburg: Polytechnic University Publishing house. № 34. P. 3.*)
- Тепляшин А.С., Чупикова Н.И., Коржикова С.В., Шарифуллина С.З., Ростовская М.С., Топчиашвили З.А., Савченкова И.П.* 2005. Сравнительный анализ двух клеточных популяций с фенотипом, подобным мезенхимным стволовым клеткам, выделенных из разных участков подкожно-жировой клетчатки. Цитология. Т. 47 № 7. P. 637–643. (*Teptyashin A.S., Chupikova N.I., Korzhikova S.V., Sharifullina S.Z., Rostovskaya M.S., Topchiashvili Z.A., Savchenkova I.P.* 2005. Comparative analysis of two cell populations with a phenotype similar to mesenchymal stem cells isolated from different areas of subcutaneous fat. *Tsitologiya. V. 47. № 7. P. 637–643.*)
- Шаровская Ю.Ю., Лаарькова М.А., Киселев С.Л., Чайлахян Л.М.* 2009. Исследование диффузионной связи через щелевые контакты в эмбриональных стволовых клетках человека в процессе спонтанной дифференцировки. Доклады Академии наук. Т. 427. № 3. С. 387. (*Sharovskaya Y.Y., Lagarkova M.A., Kiselev S.L., Chailakhyan L.M.* 2009. Gap junctional intercellular communication in human embryonic stem cells during spontaneous differentiation. *Dokl. Biol. Sci. V. 427. P. 387.*)
- Adak S., Magdalene D., Deshmukh S., Das D., Jaganathan B.* 2021. A review on mesenchymal stem cells for treatment of retinal diseases. *Stem Cell Rev. Rep. V. 6. P. 1.* <https://doi.org/10.1007/s12015-020-10090-x>
- Akpinar G., Yonetan K.K., Kasap M., Erdal Karaoz E.* 2021. Search for novel plasma membrane proteins as potential biomarkers in human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, adipose tissue, bone marrow, and hair follicle. *J. Membr. Biol. V. 254. P. 409.* <https://doi.org/10.1007/s00232-021-00190-1>
- Albu S., Kumru H., Coll R., Vives J., Vallés M., Denito-Penalty J., Rodriguez L., Codinach M., Hernández J., Navarro X., Vidal J.* 2021. Clinical effects of intrathecal administration of expanded Wharton jelly mesenchymal stromal cells in pa-

- tients with chronic complete spinal cord injury: a randomized controlled study. *Cytotherapy*. V. 23. P. 146. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.08.008>
- Almalki S.G., Agrawal D.K.* 2016. Effects of matrix metalloproteinases on the fate of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* V. 7. P. 129. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0393-1>
- Bouloumié A., Sengenès C., Portolan G., Galitzky J., Lafontan M.*, 2001. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes*. V. 50. P. 2080. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.9.2080>
- 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/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chavey C., Mari B., Monthouel M.N., Bonnafous S., Anglard P., Van Obberghen E., Tartare-Deckert S.* 2003. Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* V. 278. P. 11888. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209196200>
- Chen C.-F., Chen Y.-C., Fu Y.-S., Tsai S.-W., Wu P.-K., Chen C.-M., Chang M.-C., Chen W.-M.* 2021. Characterization of osteogenesis and chondrogenesis of human decellularized allogeneic bone with mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, and Wharton's jelly. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 8987. <https://doi.org/10.3390/ijms22168987>
- Choi J.S., Lee B.J., Park H.Y., Song J.S., Shin S.C., Lee J.C., Wang S.G., Jung J.S.* 2015. Effects of donor age, long-term passage culture, and cryopreservation on tonsil-derived mesenchymal stem cells. *Cell Physiol. Biochem.* V. 36. P. 85. <https://doi.org/10.1159/000374055>
- Costa L., Eiro N Fraile M., Gonzalez L., Saá J., Garcia-Portabella P., Vega B., Schneider J., Vizoso F.* 2021. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. *Cell Mol. Life Sci.* V. 78. P. 447. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03600-0>
- Cox R.P., Krauss M.R., Balis M.E., Dancis J.* 1972. Communication between normal and enzyme-deficient cells in tissue culture. *Exp. Cell Res.* V. 74. P. 251. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90503-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90503-4)
- Darnell M., O'Neil A., Mao A., Gu L., Rubin L.L., Mooney D.J.* 2018. Material microenvironmental properties couple to induce distinct transcriptional programs in mammalian stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 115. P. E8368. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802568115>
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.* 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Int. Soc. Cell. Therapy Position Statement. Cytother.* V. 8. P. 315. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Eiro N., Fraile M., Fernandes-Francos S., Sanchez R., Costa L.A., Vizoso F.J.* 2021. Importance of the origin of mesenchymal (stem) stromal cells in cancer biology: "alliance" or "war" in intercellular signals. *Cell Biosci.* V. 11. P. 109. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00620-6>
- Gattazzo F., Urciuolo A., Bonaldo P.* 2014. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1840. P. 2506. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.01.010>
- Gutiérrez-Fernández A., Soria-Valles C., Osorio F.G., Gutiérrez-Abril J., Garabaya C., Aguirre A., Fueyo A., Fernández-García M.S., Puente X.S., López-Otín C.* 2015. Loss of MT1-MMP causes cell senescence and nuclear defects which can be reversed by retinoic acid. *EMBO J.* V. 34. P. 1875. <https://doi.org/10.15252/embj.201490594>
- Hooper M.L., Subak-Sharpe J.H.* 1981. Metabolic cooperation between cells. *Int. Rev. Cytol.* V. 69. P. 45. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62320-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62320-7)
- Jin Q., Yuan K., Lin W., Niu C., Ma R., Huang Z.* 2019. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and adipose tissue for bone regeneration potential. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* V. 47. P. 1577. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1594861>
- Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z.* 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* V. 141. P. 52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>
- Kobayashi T., Torii D., Iwata T., Izumi Y., Nasu M., Tsutsui T.W.* 2020. Characterization of proliferation, differentiation potential, and gene expression among clonal cultures of human dental pulp cells. *Hum. Cell.* V. 33. P. 490. <https://doi.org/10.1007/s13577-020-00327-9>
- Laemmli U.* 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* V. 227. P. 680685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Li J., Xu S.-Q., Zhao Y.-M., Yu S., Ge L.-H., Xu B.-H.* 2018. Comparison of the biological characteristics of human mesenchymal stem cells derived from exfoliated deciduous teeth, bone marrow, gingival tissue, and umbilical cord. *Mol. Med. Rep.* V. 18. P. 4969. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9501>
- Lynch K., Pei M.* 2014. Age associated communication between cells and matrix: a potential impact on stem cell-based tissue regeneration strategies. *Organogenesis.* V. 10. P. 289. <https://doi.org/10.4161/15476278.2014.970089>
- Mannello F., Tonti G.A., Bagnara G.P., Papa S.* 2006. Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* V. 24. P. 475. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0333>
- Mannino G., Russo C., Longo A., Anfusio C.G., Lupo G., Furno D.L., Giuffrida R., Giurdanella G.* 2021. Potential therapeutic applications of mesenchymal stem cells for the treatment of eye diseases. *World J. Stem Cells.* V. 13. P. 632. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i6.632>
- Moghadasi S., Elveny M., Rahman H.S., Suksatan W., Jalil A.T., Abdelbasset W.K., Yumashev A.V., Shariatzadeh S., Motavalli R., Behzad F., Marofi F., Hassanzadeh A., Pathak Y., Jarahian M.* 2021. A paradigm shift in cell-free approach: the emerging role of MSCs-derived exosomes in regenerative medicine. *J. Transl. Med.* V. 19. P. 302. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02980-6>
- Muraglia A., Cancedda R., Quarto R.* 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* ac-

- ording to a hierarchical model. *J. Cell Sci.* V. 7. P. 1161.
<https://doi.org/10.1242/jcs.113.7.1161>
- Nagase H., Woessner J.F. 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* V. 274. P. 21491.
<https://doi.org/10.1201/9781482272765>
- Niedernhofer L.J., Gurkar A.U., Wang Y., Vijg J., Hoeijmakers J.H.J., Robbins P.D. 2018. Nuclear genomic instability and aging. *Ann. Rev. Biochem.* V. 87. P. 295.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012239>
- Noh E.M., Kim J.M., Hong O.Y., Song H.K., Kim J.S., Kwon K.B., Lee Y.R. 2017. PTEN inhibits replicative senescence-induced MMP-1 expression by regulating NOX4-mediated ROS in human dermal fibroblasts. *J. Cell Mol. Med.* V. 21. P. 3113.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.13220>
- Oliver G.W., Stetler-Stevenson W.G., Kleiner D.E. 1999. Zymography, casein zymography, and reverse zymography: activity assays for proteases and their inhibitors. In: *Proteolytic enzymes*. Berlin, Heidelberg: Springer Lab. Manual. Springer.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-59816-6_5
- Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 8. P. 221.
<https://doi.org/10.1038/nrm2125>
- Parolini O., Alviano F., Bagnara G.P., Bilic G., Buhring H.J., Evangelista M., Hennerbichler S., Liu B., Magatti M., Mao N., Miki T., Marongiu F., Nakajima H., Nicaido T., Portmann-Lanz C.B. et al. 2008. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta derived stem cells. *Stem Cells.* V. 26. P. 300.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0594>
- Raposo L., Lourenço A.P., Nascimento D.S., Rui Cerqueira R., Cardim N., Leite-Moreira A. 2021. Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells as adjuvant therapy for myocardial infarction: a review of current evidence focusing on pre-clinical large animal models and early human trials. *Cytotherapy.* V. 23. P. 974.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2021.05.002>
- Reed S.L., Escayg A. 2021. Extracellular vesicles in the treatment of neurological disorders. *Neurobiol. Dis.* V. 157. P. 105445.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105445>
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C.M. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* V. 98. P. 2615.
- Safari F., Shakery T., Sayadamin N. 2021. Evaluating the effect of secretome of human amniotic mesenchymal stromal cells on apoptosis induction and epithelial-mesenchymal transition inhibition in LNCaP prostate cancer cells based on 2D and 3D cell culture models. *Cell Biochem. Funct.* V. 39. P. 813.
<https://doi.org/10.1002/cbf.3654>
- Schneider R.K., Puellen A., Kramann R., Raupach K., Bornemann J., Knuechel R., Perez-Bouza A., Neuss S. 2010. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials.* V. 31. P. 467.
- Semenova E., Grudniak M.P., Machaj E.K., Bocian K., Chroscinska-Krawczyk M., Trochonowicz M., Stepaniec I.M., Murzyn M., Zagorska K.E., Boruczowski D., Kolanowski T.J., Oldak T., Rozwadowska N. 2021. Mesenchymal stromal cells from different parts of umbilical cord: approach to comparison and characteristics. *Stem Cell Rev. Rep.*
<https://doi.org/10.1007/s12015-021-10157-3>
- Sensebé L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P., Giordano R. 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* V. 98. P. 93.
- Shin S., Lee J., Kwon Y., Park K.-S., Jeong J.-H., Choi S.-J., Bang S., Chang J., Lee C. 2021. Comparative proteomic analysis of the mesenchymal stem cells secretome from adipose, bone marrow, placenta and Wharton's jelly. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 845.
<https://doi.org/10.3390/ijms22020845>
- Sillat T., Saat R., Pöllänen R., Hukkanen M., Takagi M., Kontinen Y.T. 2012. Basement membrane collagen type IV expression by human mesenchymal stem cells during adipogenic differentiation. *J. Cell Mol. Med.* V. 16. P. 1485.
- Somoza R., Conget P., Rubio F.J. 2008. Neupotency of human mesenchymal stem cell cultures: clonal studies reveal the contribution of cell plasticity and cell contamination. *Biol. Blood Marrow Transplant.* V. 14. P. 546.
<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.02.017>
- Stanko P., Kaiserova K., Altanerova V., Altaner C. 2014. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* V. 158. P. 373.
<https://doi.org/10.5507/bp.2013.078>
- Sun J., Xing F., Zou M., Gong M., Li L., Zhou Xiang Z. 2021. Comparison of chondrogenesis-related biological behaviors between human urine-derived stem cells and human bone marrow mesenchymal stem cells from the same individual. *Stem Cell Res. Ther.* V. 12. P. 366.
- Sworder B.J., Yoshizawa S., Mishra P.J., Cherman N., Kuznetsov S.A., Merlino G., Balakumaran A, Robey P.G. 2015. Molecular profile of clonal strains of human skeletal stem/progenitor cells with different potencies. *Stem Cell Res.* V. 14. P. 297.
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.02.005>
- Tai C., Wang L., Xie Y., Gao T., Huang F., Wang B. 2021. Analysis of key distinct biological characteristics of human placenta-derived mesenchymal stromal cells and individual heterogeneity attributing to donors. *Cells Tiss. Organs* V. 210. P. 45.
<https://doi.org/10.1159/000513038>
- Vilaça-Faria H., Marote A., Lages I., Ribeiro C., Mendes-Pinheiro B., Domingues A.V., Campos J., Lanceros-Mendez S., Salgado A.J., Teixeira F.G. 2021. Fractionating stem cells secretome for Parkinson's disease modeling: is it the whole better than the sum of its parts? *Biochimie.* V. 189. P. 87.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.06.008>
- Wangler S., Kamali A., Wapp C., Wuertz-Kozak K., Häckel S., Fortes C., Lorin M Benneker L.M., Haglund L., Richards R.G., Alini M., Peroglio M., Sibylle Grad S. 2021. Uncovering the secretome of mesenchymal stromal cells exposed to healthy, traumatic, and degenerative intervertebral discs: a proteomic analysis. *Stem Cell Res. Ther.* V. 12. P. 11.
<https://doi.org/10.1186/s13287-020-02062-2>
- Xiao Z., Lei T., Liu Y., Yang Y., Bi W., Du H. 2021. The potential therapy with dental tissue-derived mesenchymal stem cells

in Parkinson's disease. *Stem Cell Research & Therapy*. V. 12. P. 5.
<https://doi.org/10.1186/s13287-020-01957-4>

Yigitbilek F., Conley S.M., Tang H., Saadiq I.M., Jordan K.L., Lerman L.O., Taner T. 2021. Comparable *in vitro* function of human liver-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells: implications for cell-based therapy.

Front. Cell Dev. Biol. V. 9. eCollection.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.641792>

Zhang X., Wang N., Huang Y., Li Y., Li G., Lin Y., Atala A., Hou J., Zhao W. 2022. Extracellular vesicles from three dimensional culture of human placental mesenchymal stem cells ameliorated renal ischemia/reperfusion injury. *Int. J. Artif. Organs*. 45. V. 2. P. 181–92.
<https://doi.org/10.1177/0391398820986809>

Metalloproteinase's Activity of Two Placenta-Derived Stem Cells Lines from a Donor Differing in the Adipogenic Differentiation Potential and Nature of Replicative Senescence

I. V. Voronkina^{a, *}, L. V. Smagina^a, A. M. Koltsova^b, A. S. Musorina^b, and G. G. Poljanskaya^{b, **}

^a*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197022 Russia*

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

*e-mail: voronirina@list.ru

**e-mail: gpolanskaya@gmail.com

A long-term cultivation of 2 lines of human MSCs isolated from different sites of placenta was carried out. The MSC-PL-1 cell line is characterized by premature replicative senescence (RS) compared to the MSC-PL-2 line. During the induction of adipogenic differentiation (AD), it was shown that AD does not occur at early and late passages in cells of MSC-PL-1 line unlike cells of the MSC-PL-2 line. Comparative analysis of the activities of matrix metalloproteinases (MMP-1, -2 and -9) in the process of RS of these cell lines indicates interlinear differences. So, during RS in MSC-PL-2 cells the activity of MMP-2 and -1 decreases, and MMP-9 does not change, and in MSC-PL-1 cells with premature RS the activity of MMP-9 and -1 increases, while activity of MMP-2 decreases. The analysis of MMP -1 and -2 activities during the process of adipogenic differentiation in the MSC-PL-2 line at the early 6th passage showed a number of differences between the activity levels of these MMPs during 21 days, but they all showed the same wave-like manner of changes. The activity of MMP-9 had a different character of changes during the 21 days of differentiation. The same pattern of changes took place at the late 16th passage in same 3 MMP during 21 days of differentiation. Since there is no adipogenic differentiation in the MSC-PL-1 line, we analyzed the activities of MMP -1, -2 and -9 during cultivation in induction medium for 21 days in the early 6th and late 13th passages. There were changes in the activity of all MMPs in both variants, but they were not synchronous. In general, there was a significant decrease in the activity of all 3 MMP on the 13th passage compared to the 6th passage. The obtained results indicate the participation of MMPs in a wide range of cellular processes.

Keywords: human mesenchymal stem cells, replicative senescence, adipogenic differentiation, matrix metalloproteinases

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КРАУДЕРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. И. Е. Перевозников¹, *, Р. Е. Ушаков¹, Е. Б. Бурова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: ilyaperevoznikov@gmail.com

Поступила в редакцию 01.10.2022 г.

После доработки 12.10.2022 г.

Принята к публикации 28.10.2022 г.

Последние десятилетия отмечены интенсивным развитием биологии внеклеточного матрикса (ВКМ), контролирующего основные клеточные функции — от пролиферации и дифференцировки до миграции и апоптоза. Биоактивные свойства ВКМ открывают широкие перспективы его использования в биоинженерии и регенеративной медицине. В этом контексте ключевой технологией является получение ВКМ путем децеллюляризации органов, тканей или клеточных культур. Проблема быстрой наработки больших количеств биоактивных ВКМ культивируемых клеток для медицинских целей представляется весьма актуальной; вместе с тем, в отношении эндометриальных мезенхимных стромальных клеток человека (эМСК) вопрос остается открытым. С целью оптимизации условий продукции ВКМ культивируемыми эМСК мы изучили влияние макромолекулярных соединений (краудеров) — фикола и полиэтиленгликоля — на эффективность депонирования белков ВКМ в зависимости от времени, концентрации и молекулярного веса краудеров в условиях нормоксии и гипоксии. Как показано методом иммунофлуоресценции, фикола 400 наиболее эффективен для наработки ключевых компонентов матрикса — фибронектина, коллагена IV типа и в меньшей степени коллагена III типа. При сравнении нормоксических (20% O₂) и гипоксических (3% O₂) условий культивирования выявлено, что клетки продуцируют ВКМ с более развитой структурой при пониженной концентрации кислорода; существенно, что в этих условиях фикола 400 способствует депонированию ВКМ только при низком содержании сыворотки в ростовой среде. Суммируя, можно заключить, что сочетание гипоксии, фикола 400 и низкого содержания сыворотки в ростовой среде обеспечивает оптимальный способ продукции ВКМ. Мы впервые продемонстрировали феномен макромолекулярного краудинга в контексте улучшения депонирования и организации структуры ВКМ у эМСК.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс, эндометриальные мезенхимные стромальные клетки, гипоксия, макромолекулярные краудеры

DOI: 10.31857/S0041377123020074, **EDN:** LYQSER

Использование мезенхимных стромальных клеток (МСК) в тканевой инженерии и регенеративной медицине благодаря их способности к самообновлению, мультипотентности, стабильности кариотипа и секреторному фенотипу открывает широкие возможности для лечения сердечно-сосудистых и ревматических болезней, костных заболеваний, повреждений нейронов, воспалительных процессов в легких, диабета и т.д. (Maumus et al., 2013; Konala et al.,

2016; Cunningham et al., 2018; Xu et al., 2019; Rolands-son Enes et al., 2021).

В настоящее время в научной среде доминирует точка зрения, что терапевтический эффект трансплантированных МСК связан с их паракринным действием благодаря секретируемым факторам, которые поддерживают процессы регенерации в поврежденных тканях, индуцируют ангиогенез и модулируют иммунную систему. С другой стороны, как известно, основные клеточные функции контролирует внеклеточный матрикс (ВКМ), являющийся основным компонентом микроокружения клеток и принимающий непосредственное участие в формировании клеточной (тканевой) ниши (Lin et al., 2012; Rao Patabhi et al., 2014; Xing et al., 2020).

ВКМ представляет собой трехмерную молекулярную сеть, занимающую пространство между клетка-

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин; ВКМ — внеклеточный матрикс; ММК — макромолекулярные краудеры; МСК — мезенхимные стромальные клетки; эМСК — эндометриальные МСК человека; ПРС — полная ростовая среда; ПЭГ — полиэтиленгликоль; CHAPS — (3-[(3-cho-lamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate); FVO — занимаемый фракционный объем (fraction volume occupancy).

ми во всех тканях организма, причем его состав и свойства сильно варьируют. Основными компонентами ВКМ являются структурные белки – коллагены, гликопротеины и протеогликаны (Hynes, 2009; Naba et al., 2012; Матвеева, Андреева, 2020); кроме того, ВКМ выполняет функцию депо для ряда морфогенов и факторов роста (Discher et al., 2009). ВКМ вовлечен в регуляцию важнейших клеточных процессов, таких как дифференцировка, пролиферация, миграция клеток, проведение внеклеточных сигналов, апоптоз и морфогенез (Rozario, DeSimone, 2010; Clause, Barker, 2013; Assunção et al., 2020; Xing et al., 2020). Влияние на столь широкий спектр функций происходит благодаря взаимодействию с различными мембранно-связанными клеточными рецепторами, в первую очередь интегринами. Реагируя на сигналы от ВКМ, клетки, в свою очередь, способны ремоделировать матрикс (Ahmed, Ffrench-Constant, 2016). Осуществляется это за счет сериновых и цистеиновых протеаз, а также матриксных металлопротеиназ, которые могут как участвовать в деградации белков ВКМ, так и высвобождать депонированные в нем факторы роста, в частности TGF- β (Schaefer, 2010). Таким образом, взаимодействие клеток и ВКМ является двунаправленным.

Одним из способов получения ВКМ является децеллюляризация тканей, однако при использовании такого матрикса возникает опасность иммунного отторжения в случае неполного удаления клеток (Masago et al., 2021); кроме того, следует учитывать сложность децеллюляризации некоторых тканей, особенно ниш стволовых клеток (Assunção et al., 2020). В качестве альтернативы используются синтетические двумерные и трехмерные скаффолды, покрытые отдельными белками ВКМ (Yang et al., 2020), либо подложки из смеси белков, входящих в состав ВКМ. В последние годы повышенный интерес научного сообщества вызывает исследование матрицесов клеточного происхождения в связи с их существенными преимуществами перед синтетическими аналогами: уникальная биосовместимость, сохранение архитектуры и биохимических свойств ткани (Hoshiba et al., 2010; Nellinger et al., 2022), возможность скрининга популяции исходных клеток-продуцентов и контроля за условиями наработки ВКМ (Li et al., 2020; Antich et al., 2021). Децеллюляризованные ВКМ клеточного происхождения находят применение в качестве модели для изучения взаимодействий матрикс–клетка, а также выступают основой для разработки биосовместимых скаффолдов.

Однако широкое применение ВКМ клеточного происхождения ограничено низкой скоростью и эффективностью его наработки *in vitro*, а также невысокой физико-механической прочностью по сравнению с нативным ВКМ тканей. Решение первой проблемы связано с созданием масштабного производства ВКМ со специальной инфраструктурой, для чего потребуется разработка нового оборудова-

ния и вложение определенных денежных средств. Вторая проблема, в принципе, может быть решена путем введения специальных сшивок в структуру ВКМ (Nyambat et al., 2020). Принимая во внимание возникающие сложности в обоих случаях, на сегодняшний день не теряет актуальности поиск способов увеличения скорости депонирования ВКМ культивируемыми клетками (Assunção et al., 2020).

Среди факторов, которые могут влиять на продукцию ВКМ МСК, рассматривают pH, концентрацию O₂, температуру, механические стимулы и регуляторные молекулы (Matveeva, Andreeva, 2020). С целью ускорения и усиления депонирования ВКМ в системах культивируемых клеток используют инертные высокополимерные вещества (краудеры); добавление таких макромолекул в ростовые среды имитирует существующее *in vivo* плотное внеклеточное пространство и позволяет ускорить, например, энзиматическую конверсию водорастворимого проколлагена в нерастворимый коллаген I типа – ключевую стадию образования коллагенового матрикса (Bateman et al., 1986; Lareu et al., 2007). Макромолекулярный краудинг – это биофизический феномен, связанный с объемом, исключаемым макромолекулами, поскольку они подвергаются стерическому отталкиванию и электростатическим взаимодействиям. Эффекты исключенного объема описываются величиной FVO (fraction volume occupancy), т.е. фракцией от общего объема, занимаемой краудером. Исключенный объем зависит от формы, размера, заряда и полидисперсности молекул. В отношении биологических систем это означает увеличение вероятности встречи ферментов с субстратом, что существенно ускоряет протекание биологических процессов (Cigognini et al., 2016), в том числе ферментативных реакций, ответственных за сборку и депонирование матрикса (Chen et al., 2011; Kuznetsova et al., 2014). К макромолекулярным краудерам (ММК) относятся такие различные по природе соединения, как фиколл (ficoll), гиалуроновая кислота (hyaluronic acid), каррагинан (carrageenan), сульфат декстрана (dextran sulphate), поливинилпирролидон (polyvinylpyrrolidone) (Gaspar et al., 2019; Tsiapalis, Zeugolis, 2021).

Другим подходом является культивирование клеток в условиях гипоксии. Для МСК концентрация O₂ ниже атмосферного уровня является одним из наиболее важных физических факторов тканевого микроокружения (Buravkova et al., 2014). Адаптация МСК к гипоксическим условиям происходит благодаря активации HIF-1 (hypoxia inducible factor-1), который регулирует транскрипционную активность структурных компонентов ВКМ и ферментов его ремоделирования. Было показано, что в условиях гипоксии в матриксе МСК существенно повышается содержание фибронектина, коллагеновых белков и ангиогенных факторов (Cigognini et al., 2016; Du et al., 2017), причем добавление в ростовую среду крауде-

ров (каррагинана и фикола) при культивировании МСК из костного мозга при пониженном содержании кислорода также приводит к увеличению эффективности продукции белков ВКМ (Cigognini et al., 2016). Следовательно, совмещение условий гипоксии и макромолекулярного краудинга может представлять интерес для всестороннего исследования. Наряду с этим отмечали, что культивирование клеток в ростовой среде с низкой концентрацией сыворотки (около 1%) также может увеличивать скорость наработки компонентов ВКМ (Satyam et al., 2014; Kumar et al., 2015a, 2015b).

Представленная работа посвящена оптимизации условий депонирования компонентов внеклеточного матрикса мезенхимными стромальными клетками человека, выделенными из десквамированного эндометрия в менструальной крови (эмСК). Неинвазивный и легкодоступный источник эмСК обеспечивает широкомасштабные исследования *in vitro*. Благодаря высокой пролиферативной активности при длительном культивировании и генетической стабильности (Домнина и др., 2013), эти клетки могут быть перспективным источником ВКМ для изучения функциональной активности и потенциального применения децеллюляризованных ВКМ в регенеративной медицине. Как показывает анализ литературы, информация о применении краудеров различной природы с целью улучшения условий депонирования ВКМ культивируемыми МСК весьма ограничена. Так, в ряде работ было продемонстрировано, что макромолекулярный краудинг ускоряет депонирование и определяет архитектуру ВКМ, продуцированного МСК из костного мозга (Zeiger et al., 2012; Ang et al., 2014; Rashid et al., 2014; Prewitz et al., 2015); при этом использованные краудеры (фиколл, поливинилпирролидон и сульфат декстрана) повышали эффективность наработки коллагенов I–IV типов и фибронектина. В контексте эмСК, подобные работы до настоящего времени не были описаны в литературе.

Мы провели сравнительное исследование влияния макромолекулярных краудеров (фиколл и полиэтиленгликоля) на эффективность депонирования основных белков ВКМ – коллагена III и IV типов и фибронектина – в условиях нормоксии и гипоксии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Характеристика клеток. Во всех экспериментах использовали эмСК человека, выделенные из десквамированного эндометрия в менструальной крови сотрудниками Лаборатории внутриклеточной сигнализации, ИИЦ РАН, на 10–11 пассаже (Земелько и др., 2011). Была подтверждена принадлежность выделенных эмСК к мезенхимным стромальным предшественникам с использованием минимальных критериев, предложенных ISTC (Dominici et al., 2006). Как было установлено (Земелько и др., 2011), используемые эмСК

экспрессируют клеточные маркеры CD73, CD90, CD105, CD13, CD29 и CD44, но не обнаруживают поверхностных антигенов гемопоэтических клеток: CD19, CD34, CD45, CD117, CD130 и HLA-DR (класс II). Мультипотентность эмСК подтверждается их способностью дифференцироваться в различные мезодермальные типы клеток, такие как остеобlastы и адипоциты. Кроме того, выделенные эмСК частично (более 50%) экспрессируют маркер плюрипотентности SSEA-4, но не экспрессируют Oct-4. Иммунофлуоресцентный анализ полученных клеток выявил экспрессию маркеров нейрональных предшественников нестина и бета-III-тубулина, что говорит об их нейрональной предрасположенности. эмСК характеризуются высокой скоростью пролиферации клеток (время удвоения 22–23 ч) и эффективностью колониобразования (около 60%).

Культивирование клеток. Клетки культивировали во флаконах T25 и T75 (Thermo Scientific, США) в полной ростовой среде (PRC), содержащей среду DMEM/F12 (Gibco, США), 10% эмбриональной сыворотки (FBS) (HyClone, США), 1% PenStrep (Gibco, США) и 1% GlutaMAX (Gibco, США) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для проведения экспериментов в гипоксических условиях и в присутствии макромолекулярных краудеров клетки трипсинизировали с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и ЭДТА (Invitrogen, США) и рассевали по 200 тыс. клеток на покрытые 0.1%-ным раствором желатина чашки диаметром 35 мм (Thermo Scientific, США).

Нормоксические условия культивирования клеток. Через 3 сут после посева клеток PRC заменяли на среду, содержащую макромолекулярные краудеры в соответствующей концентрации. Краудеры растворяли в ростовой среде, содержащей 1% FBS и 0.2 мМ аскорбата натрия (Sigma, Германия), которую стерилизовали фильтрацией через мембрану 0.22 мкм непосредственно перед использованием. Аскорбат является необходимой добавкой для стабильной наработки ВКМ (Choi et al., 2008), выступая в роли антиоксиданта, а также кофактора ферментов лизилгидроксилазы и пролилгидроксилазы, участвующих в фибриллогенезе коллагена (Pinnell, 1985). Мы использовали тринатриевую соль 2-фосфо-L-аскорбиновой кислоты как стабильную форму аскорбата натрия с целью снижения частоты замены ростовой среды. В качестве контроля служили клетки, растущие в среде с содержанием FBS (1 или 10%) и 0.2 мМ аскорбата натрия. Клетки культивировали в течение 3 или 7 сут с момента добавления краудеров (или аскорбата натрия в случае контрольных клеток), заменяя среду на свежую каждые 3 сут. По окончании культивирования проводили децеллюляризацию с целью получения бесклеточного ВКМ.

Гипоксические условия культивирования клеток. После посева клетки инкубировали в течение 1 сут в условиях нормоксии, затем чашки переносили в инкубатор с гипоксическими условиями (3% O₂).

Через 1 сут ПРС в чашках заменяли на среду, содержащую 50 мг/мл фикола 400 и 1 или 10% FBS; все среды стерилизовали фильтрацией через мембрану 0.22 мкм непосредственно перед использованием. В качестве контроля служили клетки, растущие в условиях гипоксии в среде с содержанием FBS 1 или 10%. Все ростовые среды содержали 0.2 мМ аскорбата натрия. Клетки культивировали в течение 7 или 14 сут с момента добавления фикола 400 (или аскорбата натрия в случае контрольных клеток), заменяя среду на свежую каждые 3 сут. По окончании инкубации проводили децеллюляризацию ВКМ.

Макромолекулярные краудеры. В качестве макромолекулярных краудеров для исследования мы выбрали фикола 400 кДа (Pharmacia, Швеция), а также полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 2 (Merck, США), 4 и 6 кДа (Ferak Berlin, Германия). При расчете рабочих концентраций взяли за основу ПЭГ 4 кДа в концентрации 50 мг/мл, который способствовал повышению скорости процессинга проколлагена I в коллаген и накоплению последнего (Bateman et al., 1986). Согласно расчету по приведенной ниже формуле, фракционный объем (FVO), занимаемый ПЭГ в концентрации 50 мг/мл, составляет 12.9%. Для вычисления FVO использовали гидродинамический радиус, который занимает 1 молекула ПЭГ 4 кДа в растворе. Значения гидродинамических радиусов были взяты из источников литературы (Kuznetsova et al., 2014; Dong et al., 2018): 1.6 нм (ПЭГ 4 кДа), 2.08 нм (ПЭГ 6 кДа) и 8 нм (фикола 400 кДа). На основе этих данных была рассчитана концентрация для ПЭГ 6 кДа (35 мг/мл), соответствующая FVO = 12.9%. Расчет проводили по формуле, созданной на основе вычислений (см.: Chen et al., 2011):

$$FVO_{\text{ПЭГ4 кДа}} = \frac{4}{3} \pi R_h^3 \frac{M_{1 \text{ мл}}}{Mm_{\text{ПЭГ4 кДа}}} N_A \times 10^6,$$

где $FVO_{\text{ПЭГ4 кДа}}$ – фракционный объем, занимаемый ПЭГ 4 кДа (для перевода в % полученный результат умножается на 100); R_h – гидродинамический радиус ПЭГ 4 кДа (м); $M_{1 \text{ мл}}$ – масса ПЭГ 4 кДа, содержащегося в 1 мл раствора (г); $Mm_{\text{ПЭГ4 кДа}}$ – молярная масса ПЭГ 4 кДа (г); N_A – число Авогадро.

В настоящей работе тестировали эффекты ПЭГ различной мол. массы в следующих концентрациях: ПЭГ 2 кДа – 40 мг/мл; ПЭГ 4 кДа – 25, 50 и 100 мг/мл; ПЭГ 6 кДа – 17.5, 35 и 70 мг/мл. На основе известного радиуса Стокса (1.15 нм) (Zhu et al., 2016) для ПЭГ 2 кДа было рассчитано значение $FVO = 7.7\%$. Как было показано, наиболее эффективной концентрацией фикола для депонирования ВКМ является смесь 37.5 мг/мл фикола 70 кДа и 25 мг/мл фикола 400 кДа (Chen et al., 2011; Tsiapalis, Zeugolis, 2021). Суммарный FVO смеси составляет около 17% по объему, что превосходит значение, вычисленное нами для ПЭГ; поэтому при выборе концентрации фикола 400 кДа мы ориентировались на это значение

и определили, что 50 мг/мл дают величину FVO близкую к этой (около 16%). Таким образом, для исследования эффекта фикола 400 кДа были выбраны следующие концентрации: 25, 50 и 100 мг/мл.

Децеллюляризация ВКМ и иммунофлуоресценция. Децеллюляризацию ВКМ проводили, осторожно обрабатывая клетки 0.5%-ным раствором CHAPS, содержащим 20 мМ гидроксида аммония, в течение 3 мин при комнатной температуре с последующей промывкой PBS. Фиксировали ВКМ 3.7%-ным раствором формалина в течение 15 мин и инкубировали в 0.5%-ном Тритоне-X-100 в течение 15 мин. После каждой стадии препараты промывали PBS 5 раз по 3 мин. Далее ВКМ обрабатывали 1%-ным БСА в течение 30 мин и инкубировали в течение ночи при 4°C в 1%-ном БСА с первичными антителами к фибронектину (Sigma, США) (разведение 1 : 400), коллагену III или IV типов (ИМТЕК, Россия; разведение 1 : 20) с последующей промывкой PBS 5 раз по 2 мин; инкубировали с вторичными козьими антителами, выработанными против иммуноглобулинов кролика и конъюгированными с флуорофором Alexa 488 (GAR-Alexa 488) (Invitrogen, США; разведение 1 : 500), в течение 40 мин при комнатной температуре и промывали PBS 5 раз по 2 мин. Анализ окрашенного ВКМ проводили на флуоресцентном микроскопе Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, Сингапур).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе исследовали влияние различных по химической природе полимерных соединений – фикола 400 и ПЭГ с мол. массой 2, 4 или 6 кДа – на эффективность депонирования ключевых белков ВКМ культивируемыми ЭМСК в условиях нормоксии и гипоксии. Следует подчеркнуть, что в контексте ЭМСК поиск подходов для увеличения скорости и эффективности продукции компонентов ВКМ является новаторским. Как известно, макромолекулярные соединения типа фикола при добавлении в ростовую среду в процессе культивирования клеток рассматриваются как макромолекулярные краудеры, способствующие продукции белков ВКМ (Chen et al., 2011; Kuznetsova et al., 2014; Prewitz et al., 2015; Cigognini et al., 2016; Gaspar et al., 2019; Tsiapalis, Zeugolis, 2021). В частности, фикола 400 в комбинации с фиколом 70 стимулировал депонирование культивируемыми клетками ряда ключевых белковых компонентов ВКМ, таких как фибронектин, коллаген I, II и IV типа (Chen et al., 2011, 2013; Cigognini et al., 2016; Tsiapalis, Zeugolis, 2021), что позволяло надеяться на перспективность использования фикола 400 для улучшения условий наработки матрикса ЭМСК. Кроме того, выбор фикола 400 в качестве объекта исследования был обусловлен крайне скудной информацией о его самостоятельном действии на продукцию ВКМ клетками в культуре; в доступной нам литературе не удалось обнаружить и аналогичных сведений относительно ПЭГ.

Фиколл представляет собой нейтральный полимер, полученный в результате сополимеризации сахарозы и эпихлоргидрина; этот полисахарид не цитотоксичен и не оказывает существенного влияния на вязкость раствора при соответствующих концентрациях. ПЭГ, получаемый каталитической полимеризацией окиси этилена, является гидрофильным веществом с низкой токсичностью; находит широкое применение в различных областях — медицины, биологии, промышленности, в том числе химической и пищевой. Как правило, ПЭГ-полимеры в той или иной степени обладают полидисперсностью (молекулярно-массовым распределением), причем длина полимерных цепей зависит от соотношения реагентов при полимеризации.

С целью оптимизации условий депонирования компонентов ВКМ культивируемыми эМСК было проведено сравнительное изучение эффектов фиколла и ПЭГ разной мол. массы при варьировании концентрации ММК, времени продукции ВКМ, содержания кислорода в атмосфере (10 vs 1%). Как сообщалось, культивирование клеток в ростовой среде с низкой концентрацией сыворотки (около 1%) или в бессывороточной среде приводит к увеличению скорости и эффективности депонирования ВКМ, поскольку сыворотка содержит металлопротеазы, разрушающие ВКМ, и снижает скорость его ремоделирования (Satyam et al., 2014; Kumar et al., 2015a, 2015b).

В предварительных экспериментах мы установили, что применение детергента CHAPS для децеллюляризации матрикса эМСК позволяет не только полностью удалить клетки, но и сохранить биоактивные свойства децеллюляризованного ВКМ; с помощью методов иммуноцитохимии и иммуноблотинга было продемонстрировано отсутствие клеточных структур (ядер, актинового и тубулинового цитоскелета), а также наличие основных белков ВКМ — фибро-

нектин, коллагена I, III и IV типов (данные не показаны).

Влияние макромолекулярных краудеров на эффективность депонирования белков ВКМ клетками эМСК. Исследовали зависимость продукции фибронектина и коллагенов III и IV типа от концентрации краудеров ПЭГ и фиколла в стандартных условиях нормоксии в течение 3 и 7 сут. Использованные концентрации: ПЭГ 2 кДа — 40 мг/мл; ПЭГ 4 кДа — 25, 50 или 100 мг/мл; ПЭГ 6 кДа — 17.5, 35 или 70 мг/мл; фиколл 400 — 25, 50 или 100 мг/мл. После децеллюляризации анализ белкового состава полученных ВКМ проводили методом иммунофлуоресценции.

эМСК, инкубированные в средах с добавлением ПЭГ 4 кДа (100 мг/мл) или ПЭГ 6 кДа (35 и 70 мг/мл), в значительной степени погибли в течение первых 3-х сут, поэтому были исключены из эксперимента. Хотя ПЭГ считается по данным FDA (Food and Drug Administration) инертным и безопасным, вероятной причиной клеточной гибели вполне могло быть цитотоксическое действие высоких доз ПЭГ, а также потенциальное наличие в препаратах ПЭГ токсичных примесей — окиси этилена и 1,4-диоксана.

Эффективность депонирования белковых компонентов ВКМ оценивали по интенсивности их флуоресценции и плотности (целостности) образованной сети. Отрицательным контролем служило отсутствие флуоресценции при окраске ВКМ первичными антителами против α -тубулина и вторичными антителами GAR-Alexa 488 (рис. 1). Как показывает сравнение белков ВКМ, депонированных клетками в течение 3 сут в присутствии фиколла 400 (рис. 2), наиболее эффективно действует фиколл 400 в концентрации 50 мг/мл (FVO = 16%) (рис. 2б), при этом пролонгирование культивирования эМСК с фиколлом 400 до 7 сут усиливает депонирование фибронектина и коллагена IV типа (рис. 3б), которые по интенсивности окраски и плотности образуемой сети превосходят наблюдаемые для фиколла 400 в концентрациях 25 мг/мл (FVO = 8%) и тем более 100 мг/мл (FVO = 32%) (рис. 3а, в). Сравнение

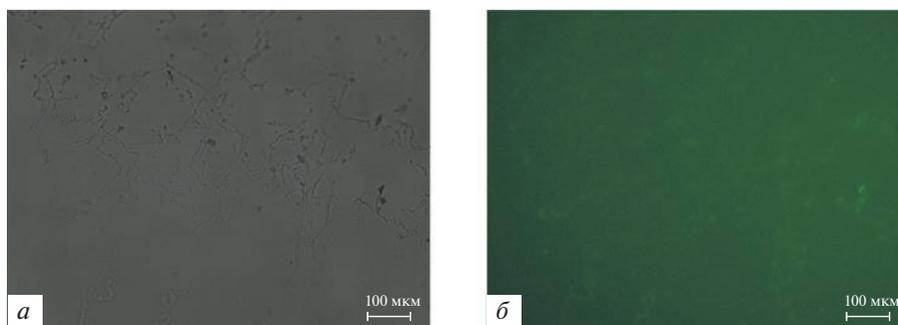


Рис. 1. Окрашивание децеллюляризованного внеклеточного матрикса (ВКМ) эндометриальных мезенхимных стромальных клеток человека (эМСК) первичными антителами против α -тубулина и вторичными антителами GAR-Alexa 488 (отрицательный контроль). *a* — Контраст в проходящем свете, *б* — флуоресценция вторичных антител (отсутствует). Съемку проводили на микроскопе Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, Сингапур), масштабный отрезок — 100 мкм.

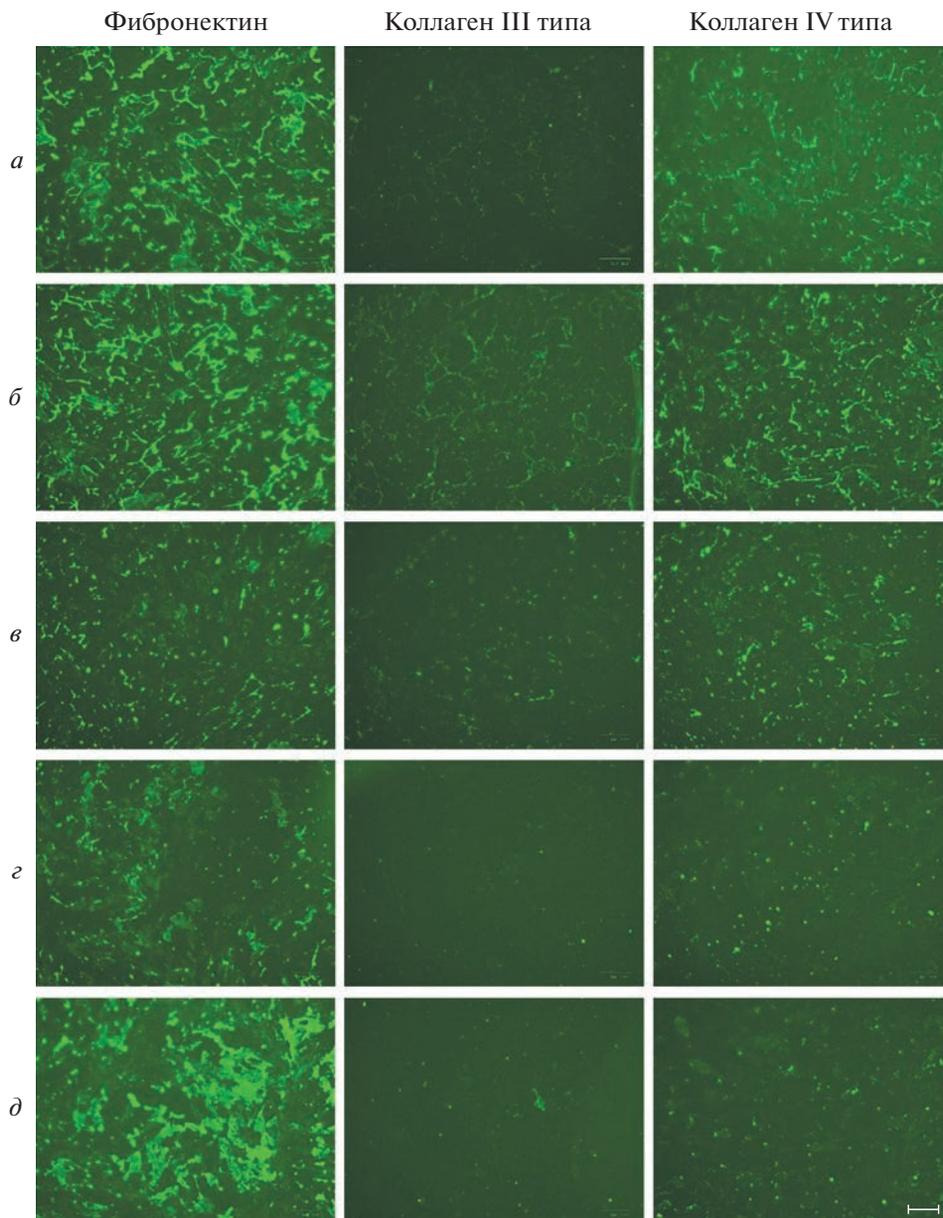


Рис. 2. Влияние фикола 400 в разных концентрациях на эффективность депонирования белков ВКМ эМСК в условиях нормоксии (20% O_2) при культивировании в течение 3 сут. Иммунофлуоресценции на фибронектин, коллаген III и IV типа. Концентрация фикола 400 в ростовой среде, содержащей 1% сыворотки FBS: *а* – 25, *б* – 50, *в* – 100 мг/мл. *г*, *д* – Среда, содержащая 1 и 10% FBS соответственно (окраска контрольных клеток, типичная и для варианта на рис. 4). Представлены наиболее репрезентативные результаты окрашивания белков ВКМ. Условия окраски и съемки идентичны для всех вариантов, представленных на рис. 2–7 (микроскоп Fluorescent Cell Imager; Bio-Rad, Сингапур), масштабный отрезок: 100 мкм.

рис. 2г, д с рис. 3г, д показывает, что наработка всех исследуемых белков ВКМ при культивировании контрольных эМСК в среде с содержанием FBS 1 и 10% значительно усиливается в интервале от 3 до 7 сут.

Тестирование ПЭГ в качестве потенциального краудера, позитивно влияющего на депонирование ВКМ, выявило большую эффективность ПЭГ 4000 в концентрации 25 мг/мл (рис. 4б) по сравнению с остальными препаратами ПЭГ различной мол. массы. При таких условиях через 7 сут усиливается наработка

всех исследуемых белков ВКМ – фибронектина, коллагена III и IV типа (рис. 5б). Однако принимая во внимание результаты окраски контрольных эМСК, которые депонировали ВКМ в ростовой среде с 1% FBS в течение 7 сут (рис. 3г), не совсем корректно говорить о сильном стимулирующем эффекте 25 мг/мл ПЭГ 4000: в целом они сопоставимы. В противоположность ПЭГ 4000 (25 мг/мл), культивирование клеток в присутствии ПЭГ 6000 оказывает выраженное негативное влияние на депонирование белков ВКМ

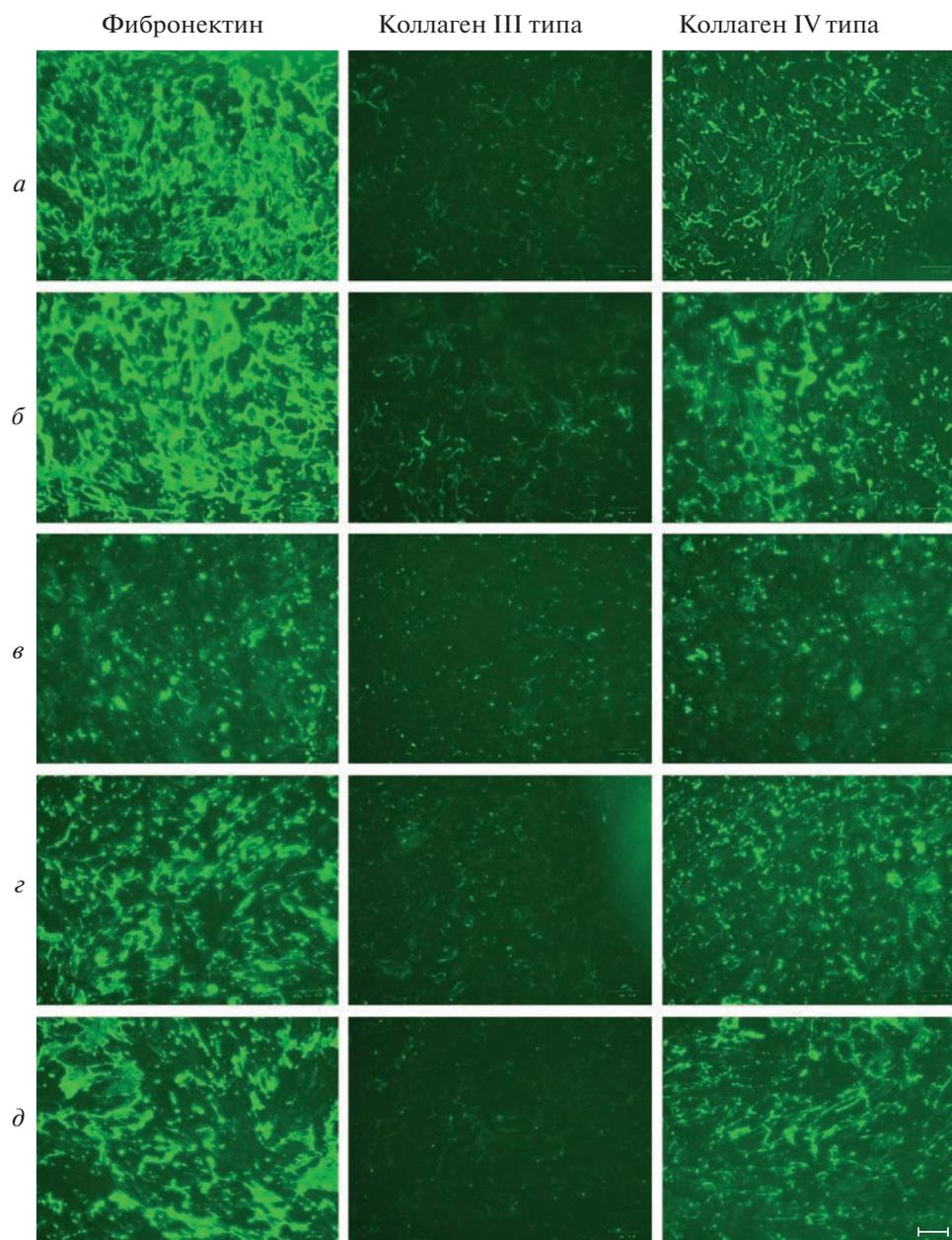


Рис. 3. Влияние фикола 400 на эффективность депонирования белков ВКМ эмСК в условиях нормоксии при культивировании в течение 7 сут. Концентрация фикола 400 в ростовой среде, содержащей 1% сыворотки FBS: *a* – 25, *б* – 50, *в* – 100 мг/мл. *г*, *д* – Среда, содержащая 1 и 10% FBS соответственно (окраска контрольных клеток, типичная и для варианта на рис. 5).

(рис. 4г и рис. 5г). Важно подчеркнуть, что сравнение результатов действия ПЭГ 4 и 6 кДа в разных концентрациях (за исключением 50 мг/мл ПЭГ 4000) вполне релевантно, поскольку значения их FVO одинаковы (6.5%). Как и в случае с фиколом 400, пролонгирование времени культивирования в присутствии ПЭГ вне зависимости от его мол. массы и использованной концентрации приводит к ускорению депонирования белков ВКМ; однако, как и ожидалось, в разной степени (рис. 4, 5).

Понижение содержания сыворотки в ростовой среде до 1% не оказывает заметного стимулирующего эффекта на скорость депонирования ВКМ по сравнению с нормальной средой, содержащей 10% сыворотки: через 7 сут наблюдали практически идентичную окраску фибронектина, коллагена III и IV типа (рис. 3г, д).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о потенциале фикола 400 как ММК для оптимизации депонирования компонентов ВКМ

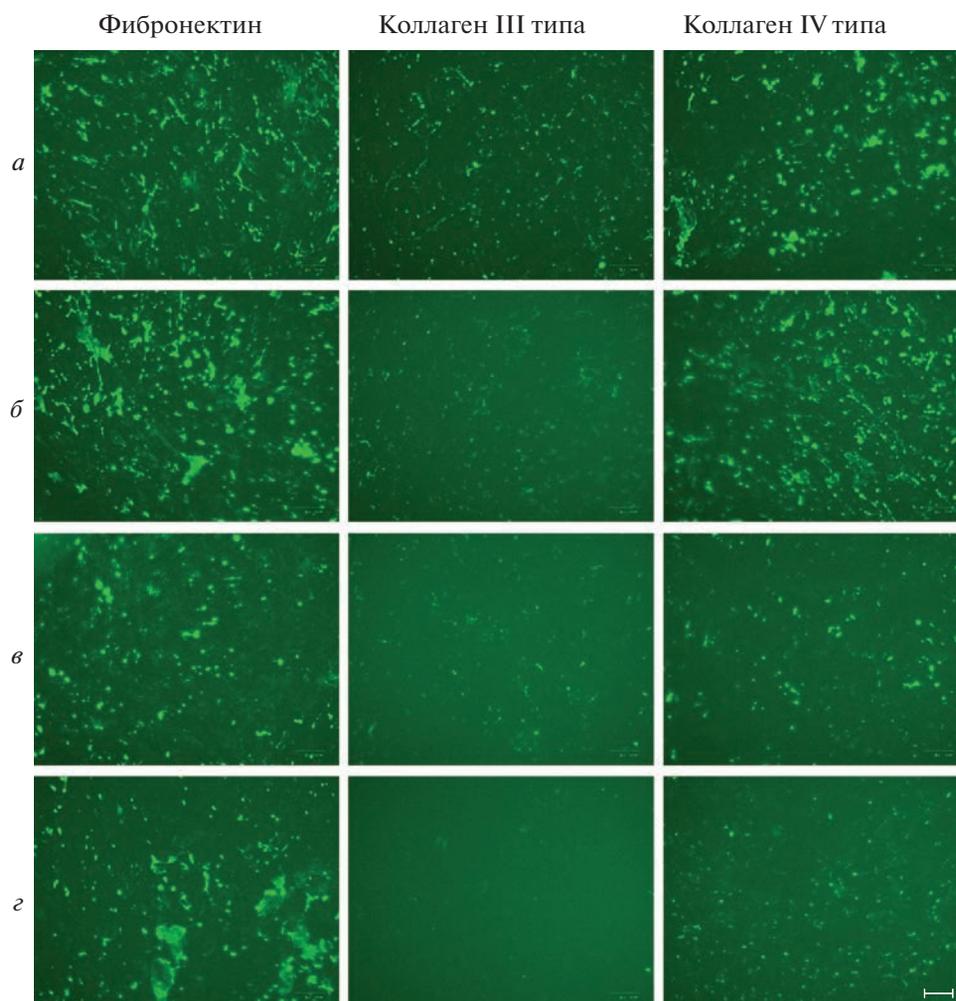


Рис. 4. Нарботка белков ВКМ при культивировании эМСК в течение 3 сут в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) разной мол. массы в ростовой среде, содержащей 1% FBS, в условиях нормоксии. *a* – ПЭГ 2 кДа, 40 мг/мл; *б* – ПЭГ 4 кДа, 25 мг/мл, *в* – ПЭГ 4 кДа, 50 мг/мл, *г* – ПЭГ 6 кДа, 17.5 мг/мл.

эМСК; в то же время применение ПЭГ для этой цели представляется бесперспективным.

Влияние фикола 400 на эффективность депонирования белков ВКМ эМСК в условиях гипоксии. Чтобы выяснить потенциальную роль гипоксии в депонировании белков ВКМ по сравнению с нормальными условиями культивирования (нормоксией) в присутствии ММК, использовали фикола 400 в концентрации 50 мг/мл как наиболее перспективный краудинг-агент. При культивировании эМСК в условиях гипоксии обнаружили, что добавление фикола 400 в стандартную ростовую среду (10% FBS) приводило к заметному нарушению целостности 7-суточного матрикса как в отношении фибронектина, так и коллагена IV типа (рис. 6б), причем эта тенденция становилась более выраженной через 14 сут (рис. 7з). Однако культивирование клеток в условиях гипоксии в среде, содержащей 1% FBS и фикола 400, оказало прямо противоположный эффект: ВКМ обладал более развитой и целостной структурой (рис. 7б)

по сравнению с ВКМ, который продуцировали клетки в ростовой среде с 1% FBS (рис. 7а). Таким образом, сочетание трех факторов – гипоксии, низкого содержания сыворотки и краудера – оказало сильное пролонгированное действие на депонирование фибронектина и коллагена IV типа и в меньшей степени – коллагена III типа. Ранее в ряде работ отмечали эффективность совмещения гипоксических условий и макромолекулярного краудинга для оптимального депонирования компонентов ВКМ в культуре МСК (Cigognini et al., 2016) и фибробластов (Satyam et al., 2016; Kumar et al., 2018). Аналогично, использование ростовой среды с пониженным содержанием сыворотки в присутствии краудинг-агентов приводило к ускорению продукции белков ВКМ фибробластами различной природы (Kumar et al., 2015a, 2015b).

При сравнении 7-суточного ВКМ, продуцированного клетками в среде с 10% FBS в условиях нормоксии (рис. 3д) и гипоксии (рис. 6а), становится

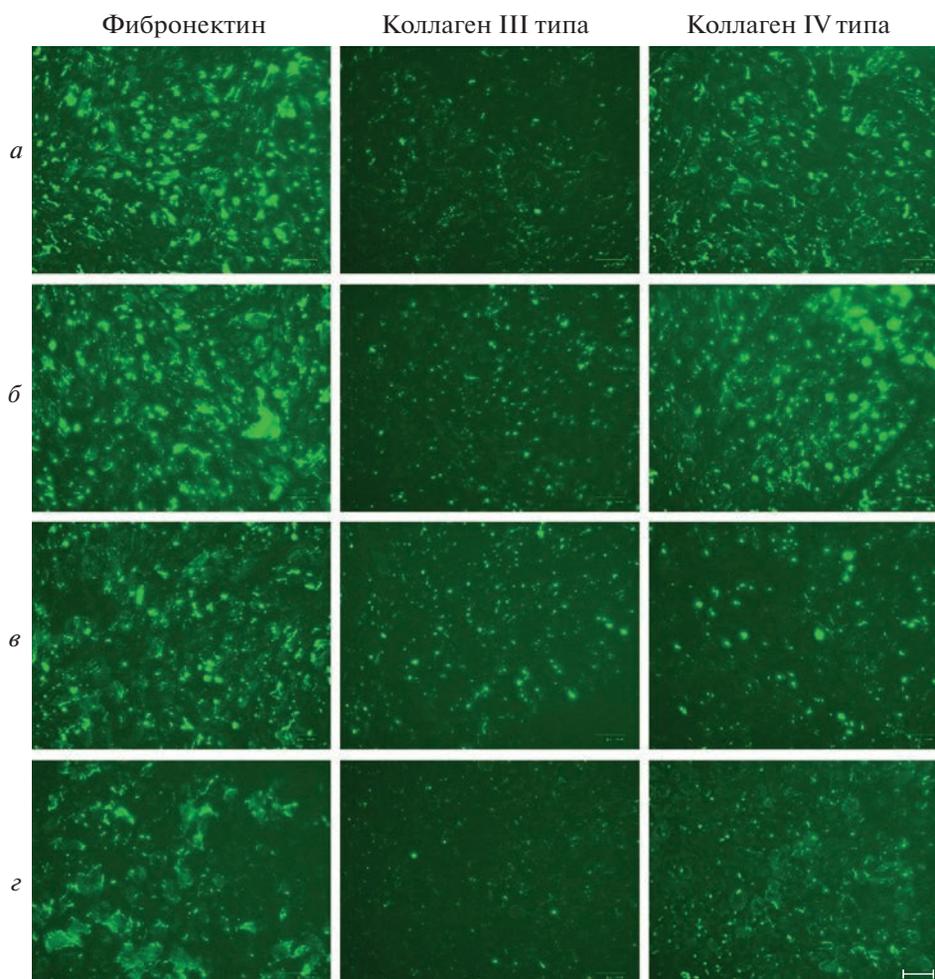


Рис. 5. Нарботка белков ВКМ при культивировании эМСК в течение 7 сут в присутствии ПЭГ в ростовой среде с 1% FBS в условиях нормоксии. *а* – ПЭГ 2 кДа, 40 мг/мл; *б* – ПЭГ 4 кДа, 25 мг/мл, *в* – ПЭГ 4 кДа, 50 мг/мл, *г* – ПЭГ 6 кДа, 17.5 мг/мл.

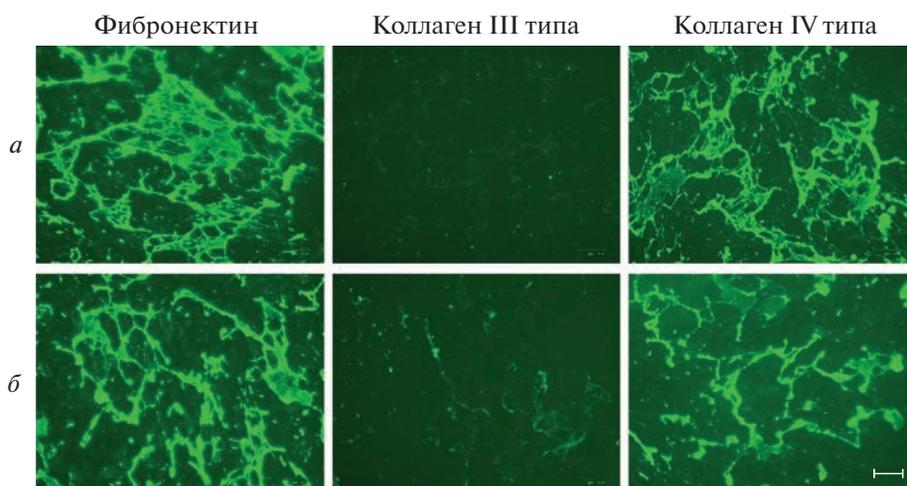


Рис. 6. Влияние фикола 400 в концентрации 50 мг/мл на эффективность депонирования белков ВКМ при культивировании эМСК в течение 7 сут в условиях гипоксии (3% O₂). *а*, *б* – содержание FBS в ростовой среде 1 и 10% соответственно.

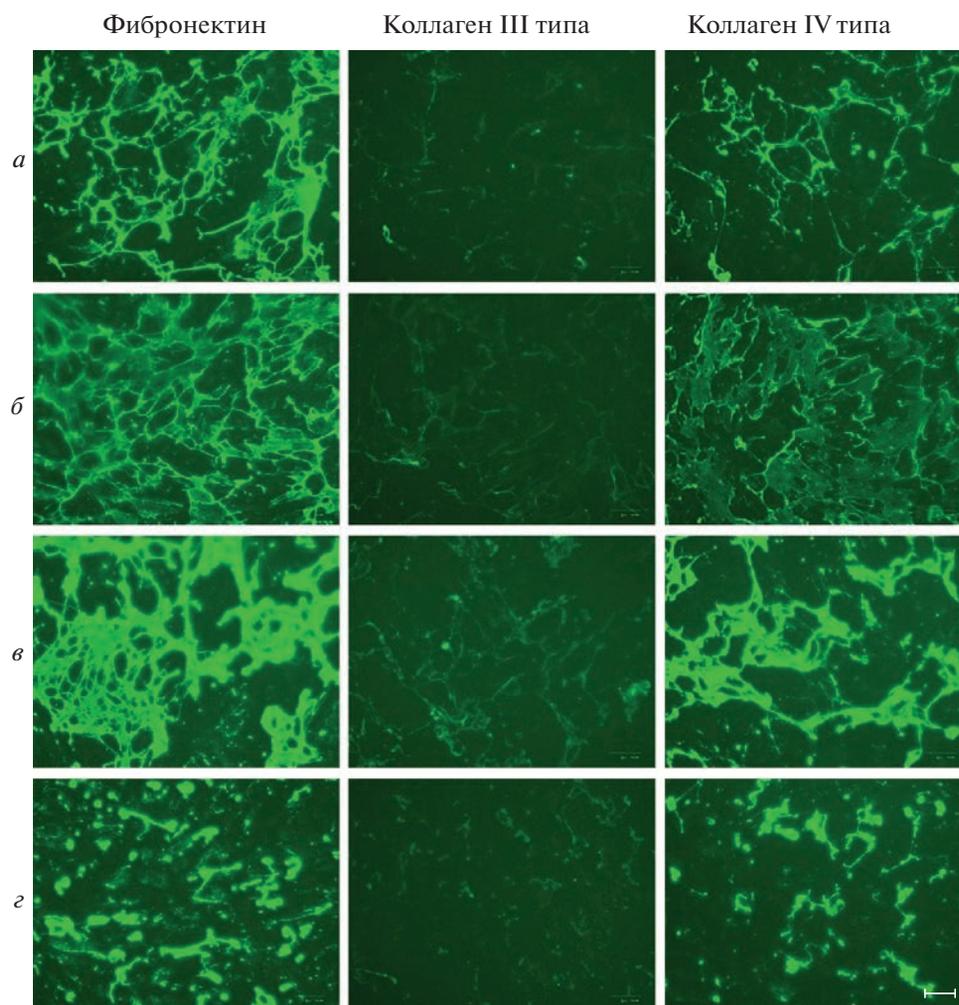


Рис. 7. Влияние фикола 400 в концентрации 50 мг/мл (*б, г*) на эффективность депонирования белков ВКМ при культивировании ЭМСК в течение 14 сут в условиях гипоксии (3% O₂). *a* – 1% FBS в среде без фикола, *б* – 1% FBS, присутствие фикола; *в* – 10% FBS в среде без фикола, *г* – 10% FBS, присутствие фикола.

очевидной стимулирующей роль гипоксии в производстве ВКМ в контексте ускорения депонирования фибронектина и коллагена IV типа, а также образования более разветвленной и целостной сети этих белков. Кроме того, в гипоксических условиях через 14 сут наблюдали более выраженное образование фибриллярной сети коллагена III (рис. 7*в*). В совокупности, наши данные подтверждают, что применение гипоксических условий является перспективным подходом для оптимизации производства ВКМ культивируемыми МСК (Cigognini et al., 2016; Du et al., 2017).

Как было показано, комбинированное действие фикола 400 и фикола 70 вызывает ускорение депонирования ключевых белков ВКМ: коллагена I в случае культивируемых дермальных фибробластов (Gaspar et al., 2019), а также фибронектина, коллагена I и IV типа в случае МСК костного мозга (Zeiger et al., 2012; Rashid et al., 2014; Prewitz et al., 2015). Сведения о самостоятельных эффектах фикола 400 в ка-

честве ММК немногочисленны (Satyam et al., 2014; Gaspar et al., 2019); кроме того, прежде не исследовали способность этого краудера стимулировать наработку ВКМ культивируемыми ЭМСК. Мы установили, что в нормальных условиях культивирования ЭМСК пролонгированное действие фикола 400 приводит к ускорению продукции фибронектина и коллагена III и IV типа, тогда как при гипоксии этот эффект значительно усиливается, но только при условии пониженного содержания сыворотки в ростовой среде клеток.

В представленной работе мы продемонстрировали влияние макромолекулярных краудеров фикола 400 и ПЭГ различной мол. массы на депонирование ВКМ ЭМСК в условиях нормоксии и гипоксии. На основе полученных данных можно заключить, что фикола 400 эффективен как краудер для ускорения продукции ключевых компонентов матрикса ЭМСК – фибронектина и коллагена IV типа, в меньшей степени коллагена III типа. При сравнении нормокси-

ческих (20% O₂) и гипоксических (3% O₂) условий культивирования показано, что клетки продуцируют ВКМ с более развитой структурой при пониженной концентрации кислорода. Отметим, что в условиях гипоксии фиколл 400 способствует депонированию ВКМ только при низком содержании сыворотки в ростовой среде. В контексте ЭМСК полученные результаты обладают новизной и расширяют представления о способах оптимизации депонирования ВКМ.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовали оборудование ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, поддержанного грантом Минобрнауки РФ (Соглашение № 075-15-2021-683).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах животные и люди не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Домнина А.П., Фридлянская И.И., Земелько В.И., Пуговкина Н.А., Ковалева З.В., Зенин В.В., Гринчук Т.М., Никольский Н.Н. 2013. Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека при длительном культивировании не подвергаются спонтанной трансформации. Цитология. Т. 55. № 1. С. 69. (Domnina A.P., Fridliandskaia I.I., Zemelko V.I., Pugovkina N.A., Kovalева Z.V., Zenin V.V., Grinchuk T.M., Nikolsky N.N. 2013. Mesenchymal stem cells from human endometrium do not undergo spontaneous transformation during long-term cultivation. Cell Tiss. Biol. V. 7. P. 221.)
- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. № 12. С. 919. (Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artzibasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Bichevaia N.K., Korsak V.S., Nikolsky N.N. 2012. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. Cell Tiss. Biol. V. 6. № 1. P. 1.)
- 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. Tsitologiya. V. 62. № 10. P. 699.) <https://doi.org/10.31857/S004137712010003X>
- Ahmed M., Ffrench-Constant C. 2016. Extracellular matrix regulation of stem cell behavior. Curr. Stem Cell Rep. V. 2. P. 197. <https://doi.org/10.1007/s40778-016-0056-2>
- Ang X.M., Lee M.H.C., Blocki A., Chen C., Ong L.L.S., Asada H.H., Sheppard A., Raghunath M. 2014. Macromolecular crowding amplifies adipogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by enhancing the pro-adipogenic microenvironment. Tiss. Eng. Part A. V. 20. P. 966. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0337>
- 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 (8): 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: 602009. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.602009>
- Bateman J.F., Cole W.G., Pillow J.J., Ramshaw J.A.M. 1986. Induction of procollagen processing in fibroblast cultures by neutral polymers. J. Biol. Chem. V. 261. P. 4198. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)35645-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)35645-4)
- Buravkova L.B., Andreeva E.R., Gogvadze V., Zhivotovsky B. 2014. Mesenchymal stem cells and hypoxia: where are we? Mitochondrion. V. 19. P. 105. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.07.005>
- Chen B., Wang B., Zhang W.J., Zhou G., Cao Y., Liu W. 2013. Macromolecular crowding effect on cartilaginous matrix production: a comparison of two-dimensional and three-dimensional models. Tiss. Engineering. V. 19. P. 586. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0408>
- Chen C., Loe F., Blocki A., Peng Y., Raghunath M. 2011. Applying macromolecular crowding to enhance extracellular matrix deposition and its remodeling *in vitro* for tissue engineering and cell-based therapies. Adv. Drug Delivery Rev. V. 63. P. 277. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.003>
- Choi K.M., Seo Y.K., Yoon H.H., Song K.Y., Kwon S.Y., Lee H.S., Park J.K. 2008. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. J. Biosci. Bioeng. V. 105. P. 586. <https://doi.org/10.1263/jbb.105.586>
- Cigognini D., Gaspar D., Kumar P., Satyam A., Alagesan S., Sanz-Nogués C., Griffin M., O'brien T., Pandit A., Zeugolis D.I. 2016. Macromolecular crowding meets oxygen tension in human mesenchymal stem cell culture – a step closer to physiologically relevant *in vitro* organogenesis. Sci. Rep. V. 6. P. 30746. <https://doi.org/10.1038/srep30746>
- Clause K.C., Barker T.H. 2013. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. Curr. Opin. Biotechnol. V. 24. P. 830. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.011>
- Cunningham C.J., Redondo-Castro E., Allan S.M. 2018. The therapeutic potential of the mesenchymal stem cell secretome in ischaemic stroke. J. Cerebral Blood Flow Metab. V. 38. P. 1276. <https://doi.org/10.1177/0271678X18776802>
- Discher D.E., Mooney D.J., Zandstra P.W. 2009. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. Science. V. 324. P. 1673. <https://doi.org/10.1126/science.1171643>

- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper–Cortenbach I., Marini F., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.M. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. V. 8. P. 315. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dong X., Al-Jumaily A., Escobar I.C. 2018. Investigation of the use of a bio-derived solvent for non-solvent-induced phase separation (NIPS) fabrication of polysulfone. *Membranes*. V. 8. P. 23. <https://doi.org/10.3390/membranes8020023>
- Du H.-C., Jiang L., Geng W.-X., Li J., Zhang R., Dang J.-G., Shu M.-G., Li L.-W. 2017. Growth factor-reinforced ECM fabricated from chemically hypoxic MSC sheet with improved *in vivo* wound repair activity. *BioMed Res. Int.* V. 2017. 2017: 2578017. <https://doi.org/10.1155/2017/2578017>
- Gaspar D., Fuller K.P., Zeugolis D.I. 2019. Polydispersity and negative charge are key modulators of extracellular matrix deposition under macromolecular crowding conditions. *Acta Biomaterialia*. V. 88. P. 197. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.050>
- Hoshiba T., Lu H., Kawazoe N., Chen G. 2010. Decellularized matrices for tissue engineering. *Expert Opin Biol. Ther.* V. 10. P. 1717. <https://doi.org/10.1517/14712598.2010.534079>
- Hynes R.O. 2009. Extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. V. 326. P. 1216. <https://doi.org/10.1126/science.1176009>
- Konala V.B., Mamidi M.K., Bhonde R., Das A.K., Pochampally R., Pal R. 2016. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*. V. 18. P. 13. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.008>
- Kumar P., Satyam A., Fan X., Collin E., Rochev Y., Rodriguez B.J., Gorelov A., Dillon S., Joshi L., Raghunath M., Pandit A., Zeugolis D.I. 2015a. Macromolecularly crowded *in vitro* micro-environments accelerate the production of extracellular matrix-rich supramolecular assemblies. *Sci. Rep.* V. 5. P. 8729. <https://doi.org/10.1038/srep08729>
- Kumar P., Satyam A., Fan X., Rochev Y., Rodriguez B., Gorelov A., Joshi L., Raghunath M., Pandit A., Zeugolis D.I. 2015b. Accelerated development of supramolecular corneal stromal-like assemblies from corneal fibroblasts in the presence of macromolecular crowders. *Tiss. Eng. C Methods*. V. 21. P. 660. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2014.0387>
- Kumar P., Satyam A., Cigognini D., Pandit A., Zeugolis D.I. 2018. Low oxygen tension and macromolecular crowding accelerate extracellular matrix deposition in human corneal fibroblast culture. *J. Tiss. Eng. Regen. Med.* V. 12. P. 6. <https://doi.org/10.1002/term.2283>
- Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Uversky V.N. 2014. What macromolecular crowding can do to a protein. *Int. J. Mol. Sci.* V. 15. P. 23090. <https://doi.org/10.3390/ijms151223090>
- Lareu R.R., Subramhanya K.H., Peng Y., Benny P., Chen C., Wang Z., Rajagopalan R., Raghunath M. 2007. Collagen matrix deposition is dramatically enhanced *in vitro* when crowded with charged macromolecules: the biological relevance of the excluded volume effect. *FEBS Letters*. V. 581. P. 2709. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.020>
- 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>
- Massaro M.S., Palek R., Rosendorf J., Cervenkova L., Liska V., Moulisova V. 2021. Decellularized xenogeneic scaffolds in transplantation and tissue engineering: Immunogenicity versus positive cell stimulation. *Mater. Sci. Eng. C*. V. 127. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112203>
- Maumus M., Jorgensen C., Noël D. 2013. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes. *Biochimie*. V. 95. P. 2229. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.04.017>
- Naba A., Clauser K.R., Hoersch S., Liu H., Carr S.A., Hynes R.O. 2012. The matrisome: *in silico* definition and *in vivo* characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol. and Cell. Proteomics*. V. 11: M111.014647. <https://doi.org/10.1074/MCP.M111.014647>
- Nellinger S., Mrsic 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>
- Nyambat B., Manga Y.B., Chen C.H., Gankhuyag U., Pratomo Wp A., Kumar S.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>
- Pinnell S.R. 1985. Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: a review. *Yale J. Boil. Med.* V. 58. P. 553.
- Prewitz M.C., Stissel A., Friedrichs J., Traber N., Vogler S., Bornhauser M., Werner C. 2015. Extracellular matrix deposition of bone marrow stroma hanced by macromolecular crowding. *Biomaterials*. V. 73. P. 60. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.09.014>
- Rao Pattabhi S., Martinez J.S., Keller Iii T.C.S. 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>
- Rolandsson Enes S., Krasnodembskaya A.D., English K., dos Santos C.C., Weiss D.J. 2021. Research progress on strategies that can enhance the therapeutic benefits of mesenchymal stromal cells in respiratory diseases with a specific focus on acute respiratory distress syndrome and other inflammatory lung diseases. *Front. Pharmacol.* V. 12: 647652. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.647652>
- Rashid R., Lim N., Chee S., Png S., Wohland T., Raghunath M. 2014. Novel use for polyvinylpyrrolidone as a macromolecular crowder for enhanced extracellular matrix deposition and cell proliferation. *Tissue Eng. C Methods*. V. 20.

- P. 994.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2013.0733>
- Rozario T., DeSimone D.W. 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Devel. Biol.* V. 341. P. 126.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026>
- Satyam A., Kumar P., Cigognini D., Pandit A., Zeugolis D.I. 2016. Low, but not too low, oxygen tension and macromolecular crowding accelerate extracellular matrix deposition in human dermal fibroblast culture. *Acta Biomaterialia.* V. 44. P. 221.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.08.008>
- Satyam A., Kumar P., Fan X., Gorelov A., Rochev Y., Joshi L., Peinado H., Lyden D., Thomas B., Rodriguez B., Raghunath M., Pandit A., Zeugolis D. 2014. Macromolecular crowding meets tissue engineering by self-assembly: a paradigm shift in regenerative medicine. *Advanced Materials.* V. 26. P. 3024.
<https://doi.org/10.1002/adma.201304428>
- Schaefer L. 2010. Extracellular matrix molecules: endogenous danger signals as new drug targets in kidney diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* V. 10. P. 185.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.11.007>
- Tsiapalis D., Zeugolis D.I. 2021. It is time to crowd your cell culture media – Physicochemical considerations with biological consequences. *Biomaterials.* V. 275: 120943.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120943>
- Xing H., Lee H., Luo L., Kyriakides T.R. 2020. Extracellular matrix-derived biomaterials in engineering cell function. *Biotechnol. Adv.* V. 42: 107421.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107421>
- Xu S., Liu C., Ji H.L. 2019. Concise review: therapeutic potential of the mesenchymal stem cell derived secretome and extracellular vesicles for radiation-induced lung injury: progress and hypotheses. *Stem Cells Transl. Med.* V. 8. P. 344.
<https://doi.org/10.1002/sctm.18-0038>
- Yang L., Ge L., van Rijn P. 2020. Synergistic effect of cell-derived extracellular matrices and topography on osteogenesis of mesenchymal stem cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* V. 12. P. 25591.
<https://doi.org/10.1021/acsami.0c05012>
- Zeiger A.S., Loe F.C., Li R., Raghunath M., Van Vliet K.J. 2012. Macromolecular crowding directs extracellular matrix organization and mesenchymal stem cell behavior. *PLoS One.* V. 7 P. e37904.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037904>
- Zhu J., Zheng J., Liu C., Zhang S. 2016. Ionic complexing induced fabrication of highly permeable and selective polyacrylic acid complexed poly (arylene ether sulfone) nanofiltration membranes for water purification. *J. Membr. Sci.* V. 520. P. 130.
<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2016.07.059>

An Impact of Hypoxia and Macromolecular Crowders on Extracellular Matrix Deposition by Human Endometrial Mesenchymal Stromal Cells

I. E. Perevoznikov^{a, *}, R. E. Ushakov^a, and E. B. Burova^a

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

**e-mail: ilyaperevoznikov@gmail.com*

The last decades are characterized by intensive development of extracellular matrix (ECM) biology. ECM binds cells in an integral tissue and controls the cell functions – from proliferation and differentiation to migration and apoptosis. Bioactive properties of ECM provide the wide perspectives of using in bioengineering and regenerative medicine. In this context, the ECM production by decellularization of organs, tissues or cell cultures is a key technology. To date, a problem of a rapid and large-scale production of bioactive ECM by cultured cells remains very relevant. Optimization of the ECM deposition conditions by human endometrial mesenchymal stromal cells (MESCs) had not been studied yet. Here, we investigated an impact of macromolecular compounds (crowders) – ficoll and PEG on efficiency of crucial ECM proteins deposition depending on both concentration and molecular weight of crowders under normoxia and hypoxia. According to immunofluorescence analysis, among all studied crowders, ficoll 400 had a potent effect on the production of ECM core proteins – fibronectin, type IV collagen and, in a lower rate, type III collagen. The MESCs incubation under hypoxia promoted the formation of a properly organized ECM structure as well as increase in efficiency of ECM protein deposition. Of note, in these conditions ficoll 400 accelerated the ECM production only in a low serum medium. Together, combination of ficoll 400, low serum medium and hypoxia provides the optimal conditions for ECM synthesis. The present work demonstrates for the first time the phenomenon of macromolecular crowding in the context of improving the conditions for deposition and organization of ECM by MESCs.

Keywords: extracellular matrix, human endometrial mesenchymal stromal cells, hypoxia, macromolecular crowders

УДК 576.08

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ТРЕХМЕРНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ (СТРОМАЛЬНЫХ) КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАТРИЦЫ ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

© 2023 г. И. К. Кунеев¹, Ю. С. Иванова¹, Ю. А. Нащекина¹, Е. К. Патронова¹,
А. В. Соколова¹, А. П. Домнина^{1, *}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: aldomnina@mail.ru

Поступила в редакцию 29.10.22 г.

После доработки 19.12.2022 г.

Принята к публикации 20.12.2022 г.

Разработка методов культивирования клеток в трехмерных системах важна и необходима для развития актуальных направлений современной клеточной биологии. При культивировании в системе 3D воспроизводится тканеспецифическая архитектура, точнее воссоздается реальная микросреда и поведение клеток *in vivo*. Мезенхимные стволовые/стромальные клетки человека (МСК) обычно выделяют и культивируют как монослойную 2D-культуру. В данной работе мы разработали метод трехмерного культивирования и тканеспецифической децидуальной дифференцировки МСК, выделенных из ткани эндометрия человека, с использованием матрицы, полученной из децеллюляризованного яблока. Матрицы из децеллюляризованного яблока обладают достаточной механической прочностью, биосовместимы, доступны, просты в использовании и имеют широкие возможности для модификации поверхности. Данная система культивирования клеток подходит как для их изучения методом конфокальной микроскопии, так и для исследований с помощью проточной цитометрии. Разработанная нами модель может стать основой для создания новых клеточных продуктов и тканеинженерных конструкций для нужд регенеративной биомедицины.

Ключевые слова: 3D-культивирование, децеллюляризованные растения, эндометриальные мезенхимные стволовые (стромальные) клетки, децидуальная дифференцировка

DOI: 10.31857/S0041377123020037, **EDN:** LWOREJ

Мезенхимные стволовые (стромальные) клетки человека (МСК) — один из наиболее часто используемых типов клеток при разработке новых технологий регенеративной медицины. Традиционно МСК выделяют и культивируют как монослойную двумерную (2D) культуру, однако в настоящее время активно исследуются возможности трехмерного (3D) культивирования МСК (Hauck, 2011; Domnina et al., 2018; Langhans, 2018; Jensen, Teng, 2020). Многими исследователями вариант культивирования МСК в 3D-системах предлагается как способ повышения их терапевтических свойств (Domnina et al., 2018, 2020; Vou-Ghannam et al., 2021; Kouroupis, Correa, 2021). Кроме того, культивирование в 3D-геометрии открывает возможности для воспроизведения в системе *in vitro* архитектуры ткани, моделирования тканеспецифического микроокружения и поведения клеток (Jauković et al., 2020; Jensen, Teng, 2020; Vou-

Ghannam et al., 2021; Kouroupis, Correa, 2021). Поэтому разработка методов культивирования клеток в 3D-системах является актуальным направлением современной клеточной биологии, стимулирующим создание новых клеточных продуктов и тканеинженерных конструкций.

Основные приемы культивирования в 3D-системах подразделяются на способы с использованием каркаса для прикрепления клеток (скаффолда) и без него (клеточные пласты, сфероиды) (Hauck, 2011; Chen et al., 2015; Bartosh, Ylostalo, 2019). Матрицы для культивирования клеток могут быть созданы как на основе синтетических и природных полимеров (коллагена, хитозана, полилактида, полиглицеролсебаката и др.), так и путем децеллюляризации органов и тканей (Guruswamy Damodaran, Vermette, 2018; Baruffaldi et al., 2021; Hu et al., 2022).

Для успешного культивирования клеток человека на трехмерной матрице при ее создании необходимо учесть ряд требований к исходному материалу. Он должен обладать достаточной механической прочностью, физико-химической устойчивостью, быть

Принятые сокращения: эМСК — эндометриальные мезенхимные стволовые (стромальные) клетки; EdU — 5-этинил-2'-дезоксидеоксиуридин; PBS — фосфатно-солевой буферный раствор; PI — йодистый пропидий.

биосовместимым и биологически инертным. Кроме того, целесообразно применять легкодоступные и недорогие материалы. Одним из таковых является биогенная целлюлоза. В частности, недавно в качестве матриц для 3D-культивирования было предложено использовать целлюлозные каркасы из децеллюляризованных растений (Modulevsky et al., 2014, 2016; Lee et al., 2019; Bilirgen et al., 2021).

Целлюлоза – компонент клеточной стенки растений и один из природных полимеров, удовлетворяющий всем перечисленным критериям. Этот материал дает возможность создавать матрицы разнообразной формы и архитектуры, при этом поверхность матриц можно химически модифицировать (Phan et al., 2020; Bilirgen et al., 2021). Еще одним важным свойством целлюлозных матриц является их устойчивость к диссоциации в водных растворах, что позволяет проводить длительное наблюдение за населяющими их клетками. Одним из широко используемых источников целлюлозного материала для создания трехмерных скаффолдов является целлюлоза, продуцируемая бактериями (Svensson et al., 2005; Gorgieva, Trček 2019; Cherng et al., 2021).

МСК могут быть выделены из различных тканевых источников, одними из наиболее доступных являются МСК, получаемые из менструальной крови. Эндометрий – это внутренняя оболочка матки, претерпевающая более 400 циклов регенерации и восстановления в течение репродуктивных лет жизни женщины. Каждый месяц 4–10 мм эндометрия отслаивается в течение пролиферативной фазы менструального цикла (Gargett, Masuda, 2010). Десквамированный (отшелушившийся) эндометрий, содержащийся в менструальной крови, оказался самым неинвазивным источником МСК человека (эМСК) (Meng et al., 2007; Мусина и др., 2008; Patel et al., 2008, Земелько и др., 2011). эМСК обладают всеми свойствами МСК из других тканевых источников – экспрессией характерных поверхностных маркеров, способностью к направленной остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировке, активной пролиферации, адгезивностью к пластику (Meng et al., 2007; Мусина и др., 2008; Patel et al., 2008, Земелько и др., 2011). Кроме этого, эМСК сохраняют тканеспецифическую функциональность. Основной функцией эндометрия является поддержание беременности на всех этапах. Для поддержания беременности на ранних этапах, в ответ на воздействие индукторов, клетки эндометрия претерпевают ряд морфологических и функциональных изменений, называемых децидуальной трансформацией. эМСК в культуре тоже сохраняют способность к дифференцировке в децидуальные клетки, которые характеризуются эпителиоподобной формой и увеличением секреции пролактина (Домнина и др., 2015).

В настоящей работе мы разработали технологию трехмерного культивирования эМСК с использова-

нием матрицы из целлюлозы, полученной путем децеллюляризации яблока.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Подготовка матриц из целлюлозы. Целлюлозные матрицы для культивирования клеток изготавливали из мезокарпия (мякоти) яблок. Для этого был сконструирован прибор, состоящий из ломтерезки (слайсера) и ножа, позволяющий придавать заготовке из яблока удобную для дальнейшей работы форму (рис. 1а). С использованием этого оборудования изготавливали заготовки из яблочного мезокарпия с размером $10 \times 10 \times 2$ мм, позволяющие обеспечить матрице достаточную прочность для удобной работы с ней (рис. 1б). Очистку целлюлозного каркаса от клеточного содержимого (децеллюляризацию) производили путем обработки заготовок 0.5%-ным раствором натрия додецилсульфата (SDS) на протяжении 48 ч в условиях покачивания пробирки с заготовками на шейкере (скорость вращения 180 об./мин). Затем производили очистку полученных матриц от детергента. С этой целью матрицы помещали в фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) на 24 ч с покачиванием заготовок на шейкере (180 об./мин). После этого стерилизовали матрицы обработкой 70%-ным раствором этилового спирта в течение 1 ч с тем же покачиванием заготовок на шейкере. Отмывку целлюлозных матриц от этанола производили интенсивным пипетированием в 2 мл PBS с 12-кратной заменой буфера. После 9-ого цикла пипетирования матрицы переносили в новую стерильную пробирку, в которой по окончании отмывки их хранили в стерильном PBS до коллагенизации (не более 2 нед.). На рис. 1б представлены матрицы после каждого этапа обработки.

Для улучшения адгезивных свойств поверхности для прикрепления клеток, матрицы обрабатывали коллагеном I типа, важнейшим компонентом внеклеточного матрикса эМСК, с использованием методики лиофильной сушки. Матрицы из целлюлозы, покрытые раствором коллагена I типа (в концентрации 2 мг/мл) в присутствии 0.1%-ной уксусной кислоты, инкубировали при температуре -20°C в течение 24 ч. Затем на протяжении 8 ч производили лиофильную сушку матриц при температуре -50°C и давлении 0.1 мм рт. ст. Далее матрицы стерилизовали озонированием и промывали стерильным раствором PBS в течение 48 ч на шейкере (с частотой 180 об./мин), после чего помещали в новый стерильный PBS и хранили до применения (не более 1 мес.).

Для оценки геометрии строения полученных матриц с помощью флуоресцентной микроскопии использовали окрашивание красителем Конго красный (Congo Red; Sigma-Aldrich, США). Для этого исследуемые образцы инкубировали 10 мин при комнатной температуре в водном 0.2%-ном растворе Конго красного на шейкере (160 об./мин), после чего трехкратно промывали раствором PBS.

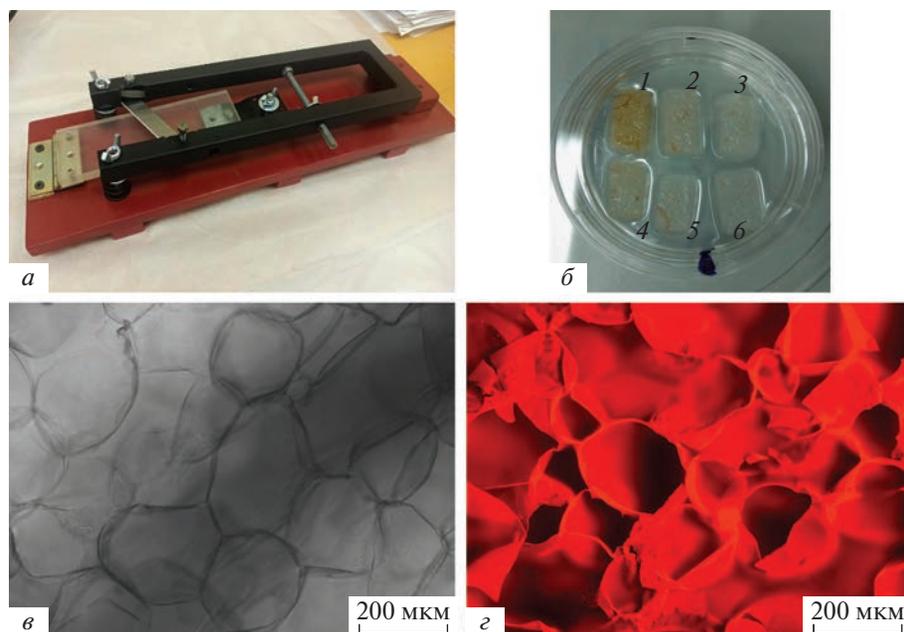


Рис. 1. Подготовка и визуализация целлюлозной матрицы из яблока. *a* – Ломтерезка (слайсер) для нарезки заготовок для матриц из целлюлозы. *б* – Целлюлозные матрицы на разных стадиях децеллюляризации (ДЦ): 1 – матрица из яблока до ДЦ, 2, 3 – матрица после обработки 0.5%-ным раствором SDS в течение 24 и 48 ч соответственно; 4, 5 – матрица после обработки 0.1%-ным раствором SDS в течение 24 и 48 ч соответственно; *б* – ДЦ-целлюлозная матрица; *в*, *г* – матрица после ДЦ до и после окрашивания Конго красным соответственно.

Подготовка эМСК для культивирования в трехмерной системе. Для заселения в трехмерную матрицу использовали эМСК из Коллекции культур клеток позвоночных (ЦКП Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). эМСК были получены из фрагментов эндометрия, содержащихся в менструальной крови (Земелько и др., 2011). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% коровьей эмбриональной сыворотки, 1% глутамина и 1% смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (Gibco, США), и пересевали с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и ЭДТА (Invitrogen, США) в соотношении 1 : 3.

Для прижизненной визуализации эМСК в составе матрицы с помощью флуоресцентной микроскопии применяли полученную нами ранее с помощью лентивирусной трансдукции линию эМСК, способную к экспрессии в цитоплазму YFP-содержащего белка NuPer – биосенсора H_2O_2 (Lyublinskaya et al., 2017). Флуоресценция NuPer в цитоплазме позволяла оценить морфологию клеток, их жизнеспособность и метаболическую активность.

Для отдельных экспериментов ядра клеток дополнительно окрашивали красителем Hoechst 33342, интеркалирующим в ДНК живых клеток, согласно протоколу производителя (Sigma-Aldrich, США).

Заселение целлюлозных матриц эМСК. Для заселения в матрицы эМСК по достижении ими моноклона на пассажах 6–10 открепляли от подложки с по-

мощью 0.05%-ного раствора трипсина и ЭДТА, после чего центрифугировали при 1500 *g* в течение 5 мин. эМСК (2×10^6) ресуспензировали в 60 мкл ростовой среды. Заселение модифицированных коллагеном матриц проводили путем инъекции суспензии клеток в матрицу с применением катетера “бабочка” с инфузионной иглой 25G с последующим дополнительным нанесением суспензии клеток на поверхность матрицы (капельно). Затем заселенные матрицы в чашках Петри 3.5 см² помещали в инкубатор при 37°C и 5% CO₂ на 45 мин, не добавляя ростовую среду, для обеспечения частичной адгезии клеток к матрице. После этого в чашки Петри добавляли по 2 мл свежей ростовой среды.

Оценка жизнеспособности и пролиферативной активности эМСК в составе целлюлозной матрицы методом проточной цитометрии. Единичную клеточную суспензию получали путем инкубации заселенной матрицы при температуре 37°C в растворе TrypLE™ Express (Fisher Scientific, США) в течение 15 мин с последующей промывкой матрицы ростовой средой под давлением с использованием шприца 2 мл без иглы. Клетки ресуспензировали (1 млн/мл) в растворе PBS, содержащем 5% эмбриональной коровьей сыворотки. Для мечения ядер мертвых клеток применяли йодистый пропидий (PI) (Sigma, США) в конечной концентрации 50 мкг/мл. Суспензию эМСК, извлеченных из целлюлозной матрицы, окрашивали PI в течение 5 мин и далее оценивали жизнеспособ-

ность клеток с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter, США).

Для исследования распределения эМСК по фазам клеточного цикла суспензию эМСК, извлеченных из целлюлозной матрицы, пермеабелизовали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 (Sigma-Aldrich, США) и дополнительно окрашивали в течение 5 мин 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI; Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 2 мкг/мл при комнатной температуре. Число клеток в разных фазах клеточного цикла определяли с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter, США).

Оценка жизнеспособности и пролиферативной активности эМСК в составе трехмерной конструкции методом конфокальной микроскопии. Для анализа жизнеспособности эМСК после заселения в матрицу использовали 3 флуоресцентных метки: NuPer (сенсор перекиси водорода), интеркалирующий ядерный краситель Hoechst 33342, а также маркер ядер погибших клеток PI (Sigma, США) в конечной концентрации 50 мкг/мл. NuPer позволяет обнаруживать живые клетки, метаболические пути которых в текущий момент активны. Клетки, окрашенные PI (красные), считали погибшими. Для наблюдений использовали конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Olympus FV3000 (Olympus, США).

Для визуальной оценки пролиферативной активности эМСК в составе целлюлозных матриц использовали коммерческий набор Click-iT™ EdU Cell Proliferation Kit for Imaging (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Через 16 ч после посева клеток в ростовую среду добавлялся аналог тимидина 5-этил-2'-дезоксинуридин (EdU), который встраивается в синтезируемую цепь ДНК в ходе репликации. Через 6 ч клетки фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида и метили Alexa Fluor 488 в форме азиды согласно протоколу производителя. Изображения матриц получали с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus FV3000 (Olympus, США). Для дальнейшей обработки изображений использовали программное обеспечение ImageJ. Флуоресцирующие ядра считали, используя метод треугольников для определения порогового значения флуоресценции (Zack et al., 1977).

Оценка экспрессии поверхностных маркеров эМСК в составе целлюлозной матрицы методом проточной цитометрии. Иммунофенотипический анализ поверхностных CD-маркеров эМСК, извлеченных из матрицы, проводили с помощью проточного цитофлуориметра Cytotflex (Beckman Coulter, США). Клетки ресуспензировали (1 млн/мл) в растворе PBS, содержащем 5% эмбриональной коровьей сыворотки. Для анализа использовали антитела, конъюгированные с фикоэритрином: CD44, CD73, CD90, CD105. Все антитела, включая антитела изотипического контроля, были получены от Beckman Coulter (США) и использованы по протоколу производителя.

Имуноцитохимическое окрашивание на виментин. При проведении имуноцитохимического исследования матриц, заселенных эМСК, все манипуляции проводили при покачивании матриц, помещенных в чашки Петри, на шейкере (100 об./мин). Вначале матрицы с эМСК промывали раствором PBS 4 раза по 5 мин, фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 15 мин и снова промывали раствором PBS 4 раза по 5 мин. Затем клетки пермеабелизовали 1%-ным раствором Тритона X-100 в течение 30 мин, после чего блокировали сайты неспецифического связывания в растворе, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA), 5% нормальной сыворотки козы и 0.3% Тритона X-100 в PBS в течение 1 ч. Инкубацию с первичными моноклональными мышиными антителами к виментину (MA5-11883; Invitrogen, США) в концентрации 2 мкг/мл (в присутствии 1% BSA и 0.3% Тритона X-100 в PBS) проводили в течение ночи при 4°C. Далее осуществляли промывку PBS, содержащим 0.3% Тритона X-100 4 раза по 5 мин и инкубировали со вторичными антителами козы к IgG мыши, конъюгированными с Alexa Fluor™ 594 (A-11005; Invitrogen, США) в разведении 1 : 500 (в присутствии 1% BSA и 0.3% Тритона X-100 в PBS) в течение 40 мин в темноте с последующей промывкой образца PBS 4 раза по 5 мин. Для визуализации ядер клеток последнюю промывку производили в присутствии 0.5 мкг/мл DAPI. После окрашивания матрицы помещали в 4-луночную кювету с дном из боросиликатного стекла и исследовали методом конфокальной микроскопии.

Проведение децидуальной дифференцировки. Целлюлозные матрицы после заселения эМСК, экспрессирующими NuPer, культивировали в течении 10 сут в стандартной ростовой среде. Затем среду заменяли на среду без сыворотки на 24 ч. После этого производили замену среды на среду, содержащую 2% коровьей эмбриональной сыворотки и 1 мМ индуктора децидуальной дифференцировки 8-Br-cAMP (Sigma, США). Замену среды на свежую производили каждые третьи сут культивирования. Контрольные матрицы с эМСК культивировали таким же образом и в той же культуральной среде, но без добавления 8-Br-cAMP. На 7 сут среду из контрольных и дифференцируемых культур отбирали для определения содержания пролактина. Содержание пролактина определяли методом иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием коммерческого набора согласно инструкции производителя (Abcam, Великобритания). Концентрации пролактина, определенные методом иммуноферментного анализа, соотносили с числом клеток. Морфологию клеток определяли с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus FV3000 (Olympus, США).

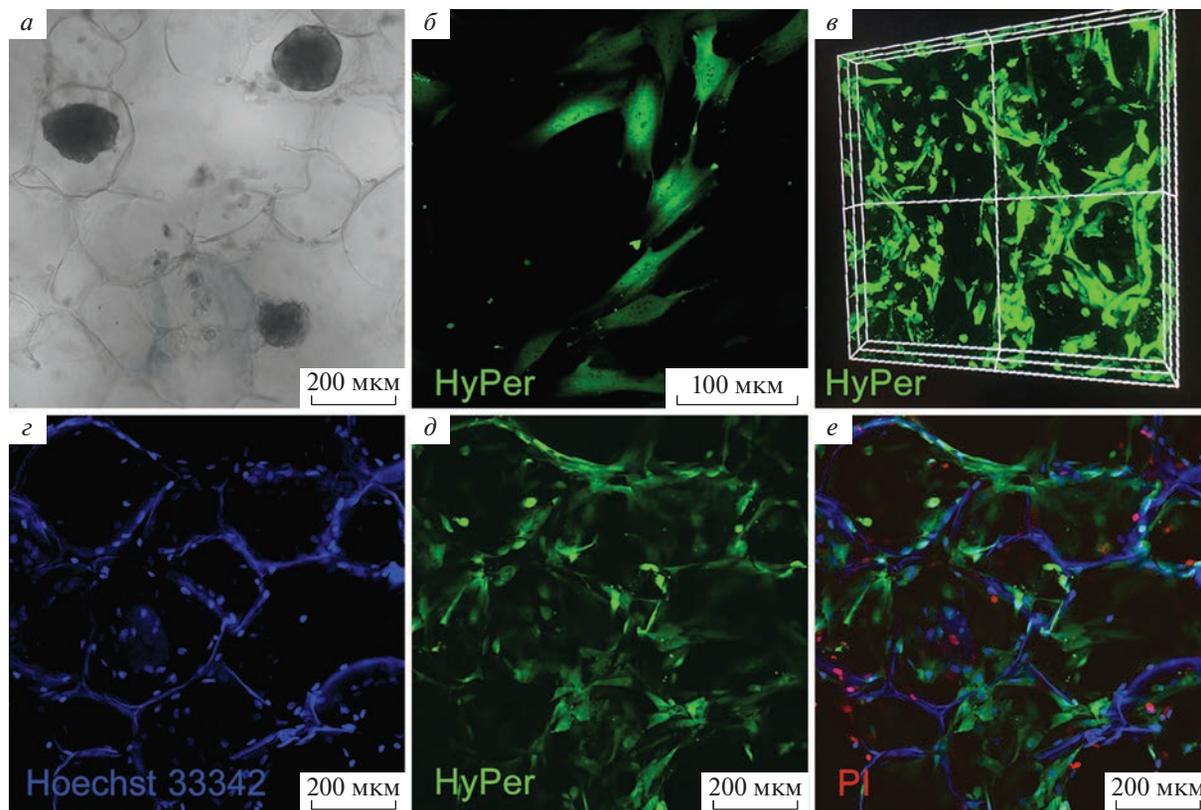


Рис. 2. эмСК после заселения в целлюлозную матрицу. *a* – эмСК, сформировавшие сфероиды в не обработанной коллагеном I типа целлюлозной матрице; *б* – эмСК, экспрессирующие в цитоплазме биосенсор H_2O_2 (HyPer, зеленый цвет), культивируемые в монослое; *в* – эмСК, экспрессирующие в цитоплазме биосенсор H_2O_2 (HyPer, зеленый цвет), культивируемые в целлюлозной матрице, обработанной коллагеном I типа; *г* – эмСК, культивируемые в целлюлозной матрице, обработанной коллагеном I типа, окрашенные до заселения в матрицу ДНК-интеркалирующим красителем Hoechst 33342 (синий); *д* – 3D-модель матрицы с клетками, собранная из серии изображений, полученных последовательно на разном фокусном расстоянии; *е* – эмСК, экспрессирующие HyPer (зеленый), окрашенные Hoechst 33342 (синий) и йодистым пропидием (PI) (красный) для визуализации погибших клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основной целью данной работы стала разработка методики трехмерного культивирования МСК в составе целлюлозных матриц и поиск подходов для анализа клеток в составе 3D-систем культивирования. Матрицы были созданы с использованием адаптированной нами методики Модулевского с коллегами (Modulevsky et al., 2014) и разработанного авторами работы слайсера для получения образцов с заданными параметрами. Полученная матрица обладала ячеистой структурой, морфологические особенности которой были оценены методами световой и флуоресцентной микроскопии с применением Конго красного, окрашивающего β -глюканы (рис. 1в, г). Размер ячеек матрицы составляет 200–300 мкм, ячейки взаимосвязаны и высокопористы, поэтому матрица не создает препятствий для переноса питательных веществ и кислорода, клеточной пролиферации и миграции (Modulevsky et al., 2014). Согласно данным из литературы, матрица из яблока обладает наиболее подходящими для роста клеток механическими свойствами по сравнению с целлю-

лозными скаффолдами, полученным из других растительных объектов (Lee et al., 2019).

Следующим этапом работы была разработка методики заселения целлюлозных матриц МСК. В настоящей работе в качестве клеточного компонента 3D-системы культивирования использовали эмСК человека. Несмотря на высокую способность эмСК к адгезии, при попытках заселения матрицы без дополнительной модификации ее поверхности не удалось достичь эффективного заселения; эмСК не прикреплялись к матрице и образовывали сфероиды внутри целлюлозных ячеек (рис. 2а). Для увеличения клеточной адгезии была разработана методика покрытия целлюлозной матрицы коллагеном I типа с использованием метода лиофильной сушки.

Согласно данным из литературы, для заселения матриц обычно наносят суспензию клеток в небольшом объеме культуральной среды (20–40 мкл) на поверхность матрицы и недолго выдерживают (около 6 ч) в стандартных условиях (37°C , 5% CO_2) для лучшего прикрепления клеток с последующим добавлением культуральной среды до необходимого объема

(Modulevsky et al., 2014; Lee et al., 2019). Для увеличения плотности и равномерности заселения эМСК в матрицы нами предложен комбинированный метод посева эМСК, состоящий из введения клеточной суспензии в толщу матрицы с помощью иглы-катетера и дополнительного нанесения суспензии на поверхность матрицы. Матрицы после заселения одновременно (45 мин) культивировали без добавления культуральной среды для обеспечения частичной адгезии клеток в их составе. Данный инъекционно-капельный метод заселения позволил увеличить эффективность посева до уровня свыше 85% от исходного числа клеток, а также повысить равномерность распределения эМСК в целлюлозной матрице.

Несмотря на масштабность проводимых исследований в области 3D-культивирования клеток, основное внимание уделяется выбору материала скаффолда, служащего основой для роста клеток, улучшению его адгезивных свойств, подбору клеточного материала, совместимого с материалом скаффолда. Однако вопросы, связанные с фундаментальными характеристиками клеток, помещенных в 3D-окружение, остаются в тени. Разработанная нами модель культивирования эМСК в 3D-системе позволяет охарактеризовать клетки.

Для визуализации живых эМСК с помощью конфокальной микроскопии, в экспериментах использовали линии клеток, экспрессирующие генетически кодируемый биосенсор перекиси водорода *HuPer*, который преимущественно применяется для оценки редокс-статуса клеток. Известно, что перекись водорода является одним из регуляторов внутриклеточного сигналинга, поэтому в интактной (без добавления экзогенной перекиси водорода) клетке поддерживается определенный базальный уровень перекиси водорода, активирующий флуоресценцию биосенсора *HuPer*. В настоящей работе мы использовали этот флуоресцентный сигнал для визуализации метаболически активных клеток. Кроме того, перед заселением в матрицу клетки были помечены прижизненным ДНК-интеркалирующим красителем *NucleoStain 33342* (рис. 2б, в). Это позволило оценить плотность заселения матриц, пролиферативную активность, морфологические особенности и жизнеспособность клеток *in situ* без дополнительных манипуляций с помощью флуоресцентной микроскопии. Жизнеспособность оценивали, определяя число PI-положительных клеток (рис. 2е). 3D-модель, собранная из серии изображений, последовательно полученных на разном фокусном расстоянии, отражает равномерное распределение клеток на внутренних поверхностях матрицы по всем трем направлениям (рис. 2д). При оценке морфологии клеток внутри матриц отмечали сохранение веретенообразной формы, характерной для эМСК, культивируемых в виде монослоя (рис. 2е).

Оценку пролиферативной активности эМСК при культивировании в матрицах проводили с использо-

ванием набора *Click-iT™ EdU Cell Proliferation Kit*, позволяющего визуализировать флуоресцентный сигнал меченого красителем аналога тимидина, встраиваемого в ДНК в процессе репликации (рис. 3а, б). Проведенный флуоресцентный анализ выявил популяцию EdU-положительных клеток, что свидетельствует об активной пролиферации эМСК, населяющих скаффолд. Для подтверждения этих наблюдений и изучения динамики заполнения матрицы клетками осуществляли последовательную съемку определенного фрагмента матрицы в различные дни культивирования, участок отмечали механически, и все изображения получали на одинаковой глубине относительно поверхностей матрицы.

Для количественной характеристики свойств эМСК, культивируемых в 3D-условиях, были разработаны протоколы, позволяющие извлекать заселенные в матрицу клетки. Проведенная методом проточной цитометрии оценка жизнеспособности эМСК показала, что на 7 сут культивирования в матрице доля жизнеспособной популяции составляла более 86% (рис. 5а). При более длительном культивировании (до 30 сут) в составе матрицы также определяли значительное количество живых клеток (данные не представлены). При анализе распределения эМСК по фазам клеточного цикла было обнаружено, что в популяции клеток, извлеченных из матрицы, соотношение фаз клеточного цикла было аналогично распределению в пролиферирующих монослойных культурах эМСК (рис. 3б).

Кроме того, с помощью проточной цитометрии была проведена фенотипическая характеристика эМСК, культивируемых в матрицах. Экспрессия ключевых поверхностных маркеров эМСК (рис. 5в) соответствовала стандартным значениям, характерным для МСК (Husein, Thiernemann, 2010).

Для подтверждения сохранения мезенхимных свойств эМСК при культивировании в составе целлюлозных матриц, проводили иммуноцитохимическое окрашивание на наличие в клетках виментина, одного из основных маркеров клеток мезенхимного ряда. В результате было обнаружено характерное окрашивание цитоскелета эМСК в составе матрицы (рис. 6).

Помимо фенотипических признаков, одним из ключевых маркеров МСК является их способность к тканеспецифической дифференцировке (Husein, Thiernemann, 2010). МСК эндометриального происхождения, в первую очередь, присуща способность к дифференцировке в децидуальные клетки (Домнина и др., 2015). Как известно, ткань эндометрия при завершении менструального цикла децидуализируется, что обеспечивает возможность последующей успешной имплантации бластоцисты в ходе эмбрионального развития зародыша (Gargett, Masuda, 2010). Культивирование эМСК внутри целлюлозной матрицы в присутствии индуктора деци-

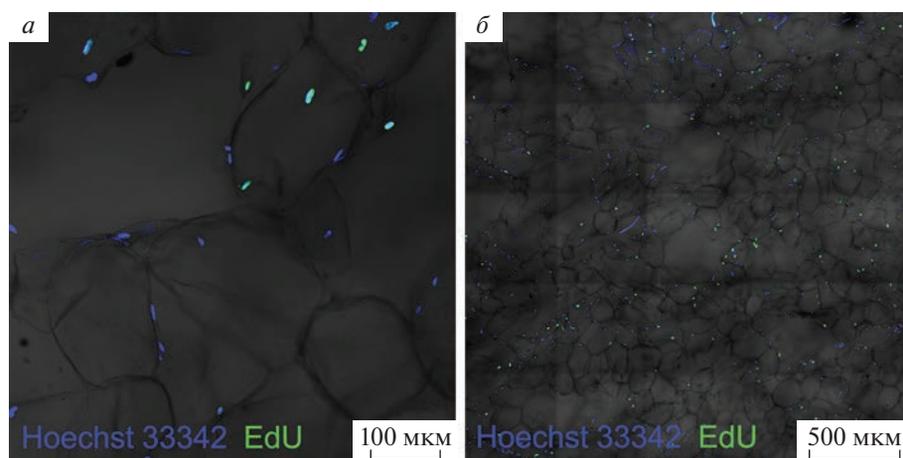


Рис. 3. Ядра эМСК, окрашенные красителем Hoechst 33342 и меченные EdU с последующим окрашиванием Alexa Fluor 488, при культивировании в матрицах, обработанных коллагеном I типа. *а* – Ядра пролиферирующих эМСК флуоресцируют зеленым цветом (EdU), ядра не пролиферирующих эМСК окрашены только синим (Hoechst 33342). *б* – Сшивка изображений, полученная в результате последовательной съемки матрицы, заселенной эМСК, по которым производили подсчет окрашенных Hoechst 33342 и меченных EdU с последующим окрашиванием Alexa Fluor 488 ядер пролиферирующих эМСК.

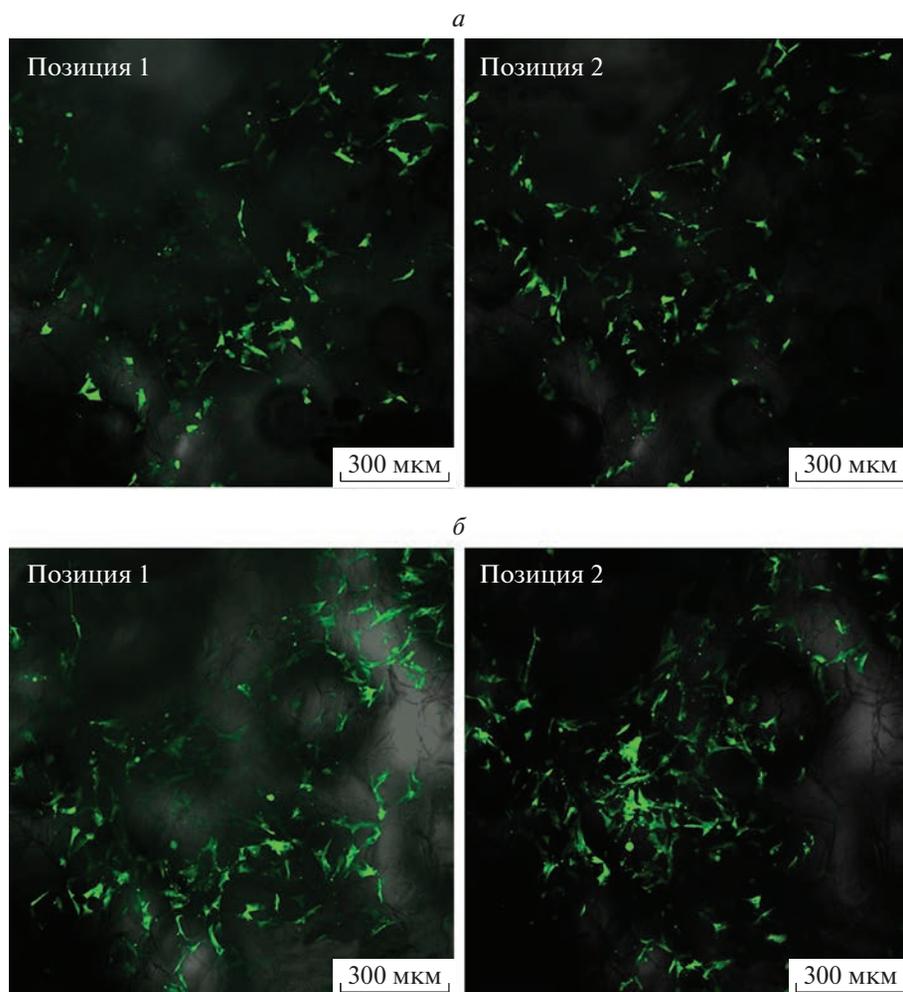


Рис. 4. Изображения флуоресцирующих зеленым цветом эМСК для визуальной оценки их пролиферативной активности в целлюлозной матрице. Конфокальная микроскопия. *а, б* – Участок матрицы через 1 и 6 сут соответственно после заселения ее эМСК, экспрессирующими флуоресцирующий биосенсор H_2O_2 (HuPer); показаны участок матрицы на глубине ближе к поверхности (позиция 1) и ближе к середине (позиция 2).

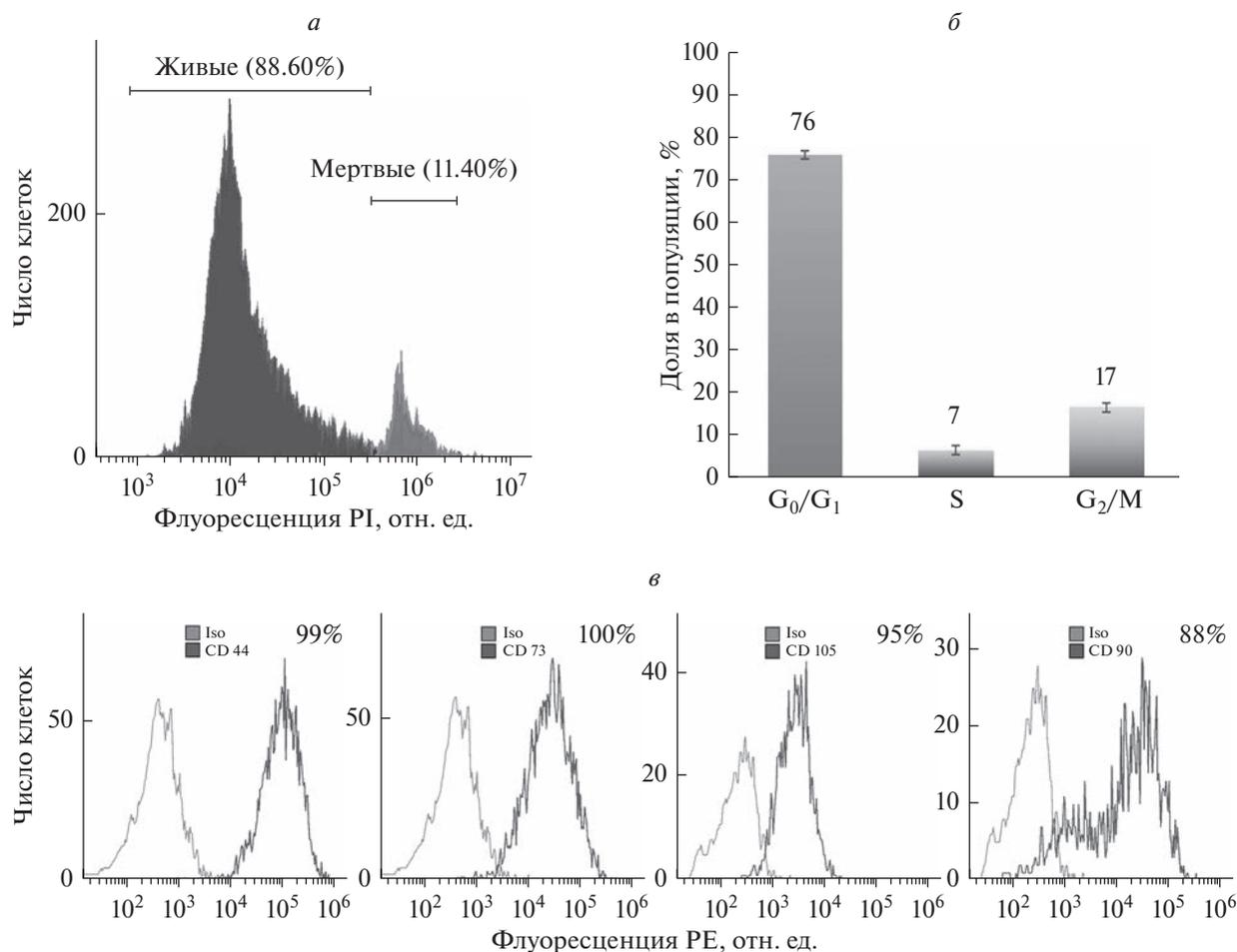


Рис. 5. Жизнеспособность и пролиферативная активность ЭМСК, культивируемых в матрицах, обработанных коллагеном I типа. Проточная цитометрия. *а* – Гистограмма, показывающая долю живых и мертвых ЭМСК, извлеченных из матрицы; *б* – распределение по фазам клеточного цикла ЭМСК, культивируемых в матрицах, обработанных коллагеном I типа (цифры над столбцами указывают долю клеток); *в* – гистограмма проточной цитометрии, показывающая наличие поверхностных CD-маркеров ЭМСК, культивируемых в целлюлозных матрицах (Iso – изотипический контроль).

дуализации 8-Br-cAMP в ростовой среде повлекло за собой морфологические и секреторные изменения. Форма клеток изменилась с веретеновидной на более округлую, что характерно для децидуально дифференцированных ЭМСК (рис. 7а, б). Наблюдалось увеличение секреции пролактина по сравнению с не дифференцированными ЭМСК (рис. 7в).

По данным литературы, растительные целлюлозные матрицы, заселенные клетками, в основном предлагаются для регенерации костной ткани, поэтому авторы работ проводят дифференцировку в остеогенном направлении (Bilirgen et al., 2021). Нами впервые показана возможность использовать такие модели для формирования других типов тканей, а также показана возможность дифференцировать ЭМСК в составе целлюлозной матрицы в тканеспецифические децидуальные клетки.

Обсуждая полученные результаты и перспективы использования созданных 3D-клеточных структур,

важно отметить, что разработанная нами технология позволяет варьировать способы модификации поверхности матриц, применяя не только коллаген I типа, но и другие компоненты внеклеточного матрикса клеток человека, такие как фибронектин и коллаген IV типа (Bilirgen et al., 2021). Она позволяет создавать 3D-системы на основе других типов клеток, используя их для моделирования заболеваний и тестирования фармакологических препаратов, а также развивать предложенный нами метод культивирования ЭМСК, реализуя амбициозную задачу восстановления архитектуры ткани эндометрия *in vitro*.

В итоге мы показали, что целлюлозная матрица, полученная из мезокарпия яблока, может служить подходящим каркасом для культивирования и дифференцировки ЭМСК в 3D-системе. Эта модель подходит как для изучения клеток методом конфокальной микроскопии, так и для исследований с помощью проточной цитометрии. Благодаря достаточной

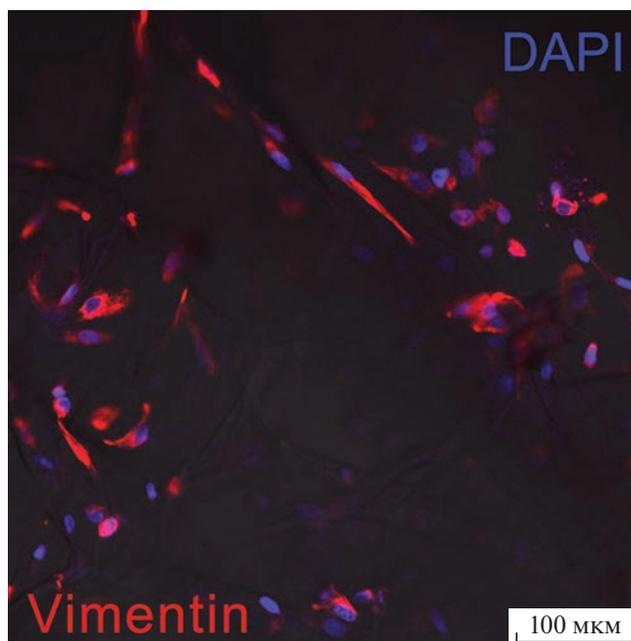


Рис. 6. Иммуноцитохимическое окрашивание эмСК, культивируемых в целлюлозных матрицах, на виментин (красный цвет). Ядра окрашены DAPI (синие).

механической прочности, биосовместимости, доступности и легкости в использовании, применение матриц из децеллюляризированной ткани яблока, заселенных МСК, может стать новой стратегией в регенеративной медицине.

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллекция культур клеток позвоночных ЦКП Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), из которой получены эмСК, поддержана Минобрнауки РФ (Соглашение № 075-15-2021-683).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-10126).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с использованием животных и человека авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

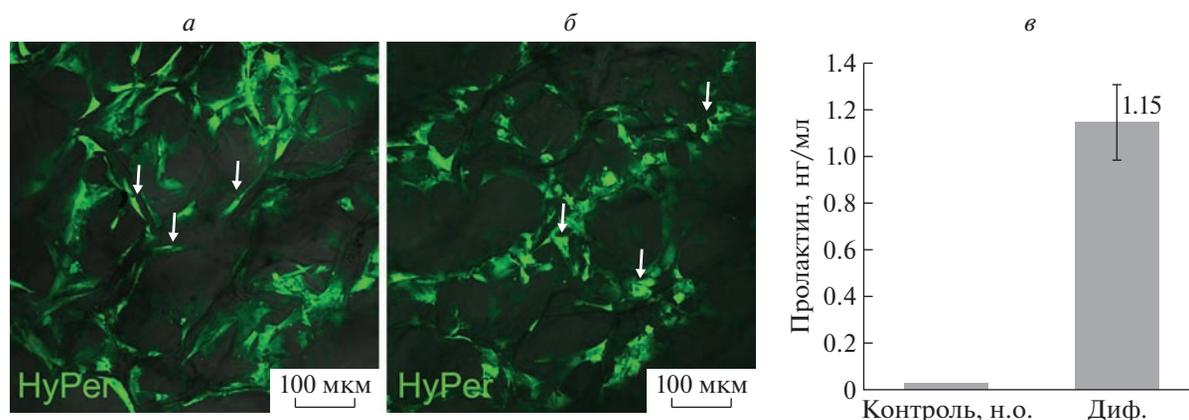


Рис. 7. Индукция тканеспецифической децидуальной дифференцировки эмСК, культивируемых в целлюлозных матрицах. Дифференцировку (Диф.) индуцировали добавлением 1 мМ 8-Br-cAMP (Sigma, США) в культуральную среду. *а* – Недифференцированные эмСК, *б* – изменение морфологии эмСК при дифференцировке. *Стрелками* указаны клетки, имеющие наиболее характерные морфологические изменения. *в* – Секретция пролактина эмСК недифференцированных (контроль) и при децидуальной дифференцировке (при добавлении 1 мМ 8-Br-cAMP); н.о. – не определяется.

ВКЛАД АВТОРОВ

И.К. Кунеев и Ю.С. Иванова (равный вклад): получение и подготовка целлюлозных матриц, культивирование клеток, заселение матриц клетками, исследование свойств клеток в матрицах, участие в написании текста статьи; Ю.А. Нашекина: разработка метода покрытия целлюлозных матриц коллагеном, Е.К. Патронова: обработка полученных данных; А.В. Соколова: участие в исследовании свойств клеток в матрицах; А.П. Домнина: план экспериментов, обработка и анализ полученных результатов, участие в написании и редактировании текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Домнина А.П., Новикова П.В., Фридлянская И.И., Шилина М.А., Зенин В.В. Никольский Н.Н. 2015. Индукция децидуальной дифференцировки в эндометриальных мезенхимных стволовых клетках. Цитология. Т. 57. № 12. С. 880. (Domnina A.P., Novikova P.V., Fridlyanskaya I.I., Shilina M.A., Zenin V.V., Nikolsky N.N. 2016. Induction of decidual differentiation of endometrial mesenchymal stem cells. Tsitologiya. V. 57. № 12. P. 880.)
- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. № 12. С. 919. (Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artzibasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Bichevaia N.K., Korsak V.S., Nikolsky N.N. 2012. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization and use as feeder layer for maintenance of human embryonic stem cell lines. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 6. P. 1.)
- Мусина Р.А., Белявский А.В., Тарусова О.В., Соловьева Е.В., Сухих Г.Т. 2008. Мезенхимные стволовые клетки эндометрия, полученные из менструальной крови. Кл. техн. биол. мед. Т. 2. С. 110. (Musina R.A., Tarusova O.V., Solovyova E.V., Sukhikh G.T., Belyavski A.V. 2008. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. V. 145. P. 539)
- Bartosh T.J., Ylostalo J.H. 2019. Efficacy of 3D culture priming is maintained in human mesenchymal stem cells after extensive expansion of the cells. Cells. V. 8. P. 1031. <https://doi.org/10.3390/cells8091031>
- Baruffaldi D., Palmara G., Pirri C., Frascella F. 2021. 3D cell culture: recent development in materials with tunable stiffness. ACS Applied Bio Materials. V. 4. P. 2233. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01472>
- Bilirgen A.C., Toker M., Odabas S., Yetisen A. K., Garipcan B., Tasoglu S. 2021. Plant-based scaffolds in tissue engineering. ACS Biomat. Sci. Eng. V. 7. P. 926. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01527>
- Bou-Ghannam S., Kim K., Grainger D.W. 2021. 3D cell sheet structure augments mesenchymal stem cell cytokine production. Sci Rep. V. 11. P. 8170. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87571-7>
- Chen G., Qi Y., Niu L., Di T., Zhong J., Fang T., Yan W. 2015. Application of the cell sheet technique in tissue engineering. Biomed. Rep. V. 3. P. 749. <https://doi.org/10.3892/br.2015.522>
- Cherng J.-H., Chou S.-C., Chen C.-L., Wang Y.-W., Chang S.-J., Fan G.-Y., Leung F.-S., Meng E. 2021. Bacterial cellulose as a potential bio-scaffold for effective re-epithelialization. Therapy Pharmaceutics. V. 13. P. 1592. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101592>
- Domnina A.P., Ivanova J.V., Alekseenko L.L., Kozhukharova I.V., Borodkina A.V., Pugovkina N.A., Smirnova I.S., Lyublinskaya O.G., Fridlyanskaya I.I., Nikolsky N.N. 2020. Three-dimensional compaction switches stress response programs and enhances therapeutic efficacy of endometrial mesenchymal stem/stromal cells. Front. Cell Devel. Biol. V. 8. P. 473. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00473>
- Domnina A.P., Novikova P.V., Obidina J.I., Fridlyanskaya I.I., Alekseenko L.L., Kozhukharova I.V., Lyublinskaya O.G., Zenin V.V., Nikolsky N.N. 2018. Human mesenchymal stem cells in spheroids improve fertility in model animals with damaged endometrium. Stem Cell Res. Ther. V. 9. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0801-9>
- Gargett C.E., Masuda H. 2010. Adult stem cells in the endometrium. Mol. Hum. Reprod. V. 16. P. 818. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq061>
- Gorgieva S., Trček J. 2019. Bacterial cellulose: production, modification and perspectives in biomedical applications. Nanomaterials. V. 9. P. 1352. <https://doi.org/10.3390/nano9101352>
- Guruswamy Damodaran R., Vermette P. 2018. Tissue and organ decellularization in regenerative medicine. Biotech. Progress. V. 34. P. 1494. <https://doi.org/10.1002/btpr.2699>
- Haycock J.W. 2011. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. Methods Mol. Biol. V. 695. P. 1. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_1
- Husein K.S., Thiemermann C. 2010. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. Stem Cells. V. 28. P. 585. <https://doi.org/10.1002/stem.269>
- Jauković A., Abadžić D., Trivanović D. 2020. Specificity of 3D msc spheroids microenvironment: impact on msc behavior and properties. Stem Cell Rev. Rep. V. 16. P. 853. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-10006-9>
- Jensen C., Teng Y. 2020. Is it time to start transitioning from 2d to 3d cell culture? Front. Mol. Biosci. V. 7. P. 33. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033>
- Kouroupis D., Correa D. 2021. Increased mesenchymal stem cell functionalization in three-dimensional manufacturing settings for enhanced therapeutic applications. Front. Bioeng. Biotechnol. V. 9. P. 621748. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.621748>
- Langhans S.A. 2018. Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning. Front. Pharmacol. V. 9. P. 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>
- Lee J., Jung H., Park N. 2019. Induced osteogenesis in plants decellularized scaffolds. Sci. Rep. V. 9. P. 20194. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56651-0>
- Lyublinskaya O.G., Ivanova J.S., Pugovkina N.A., Kozhukharova I.V., Kovaleva Z.V., Shatrova A.N., Aksenov N.D., Zenin V.V., Kaulin Y.A., Gamaley I.A., Nikolsky N.N. 2017. Redox environment in stem and differentiated cells: a

- quantitative approach. *Redox Biol.* V. 12. P. 758. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.016>
- Meng X., Ichim T.E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K.W., Thébaud B., Rioridan N.H. 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J. Transl. Med.* V. 5. P. 57. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-57>
- Modulevsky D.J., Cuerrier C.M., Pelling A.E. 2016. Biocompatibility of subcutaneously implanted plant-derived cellulose biomaterials. *PLoS One.* V. 11. P. e0157894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157894>
- Modulevsky D.J., Lefebvre C., Haase K., Al-Rekabi Z., Pelling A.E. 2014. Apple derived cellulose scaffolds for 3D mammalian cell culture. *PLoS One.* V. 9. P. e97835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097835>
- Patel A.N., Park E., Kuzman M., Benetti F., Silva F.J., Allickson J.G. 2008. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant.* V. 17. P. 303. <https://doi.org/10.3727/096368908784153922>
- Phan N.V., Wright T., Rahman M.M., Xu J., Coburn J.M. 2020. *In vitro* biocompatibility of decellularized cultured plant cell derived matrices. *ACS Biomater. Sci. Eng.* V. 6. P. 822. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.9b00870>
- Svensson A., Nicklasson E., Harrah T., Panilaitis B., Kaplan D.L., Brittberg M., Gatenholm P. 2005. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials.* V. 26. P. 419. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.049>
- Hu Xinqiang, Xia Zengzilu, Cai Kaiyong. 2022. Recent advances in 3D hydrogel culture systems for mesenchymal stem cell-based therapy and cell behavior regulation. *J. Mater. Chem. B.* V. 10. P. 1486. <https://doi.org/10.1039/D1TB02537F>
- Zack G.W., Rogers W.E., Latt S.A. 1977. Automatic measurement of sister chromatid exchange frequency. *J. Histochem. Cytochem.* V. 25. P. 741. <https://doi.org/10.1177/25.7.70454>

Development of Method for Three-Dimensional Cultivation of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells Using Cellulose Scaffolds

I. K. Kuneev^a, J. S. Ivanova^a, Y. A. Nashchekina^a, E. K. Patronova^a, A. V. Sokolova^a, and A. P. Domnina^a, *

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

**e-mail: aldognina@mail.ru*

The development of methods for culturing cells in three-dimensional systems is an urgent focus of modern cell biology. When cultured in the 3D system, a tissue-specific architecture is reproduced and the real microenvironment and cell behavior *in vivo* are more precisely recreated. Human mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) are typically isolated and cultured as a monolayer 2D culture. In this work, we developed a method for three-dimensional cultivation and tissue-specific decidual differentiation of MSCs isolated from human endometrial tissue using a matrix derived from decellularized apple. Decellularized apple matrices have sufficient mechanical strength, are biocompatible, accessible, easy to use, and have ample scope for surface modification. This cell culture system is suitable for both confocal microscopy and flow cytometry studies. The model we developed can become the basis for the creation of new cell products and tissue-engineering structures in the field of regenerative biomedicine.

Keywords: 3D cultivation, decellularized plants, endometrial mesenchymal stem/stromal cells, decidual differentiation

КРИОПРОТЕКТОРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИПЕПТИДА L-КАРНОЗИНА (β-АЛАНИЛ-L-ГИСТИДИНА)

© 2023 г. А. А. Мокрушин*

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

*E-mail: mok@inbox.ru

Поступила в редакцию 30.09.2022 г.

После доработки 02.11.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Дипептид (β-аланил-L-гистидин) обнаружен в значительных количествах в мышцах и в головном мозге млекопитающих, особенно в обонятельных структурах. L-карнозин проявляет многие протективные эффекты при действии на клетки различных цитотоксических факторов. Срезы обонятельной коры мозга крыс мы использовали для изучения криопротективных характеристик L-карнозина в процессе криосохранения (КС). Анализировали изменения активности N-метил-D-аспарататных рецепторов (NMDAR) при регистрации NMDA-потенциалов, вызываемых электрической стимуляцией латерального обонятельного тракта. Срезы мозга преинкубировали с L-карнозином (20 мМ) в искусственном цереброспинальном растворе, замораживали (–10°C,) и после длительного КС (30 сут) отогревали до 37°C. До и после КС определяли изменения амплитуд NMDA-потенциалов. Обнаружено, что дипептид оптимизировал рН замораживающего раствора после КС и сохранял активность NMDAR, определяемых по амплитуде NMDA-потенциалов. L-карнозин после КС способствовал дегидратации избыточной свободной воды из срезов. Дипептид ингибировал развитие глутаматной эксайтотоксичности в срезах мозга в процессе КС и сохранял нормальное функционирование NMDAR. Полученные данные доказывают, что L-карнозин проявляет свойства эндогенного криопротектора в нервной ткани.

Ключевые слова: L-карнозин, срезы мозга, рецепторы NMDA, фокальные потенциалы, замораживание–отогревание, криосохранение

DOI: 10.31857/S0041377123020049, **EDN:** LWPMHE

Криосохранение (КС) – это биотехнология обратимого торможения жизнедеятельности клеток и органов млекопитающих при длительном воздействии отрицательных температур. Исследование закономерностей и способов КС очень востребовано в регенеративной медицине для трансплантации и создания криобанка (Ichikawa et al., 2007).

Достигнуты значительные успехи КС одноклеточных клеток (ооцитов, сперматозоидов, клеток крови) с последующим восстановлением их биологических функций после отогревания. Однако значительные проблемы возникают при длительном КС нервной ткани из-за ее гетерогенности, необходимости сохранения не только базовых функций (передачи информации в нервной сети), но и более высоких (пластических свойств): способности обучения и хранения информации (памяти). Вместе с тем, в клинике существует острая потребность эксплан-

татов мозга для пересадки при таких невропатологиях, как инсульт, эпилепсия и травма. Такие экспланты мозга должны храниться в криобанке при специальных условиях. Установлено, что обычные способы замораживания–отогревания в процедуре КС вызывают нарушение функций нервных клеток, синапсов и делают их непригодными для трансплантации. Для сохранения их функций при КС используют криопротекторы. Традиционно применяемые протекторы (ДМСО, этиленгликоль и др.) оказывают негативное влияние на нейроны и блокируют синаптические механизмы, поэтому их применение при КС нецелесообразно (Пичугин, 2013). Таким образом, для потенциальных криопротекторов нервной ткани предъявляются особые требования, чтобы они обладали высокой эффективностью, не нарушали функций отдельных синаптических механизмов, не влияли на интегрированность нейрональной сети, а также не проявляли токсичность.

В настоящей работе в качестве потенциального криопротектора был исследован карнозин. Карнозин (β-аланил-L-гистидин), эндогенный дипептид, синтезируемый ферментом карнозинсинтаза 1 (CARNS1) из аминокислот β-аланина (синтезируется в печени) и

Принятые сокращения: КС – криосохранение; ДМСО – диметилсульфоксид; ЛОТ – латеральный обонятельный тракт; ФП – фокальные потенциалы; АМРА – альфа-амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота; CARNS – карнозинсинтаза; NMDA – N-метил-D-аспаратат; NMDAR – рецептор(ы) NMDA.

L-гистидина (получаемого из пищи). Содержание этого дипептида наиболее высокое (миллимолярные концентрации) в сердечных и скелетных мышцах, а также в головном мозге, особенно в обонятельной луковице и обонятельной коре (Boldyrev et al., 2013). Так, концентрация L-карнозина в коре больших полушарий головного мозга составляет 0.1 мМ, а в обонятельных луковицах — на порядок выше (1–2 мМ) (Hipkiss et al., 1998; Boldyrev et al., 2013). В меньших количествах (менее 0.1 мМ) он находится и в других тканях организма (Boldyrev et al., 2013).

Уровни L-карнозина в тканях целого организма регулируются активностью двух карнозиаз с помощью которых, он распадается на β -аланин и L-гистидин: CNDP1 и цитозольной карнозиндипептидазы 2 (CNDP2), которые относятся к семейству металлопротеаз M20 (Teufel et al., 2003).

Выявлено, что L-карнозин в нормотермических условиях производит плеiotропные положительные эффекты в организме. Так, L-карнозин проявляет свойства антиоксиданта, он нейтрализует активные формы кислорода, а также предотвращает перекисное окисление липидов, сохраняя структуру клеточных мембран. Дипептид препятствует процессу гликелирования, т.е. окисления белков глюкозой и связывает образующиеся при гликолизе протоны (Perper et al., 2010). Он выполняет роль внутриклеточного рН-буфера, что указывает на способность пептида проникать внутрь клеток через их мембраны (Boldyrev et al., 2013). L-карнозин действует в организме хелатором тяжелых металлов (свинец, ртуть, мышьяк, кадмий), которые являются ферментными ядами, а также защищает клетки от прооксидантных металлов (железа, меди, цинка), вызывающих разрушение клеточных мембран (Berezhnoy et al., 2019).

В контексте исследования L-карнозина в качестве криопротектора важно отметить его функции в центральных обонятельных структурах. Так, выявлена совместная локализация возбуждающего медиатора — глутамата и L-карнозина в пресинаптических терминалах в обонятельных нейронах, что может улучшать функционирование глутаматергических рецепторных механизмов (Sassoe-Pognetto et al., 1993; Bonfanti et al., 1999). Экзогенная аппликация L-карнозина на обонятельные нейроны приводила к снижению их гибели за счет действия на глутаматергическую систему и митохондриальную биоэнергетику клеток (Ouyang et al., 2016).

Колокализация L-карнозина и глутамата в пресинапсах обонятельных нейронов привела к гипотезе, что L-карнозин является основным нейротрансммитером в обонятельных структурах (Tiedje et al., 2010). Однако она не подтвердилась (Bonfanti et al., 1999; De Marchis et al., 2000). Вместе с тем, выявлено, что L-карнозин, выделяясь из пресинапсов во внеклеточное пространство в обонятельной коре, действует, как объемный медиатор паракринно, воздействуя на окружающие клетки и способствуя их активации, за-

щает от действия стресс-факторов (Мокрушин, Плеханов, 2001).

Обнаружено, что L-карнозин модулирует глутаматергическую медиаторную систему в центральной нервной системе и в микромолярных концентрациях активирует AMPA и NMDA-зависимые механизмы (Khama-Murad et al., 2008).

Особый интерес представляют результаты исследований протективного потенциала L-карнозина. В условиях развития ишемического и геморрагического поражения мозговых структур L-карнозин проявил себя эффективным протектором нервных клеток (Zemke et al., 2005; Khama-Murad et al., 2011; Zhang et al., 2011; Bae, Majid, 2013; Lopachev et al., 2017, 2020; Стволинский и др., 2017). Выявлено протективное действие L-карнозина на такие нейродегенеративные заболевания, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и др. (Solana-Manrique et al., 2022).

Таким образом, представленные данные доказывают, что L-карнозин является мультипотентным эффективным протектором и нейромодулятором в нормальных условиях в структурах нервной системы. В связи с этим мы предположили, что обладая протективным потенциалом, L-карнозин может выполнять функцию криопротектора в нервной ткани в процессе КС. Для того чтобы проверить эту гипотезу, мы исследовали эффекты экзогенной аппликации L-карнозина на экспериментальной модели — переживающих срезах обонятельной коры мозга крыс.

Срезы головного мозга являются оптимальными экспериментальными объектами для разработки протоколов, методов КС и поиска криопротекторов. Они позволяют изучать восстановление активности не только нейронов, но и синаптических механизмов при КС. Удалось обнаружить, что при медленных скоростях охлаждения срезов обонятельной коры (0.1–0.125°С/мин) до 16°С активность таких ионотропных глутаматергических рецепторных механизмов, как α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота (AMPA) и N-метил-D-аспартата (NMDAR) сохранялись (Mokrushin et al., 2014). В дальнейших исследованиях была выявлена различная устойчивость AMPAR и NMDAR к замораживанию—отогреванию срезов головного мозга при низкотемпературном КС (–10°С, 52 дня). AMPAR в этих условиях сохранялись и усиливались, а процессы NMDAR, наоборот, подавлялись и блокировались, что указывало на значительное (необратимое) нарушение их функций (Мокрушин, 2016, 2020; Мокрушин, Боровиков, 2017). Эти результаты принципиальны, поскольку NMDAR являются ключевыми в глутаматергической медиаторной системе головного мозга, участвуют в обучении, формировании памяти, а также в развитии различных невропатологий (эпилепсии, инсульта, травмы и др.) (Obrenovitch, Urenjak, 1997). Поскольку NMDAR являются наиболее уязвимыми механизмами при действии долговременного КС, в настоящей работе мы

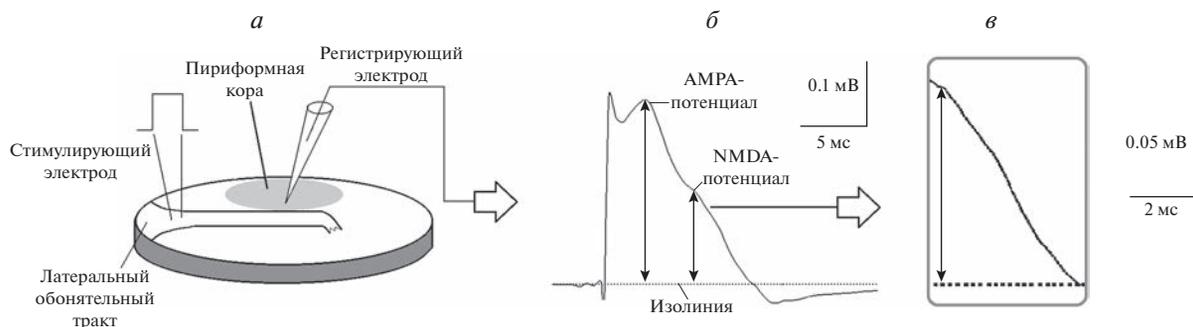


Рис. 1. Схема экспериментальной модели для изучения криопротекторных характеристик L-карнозина (20 мМ). *а* – Схема среза обонятельной коры мозга крыс с основными морфологическими структурами и локализацией стимулирующего и регистрирующего электродов. *б* – Суммарный потенциал, регистрируемый в срезе в ответ на электрическую стимуляцию латерального обонятельного тракта с указанием постсинаптических компонентов: раннего AMPA-потенциала и позднего NMDA-потенциала (мкВ). *в* – NMDA-потенциал (в увеличенном масштабе), являющийся индикатором активности NMDAR; в работе изучали только изменения NMDA-потенциалов при действии L-карнозина в процессе криосохранения; штрих-линия представляет изолинию; вертикальная стрелка показывает способ измерения амплитуд NMDA-потенциала. Калибровка указана.

сосредоточились на исследовании эффектов карнозина на эти рецепторные механизмы. Срезы обонятельной коры мозга крыс преинкубировали в растворе с L-карнозином в концентрации 20 мМ, замораживали в нем до -10°C , хранили при этой температуре в течение 30 сут, затем отогревали до 37°C и регистрировали изменения активности NMDAR до и после КС.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. Все эксперименты проводили на белых крысах-самках линии Wistar массой 180–200 г. Использовали 20 животных, которых содержали в помещении вивария Института физиологии им. И.П. Павлова РАН при свободном доступе к воде и пище с 12-часовым циклом ночь/день. Эксперименты с животными проводили в соответствии с рекомендациями по этике, предложенными Директивой Совета Европейских сообществ (86/609 ЕЕС).

Приготовление срезов. Исследования проведены на тангенциальных срезах обонятельной коры головного мозга крыс-самцов толщиной 400–500 мкм. Срезы мозга включают нейроны пириформной коры, глутаматергические синапсы и проводящие нервные волокна латерального обонятельного тракта (ЛОТ) (рис. 1*а*). Приготовление срезов происходило следующим образом. Крыс декапитировали при помощи гильотины. Хирургическими инструментами извлекали головной мозг и помещали его на фильтровальную бумагу, покрывающую металлический столик, охлажденный до 4°C . При помощи специального резака (Митюшов и др., 1986; Мокрушин, 1997) готовили срезы обонятельной коры мозга. Кисточкой срез переносили в стеклянный флакон с искусственным цереброспинальным раствором (ИЦР; состав в мМ: 124 NaCl, 5 KCl, 2.6 CaCl₂, 1.24 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 3 NaHCO₃, 10 глюкозы; pH 7.3 при 37°C) объемом 1 мл. Длительность всей

процедуры приготовления среза от момента декапитации до помещения его во флакон с раствором составляла 1–1.5 мин. Газовую атмосферу над жидкостью со срезом в течение 1 мин заменяли на кислород. Флакон со срезом устанавливали в аппарат Варбурга (Германия) с частотой качаний 120 за 1 мин при температуре 37°C .

Определение активности NMDAR. Срезы предварительно инкубировали в течение 1 ч аэрированным ИЦР. После этого срезы один за другим переносили в регистрационную камеру электрофизиологической установки (Мокрушин, Боровиков, 2017), непрерывно перфузировали ИЦР со скоростью 2.0 мл/мин и регистрировали активность NMDA-потенциалов. В ответ на электрическую стимуляцию ЛОТ в нормотермических условиях внеклеточно регистрируются фокальные потенциалы (ФП), которые отражают суммарную активность нейронов пириформной коры и волокон ЛОТ. Без стимуляции ЛОТ спонтанная активность в срезах не регистрируется. ФП является многокомпонентным потенциалом, состоящим из пресинаптического компонента, который отражает активность проводящих волокон ЛОТ – суммарный потенциал действия (ПД-ЛОТ) и постсинаптических компонентов, которые отражают активацию глутаматергических ионотропных рецепторов – альфа-амино-3-гидрокси-5-метилизоксалол-4-пропионовой кислоты (AMPA) и N-метил-D-аспартата (NMDAR) (рис. 1*б*). В настоящей работе изучали изменения только активности NMDAR в виде NMDA-потенциалов (рис. 1*в*). Эти потенциалы фармакологически идентифицированы ранее в нормотермических условиях при аппликации на срезы специфического антагониста D-APV (50 мкМ) (Мокрушин, 1997; Mokrushin, Pavlina, 2013). В срезах регистрировали амплитуды NMDA-потенциалов (мкВ) стеклянными микроэлектродами, заполненными 1 М NaCl, с сопротивлением 1–5 МОм. Эти потенциалы регистрировали в ответ на электрические импульсы

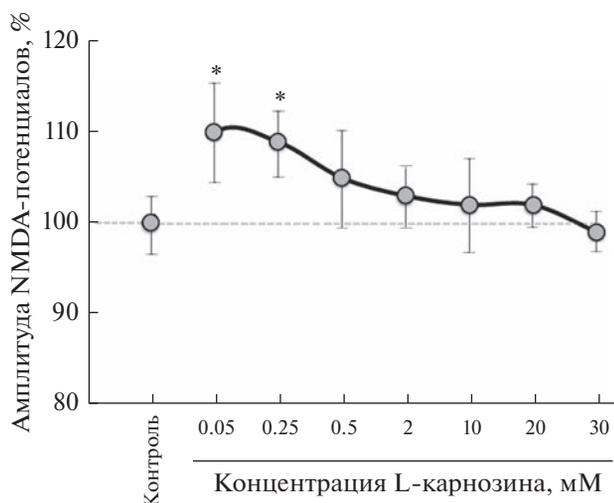


Рис. 2. Дозозависимое действие экзогенной аппликации L-карнозина в разной концентрации на амплитуду NMDA-потенциалов в срезах обонятельной коры крыс. Ось абсцисс — шкала неравномерная. Каждая концентрация L-карнозина тестировалась на отдельной группе срезов ($n = 12$ для каждой концентрации). Штриховая линия — амплитуда NMDA-потенциала в срезах в контроле без аппликации L-карнозина (100%). * Различия амплитуды NMDA-потенциалов по сравнению с контрольными значениями достоверны при $P \leq 0.05$ (непараметрический U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

ЛОТ от электростимулятора (ЭСУ-1, Россия) прямоугольной формы, длительностью 0.1 мс, интенсивностью 1–3 В и частотой 0.003 Гц при 37°C в течение 20 мин. Регистрацию проводили в проточной камере электрофизиологической установки (Мокрушин, Боровиков, 2017) с использованием усилителя (НТО, Россия). Потенциалы оцифровывали аналого-цифровым прибором (Е 20–10, Россия) и обрабатывали с помощью компьютерной программы “Анализ электрической активности нейронов” (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Россия).

Измерение pH среды. Измерение pH ИЦР со срезом до и после КС с использованием L-карнозина осуществляли с помощью pH-метра Seven Compact S220 (Mettler Toledo, США). Значения pH определяли с точностью до 0.1. Температуру среды со срезами до и после замораживания при регистрации NMDA-потенциалов измеряли с помощью прибора “Измеритель пид-регулятор ТРМ12” (Россия).

Определение содержания воды в срезах. Содержание воды определяли путем измерения веса срезов до и после воздействия КС. Срезы после предварительной инкубации в контрольной среде (без L-карнозина) помещали на фильтровальную бумагу и быстро удаляли избыток жидкости, не удаляя воду из ткани. Затем срезы взвешивали на торсионных весах ВТ-500 (Россия), полученные значения весов обозначали как M_k (контрольные, мг). После КС срезы снова высушивали в сушильном шкафу при 85°C в течение 5 ч, охлаждали в эксикаторе, повторно взвешивали,

вес обозначали как $M_{вс}$ (мг). Содержание воды в срезах определяли в мг по формуле: $S_v = (M_k - M_{вс})/M_{вс}$ где: S_v — содержание воды в срезах после КС, M_k — вес контрольных срезов до КС, $M_{вс}$ — вес высушенных срезов после КС.

Протокол криосохранения срезов с L-карнозином проводили в следующей последовательности. Срезы в течение 20 мин перфузировали ИЦР (солевой состав см. выше) в проточной камере электрофизиологической установки (Мокрушин, Боровиков, 2017) и регистрировали амплитуды NMDA-потенциалов (мкВ). Полученные значения амплитуд NMDA-потенциалов рассматривали как контрольные перед замораживанием и принимали за 100%. Затем срезы перфузировали ИЦР (того же состава) с добавлением L-карнозина до концентрации 20 мМ в течение 20 мин и регистрировали NMDA-потенциалы. Далее срезы замораживали в растворе ИЦР при медленной скорости (0.1°C/мин) до -10°C и хранили в морозильнике термостата “ThermoStat plus” (Eppendorf, Германия). Через 30 сут КС срезы отогревали до 37°C с такой же скоростью (0.1°C/мин), при этом солевой состав среды и концентрация L-карнозина не менялись. Вновь регистрировали NMDA-потенциалы и выражали их в % по отношению к значениям до замораживания. Во время отогревания NMDA-потенциалы регистрировали в диапазоне температур от 5°C до 37°C.

Химические реактивы для приготовления растворов были приобретены в фирме Химреактив (Россия), L-карнозин — у Sigma (США).

Статистическую обработку изменения амплитуд NMDA-потенциалов проводили с использованием непараметрического параметра Вилкоксона–Манна–Уитни (U-критерия). Цифровые данные выражали средним значением и его стандартной ошибкой. Различия считали достоверными при уровне статистической значимости $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нейротропное действие L-карнозина на активность NMDAR. Для выяснения протективного эффекта L-карнозина в процессах криосохранения нервной ткани представляется важным определить нейротропные эффекты его экзогенной аппликации в отношении активности NMDAR. Это необходимо для определения оптимальной концентрации L-карнозина для последующего использования его в качестве криопротектора. Активность NMDAR оценивали по амплитуде NMDA-потенциалов. Каждую концентрацию L-карнозина тестировали на отдельной группе срезов. Результаты исследований представлены на рис. 2.

Зависимость амплитуд NMDA-потенциалов от концентрации экзогенного L-карнозина была нелинейной. Малые концентрации дипептида (0.05, 0.25 мМ) вызывали увеличение NMDA-потенциалов. L-кар-

нозин в концентрации 0.5–2 мМ также индуцировал возрастание амплитуды NMDA-потенциалов, но эти изменения были статистически недостоверными по сравнению с контрольными значениями. В диапазоне концентраций экзогенного L-карнозина 10–30 мМ амплитуда NMDA-потенциалов не отличалась от контрольных значений.

Представленные результаты соответствуют ранним данным в том, что микромолярные концентрации L-карнозина активируют NMDA-потенциалы (Khama-Murad et al., 2008).

На основе полученных результатов для последующего изучения протективных свойств L-карнозина была выбрана концентрация 20 мМ как наиболее стабильная (в диапазоне 10–30 мМ) по действию на NMDA-потенциалы.

Действие L-карнозина на pH замораживающей среды до и после КС. В предыдущей работе было обнаружено, что после КС срезов мозга замораживающая среда закислялась до pH 6.5 и при этом амплитуды NMDA-потенциалов значительно редуцировались или блокировались; использование гибридной буферной системы из карбонатной (NaHCO_3), фосфатной (KH_2PO_4) и трис(гидроксиметил)аминометановой ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$), а также увеличение pH среды до 7.6–7.7 в процессе замораживания срезов способствовало сохранению амплитуды NMDA-потенциалов после КС (Мокрушин, 2022). В связи с этим возник вопрос, как “справится” L-карнозин с изменением pH замораживающего раствора после КС? Для ответа на этот вопрос срезы инкубировали в замораживающем растворе в течение 20 мин при температуре 37°C с L-карнозином (20 мМ) до и после КС. Полученные данные сравнивали со значениями pH в растворе инкубации срезов без L-карнозина и замораживания (контроль).

Добавление L-карнозина в замораживающий раствор до КС не влияло на pH раствора, но приводило к увеличению pH этого раствора после КС до pH 7.4 (рис. 3). Отметим, что такое повышение pH не критично и находится в оптимальном диапазоне для функционирования NMDAR (pH 7.2–7.4, на рис. 3 отмечен серым фоном).

Этот вывод подтверждается измерением амплитуд NMDA-потенциалов до и после КС. Так, амплитуда NMDA-потенциалов до КС составляла 129 ± 8 мкВ, а после КС и последующего отогревания составляла 118 ± 10 мкВ. Статистически эти значения не отличались от значений до КС ($P \geq 0.05$, $U = 29$, $n = 7$).

Таким образом, L-карнозин “справляется” с регуляцией pH замораживающего раствора и проявляет характеристики криопротектора.

Влияние L-карнозина на содержание воды в срезах до и после КС. Процесс дегидратации–гидратации нервных клеток и межклеточного пространства является важным вопросом в сохранении жизнеспособности структур нервной ткани после КС. Этот

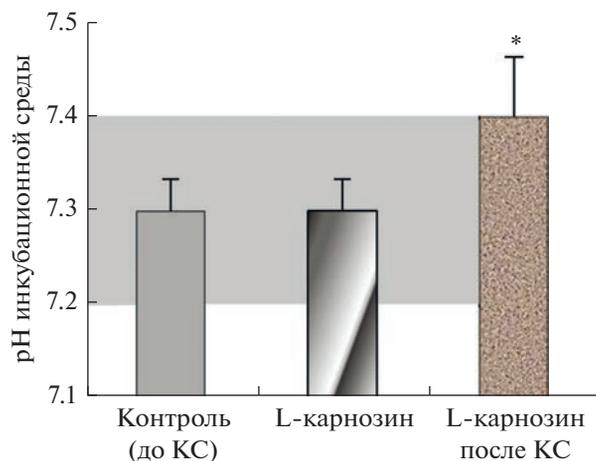


Рис. 3. Действие экзогенного L-карнозина (20 мМ) на pH замораживающего раствора до и после криоконсервации (КС). Серым фоном отмечены оптимальные диапазоны pH (pH 7.2–7.4), при которых стабильно сохраняются амплитуды NMDA-потенциалов ($n = 7$). * – Отличия значений pH замораживающего раствора с 20 мМ карнозина после КС от значений pH раствора без карнозина до КС (контроль) достоверны при $P \leq 0.05$ (непараметрический U -критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

вопрос был изучен в специальной серии экспериментов. Исследовали изменение содержания воды (набухание) в срезах после повторного отогревания срезов от -10 до 37°C . Методика измерения содержания воды в срезах и расчеты подробно описаны в разделе “Материал и методика”.

Вес срезов после КС без добавления L-карнозина в замораживающий раствор увеличивался в среднем на $20 \pm 7\%$ по сравнению с контрольными значениями (рис. 4). Эти данные указывают на усиление гидратации ткани срезов (набухание), что может оказать негативное влияние на функционирование NMDA-зависимых механизмов. Измерение амплитуд NMDA-потенциалов подтвердило такое предположение. Так, амплитуда NMDA-потенциала уменьшалась после КС без L-карнозина и составляла 16 ± 5 мкВ против 128 ± 10 мкВ до КС ($P \leq 0.05$, $U = 7$, $n = 12$).

Степень гидратации срезов значительно снижалась при добавлении L-карнозина (20 мМ) в замораживающий раствор (рис. 4). После КС вес срезов незначительно увеличивался ($108 \pm 6\%$ против 100% в контроле, $P > 0.05$, $U = 7$, $n = 16$). Однако такие изменения гидратации срезов в присутствии L-карнозина в замораживающем растворе способствовали сохранению NMDA-потенциалов после КС. Амплитуда NMDA-потенциалов до КС составляла 134 ± 11 мкВ, а после КС – 124 ± 10 мкВ. Статистически эти значения не отличались от значений до КС ($P \leq 0.05$, $U = 27$, $n = 12$).

Таким образом, L-карнозин в замораживающем растворе после КС уменьшал гидратацию срезов и способствовал сохранению активности NMDA-за-

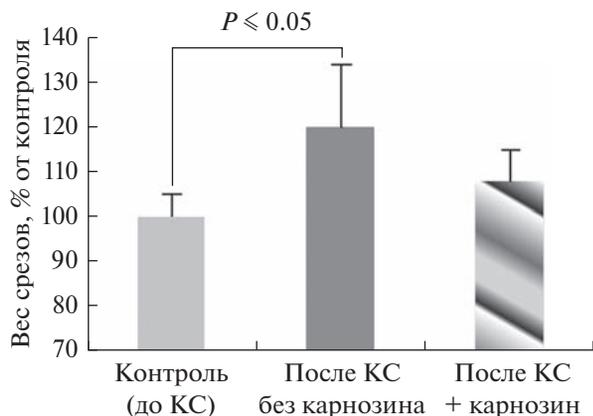


Рис. 4. Действие L-карнозина (20 мМ) на изменение содержания воды (набухание) в срезах мозга, определяемому по их весу, в процессе КС. Для каждой группы измерений $n = 5$. Различия величин амплитуд NMDA-потенциалов до КС (контроль) и после КС без L-карнозина достоверны при $P \leq 0.05$ (непараметрический *U*-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

висимых механизмов. Следовательно, экзогенный L-карнозин проявляет свойства криопротектора.

Действие L-карнозина (20 мМ) на изменения NMDA-потенциалов при отогревании срезов после КС. На основании приведенных выше данных о криопротекторных свойствах L-карнозина мы исследовали динамику изменений амплитуд NMDA-потенциалов в процессе отогревания срезов после КС при добавлении L-карнозина и сравнили с аналогичным процессом без L-карнозина.

В контрольных экспериментах без использования L-карнозина амплитуда NMDA-потенциалов изменялась куполообразно в процессе отогревания срезов с медленной скоростью ($0.1^\circ\text{C}/\text{мин}$) (рис. 5). При 5°C амплитуда NMDA-потенциалов была ниже контрольного значения (до замораживания) и составляла $97 \pm 3\%$. Дальнейшее отогревание срезов приводило к увеличению амплитуды NMDA-потенциалов с максимумом в диапазоне температур от 21 до 26°C (137 ± 4 и $139 \pm 5\%$ соответственно). Затем активность амплитуды NMDA-потенциалов резко снижалась и при 37°C составляла $37 \pm 4\%$ от значений до КС (рис. 5).

Полученные данные свидетельствуют о гиперактивации NMDA-зависимых механизмов при отогревании без L-карнозина с медленной скоростью $0.1^\circ\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне температур от 10 до 26°C . Куполообразная кривая указывает на развитие процесса эксайтотоксичности, которая связана с усиленным выделением возбуждающего медиатора глутамата из пресинапсов и активацией постсинаптических глутаматных рецепторов. Затем интенсифицируется поток ионов кальция внутрь клеток, что приводит к нарушению нормального функционирования клеток, а при глубокой гипотермии и последующем отогревании — эксайтотоксическую гибель нейронов (Warren et al.,

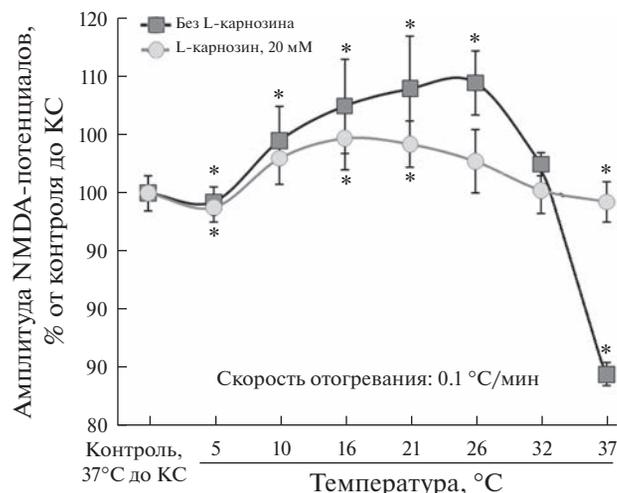


Рис. 5. Динамика изменений амплитуд NMDA-потенциалов при отогревании после предварительной обработки срезов L-карнозином (20 мМ). По оси абсцисс — температура замораживающего раствора при отогревании, при которой измеряли амплитуду NMDA-потенциалов, $^\circ\text{C}$ (шкала неравномерная; $n = 9$). Скорость отогревания: $0.1^\circ\text{C}/\text{мин}$. * Отличия амплитуды NMDA-потенциалов от контрольных значений достоверны при $P \leq 0.05$ (непараметрический *U*-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

2012). В результате амплитуда NMDA-потенциалов редуцируется ниже значений до КС и на данной экспериментальной модели наблюдается нарушение функционирования NMDAR. Следовательно, КС срезов с медленной скоростью ($0.1^\circ\text{C}/\text{мин}$) замораживания–отогревания без L-карнозина не способствует сохранению значений NMDAR, которые были до КС.

Добавление L-карнозина (20 мМ) в замораживающий раствор также сопровождалось куполообразной формой изменений амплитуды NMDA-потенциалов, но при этом значительно снижались амплитудные характеристики этой кривой (рис. 5). Только в диапазоне температур от 16°C до 21°C значения амплитуды NMDA-потенциалов (120 ± 5 и $118 \pm 7\%$ соответственно) превышали контрольные до КС. При дальнейшем увеличении температуры в интервале от 26 до 37°C значения амплитуды NMDA-потенциалов не отличались от контрольного уровня до КС (рис. 5).

Полученные данные указывают на то, что L-карнозин ингибирует развитие глутаматной эксайтотоксичности в срезах мозга в процессе КС и способствует сохранению нормального функционирования NMDA-механизмов как наиболее уязвимых к действию замораживания–отогревания.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы впервые представили характеристики L-карнозина как криопротектора для

нервной ткани теплокровных негибернирующих животных в процессе длительного КС.

Дипептид как криопротектор имеет несомненное преимущество по сравнению с часто используемыми токсичными криопротекторами ДМСО и этиленгликолем. В отличие от них, L-карнозин имеет эндогенное происхождение, не токсичен и обладает высокой биосовместимостью. Для того чтобы доказать криопротекторные свойства L-карнозина, мы исследовали его эффекты в отношении сохранения активностей NMDAR как наиболее уязвимых механизмов нервной ткани при длительном КС.

При интерпретации протективных свойств L-карнозина после КС следует принять во внимание весь спектр полученных данных. Во-первых, дипептид оптимизировал pH замораживающего раствора после КС и тем самым сохранял активность NMDA. Кроме того, фактором, усиливающим протективный эффект L-карнозина, было использование гибридной буферной системы – карбонатной (NaHCO_3), фосфатной (KH_2PO_4) и трис(гидроксиметил)аминометановой ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$), – что также улучшает активности NMDA механизмов (Мокрушин, 2022).

Во-вторых, L-карнозин способствовал дегидратации срезов. Это важно, поскольку свободная вода является причиной разрушения клеточных мембран кристаллами льда при 4°C как в процессе, так и после КС при отогревании.

Положительной характеристикой L-карнозина, как криопротектора, является отсутствие у него токсичности, поскольку он эндогенного происхождения. Пептид метаболизируется в организме на β -аланил и L-гистидин, участвующих в других процессах. По этой характеристике он превосходит такие часто используемые криопротекторы, как ДМСО и этиленгликоль. Они являются токсичными, плохо выводятся из клеток и их применение на нервной ткани вызывает необратимые повреждения нейронов (Пичугин, 2013).

Очевидно, что L-карнозин является проникающим криопротектором (Matsumura et al., 2021), поскольку установлено, он может активно транспортироваться через клеточные мембраны рядом белков из семейства протонно-связанных олигопептидных переносчиков (POT), также белков SLC15 и внутри клеток дипептид действует как pH-буфер (Boldyrev et al., 2013) тем самым увеличивается протективный потенциал пептида.

Возникает вопрос, почему в настоящей работе была использована концентрация L-карнозина 20 мМ, десятикратно превышающая его содержание в обонятельной луковице (1–2 мМ). Стратегия нашего выбора основана на том, чтобы L-карнозин действовал не только как проникающий, но и как внешний криопротектор. Для этого увеличили концентрацию экзогенного дипептида, поскольку он распадается под действием CNDP1 и цитозольной CNDP2 (Teufel et al., 2003). Кроме того, мы полагали,

что L-карнозин будет проявлять свои другие положительные характеристики – антиоксиданта, ингибитора процесса гликелирования и связывания образующихся при гликолизе протонов. Эти способности L-карнозина также могут усилить его криопротекторные свойства.

Таким образом, результаты проведенных исследований доказывают, что дипептид L-карнозин может рассматриваться как нетоксичный криопротектор в срезах мозга теплокровных негибернирующих животных. Экзогенный L-карнозин оптимизировал pH замораживающего раствора после КС. Он способствовал дегидратации избыточной свободной воды из срезов. L-карнозин ингибировал развитие глутаматной эксайтотоксичности в срезах мозга в процессе КС и способствовал сохранению нормального функционирования NMDA-механизмов как наиболее уязвимых механизмов при замораживании–отогревании.

Для нервной системы теплокровных эти данные получены впервые. Подтверждением результатов наших исследований являются данные об участии карнозина как криопротектора в репродуктивной системе животных. Установлено, что карнозин присутствует в семенной плазме нескольких видов организмов (Boldyrev et al., 2013) и может быть ключевым фактором устойчивости сперматозоидов к КС. Такое предположение подтвердилось в работе, в которой определяли концентрации эндогенного карнозина, присутствующего в семенной плазме жеребцов, и сопоставляли эти результаты с подвижностью сперматозоидов и окислительным статусом при КС. Удалось обнаружить, что более высокие концентрации эндогенного карнозина способствовали более высокой толерантности сперматозоидов к охлаждению и КС. В тех образцах семенной плазмы, в которых уровень карнозина был низкий, наблюдали значительное снижение активности сперматозоидов после КС. Авторы обнаружили, что дипептид способствовал ингибированию окислительного стресса во время КС, действуя как хелатор малонового диальдегида (Rocha et al., 2018).

В другой работе применяли экзогенный карнозин и его аналог ансерин, у которого в гетероцикле гистидина водород замещён на метильную группу. Эякуляты сперматозоидов японского перепела инкубировали *in vitro* и отдельно апплицировали на них эти дипептиды. Суспензии инкубировали при 15°C в течение 12 сут. Выявили, что оба дипептида улучшали параметры подвижности сперматозоидов после КС (Sarkar et al., 2021).

Таким образом, приведенные выше данные доказывают, что как эндогенный, так и экзогенный карнозин, работает в качестве криопротектора и в других тканях организма и можно предположить, что карнозин является универсальным криопротектором. Важно отметить, что аналог карнозина также обладает криопротективным потенциалом.

Мы полагаем, что полученные данные могут стать основой для разработки терапевтических препаратов на основе L-карнозина для применения его в качестве нетоксичного эндогенного криопротектора для нервной ткани.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор признателен Г.П. Смирновой за помощь в проведении экспериментов и С.Е. Боровикову за техническую помощь в настройке и обслуживании электрофизиологической установки.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе с животными были соблюдены все международные и национальные инструкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН по уходу и использованию животных в эксперименте, а также рекомендации по этике, предложенные Директивой Советом Европейских сообществ (86/609 ЕЕС).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Митюшов М.И., Емельянов Н.А., Мокрушин А.А., Войнер И.А., Багаева Т.Р.* 1986. Переживающий срез мозга как объект нейрофизиологического и нейрохимического исследования. Л.: Наука. 127 с. (*Mityushov M.I., Emelyanov N.A., Mokrushin A.A., Voiner I.A., Bagaeva T.R.* 1986. The surviving slice of the brain as an object of neurophysiological and neurochemical research. L.: Nauka. 127 p.)
- Мокрушин А.А.* 1997. Пептид-зависимые механизмы нейрональной пластичности в обонятельной коре. Автореф. докт. дис. СПб. 40 с. (*Mokrushin A.A.* 1997. Peptide-dependent mechanisms of neuronal plasticity in the olfactory cortex. Thesis Doct. Diss. St. Petersburg. 40 p.)
- Мокрушин А.А.* 2016. Эффекты глубокого замораживания и отогревания на ионотропные глутаматергические рецепторные механизмы *in vitro*. Бюлл. exper. биол. мед. Т. 161. С. 36. (*Mokrushin A.A.* 2016. Effects of deep freezing and rewarming on ionotropic glutamatergic receptor mechanisms *in vitro*. Bull. Exper. Biol. Med. V. 161. P. 36)
- Мокрушин А.А.* 2020. Влияние длительности криосохранения на активность ионотропных глутаматергических механизмов исследование *in vitro*. Известия РАН. серия биологическая. 2020. № 1. С. 1–10. (*Mokrushin A.A.* 2020. The influence of duration cryopreservation on activity of ionotropic glutamatergic mechanisms *in vitro* study. Proceedings of the Russian Academy of Sciences. Biological series. 2020. № 1. P. 1–10).
- Мокрушин А.А.* 2022. Улучшение кислотно-щелочного состава среды для длительного и обратимого криосохранения срезов мозга крыс. Цитология. Т. 64. № 1. С. 96. (*Mokrushin A.A.* 2022. Improvement of the acidbase composition of the environment for long-term and reversible cryopreservation of rat brain slices. Tsitologiya. V. 64. № 1. P. 96.)
- Мокрушин А.А., Боровиков С.Е.* 2017. Установка для изучения гипотермических эффектов на переживающих срезах мозга теплокровных. Междунар. журн. прикладных фундам. исследований. Т. 2. С. 214. (*Mokrushin A.A., Borovikov S.E.* 2017. Device for the study of hypothermic effects on the surviving brain slices of homeotherms. Int. J. Applied Basic Res. V. 2. P. 214.)
- Мокрушин А.А., Плеханов А.Ю.* 2001. Иммунологическая идентификация эндогенных пептидов, секретируемых клетками переживающих срезов обонятельной коры мозга крыс. Доклады Академии наук. Т. 378. № 4. С. 567. (*Mokrushin A., Plekhanov A.Yu.* 2001. Immunological identification of endogenous peptides secreted by surviving slices of rat olfactory cortex. Dokl. Biol. Sci. V. 378. P. 227.)
<https://doi.org/10.1023/a:1019206506211>
- Пичугин Ю.И.* 2013. Теоретические и практические аспекты современной криобиологии. М.: Научно-технический центр криобиологии и анабиоза. 60 с. (*Pichugin Y.I.* 2013. Theoretical and practical aspects of modern cryobiology. M.: Nauchno-Tekhn. Tsentri Kriobiol. Anabioz. 60 p.)
- Стволинский С.Л., Федорова Т.Н., Девятков А.А., Медведев О.С., Белоусова М.А., Рыжков И.Н., Тутельян В.А.* 2017. Нейропротективное действие карнозина в условиях экспериментальной фокальной ишемии-реперфузии головного мозга. Журн. неврологии и психиатрии. Т. 12. С. 60. (*Stvolinsky S.L., Fedorova T.N., Devyatov A.A., Medvedev O.S., Belousova M.A., Ryzhkov I.N., Tutelyan V.A.* 2017. Neuroprotective effect of carnosine in experimental focal ischemia-reperfusion of the brain. J. Neurol. Psychiatry. V. 12. P. 60.)
- Bae O., Majid A.* 2013. Role of histidine/histamine in carnosine-induced neuroprotection during ischemic brain damage. Brain Res. V. 1527. P. 246.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.07.004>
- Berezhnoy D.S., Stvolinsky S.L., Lopachev A.V., Devyatov A.A., Lopacheva O.M., Kulikova O.I., Abaimov D.A., Fedorova T.N.* 2019. Carnosine as an effective neuroprotector in brain pathology and potential neuromodulator in normal conditions. Amino Acids. V. 51. P. 139.
- Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W.* 2013. Physiology and pathophysiology of carnosine. Physiol. Rev. V. 93. P. 1803.
- Bonfanti L., Peretto P., De M.S., Fasolo A.* 1999. Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain. Prog. Neurobiol. V. 59. P. 333.
- De Marchis S., Modena C., Peretto P., Migheli A., Margolis F.L., Fasolo A.* 2000. Carnosine-related dipeptides in neurons and glia. Biochemistry. V. 65. P. 824.
- Hipkiss A.R., Preston J.E., Himsworth D.T., Worthington V.C., Keown M., Michaelis J., Lawrence J., Mateen A., Allende L., Eagles P.A.* 1998. Pluripotent protective effects of carnosine, a naturally occurring dipeptide. Ann. N.Y. Acad. Sci. V. 854. P. 37.
- Ichikawa J., Yamada R.X., Muramatsu R., Ikegaya Y., Matsuki N., Koyama R.* 2007. Cryopreservation of granule cells from

- the postnatal rat hippocampus. *J. Pharmacol. Sci.* V. 104. P. 387.
- Khama-Murad A.X., Pavlinova L.I., Mokrushin A.A.* 2008. Neurotropic effect of exogenous L-carnosine in cultured slices of the olfactory cortex from rat brain. *Bull. Exp. Biol. Med.* V. 146. P. 1–3.
<https://doi.org/10.1007/s10517-008-0227-y>
- Khama-Murad A., Mokrushin A., Pavlinova L.* 2011. Neuroprotective properties of L-carnosine in the brain slices exposed to autoblood in the hemorrhagic stroke model in vitro. *Regul. Pept.* V. 167. P. 65.
<https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.11.007>. Epub. 2010 Dec. 9.
- Lopachev A.V., Lopacheva O.M., Akkuratov E.E., Stvolinskii S.L., Fedorova T.N.* 2017. Carnosine protects a primary cerebellar cell culture from acute NMDA toxicity. *Neurochem. J.* V. 11. P. 38.
- Lopachev A.V., Kazanskaya R.B., Khutorova A.V., Fedorova T.N.* 2020. An overview of the pathogenic mechanisms involved in severe cases of COVID-19 infection, and the proposal of salicyl-carnosine as a potential drug for its treatment. *Eur. J. Pharmacol.* V. 886. P. 173457.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173457>
- Matsumura K., Hayashi F., Nagashima T.* 2021. Molecular mechanisms of cell cryopreservation with polyampholytes studied by solid-state NMR. *Commun. Materials.* V. 2. P. 116.
- Mokrushin A.A., Pavlinova L.I.* 2013. Effects of the blood components on the AMPA and NMDA synaptic responses in brain slices in the onset of hemorrhagic stroke. *Gen. Physiol. Biophys.* V. 32. P. 489.
- Mokrushin A.A., Pavlinova L.I., Borovikov S.E.* 2014. Influence of cooling rate on activity of ionotropic glutamate receptors in brain slices at hypothermia. *J. Therm. Biol.* V. 44. P. 5.
- Obrenovitch T.P., Urenjak J.* 1997. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Progress Neurobiol.* V. 51. P. 39.
- Ouyang L., Tian Y., Bao Y., Xu H., Cheng J., Wang B., Shen Y., Chen Z., Lyu J.* 2016. Carnosine decreased neuronal cell death through targeting glutamate system and astrocyte mitochondrial bioenergetics in cultured neuron/astrocyte exposed to ogd/recovery. *Brain Res. Bull.* V. 124. P. 76.
- Pepper E.D., Farrell M.J., Nord G., Finkel S.E.* 2010. Antiglycation effects of carnosine and other compounds on the long-term survival of escherichia coli. *Appl. Env. Microbiol.* V. 76. P. 7925.
- Rocha C.C., Kawai G.K.V., de Agostini L. J.D., Angrimani D., Rui B.R., de Cássia B.L., da Silva B., Alonso M.A., Mendes C.M.* 2018. Carnosine as malondialdehyde scavenger in stallion seminal plasma and its role in sperm function and oxidative status. *Theriogenol.* V. 119. P. 10.
- Sarkar P.K., Egusa A., Matsuzaki M., Sasanami T.* 2021. Effect of anserine and carnosine on sperm motility in the japanese quail. *J. Poult. Sci.* V. 58. P. 186.
- Sassoe-Pognetto M., Cantino D., Panzanelli P., Verdandi C.L., Giustetto M., Margolis F.L., De B.S., Fasolo A.* 1993. Presynaptic co-localization of carnosine and glutamate in olfactory neurones. *Neuroreport.* V. 5. P. 7.
- Solana-Manrique C., Sanz F.J., Martínez-Carrión G., Paricio N.* 2022. Antioxidant and neuroprotective effects of carnosine: therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Antioxidants.* V. 11. P. 848.
- Teufel M., Saudek V., Ledig J.P., Bernhardt A., Boularand S., Carreau A., Cairns N.J., Carter C., Cowley D., Duverger D.* 2003. Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *J. Biol. Chem.* V. 278. P. 6521.
- Tiedje K., Stevens K., Barnes S., Weaver D.* 2010. Beta-alanine as a small molecule neurotransmitter. *Neurochem. Int.* V. 57. P. 177.
- Warren D., Bickler P., Clark J., Gregersen M., Brosnan H., McKleroy W., Gabatto P.* 2012. Hypothermia and rewarming injury in hippocampal neurons involves intracellular Ca²⁺ and glutamate excitotoxicity. *Neurosci.* V. 207. P. 316.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.034>. Epub. 2012 Jan. 12.
- Zhang X., Song L., Cheng X., Yang Y., Luan B., Jia L., Xu F., Zhang Z.* 2011. Carnosine pretreatment protects against hypoxia-ischemia brain damage in the neonatal rat model. *Eur. J. Pharm.* V. 667. P. 202.
- Zemke D., Krishnamurthy R., Majid A.* 2005. Carnosine is neuroprotective in a mouse model of stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* V. 25. P. S313.

Cryoprotective Characteristics of L-Carnosine Dipeptide (β -Alanyl-L-Histidine)

A. A. Mokrushin*

Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: mok@inbox.ru

The dipeptide (β -alanyl-L-histidine) is found in significant amounts in the muscles and brain of mammals, especially in the olfactory structures. L-Carnosine exhibits many protective effects when exposed to various cytotoxic factors on cells. We used slices of the rat olfactory cortex to study the cryoprotective characteristics of L-carnosine during cryopreservation (CP). Changes in the activity of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) were analyzed during registration of NMDA potentials induced by electrical stimulation of the lateral olfactory tract. Brain slices were preincubated with L-carnosine (20 mM) in solution, frozen (-10°C), and after a long CP (30 days) they were warmed up to 37°C and changes in the amplitudes of NMDA potentials were determined. It was found that the dipeptide optimized the pH of the freezing solution after CP and retained the activity of NMDAR, determined by the

amplitude of NMDA potentials. L-Carnosine after CP contributed to the dehydration of excess free water from the slices. The dipeptide inhibited the development of glutamate excitotoxicity in brain slices during CP and maintained normal NMDAR functioning. The data obtained prove that L-carnosine exhibits the properties of an endogenous cryoprotector in the nervous tissue.

Keywords: L-Carnosine, cortical slices, NMDA receptors, focal potentials, freezing/thawing, cryopreservation

УДК 611.814.53

GFAP- И ВИМЕНТИН-ИММУНОПОЗИТИВНЫЕ СТРУКТУРЫ ЭПИФИЗА ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. Д. А. Суфиева¹, Е. А. Фёдорова¹, В. С. Яковлев¹, Д. Э. Коржевский¹, И. П. Григорьев¹, *

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197022 Россия

*E-mail: ipg-iem@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.10.2022 г.

После доработки 18.11.2022 г.

Принята к публикации 23.11.2022 г.

Эпифиз играет ключевую роль в координации различных функций организма. Основную часть клеток эпифиза составляют пинеалоциты, а вторые по количеству — глиальные клетки, данные по которым противоречивы. Настоящая работа предпринята для изучения астроглиальных клеток эпифиза человека с помощью иммуногистохимического метода с применением микроскопии проходящего света и, впервые, с использованием конфокальной лазерной микроскопии. Для маркирования астроцитов использовали антитела к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) и виментину. В эпифизе человека выявлено большое число GFAP- и виментин-иммунопозитивных структур. GFAP был локализован в полигональных клетках, расположенных в дольках среди пинеалоцитов, а виментин — в кровеносных сосудах и округлых клетках, локализованных преимущественно в трабекулах и частично в пинеальных дольках. И GFAP-, и виментин-иммунореактивные клетки имели по несколько длинных ветвящихся отростков, которые пронизывали всю паренхиму эпифиза, образуя густую сеть, и заканчивались на поверхности эпифиза, кровеносных сосудах и вокруг конкрементов. GFAP-иммунореактивные волокна плотно оплетали все конкременты (одиночные и в группах), тогда как виментин-иммуноположительные отростки окружали лишь часть из них. Исследование последовательных срезов эпифиза показало, что совпадение локализации GFAP и виментина для клеток эпифиза не типично. Можно полагать, что в эпифизе человека существуют две отдельные популяции астроцитоподобных клеток, GFAP- или виментин-содержащие, и различающиеся не только цитохимически, но и по морфологическим особенностям и локализации клеточных тел, а также по расположению отростков.

Ключевые слова: эпифиз, астроциты, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), виментин, конкременты

DOI: 10.31857/S0041377123020104, **EDN:** NDJWCZ

Эпифиз (шишковидное тело, пинеальная железа, лат. *glandula pinealis*) — это нейроэндокринный орган, основная функция которого состоит в том, чтобы получать информацию о текущем состоянии светового режима в окружающей среде (свет или темнота) и передавать эту информацию на внутренние системы организма с помощью секреции гормона мелатонина. Синтез и секреция мелатонина подвержены циркадным колебаниям: с наступлением темноты синтез мелатонина и его концентрация в крови значительно возрастает, при свете синтез мелатонина подавлен и концентрация его в крови падает. В соответствии с концентрацией мелатонина в крови в течение суток циклично меняется активность внутренних органов. Эпифиз играет ключевую роль в координации различных функций организма, в первую очередь, регуляции цикла бодрствование—сон, но, кроме того, влияет на репродуктивную функцию, иммунитет и реакцию организма на стресс. К настоящему времени установлено, что функциональная актив-

ность эпифиза нарушена при ряде нервных и психических заболеваний (болезнь Альцгеймера, заболевания аутистического спектра и др.), а также в старости (Stehle et al., 2011). Причины и механизмы этих нарушений, как и механизмы регуляции деятельности пинеалоцитов в норме пока не установлены.

Что касается структуры шишковидной железы у человека, то она имеет грушевидную форму, продольный размер составляет до 10 мм, поперечный — 4–8 мм. Эпифиз является частью эпифаламуса и расположен в задней части III желудочка, между каудальной комиссурой и дорсальной комиссурой уздечки, на верхних бугорках крыши среднего мозга. Паренхима пинеальной железы представлена дольками, частично разделенными соединительнотканью трабекулами и состоит из многочисленных клеток, пинеалоцитов и кровеносных сосудов.

Большинство клеток эпифиза составляют синтезирующие мелатонин эндокринные клетки — пинеалоциты. Кроме них в эпифизе выявлены глиальные

клетки, тучные и нейроноподобные клетки (Фёдорова и др., 2018; Pedersen et al., 1993; Sato et al., 1994; Ibanez Rodriguez et al., 2016; Григорьев и др., 2020; Csaki et al., 2021), причем астроцитоподобные клетки составляют вторую по численности клеточную популяцию после пинеалоцитов. К настоящему времени доказано, что астроглия в центральной нервной системе выполняет множество функций: она участвует в иммунной защите, обмене нейромедиаторов, синаптической передаче, синаптогенезе, нейрогенезе во взрослом мозге, в регуляции кровотока в мозговых сосудах, функционировании гематоэнцефалического барьера, водно-электролитном обмене (Sofroniew, Vinters, 2010; Butt, Verkhratsky, 2018; Lago-Baldaia et al., 2020). Учитывая полифункциональность астроглиальных клеток, не удивительно утверждение об их причастности к патогенезу многих, если не всех неврологических заболеваний (Sofroniew, Vinters, 2010; Verkhratsky et al., 2011; Dossi et al., 2018; Гомазков, 2020; Fernández-Blanco, Dierssen, 2020). Функции астроцитов, специфические для эпифиза, пока не определены, но вполне вероятно их участие в регуляции функциональной активности пинеалоцитов как в норме, так и при патологических состояниях. Однако, в отличие от структуры и функции пинеалоцитов, которые интенсивно исследовались в последние полвека, астроглиальные клетки эпифиза изучались недостаточно. Морфологическое описание астроцитов в эпифизе было дано с помощью классических гистологических методов еще в первой половине XX в. (Scharenberg, Liss, 1965), а попытки иммуногистохимического исследования пинеальных астроцитов предпринимались сразу после появления соответствующих специфических для астроглии антител, однако большая часть работ была проведена на эпифизе животных, тогда как астроглия эпифиза человека с помощью иммуногистохимии исследовалась в единичных работах, причем все – в начале 1980-х годов, в период, когда иммуногистохимические методы были несовершенны (Lowenthal et al., 1982; Papasozomenos, 1983; Zang, 1985). В настоящем исследовании морфологические особенности астроглиальных клеток эпифиза человека были изучены с помощью иммуногистохимии и впервые – с помощью конфокальной лазерной микроскопии с использованием двух взаимодополняющих маркеров астроцитов – антител к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) и виментину. Цель исследования состояла в изучении распределения и локализации GFAP- и виментин-иммунопозитивных структур в эпифизе человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследование проведено на образцах эпифиза человека ($n = 9$, 16–68 лет) из архива отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины. Архивация биологического материала была проведена с соблюдением этических норм, что подтверждено положительными заключениями ло-

кального этического комитета ФГБНУ ИЭМ № 58–9/1–684 от 11.12.2009 г. и № 2/22 от 06.04.2022 г. Образцы эпифиза были фиксированы в спирт–формалине или цинк–этанол–формалине (Korzhevskii et al., 2015), обезвожены и залиты в парафин по общепринятой методике. Из парафиновых блоков готовили серийные срезы толщиной 7 мкм на ротационном микротоме (Leica RM 2125RT) и наклеивали на предметные стекла с адгезивным покрытием Histobond+ (Marienfeld, Германия). После стандартной процедуры депарафинирования препараты подвергали тепловому демаскированию в цитратном модифицированном буфере S1700 (Dako, Дания).

Для иммуногистохимического исследования эпифиза мозга использовали антитела к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) (в разведении 1 : 500, Agilent-Dako, Santa Clara, CA, США) и виментину (клон SP-20 в разведении 1 : 200, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, США). В качестве вторичных антител для световой микроскопии использовали наборы Mach2 Universal HRP Polymer Kit for mouse and rabbit (Biocare Medical, США) и Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (Spring Bioscience, США). Для визуализации продукта иммуногистохимической реакции применяли 3,3-диаминобензидин (набор реагентов DAB+, Dako, Дания), часть срезов подкрашивали гематоксилином. Для конфокальной микроскопии в качестве вторичных реагентов применяли биотинилированные антитела против иммуноглобулинов кролика из набора R&D Cell and Tissue Staining Kit (R&D Systems, США) и биотинилированные вторичные антитела из набора VECTASTAIN Universal Quick HRP kit (Vector Labs, США). Затем срезы обрабатывали конъюгатом стрептавидина с флуорохромом Rhodamine Red™-X (RRX) (Jackson ImmunoResearch, США). Ядра были подкрашены флуоресцентным красителем SYTOX Green (Invitrogen, США). Срезы заключали в быстро сохнущую нефлуоресцирующую среду Cytoseal™ 60 (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, США).

Для исследования полученных препаратов использовали микроскоп Leica DM750 с цифровой фотокамерой ICC50 (Leica Microsystems, Wetzlar, Германия). Флуоресцентно окрашенные препараты изучали с помощью конфокального лазерного микроскопа LSM800 (Carl Zeiss, Oberkochen, Германия) с использованием программного обеспечения для обработки изображений Zen-2012 (Carl Zeiss, Oberkochen, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предварительный гистологический анализ образцов эпифиза человека показал их хорошую сохранность, типичное лобулярное строение, наличие многочисленных конкрементов (кальцификаты или псаммомные тельца) и отдельных кист в его паренхиме.

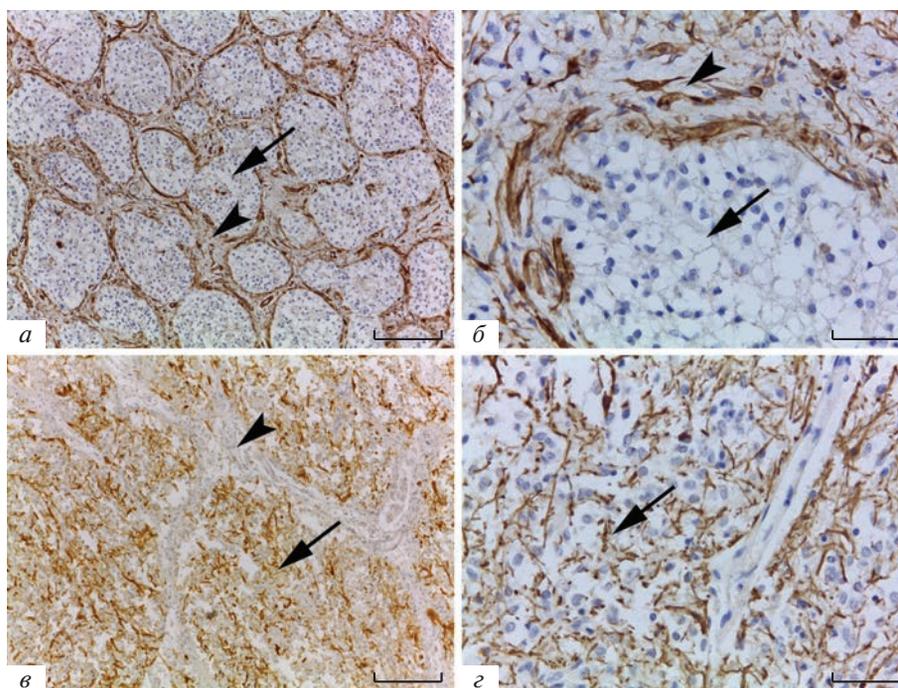


Рис. 1. Распределение астроцитарных маркеров в эпифизе человека. Иммуногистохимическая реакция на виментин (*a, б*) и GFAP (*в, г*). Преимущественная локализация виментина в кровеносных сосудах соединительнотканых трабекул эпифиза (*a, б*), GFAP – в дольке эпифиза (*в, г*). *a–в* – Стрелка – долька эпифиза, головка стрелки – трабекула эпифиза. *г* – GFAP⁺-волокна в паренхиме эпифиза (отмечены стрелкой). Масштабный отрезок равен 200 мкм (*a, в*) и 50 мкм (*б, г*).

Иммуногистохимическое исследование препаратов с помощью реакции на виментин показало, что этот белок выявляется преимущественно в клетках трабекул, разделяющих паренхиму эпифиза на дольки (рис. 1). Как правило, иммунопозитивными оказываются клетки, ассоциированные с кровеносными сосудами, которые четко прослеживаются в составе трабекул и редко выявляются в составе паренхимы эпифиза. Эти клетки имеют округлую или овальную форму и обычно 1–2 отростка, которые могут оканчиваться на кровеносных сосудах, и морфологически отличаются от типичных звездчатых астроцитов. Виментин-иммунопозитивные отростки локализуются чаще в трабекулах эпифиза. В некоторых случаях наблюдаются отдельные области в эпифизе с многочисленными виментин-иммунопозитивными клеточными телами и отростками.

Иммуногистохимическое окрашивание препаратов с помощью антител к GFAP в светооптическом микроскопе обнаружило многочисленные равномерно распределенные GFAP-иммунореактивные отростки и отдельные клеточные тела в паренхиме эпифиза (рис. 1*в, г*). Отростки образовывали густую сеть, которая оплетала кровеносные сосуды и конкременты (рис. 1*г, 4в, г*). GFAP-иммунореактивные клеточные тела были меньше пинеалоцитов, встречались редко, обычно среди пинеалоцитов внутри долек. Исследование с помощью конфокального лазерного микроскопа показало, что тела GFAP⁺-аст-

роцитов имеют полигональную форму, толстые первичные отростки и несколько тонких разветвляющихся вторичных отростков (рис 2*а, б*). Отростки располагались между пинеалоцитами в дольках эпифиза, причем редко удавалось увидеть, чтобы отростки проходили через трабекулы (рис. 2*а*). Сети разнонаправленных и пучки однонаправленных GFAP-иммунопозитивных волокон встречались примерно с такой же частотой, что и виментин-иммунореактивные. Часто волокна образовывали густое сплетение в центральной части эпифиза, на периферии располагались с меньшей плотностью, но формировали очень плотную кайму по краевой поверхности (рис. 2*д*).

При исследовании последовательных срезов, окрашенных на виментин и GFAP, было обнаружено, что виментин-иммунопозитивные тела и отростки не совпадают по локализации с GFAP-иммунопозитивными, то есть представляют собой две разные популяции клеток (рис. 3*а, б*). Эта картина наблюдается и при исследовании случаев, в которых присутствовал обширный глиоз. Области с глиозом локализовались, как правило, в центральной части эпифиза, где отростки и тела глиальных клеток располагались концентрически. При этом при окраске на GFAP в этой области наблюдались лишь однонаправленные отростки и окрашенные гематоксилином ядра клеток, в то время как на параллельном срезе при окраске на виментин помимо разнона-

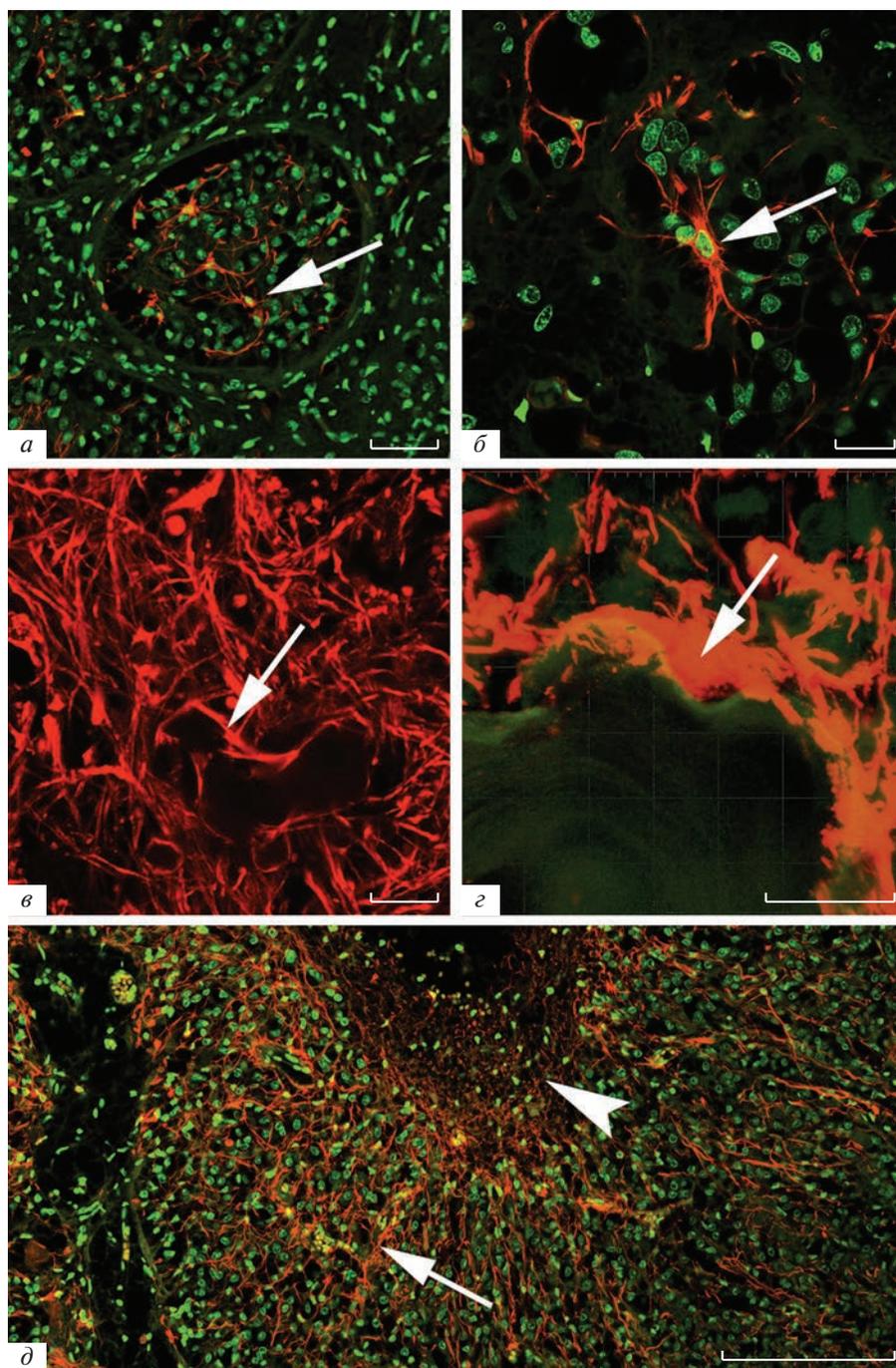


Рис. 2. Распределение GFAP в эпифизе человека. Конфокальная лазерная микроскопия. Иммуногистохимическая реакция на GFAP (красная флуоресценция) с подкраской ядер SYTOX Green (зеленый цвет). *а, б* – локализация и морфология GFAP⁺-астроцитов (указаны *стрелкой*) в пределах дольки эпифиза. *в, г* – Изолирующая глиальная прослойка, сформированная отростками астроцитов (указаны *стрелкой*), К – кальцификат. *д* – Краевая область эпифиза. *Одиночная стрелка* – отростки астроцитов, *головка стрелки* – краевая область эпифиза. *а, б, д* – одиночный оптический срез, *г* – трехмерная реконструкция, *в* – проекция 37 оптических срезов. Масштабный отрезок равен 50 (*а*), 20 (*б*), 10 (*в, г*), 200 мкм (*д*).

правленных отростков (которые были более редкими по сравнению с GFAP⁺-отростками) наблюдались и виментин⁺-тела округлой и полигональной формы (рис. 3*в, г*).

В большинстве исследованных случаев в эпифизе были обнаружены многочисленные кальцификаты, которые были либо одиночными, либо формировали группы. Они могут локализоваться как в цен-

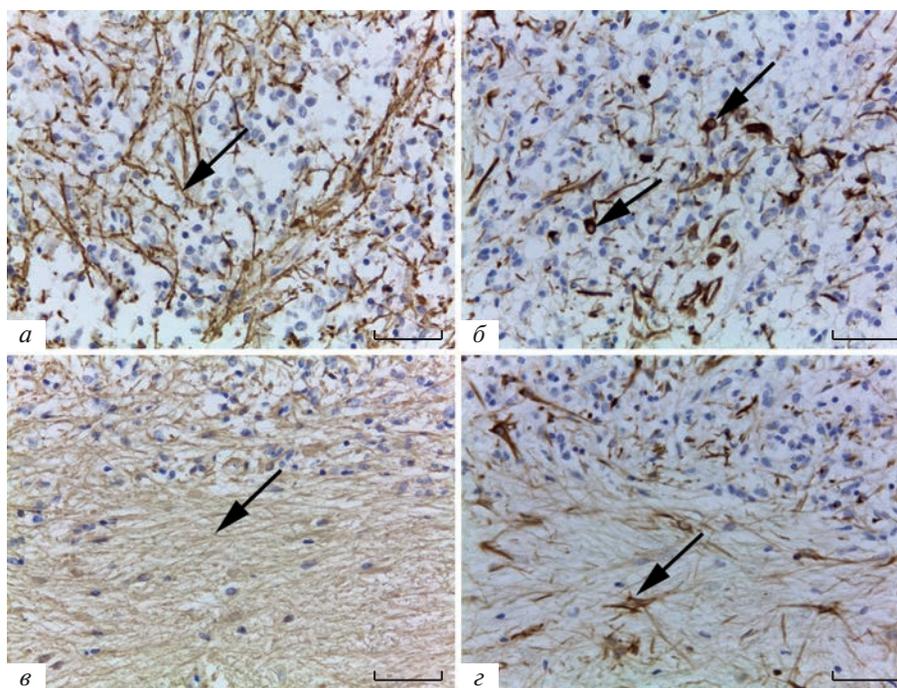


Рис. 3. Различная локализация GFAP⁺- и виментин⁺-структур на последовательных срезах эпифиза человека. Распределение GFAP⁺-волокон (а) и виментин⁺-тел (б) в паренхиме долек. в, г — обширный глиоз в эпифизе человека. Стрелками отмечены отростки GFAP⁺-волокон (а, в) и виментин-иммунопозитивных клеточных тел (б, г). Ядра клеток окрашены гематоксилином. Масштабный отрезок равен 50 мкм.

тральных областях эпифиза, так и по периферии. GFAP- и виментин-иммунореактивные волокна оплетают своими отростками и одиночные конкременты, и их группы, формируя изолирующую прослойку от окружающей нервной ткани (рис 4а, в). При этом при окраске на виментин не все конкременты (как правило, это касается одиночных кальцификатов) были изолированы виментин-иммунореактивными волокнами (рис 4б), в отличие от GFAP, который наблюдался вокруг всех кальцификатов (рис. 4в, г). При исследовании с помощью конфокального лазерного микроскопа и построения трехмерных реконструкций видно, что в областях локализации кальцификатов GFAP⁺-волокна формируют густую сеть, а сама глиальная изолирующая прослойка плотно примыкает по всей поверхности кальцификата.

При попадании на препарат вместе с эпифизом соседних участков мозга обращало на себя внимание, что виментин-иммунопозитивные волокна и тела клеток встречались в эпифизе в значительно большем количестве, чем в прилежащих отделах головного мозга.

ОБСУЖДЕНИЕ

В представленной иммуногистохимической работе были использованы антитела к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) и виментину

(виментин ранее в эпифизе человека не исследовался). GFAP — это белок промежуточных филаментов астроцитов и общепризнанный селективный маркер астроглиальных клеток (Сухорукова и др., 2015; Kovacs, 2017; O’Leary et al., 2020). Виментин — также белок промежуточных филаментов, который представлен преимущественно в клетках мезенхимного происхождения. В раннем онтогенезе виментин экспрессируется почти во всех клетках, но по мере их дифференцировки, этот белок в большинстве клеток перестает синтезироваться, и его можно обнаружить только в некоторых типах клеток, таких как фибробласты, эндотелиоциты, макрофаги, меланоциты, шванновские клетки и эндимиоциты (Kovacs, 2017; O’Leary et al., 2020; Sarnat, Yu, 2022). В полном соответствии с этими данными мы наблюдали иммунореактивность виментина в эндотелиальных клетках сосудов, а также в астроцитоподобных клетках эпифиза человека. Кроме того, виментин выявлен в ряде клеток, которые не являются астроцитоподобными клетками стромы эпифиза. Последние, по нашим наблюдениям, имели округлую форму, обычно 1–2 отростка и морфологически отличались от типичных звездчатых астроцитов. GFAP-иммунопозитивные клетки имеют полигональную форму, как правило, несколько толстых первичных отростков, от которых отходят тонкие разветвляющиеся отростки, что более соответствует форме волокнистых астроцитов. Характерно, что если GFAP-иммунореактивные тела клеток располагались среди пи-

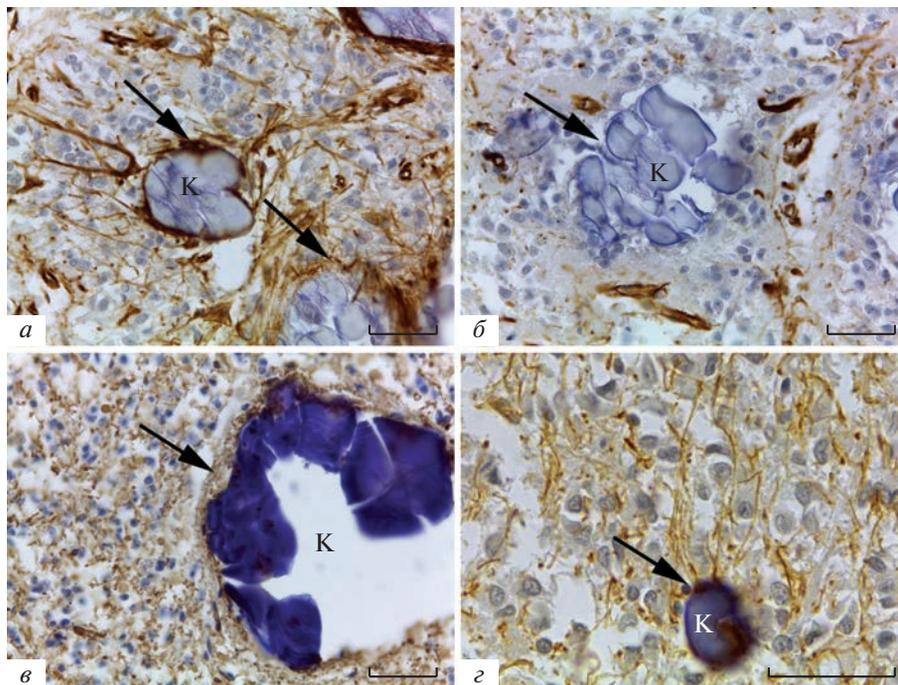


Рис. 4. Кальцификаты в эпифизе человека. Иммуногистохимическая реакция на виментин (*а, б*) и на GFAP (*в, г*). Виментин⁺- (*а*) и GFAP⁺- (*в, г*) волокна формируют изолирующую прослойку от окружающей ткани. *б* – Отсутствие глиальной прослойки вокруг группы кальцификатов, при окраске на виментин. Ядра клеток окрашены гематоксилином. К – кальцификат.

неалоцитов в пинеальных дольках, то виментин-иммунореактивные клеточные тела встречались в дольках эпифиза редко, чаще они локализовались в соединительнотканых трабекулах.

Длинные виментин-иммунореактивные волокна тянутся через всю толщу эпифиза и могут заканчиваться на краевой поверхности, кровеносных сосудах или окружать кальцификаты. Однако характерно, что если GFAP-иммунореактивные волокна оплетают практически все конкременты, одиночные и в группах, формируя плотную изолирующую прослойку от окружающей ткани, то виментин-иммунореактивные отростки окружают только часть из них. Возможно, виментин-иммуноположительные клетки оплетают кальцификаты, которые формировались в области трабекул эпифиза.

Известно, что в ходе нормального и патологического развития центральной нервной системы радиальная глия и незрелые астроциты экспрессируют в основном виментин, а по мере дифференцировки – преимущественно GFAP. Поэтому считается, что виментин характерен для дифференцирующихся астроцитов, а глиальный фибриллярный кислый белок – для зрелых астроглиальных клеток (Boya, Calvo, 1993). Исходя из этих данных, можно было бы предположить, что в эпифизе человека существует пул зрелых (содержащих GFAP) и пул незрелых (содержащих виментин) астроцитов. Однако, по нашим наблюдениям, виментин-иммунореактивные клетки обладают хорошо развитой сетью отростков,

пронизывающих все части эпифиза, плотно опутывающие кровеносные сосуды, конкременты и выходящие на краевую поверхность, вследствие чего их трудно считать незрелыми. Кроме того, сопоставленные распределения GFAP и виментина на соседних срезах не позволило в подавляющем большинстве случаев обнаружить совпадения их локализации, что свидетельствует против сококализации этих двух белков и указывает на отсутствие или малое число переходных форм астроцитов, содержащих оба белка одновременно. Эти данные приводят к выводу, что в эпифизе человека астроглия представлена двумя цитохимически различающимися подвидами: GFAP- и виментин-содержащими астроцитоподобными клетками. Нужно заметить, что ранее сходное разделение астроцитов на субпопуляции, различающиеся по цитохимическому составу, отмечали в эпифизе взрослых лабораторных животных (Huang et al., 1984; Schachner et al., 1984; Calvo et al., 1988; López-Muñoz, 1992), однако в эпифизе человека две цитохимически различные субпопуляции глиальных клеток описаны впервые в настоящем исследовании. Кроме того, виментин-иммунопозитивные клетки также могут быть представлены двумя подтипами: виментин⁺-клетками, расположенными в трабекулах, и виментин⁺-клетками, локализованными в дольках эпифиза. Эти подтипы могут различаться функционально в связи с разной локализацией в эпифизе.

Обильное представление астроглиальных волокон на поверхности эпифиза, омываемой цереброспинальной жидкостью III желудочка мозга, указывает на возможное их участие также в транспортных процессах между эпифизом и ликвором, в том числе, возможно, в транспортировке мелатонина из пинеалоцитов в ликвор.

Густое оплетение астроглиальными волокнами пинеальных конкреций пока не имеет объяснения, поскольку неизвестна причина возникновения и возможная функция конкреций. Они представляют собой минерализованные (кальцифицированные) остатки органических соединений, обладают рядом интересных биофизических свойств, встречаются в эпифизе людей разного возраста примерно в одинаковом количестве и число их заметно изменяется при ряде нервных и психических заболеваний (Vannier et al., 2002; Фокин и др., 2006). Самое простое объяснение заключается в том, что астроглиальные волокна изолируют конкреции для защиты от механического повреждения пинеальных клеток и волокон. Так ли это на самом деле, ещё предстоит выяснить.

Суммируя, можно сказать, что проведенное исследование показало наличие в эпифизе человека небольшого числа астроцитоподобных клеток, которые располагаются в дольках среди плотно упакованных пинеалоцитов и дают начало многочисленным разветвленным волокнам большой длины, которые образуют густую сеть во всей паренхиме эпифиза. Продемонстрировано наличие двух подтипов клеток — содержащих либо GFAP, либо виментин, которые отличаются не только цитохимически, но и морфологически, а также локализуются в разных компартментах эпифиза (GFAP⁺-клетки локализуются преимущественно в дольках, виментин⁺-клетки — в трабекулах эпифиза). Установлено, что кальцификаты оплетены волокнами астроцитов. При этом GFAP⁺-астроциты заметно чаще чем виментин⁺-астроциты формировали изолирующую прослойку вокруг конкрементов. Все вышесказанное может указывать и на функциональные различия этих двух подтипов глиоцитов. Последующие исследования глиальных клеток эпифиза помогут установить их роль в нормальном функционировании пинеалоцитов, а также понять их причастность к развитию различных патологий эпифиза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Представленные изображения получены с помощью оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием “Микробиом человека” при ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет финансирования Российского научного фонда (проект № 22-25-20051, <https://rscf.ru/project/22-25-20051/>) и Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 14.04.2022 г. № 47/2022.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа выполнена с соблюдением этических норм, что подтверждено положительными заключениями локального этического комитета Института экспериментальной медицины № 58–9/1–684 от 11.12.2009 г. и № 2/22 от 06.04.2022 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Д.А. Суфиева: написание текста статьи, фотографирование и анализ препаратов, подготовка иллюстраций; Е.А. Федорова: постановка иммуногистохимических реакций, фотографирование препаратов; В.С. Яковлев: изготовление срезов, постановка иммуногистохимических реакций; Д.Э. Коржевский: редактирование рукописи статьи; И.П. Григорьев: дизайн эксперимента, анализ препаратов и написание текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гомазков О.А. 2020. Астроциты мозга и синаптический диссонанс: нейродегенеративная и психическая патология. Усп. совр. биол. Т. 140. №. 2. С. 130. (Gomazkov O.A. 2020. Brain astrocytes and synaptic dissonance: neurodegenerative and mental pathology. Usp. Sovr. Biol. V. 140. P. 130. [Article in Russian].) <https://doi.org/10.31857/S0042132420010019>
- Григорьев И.П., Фёдорова Е.А., Суфиева Д.А., Коржевский Д.Э. 2020. Иммуногистохимическое исследование клеточной организации эпифиза человека. Морфология. Т. 158. № 4–5. С. 19. (Grigorev I.P., Fedorova E.A., Sufieva D.A., Korzhevskii D.E. 2021. Immunohistochemical studies of cell organization in the human epiphysis. Neurosci. Behav. Physiol. V. 51. P. 546.) <https://doi.org/10.1007/s11055-021-01103-4>
- Сухорукова Е.Г., Коржевский Д.Э., Алексеева О.С. 2015. Глиальный фибриллярный кислый белок — компонент промежуточных филаментов астроцитов мозга позвоночных. Журн. эвол. биох. физиол. Т. 51. № 1. С. 3. (Sukhorukova E.G., Korzhevskii D.E., Alekseeva O.S. 2015. Glial fibrillary acidic protein: the component of intermediate filaments in the vertebrate brain astrocytes. J. Evol. Biochem. Physiol. V. 51. P. 1.) <https://doi.org/10.1134/S0022093015010019>
- Фёдорова Е.А., Суфиева Д.А., Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. 2018. Тучные клетки эпифиза человека. Усп. геронтол. Т. 31. № 4. С. 484. (Fedorova E.A., Sufieva D.A., Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. 2018. Mast cells of the hu-

- man pineal gland. *Adv. Gerontol.* V. 9. P. 62.)
<https://doi.org/10.1134/S2079057019010053>
- Фокин Е.А., Савельев С.В., Гулимова В.И., Асадчиков В.Е., Сенин Р.А., Бузмаков А.В. 2006. Морфогенез и пространственная организация конкрементов эпифиза человека при болезни Альцгеймера, шизофрении и алкоголизме. *Арх. патол.* Т. 68. № 5. С. 20. (Fokin E.I., Savel'ev S.V., Gulimova V.I., Asadchikov E.V., Senin R.A., Buzmakov A.V. 2006. The morphogenesis and spatial organization of human pineal gland concretions in Alzheimer's disease, schizophrenia, and alcoholism. [Article in Russian]. *Arkh. Patol.* V. 68. P. 20.)
- Bacconnier S., Lang S.B., Polomska M., Hilczek B., Berkovic G., Meshulam G. 2002. Calcite microcrystals in the pineal gland of the human brain: first physical and chemical studies. *Bioelectromagnetics.* V. 23. P. 488.
<https://doi.org/10.1002/bem.10053>
- Boya J., Calvo J.L. 1993. Immunohistochemical study of the pineal astrocytes in the postnatal development of the cat and dog pineal gland. *J. Pineal Res.* V. 15. P. 13.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1993.tb00504.x>
- Butt A., Verkhatsky A. 2018. Neuroglia: realising their true potential. *Brain Neurosci. Adv.* V. 2. 2398212818817495.
<https://doi.org/10.1177/2398212818817495>
- Calvo J., Boya J., Borregon A., Garcia-Mauriño J.E. 1988. Presence of glial cells in the rat pineal gland: a light and electron microscopic immunohistochemical study. *Anat. Rec.* V. 220. P. 424.
<https://doi.org/10.1002/ar.1092200412>
- Csaki A., Koves K., Kiss A.L., Rohlich P., Boldogkoi Z., Vereczki V., Puskar Z., Tombacz D., Csabai Z. 2021. Pinealocytes can not transport neurotropic viruses. Pinealo-to-retinal connection in prepubertal rats originates from pineal neurons: Light and electron microscopic immunohistochemical studies. *Neurosci. Lett.* V. 23. P. 135517.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135517>
- Dossi E., Vasile F., Rouach N. 2018. Human astrocytes in the diseased brain. *Brain Res. Bull.* V. 136. P. 139.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.02.001>
- Fernández-Blanco Á., Dierssen M. 2020. Rethinking intellectual disability from neuro-to astro-pathology. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 9039.
<https://doi.org/10.3390/ijms21239039>
- Huang S.-K., Nobiling R., Schachner M., Taugner R. 1984. Interstitial and parenchymal cells in the pineal gland of the golden hamster. *Cell Tissue Res.* V. 235. P. 327.
<https://doi.org/10.1007/bf00217857>
- Ibanez Rodriguez M.P., Noctor S.C., Munoz E.M. 2016. Cellular basis of pineal gland development: emerging role of microglia as phenotype regulator. *PLoS One.* V. 11. P. e0167063.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167063>
- Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. 2015. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur. J. Histochem.* V. 59. P. 2530.
<https://doi.org/10.4081/ejh.2015.253026428887>
- Kovacs G.G. 2017. Cellular reactions of the central nervous system. *Handb. Clin. Neurol.* V. 145. P. 13.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00003-1>
- Lago-Baldaia I., Fernandes V.M., Ackerman S.D. 2020. More than mortar: Glia as architects of nervous system development and disease. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8. P. 611269.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.611269>
- López-Muñoz F., Calvo J.L., Boya J., Carboneil A.L. 1992. Co-expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in glial cells of the adult rat pineal gland. *J. Pineal Res.* V. 12. P. 145.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1992.tb00041.x>
- Lowenthal A., Flament-Durand J., Karcher D., Noppe M., Brion J.P. 1982. Glial cells identified by anti- α -albumin (anti-GFA) in human pineal gland. *J. Neurochem.* V. 38. P. 863.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1982.tb08714.x>
- O'Leary L.A., Davoli M.A., Belliveau C., Tanti A., Ma J.C., Farmer W.T., Turecki G., Murai K.K., Mechawar N. 2020. Characterization of vimentin-immunoreactive astrocytes in the human brain. *Front. Neuroanat.* V. 14. P. 31.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00031>
- Papasozomenos S.C. 1983. Glial fibrillary acidic (GFA) protein-containing cells in the human pineal gland. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* V. 42. P. 391.
<https://doi.org/10.1097/00005072-198307000-00003>
- Pedersen E.B., Fox L.M., Castro A.J., McNulty J.A. 1993. Immunocytochemical and electron-microscopic characterization of macrophage/microglia cells and expression of class II major histocompatibility complex in the pineal gland of the rat. *Cell Tissue Res.* V. 272. P. 257.
<https://doi.org/10.1007/bf00302731>
- Sarnat H.B., Yu W. 2022. Ganglion cell maturation in peripheral neuroblastic tumours of children. *Clin. Neuropathol.* V. 41. P. 101.
<https://doi.org/10.5414/NP301450>
- Sato T., Kaneko M., Fujieda H., Deguchi T., Wake K. 1994. Analysis of the heterogeneity within bovine pineal gland by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Cell Tissue Res.* V. 277. P. 201.
<https://doi.org/10.1007/bf00327768>
- Schachner M., Huang S.-K., Ziegelmüller P., Bizzini B., Taugner R. 1984. Glial cells in the pineal gland of mice and rats. *Cell Tissue Res.* V. 237. P. 245.
<https://doi.org/10.1007/bf00217142>
- Scharenberg K., Liss L. 1965. The histologic structure of the human pineal body. Structure and Function of the Epiphysis Cerebri. *Prog. Brain Res.* V. 10. P. 193.
[https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)63452-4](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)63452-4)
- Sofroniew M.V., Vinters H.V. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* V. 119. P. 7.
<https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Stehle J.H., Saade A., Rawashdeh O., Ackermann K., Jilg A., Sebesteny T., Maronde E. 2011. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J. Pineal Res.* V. 51. P. 17.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00856.x>
- Verkhatsky A., Sofroniew M.V., Messing A., DeLanerolle N.C., Rempe D., Rodriguez J.J., Nedergaard M. 2011. Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism. *ASN NEURO* V. 4. art: e00082.
<https://doi.org/10.1042/AN20120010>
- Zang X., Nilaver G., Stein B.M., Fetell M.R., Duffy P.E. 1985. Immunocytochemistry of pineal astrocytes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* V. 44. P. 486.
<https://doi.org/10.1097/00005072-198509000-00004>

GFAP- and Vimentin-Containing Structures in Human Pineal Gland**D. A. Sufieva^a, E. A. Fedorova^a, V. S. Yakovlev^a, D. E. Korzhevskii^a, and I. P. Grigorev^{a, *}**^a*Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, 197022 Russia*^{*}*e-mail: ipg-iem@yandex.ru*

The pineal gland plays a key role in coordinating various bodily functions. The main part of the pineal cells are pinealocytes, and the second largest are glial cells, the data on which are contradictory. The purpose of this study is to investigate the astroglial cells in the human pineal gland using immunohistochemistry with transmitted light microscopy and, for the first time, with confocal laser microscopy. Astrocytes were labeled with antibodies to glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin. A large number of GFAP- and vimentin-expressing structures were revealed in the human pineal gland. GFAP was localized in polygonal cells located among pinealocytes in lobules, while vimentin was localized in blood vessels and rounded cells localized mainly in trabeculae and partially in pineal lobules. Both GFAP- and vimentin-immunoreactive cells gave rise to several long branching processes that penetrated the entire pineal parenchyma, forming a dense network, and ended on the surface of the pineal gland, blood vessels, and around calcifications. GFAP-immunoreactive fibers tightly entwined all calcifications (single and in groups), while vimentin-immunopositive processes surrounded only a part of them. The study of consecutive sections of the pineal gland showed very rare (if any) coincidence of the localization of GFAP and vimentin in pineal cells. The obtained data suggest that there are two separate populations of astrocyte-like cells in the human pineal gland, that express GFAP or vimentin and differ not only cytochemically, but also in morphological features and localization of cell bodies, as well as in the distribution of processes.

Keywords: pineal gland, astrocytes, glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin, calcifications

ПЕРИЦИТЫ КАК НЕОБХОДИМЫЙ КЛЕТОЧНЫЙ ЭЛЕМЕНТ В TRANSWELL-МОДЕЛИ ГЭБ *IN VITRO*

© 2023 г. А. И. Мосягина¹, *, Е. Д. Хилажева¹, А. В. Моргун¹

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

*E-mail: angelina.mosiagina@gmail.com

Поступила в редакцию 07.10.2022 г.

После доработки 24.11.2022 г.

Принята к публикации 24.11.2022 г.

Цель настоящей работы заключалась в демонстрации преимущества четырехклеточной модели гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) *in vitro* в сравнении с традиционной трехклеточной моделью, а также влияния перицитов на фенотип эндотелиальных клеток. В работе описан способ сокультивирования первичных эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга, перицитов, астроцитов и нейронов в Transwell-модели ГЭБ *in vitro*. Проведен количественный анализ между показателями трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС), а также между содержанием маркеров плотных контактов эндотелиальных клеток в трех- и четырехклеточной Transwell-моделях ГЭБ. Согласно полученным данным, присутствие перицитов сопровождается более высокими показателями ТЭС и более высоким содержанием белков плотных контактов. Представленные результаты согласуются с мировой научной литературой и подтверждают гипотезу о том, что перициты выполняют не только опорную функцию для эндотелиальных клеток, но и являются важным метаболическим звеном, регулирующим барьерные функции ГЭБ. Таким образом, сокультивирование клеток нейроваскулярной единицы (НВЕ) головного мозга с перицитами необходимо для формирования у эндотелиальных клеток фенотипа, приближенного к условиям в микроокружении НВЕ *in vivo*.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, Transwell, перициты, нейроваскулярная единица, плотные контакты

DOI: 10.31857/S0041377123020050, **EDN:** LWQJAN

Нейроваскулярная единица (НВЕ) представляет собой морфофункциональную единицу гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и является совокупностью клеток, обеспечивающих взаимодействие нейронов и церебральных микрокапилляров для обеспечения энергетических потребностей головного мозга. К ключевым компонентам НВЕ относят перициты, а их дисфункция является одним из звеньев патогенеза при таких заболеваниях, как болезнь Альцгеймера (Nortley et al., 2019) и ишемический инсульт (Yang et al., 2017), поэтому все больше исследований направлено на определение роли перицитов в функционировании НВЕ головного мозга. Так, в ряде работ было показано, что перициты выполняют не только опорную функцию, но и регулируют проницаемость, сократимость и пролиферативную активность эндотелиального слоя, ангиогенез, а также могут выполнять роль периваскулярных тканевых макрофагов (Sweeney et al., 2016).

В настоящее время наиболее распространенными моделями ГЭБ *in vitro* являются трехклеточные Transwell-модели, однако они не отражают в должной степени клеточный состав НВЕ и характеризуются относительно низкими значениями трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС) и высокой проницаемостью (Hatherell et al., 2011; Srinivasan, Kolli, 2019). Сфероидные модели ГЭБ *in vitro* (Nzou et al., 2018) и микрофлюидные системы (Shin et al., 2019) также находят широкое применение, однако хотя и обладают приближенными к микроокружению *in vivo* характеристиками, но вместе с тем являются более сложными в воспроизведении. Таким образом, несмотря на всю простоту, Transwell-модели могут предложить ряд значительных преимуществ: они просты в реализации и управлении, экономически доступны, а также позволяют использовать широкий спектр методов исследования.

Цель настоящей работы заключалась в том, чтобы продемонстрировать преимущества использования четырехклеточной модели ГЭБ *in vitro* относительно традиционной трехклеточной модели, а также показать значение перицитов в функционировании НВЕ

Принятые сокращения: ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; НВЕ – нейроваскулярная единица; ТЭС – трансэндотелиальное электрическое сопротивление.

и формировании у эндотелиальных клеток фенотипа, наиболее близкого к условиям в микроокружении *in vivo*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали первичные культуры эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга, астроцитов, нейронов и перицитов, полученные из крыс линии Wistar в возрасте P4–P10 ($n = 10$).

Выделение и культивирование церебральных эндотелиоцитов. Церебральные эндотелиоциты получали согласно известному протоколу (Liu et al., 2013) с модификациями. Животных декапитировали после охлаждения на льду с последующим забором головного мозга и удалением мозговых оболочек и крупных церебральных сосудов методом роллинга на фильтровальной бумаге. Далее выделяли кору головного мозга в холодном растворе Хенкса (ПанЭко, Россия), измельчали до размеров 1 мм^3 и центрифугировали в течение 3 мин при 150 g и комнатной температуре. Далее к осадку добавляли 25%-ную сыворотку FBS (HyClone, США) в PBS (ПанЭко, Россия) в двукратном объеме относительно объема осадка, тритурировали и центрифугировали гомогенат в течение 10 мин при 600 g . Нижний слой переносили в новую пробирку 15 мл и трижды повторяли этапы тритурирования и центрифугирования. Далее производили ферментативную обработку осадка в двукратном объеме 0.1% -ной коллагеназы II (ПанЭко, Россия) в течение 35 мин в условиях инкубатора (37°C , $5\% \text{ CO}_2$), после чего осадок ресуспензировали и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин. Фрагменты и отдельные эндотелиальные клетки культивировали в культуральных флаконах T-75, предварительно покрытых желатином (Gelatin Solution 0.1% ; Biological Industries, США), в условиях CO_2 -инкубатора с использованием культуральной среды следующего состава: DMEM (ПанЭко, Россия), $20\% \text{ FBS}$ (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, США). Смену питательной среды производили каждые 3 сут.

Выделение и культивирование нейросфер. Головной мозг забирали, выделяли гиппокамп в холодном растворе Хенкса (ПанЭко, Россия), измельчали до размеров 1 мм^3 и переносили для осаждения в пробирку 15 мл со свежим раствором 2% -ной глюкозы (Sigma-Aldrich, США) в PBS (ПанЭко, Россия) на 1 мин. Далее удаляли супернатант, ресуспензировали осадок в 1 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, США) и тритурировали до получения однородной суспензии клеток. К полученной суспензии добавляли 1 мл свежей среды. После осаждения неразделенных кусочков ткани переносили супернатант в новую пробирку и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин, после чего удаляли суперна-

тант и ресуспензировали осадок в 1 мл свежей среды. Клетки культивировали в культуральных флаконах T-75 в условиях CO_2 -инкубатора с использованием культуральной среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, США). Через $24\text{--}48 \text{ ч}$ наблюдали образование нейросфер.

Получение астроцитов и нейронов. Культуру астроцитов и нейронов получали из нейросфер путем направленной дифференцировки. Дифференцировку нейросфер в астроциты проводили в среде Astrocyte Medium (ScienCell, США): базальная среда (Basal Medium; ScienCell, США), $10\% \text{ FBS}$ (HyClone, США), 5 мл AGS (astrocyte growth supplement; ScienCell, США), раствор пенициллина и стрептомицина (ScienCell, США) в конечной концентрации 50 ЕД/мл . Через $7\text{--}9$ сут культивирования в среде Astrocyte Medium наблюдали образование монослоя астроцитов. Дифференцировку нейросфер в нейроны проводили в среде Neuronal Medium (ScienCell, США): базальная среда (Basal Medium; ScienCell, США), $10\% \text{ FBS}$ (HyClone, США), 5 мл NGS (neuronal growth supplement; ScienCell, США), раствор пенициллина-стрептомицина (ScienCell, США) в конечной концентрации 50 ЕД/мл . Через $7\text{--}9$ сут культивирования в среде Neuronal Medium наблюдали образование нейронов.

Выделение и культивирование перицитов. Перициты получали согласно известному протоколу (Crouch, Doetsch, 2018) с модификациями. После извлечения головного мозга помещали в чашку Петри с холодным раствором PBS (ПанЭко, Россия). Лезвием бритвы производили 4 корональных среза и далее в каждом срезе выделяли кору и вентрикулярно-субвентрикулярную зону (V-SVZ). Выделенную ткань измельчали до размера 1 мм^3 и центрифугировали при 300 g и комнатной температуре в течение 5 мин, после чего супернатант удаляли, а осадок ресуспензировали в 0.25 мл раствора коллагеназы и диспазы (ПанЭко, Россия) и 7.25 мл 2% -ной сыворотки FBS (HyClone, США) в PBS (ПанЭко, Россия). Ферментативную обработку осадка производили в течение 30 мин в условиях CO_2 -инкубатора, далее осадок центрифугировали при 300 g в течение 5 мин, удаляли супернатант, ресуспензировали содержимое пробирки в растворе для тритурации, содержащем 50 мкл ДНКазы (Invitrogen, США) и 1 мл 2% -ной сыворотки FBS (HyClone, США) в PBS (ПанЭко, Россия), и тритурировали.

После этого содержимое пробирки аккуратно добавляли поверх перколлы в пробирку 15 мл , содержащую 8 мл 22% -ного перколлы (GE, США). Пробирку центрифугировали при 560 g в течение 10 мин, удаляли супернатант с облаком миелина, ресуспензировали клеточный осадок в 1 мл раствора Хенкса (HyClone, США) и центрифугировали при 300 g и комнатной температуре в течение 5 мин. Снова удаляли супернатант, осадок ресуспензировали в среде следующего состава: базальная среда (Basal Medium;

ScienCell, США), 2% FBS (HyClone, США), 5 мл PGS (Pericyte Growth Supplement; ScienCell, США), раствор пенициллина и стрептомицина (ScienCell, США) в конечной концентрации 50 Ед./мл. Клетки культивировали в культуральных флаконах в условиях CO₂-инкубатора. Через 7–9 сут наблюдали образование монослоя пероцитов.

Получение трехклеточной модели ГЭБ *in vitro*. Трехклеточную модель ГЭБ *in vitro* получали согласно изложенному ранее протоколу Хилажевой и соавторов (2015). Для оценки показателей ТЭС смесь астроцитов и нейронов в соотношении 1 : 1 помещали на дно лунок культурального 24-луночного планшета, затем устанавливали культуральные вставки (Corning-Costar, США), на которые помещали эндотелиальные клетки. Для оценки содержания молекул-маркеров во вставки помещали астроциты и нейроны, а эндотелиоциты засеивали на дно лунок. Смесь клеток культивировали в среде, состоящей из DMEM с FBS, глутамином и смесью антибиотиков, в условиях CO₂-инкубатора.

Получение четырехклеточной модели ГЭБ *in vitro*. Четырехклеточную модели ГЭБ *in vitro* получали согласно протоколу (Stone et al., 2019) с модификациями. Дно лунок культурального планшета и базолатеральную сторону культуральных вставок покрывали желатином (Gelatin Solution 0.1%; Biological Industries, США). Для этого в планшет с помещенными в него вставками добавляли 100 мкл желатина, после чего желатин убирали путем аспирации. Далее планшет инвертировали и на базолатеральную сторону культуральных вставок засеивали первичную культуру пероцитов в объеме среды 50 мкл. Дно планшета аккуратно помещали на крышку так, чтобы не повредить нанесенный на инвертированные вставки клеточный слой, после чего планшет помещали в CO₂-инкубатор. Через 2–3 ч планшет переворачивали и культивировали пероциты последующие 48 ч в среде из DMEM с FBS, PGS и смесью антибиотиков. Через 48 ч культивирования пероцитов в планшеты засеивали астроциты, нейроны и эндотелиоциты в двух модификациях: для оценки показателей ТЭС на дно лунок засеивали смесь астроцитов и нейронов, а на дно вставок помещали эндотелиальные клетки; для оценки содержания молекул-маркеров во вставки помещали астроциты и нейроны, а эндотелиальные клетки засеивали на дно лунок. Производили смену среды на среду DMEM с FBS, глутамином и смесью антибиотиков. Культивирование смеси клеток осуществлялось в условиях CO₂-инкубатора.

Иммуноцитохимическое определение маркеров плотных контактов эндотелиальных клеток. Регистрацию маркеров белков плотных контактов эндотелиальных клеток в трех- и четырехклеточной моделях ГЭБ *in vitro* проводили с использованием первичных антител к ZO1 (sc-8147; Santa Cruz, США) и JAM1 (ab52647; Abcam, Великобритания). Первичные антитела разводили 1 : 300, время инкубации составля-

ло 18 ч при 4°C. Вторичные антитела Alexa Fluor 488 (ab150129; Abcam, Великобритания) и Alexa Fluor 555 (ab150078; Abcam, Великобритания) использовали в рабочем разведении 1 : 500, время инкубации составляло 2 ч при 37°C. Визуализацию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE (Bio-Rad, США). Оценивали относительную интенсивность флуоресценции эндотелиоцитов, экспрессирующих целевые маркеры.

Регистрация трансэндотелиального сопротивления (ТЭС). Регистрацию ТЭС в трех- и четырехклеточной моделях ГЭБ *in vitro* проводили через 24, 48 и 72 ч после сокультивирования клеток. ТЭС непосредственно измеряли с помощью эпителиального вольтметра EVOM2 с использованием электрода STX2 (World Precision Instruments, США).

Статистический анализ. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью пакета программного обеспечения GraphPad Prizm version 9.3.0 (GraphPad Software, Inc., США). Для оценки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Так как распределение соответствовало критериям нормальности, применяли *t*-критерий Стьюдента при сравнении в независимых выборках. Различия считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0.05$. Результаты представлены в виде среднего значения и его ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнение содержания маркеров плотных контактов эндотелиальных клеток в трех- и четырехклеточной моделях ГЭБ *in vitro*. При сравнении уровней ZO1 и JAM1 эндотелиальных клеток в трех- и четырехклеточной моделях ГЭБ *in vitro* было выявлено, что содержание белков плотных контактов статистически значимо выше в четырехклеточной модели ГЭБ *in vitro*, т.е. в присутствии пероцитов (рис. 1). Так, относительная интенсивность флуоресценции ZO1-иммунопозитивных эндотелиоцитов в трехклеточной модели составила 7.3 ± 2.3 , а в четырехклеточной – 12.4 ± 4.7 усл. ед. Относительная интенсивность флуоресценции JAM1-иммунопозитивных эндотелиоцитов в трехклеточной модели составила 1.3 ± 0.3 , а в четырехклеточной – 3.5 ± 1.3 усл. ед. (рис. 2).

Сравнение ТЭС в трех- и четырехклеточной моделях ГЭБ *in vitro*. Во всех временных точках зарегистрированные показатели ТЭС в четырехклеточной модели ГЭБ *in vitro* были статистически значимо выше показателей ТЭС в модели ГЭБ без пероцитов и через 72 ч сокультивирования клеток составили 161.7 ± 5.4 и 125.7 ± 7 Ом см² соответственно (рис. 3). Кроме того, прирост значений ТЭС на сроке 72 ч сокультивирования относительно срока 24 ч составил 16% для четырехклеточной модели и 9% для трехклеточной.

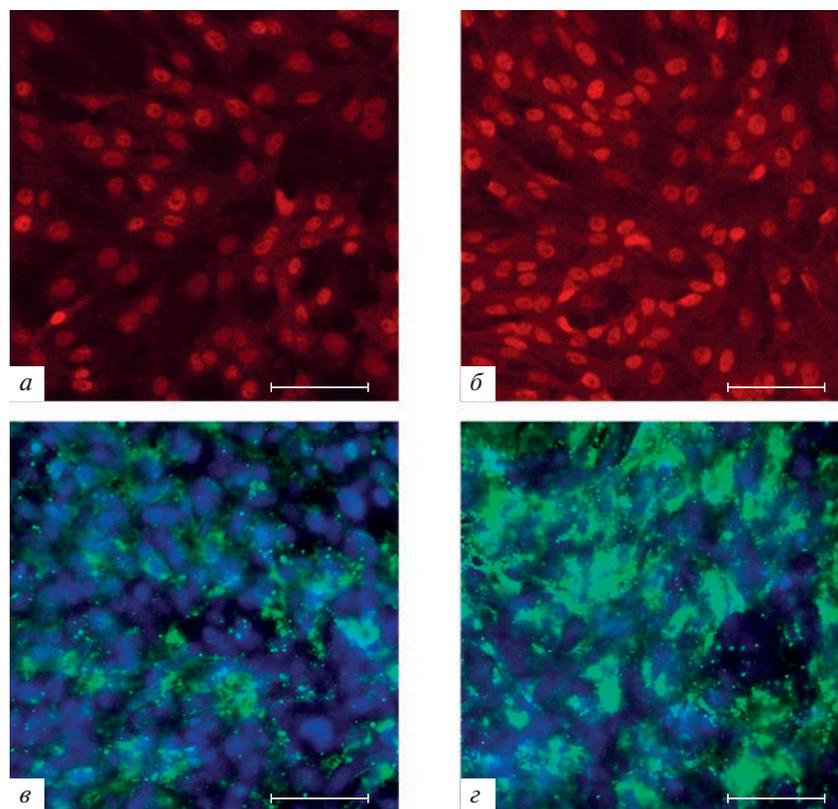


Рис. 1. Микрофотографии, демонстрирующие белки плотных контактов (JAM1 и ZO1) в эндотелиальных клетках в трех- (а, в) и четырехклеточной (б, г) Transwell-моделях гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) *in vitro*. Иммунофлюоресценция с использованием специфических антител к JAM1 (красный) и ZO1 (зеленый), голубым цветом показаны ядра клеток (краситель DAPI). Масштабная линейка: 100 мкм.

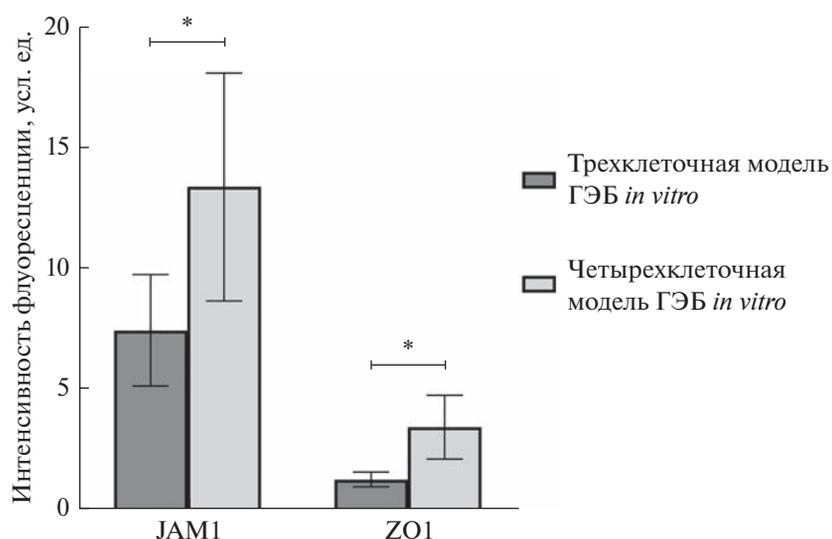


Рис. 2. Уровни белков плотных контактов эндотелиальных клеток в трех- и четырехклеточной Transwell-модели ГЭБ *in vitro*. * Различия достоверны при $p \leq 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты оценки уровней белков плотных контактов демонстрируют, что эндотелиальные клетки в четырехклеточной модели ГЭБ *in vitro* в результате присутствия перicyтов и их влияния приобретают экспрессионный профиль, более приближенный к условиям *in vivo*, а значит, формируют более компетентный и менее проницаемый монослой.

Кроме того, опираясь на данные иммуноцитохимического анализа, можно заключить, что зарегистрированные нами более высокие значения ТЭС в четырехклеточной модели ГЭБ *in vitro* обусловлены не только наличием дополнительного слоя клеток на культуральной вставке, что логично приводило бы к более высоким показателям, но также более высокими уровнями белков плотных контактов эндотелиальных клеток.

На основании этого стоит отметить, что присутствие всех клеточных типов НВЕ/ГЭБ необходимо для формирования у них фенотипа, приближенного к реальным условиям, поскольку только во взаимодействии друг с другом у клеток формируется необходимый экспрессионный профиль. Кроме того, полученные данные подчеркивают значимую роль перicyтов как метаболического звена, участвующего в сопряжении клеток ГЭБ и формировании его барьерных свойств.

Таким образом, использование перicyтов делает четырехклеточную Transwell-модель ГЭБ *in vitro* более релевантной по сравнению со стандартной трехклеточной моделью. Наряду с этим, данная модель сохраняет все преимущества стандартной Transwell-модели, поскольку остается простой в реализации и управлении, дешевой и позволяет использовать все тот же широкий спектр методов исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по результатам участия в стажировках “Освоение современных методов получения и культивирования клеток и органоидов головного мозга для решения задач персонифицированной неврологии и регенеративной медицины” и “Освоение современных методов иммуногистохимии, электронной микроскопии в нейроморфологии”, поддержанных Красноярским краевым фондом поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках конкурса проектов организации участия студентов, аспирантов и молодых ученых в конференциях, научных мероприятиях и стажировках (II очередь 2021 г.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При работе с животными соблюдали все принципы гуманности, изложенные в Директиве Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Работа была одобрена на заседании локального этического ко-

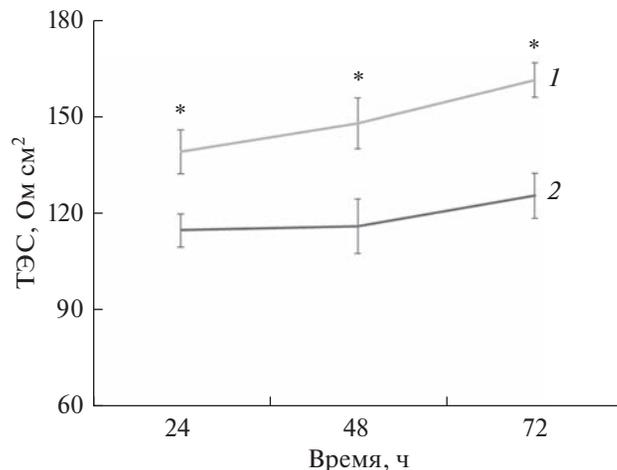


Рис. 3. Показатели трансэндотелиального сопротивления (ТЭС) в трех- (1) и четырехклеточной (2) моделях ГЭБ *in vitro*. * Различия достоверны при $p \leq 0.05$.

митета КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 8 от 06.10.2020).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Хилажеева Е.Д., Бойцова Е.Б., Пожиленкова Е.А., Солончук Ю.Р., Салмина А.Б. 2015. Получение трехклеточной модели нейроваскулярной единицы *in vitro*. Цитология. Т. 57. № 10. С. 710. (Khilazheva E.D., Boytsova E.B., Pozhilenkova E.A., Solonchuk Yu.R., Salmina A.B. 2015. The model of neurovascular unit *in vitro* consisting of three cells types. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 57. № 10. P. 710.)
- Crouch E.E., Doetsch F. 2018. FACS isolation of endothelial cells and pericytes from mouse brain microregions. Nat. Protoc. V. 13. P. 738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.158>
- Hatherell K., Couraud P.-O., Romero I.A., Weksler B., Pilkington G.J. 2011. Development of a three-dimensional, all-human *in vitro* model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. J. Neurosci. Methods. V. 199. P. 223. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.05.012>
- 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.2013.08.00>
- Nortley R., Korte N., Izquierdo P., Hirunpattarasilp C., Mishra A., Jaunmuktane Z., Kyrargyri V., Pfeiffer T., Khennouf L., Madry C., Gong H., Richard-Loendt A., Huang W., Saito T., Saido T.C. et al. 2019. Amyloid β oligomers constrict human capillaries in Alzheimer's disease via signaling to peri-

- cytes. *Science*. V. 365. Article no. eaav9518. <https://doi.org/10.1126/science.aav9518>
- Nzou G., Wicks R.T., Wicks E.E., Seale S.A., Sane C.H., Chen A., Murphy S.V., Jackson J.D., Atala A.J. 2018. Human cortex spheroid with a functional blood brain barrier for high-throughput neurotoxicity screening and disease modeling. *Sci. Rep.* V. 8. P. 7413. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25603-5>
- Shin Y., Choi S.H., Kim E., Bylykbashi 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>
- Srinivasan B., Kolli A.R. 2019. Transepithelial/transendothelial electrical resistance (TEER) to measure the integrity of blood–brain barrier. *blood–brain barrier*. *Neuromethods*. N.Y.: Humana Press. P. 142. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8946-1_6
- Stone N.L., England T.J., O’Sullivan S.E. 2019. A novel transwell blood brain barrier model using primary human cells. *Front. Cell Neurosci.* V. 13. P. 230. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00230>
- Sweeney M.D., Ayyadurai S., Zlokovic B.V. 2016. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat. Neurosci.* V. 19. P. 771. <https://doi.org/10.1038/nn.4288>
- Yang S., Jin H., Zhu Y., Wan Y., Opoku E.N., Zhu L., Hu B. 2017. Diverse functions and mechanisms of pericytes in ischemic stroke. *Curr. Neuropharmacol.* V. 15. P. 892. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170112170226>

Pericytes as an Essential Part in Transwell Models of the BBB *in Vitro*

A. I. Mosiagina^{a, *}, E. D. Khilazheva^a, and A. V. Morgun^a

^aResearch Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnoyarsk, 660022 Russia

*e-mail: angelina.mosiagina@gmail.com

In this study we aimed to demonstrate the advantages of using a quadruple culture model of the blood-brain barrier (BBB) *in vitro* in comparison with a common triple culture model, as well as to show the impact of pericytes on endothelial cells of the BBB. We co-cultured primary rat brain microvascular endothelial cells (BMECs), pericytes, astrocytes and neurons in a Transwell BBB model *in vitro*. Then, we carried out quantitative analysis to compare transendothelial electrical resistance (TEER) values, as well as expression levels of tight junction proteins, ZO1 and JAM1, in the triple culture and the quadruple culture Transwell BBB models *in vitro*. According to the obtained data, the quadruple culture model of the BBB *in vitro* has advantages over the triple culture model, since the presence of pericytes is accompanied by higher TEER values and higher expression levels of tight junction proteins in endothelial cells. The results presented in the study are consistent with the world scientific literature and confirm the hypothesis that pericytes not only offer mechanical support for endothelial cells, but also play a key role in signaling networks between different cell types of the neurovascular unit (NVU) and thus regulate the barrier functions of the BBB. According to this, co-culture of BMECs, astrocytes, and neurons with pericytes is essential for BMECs optimum phenotype and offers a closer representation of the *in vivo* environment.

Keywords: blood-brain barrier, Transwell, pericytes, neurovascular unit, tight junctions

УДК 616-092.9:576.08

ИЗМЕНЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ НЕЗРЕЛЫХ НЕЙРОНОВ ПИРИФОРМНОЙ КОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ СТРЕССА РАННЕГО ПЕРИОДА ЖИЗНИ

© 2023 г. А. Б. Салмина^{1,2}, Ю. А. Успенская³, *, Ю. А. Панина^{1,4}, Я. В. Горина^{1,4}, О. Л. Лопатина⁴

¹Научно-исследовательский институт молекулярной медицины и патобиохимии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава РФ, Красноярск, 660022 Россия

²Институт мозга Научного центра неврологии, Москва, 125367 Россия

³Красноярский государственный аграрный университет, Красноярск, 660049 Россия

⁴Кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава РФ, Красноярск, 660022 Россия

*E-mail: yulia.uspensskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 23.09.2022 г.

После доработки 17.11.2022 г.

Принята к публикации 18.11.2022 г.

Стресс раннего периода жизни является важным фактором, предрасполагающим к развитию патологии нервной системы у животных и людей в отдаленном периоде онтогенеза. Мы использовали модель стресса раннего периода жизни для оценки активации пириформной коры при предъявлении обонятельных стимулов экспериментальным животным (мышам линии CD1 в возрасте P60 (60 сут постнатального развития) и 10 мес.) и для оценки экспрессии маркеров нейронов с пролонгированной незрелостью, участвующих в процессах пластичности взрослого головного мозга и его восстановления после повреждения. Установлено, что стресс раннего периода жизни редуцирует количество незрелых нейронов с фенотипом DCX⁺PSA-NCAM⁺ в пириформной коре головного мозга и ответ на индукцию обонятельной памяти в отдаленном периоде после перенесенного стресса. В возрасте P60 обонятельная стимуляция снижает чувствительность к неприятным раздражителям и стимулирует процессы кратковременного запоминания, тогда как в возрасте 10 мес. такой эффект менее выражен. Полученные результаты свидетельствуют о возможном вкладе незрелых нейронов пириформной коры в механизмы aberrантной нейропластичности в отдаленном периоде онтогенеза после перенесенного стресса раннего периода жизни.

Ключевые слова: стресс раннего периода жизни, нейроны с пролонгированной незрелостью, обонятельная стимуляция, пириформная кора, нейропластичность

DOI: 10.31857/S0041377123020098, **EDN:** NDICBL

Стресс раннего периода жизни (СРПЖ) – феномен, лежащий в основе длительных изменений пластичности мозга, вызванных воздействием стрессовых факторов, действующих пренатально или в раннем постнатальном онтогенезе (Успенская и др., 2015; Malinovskaya et al., 2018; Fogelman, Canli, 2019; Kronman et al., 2021). Различные пренатальные или ранние постнатальные стимулы могут привести к запуску механизмов, специфичных для СРПЖ, например, гипоксия, действие ксенобиотиков, нарушение социальных взаимодействий, при этом затра-

гиваются многие физиологические механизмы, что приводит к нарушению развития головного мозга, неврологическому дефициту и повышенной предрасположенности к развитию нейродегенерации в более поздние периоды жизни. Это известно как “феномен раннего программирования”, или праймирование развивающегося мозга к патологическим состояниям из-за пренатального, интранатального или раннего постнатального стресса (Huang, 2014). Реакция на стресс всегда связана с гиперактивацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и симпатической нервной системы, запуском провоспалительных механизмов, изменением эпигенетической регуляции экспрессии генов, которые влияют на нормальное развитие клеток головного мозга и их метаболизм (Salmina et al., 2021).

Принятые сокращения: ИГХ – иммуногистохимия; ОС – обонятельная стимуляция; СРПЖ – стресс раннего периода жизни; DCX – даблкортин; nng-IN – нейроны с пролонгированной незрелостью (non-newly generated immature neurons); PBS – фосфатно-солевой буферный раствор; PSA-NCAM – полисиалилированная молекула адгезии нервных клеток (polysialylated neural cell adhesion molecule).

В последнее время повысился интерес исследователей к изучению вклада нейронов с пролонгированной незрелостью (nng-IN, non-newly generated immature neurons), локализованных в нетипичных для нейрогенеза регионах зрелого головного мозга (в частности, в коре), в процессы нейропластичности в норме и при патологии. Так, известно, что nng-IN обладают рядом интересных и мало изученных характеристик, в числе которых – сохранение экспрессии маркеров незрелых нейронов (в периоде эмбриогенеза), в частности, коэкспрессии белков даблкортина (DCX) и полисиалилированной молекулы адгезии нервных клеток (PSA-NCAM), что соответствует феномену “приостановленного развития” (arrested development); пребывание в микроокружении, не соответствующем таковому для незрелых клеток (например, формируемому в нейрогенных нишах головного мозга), которое, вероятно, обеспечивается окружающими их клетками астроглии; отсутствие пролиферативной активности и способность дифференцироваться до зрелых постмитотических нейронов при получении внешних сигналов; тесная ассоциация с васкулярным компонентом пронеурогенного микроокружения (Gómez-Climent et al., 2008, 2011; Piumatti et al., 2017). Было показано, что при старении организма часть nng-IN трансформируется в глутаматергические возбуждающие нейроны (Rotheneichner et al., 2018) или в ГАМКергические интернейроны (Benedetti et al., 2020). Однако оставалось неясным, контролируется ли этот процесс и как внешними стимулами (например, обучением), или он спонтанно реализуется и регулируется такими нейромедиаторами, как глутамат и дофамин (Coviello et al., 2020).

Весьма вероятно, что вклад nng-IN в процессы пластичности мозга может быть изменен при патологических состояниях, связанных с нарушением его развития, например, после перенесенного СРПЖ, и, вероятно, эта популяция клеток может рассматриваться в качестве мишеней для управления механизмами нейрогенеза, протекающего в “неклассических” нейрогенных нишах. Например, управление дифференцировочным потенциалом nng-IN может осуществляться за счет подавления экспрессии PSA-NCAM или путем модуляции адренергических механизмов в пириформной коре (Vadodaria et al., 2017; La Rosa et al., 2020; Bonfanti, Seki, 2021). С учетом вклада постнатального нейрогенеза в “классических” нейрогенных нишах (субвентрикулярной и субгранулярной зонах) мозг взрослого организма должен обладать весьма значительным ресурсом для усиления нейрогенеза и обновления популяции зрелых нейронов, когда это необходимо как в физиологических условиях (обучение, консолидация памяти), так и при патологических состояниях и, в частности, для предупреждения развития дисбаланса возбуждения–торможения, вызванного значительными изменениями в популяциях нейронов (Verdugo-Vega et al., 2020; Besnard, Sahay, 2021).

Мы предположили, что, будучи локализованными в пириформной коре (обонятельной зоне), nng-IN могут участвовать в механизмах нейропластичности, связанной с восприятием запахов, в формировании клеток ассоциативной памяти, в то время как СРПЖ способен нарушать активность таких нейронов и подавлять их участие в механизмах пластичности мозга в отдаленные периоды развития организма, истощая резерв клеток, чувствительных к действию внешних стимулов. Поэтому цель настоящей работы заключалась в изучении изменений популяции nng-IN при реализации механизмов пластичности головного мозга у животных, перенесших СРПЖ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. В работе использовали лабораторных животных – мышей-самцов линии CD1 ($n = 150$). Животных содержали в клетках 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. Исследования на животных проводили в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/EC).

Нами была использована модель хронического стресса мыши раннего постнатального периода (СРПЖ, сепарация “мать – детеныш”, стадия постнатального развития на P2–P14; стрессу подвергали ежедневно по 3 ч (Mirescu et al., 2004); ожидаемые результаты к возрасту P60: нарушения нейрогенеза, нарушения социального поведения, тревожность, депрессивноподобную симптоматику). К 10-му мес. у животных регистрируется развитие признаков нейродегенерации (Mirescu et al., 2004).

Животных делили на группы: 2 группы контрольные – интактные животные в возрасте, соответственно, P60 и 10 мес. ($n = 25$ в каждой группе); 2 группы экспериментальные – мыши с СРПЖ тех же возрастов (P60 и 10 мес. соответственно, $n = 25$ в каждой). Мыши из каждой группы подвергали обонятельной стимуляции (ОС). Общий дизайн эксперимента представлен на рис. 1.

С помощью ОС было проведено моделирование активации пириформной коры по протоколу (Schellinck et al., 2001). ОС представляла собой однократное последовательное предъявление животному различных запахов (воды, арахисового масла, подстила из-под крыс) в отдельной чистой клетке. Подачу ОС проводили по следующей схеме: чистая вода–перерыв–арахисовое масло–перерыв–арахисовое масло–перерыв–подстила из-под крыс–перерыв–подстила из-под крыс; длительность стимула – 2 мин, перерыв – 1 мин. Через 2, 24 ч и 7 сут после ОС производили забор тканей головного мозга для иммуногистохимического анализа (ИГХ). На каждую временную точку для ИГХ было взято по 5 мышей из каждой группы.

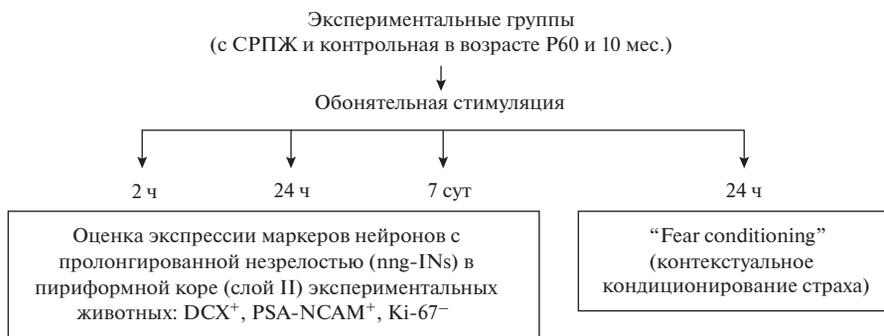


Рис. 1. Общий дизайн эксперимента. СРПЖ – стресс раннего периода жизни. Две контрольные группы (интактные животные) и две группы мышей с СРПЖ; возраст мышей ($n = 25$ в каждой группе) 60 сут постнатального развития (P60) и 10 мес. Через 2, 24 ч и 7 сут после обонятельной стимуляции производили забор тканей головного мозга для иммуногистохимического анализа (ИГХ). На каждую временную точку для ИГХ брали по 5 мышей из каждой группы. Через 24 ч проводили поведенческий тест “Fear conditioning” (контекстуальное кондиционирование страха) для оценки активации пириформной коры на поведенческом уровне ($n = 10$ в каждой группе).

Через 24 ч проводили поведенческий тест “Fear conditioning” (контекстуальное кондиционирование страха) (рис. 2) для оценки активации пириформной коры на поведенческом уровне ($n = 10$ для каждой группы).

ИГХ-анализ. Оценка количества молекул-маркеров (DCX, PSA-NCAM, Ki-67) проводили на свободно плавающих сагитальных срезах головного мозга (толщина срезов 50 мкм) согласно стандартным протоколам. От каждого животного получали 5 срезов на уровне lateral 2.9 мм – lateral 3.9 мм согласно стереотаксическому атласу головного мозга мыши. Полученные срезы промывали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), блокировали 3%-ным бычьим сывороточным альбумином (BSA; Sigma-Aldrich, США) и 1%-ном Тритоне X-100 (Sigma-Aldrich, США) в PBS. После промывки смесью PBS и 0.2% Тритона X-100 срезы инкубировали с первичными антителами в течение 20 ч. Были использованы первичные антитела: козы поликлональные к DCX (ab113435; Abcam, Великобритания); мышинные моноклональные к PSA-NCAM (14-9118-82; Invitrogen, США); кроличьи поликлональные к Ki-67 (ab15580; Abcam, Великобритания); все антитела использовали в разведении 1 : 1000.

После инкубации с первичными антителами срезы пятикратно отмывали в PBS и погружали на 1 ч в раствор, содержащий вторичные антитела: козы антимышинные, Alexa Fluor 488 (ab150117; Abcam, Великобритания), ослиные антикроличьи, Alexa Fluor 647 (ab150073, Великобритания), ослиные антикозы, Alexa Fluor 555 (ab150073, Abcam, Великобритания); все в разведении 1 : 1000.

В качестве финального этапа иммуногистохимической окраски во всех случаях наносили 30 мкл жидкости для фиксации срезов (70% глицерина в PBS + DAPI для окрашивания ядер клеток), на препарат помещали покровное стекло. Микроскопию срезов, окрашенных на DCX, PSA-NCAM, Ki-67, осуществляли на полностью автоматизированном

конфокальном лазерном сканирующем микроскопе с водной иммерсией Olympus FV10i-W (Olympus, Япония). Иммунопозитивными считали клетки, экспрессирующие DCX/PSA-NCAM и Ki67 (в том числе одновременно) в пириформной коре в пирамидальном слое (второй слой). Анализ изображений проводили с применением пакета программного обеспечения ImageJ (1.47 v, США).

Тест “Fear conditioning” – оценка контекстной памяти мышей. Экспериментальное животное помещали в аппарат (звуконепроницаемую камеру с размерами 31 × 24 × 21 см и решетчатым полом, к которому подведено электричество для создания электрического шока). Выполняли 3 сессии – в первый, второй и третий день соответственно. День 1: обучение, подача в камеру электрического тока (0.5 мА продолжительностью 2 с) в комбинации со звуковым сигналом (2.8 кГц) осуществляли на 120, 180, 240, 300 и 360 с от начала теста. Мышь удаляли из камеры через 60 с после последней подачи электрического тока. Экспериментальные группы СРПЖ с ОС получали обонятельную стимуляцию за 24 ч до начала первой сессии. День 2: оценка запоминания; в камеру подавали только белый шум (1 кГц). День 3: оценка кратковременной памяти в условиях контекста. Мышь помещали в камеру на 5 мин без каких-либо стимуляций для оценки воспроизведения поведенческих реакций, которые она запомнила в первый день при подаче стимулов. Параметры замирания животного (защитную реакцию, которая проявляется как отсутствие движения (кроме дыхания) в течение 0.75 с и дольше) регистрировали с использованием цифровой видеосистемы и программного обеспечения для отслеживания видеосигнала ANY-maze (ANY-maze, США).

Статистическая обработка. Результаты иммуногистохимии обрабатывали с использованием методов описательной статистики, непараметрической статистики (по критерию Манна–Уитни) при сравнении 2 групп. При сравнении трех и более групп ис-

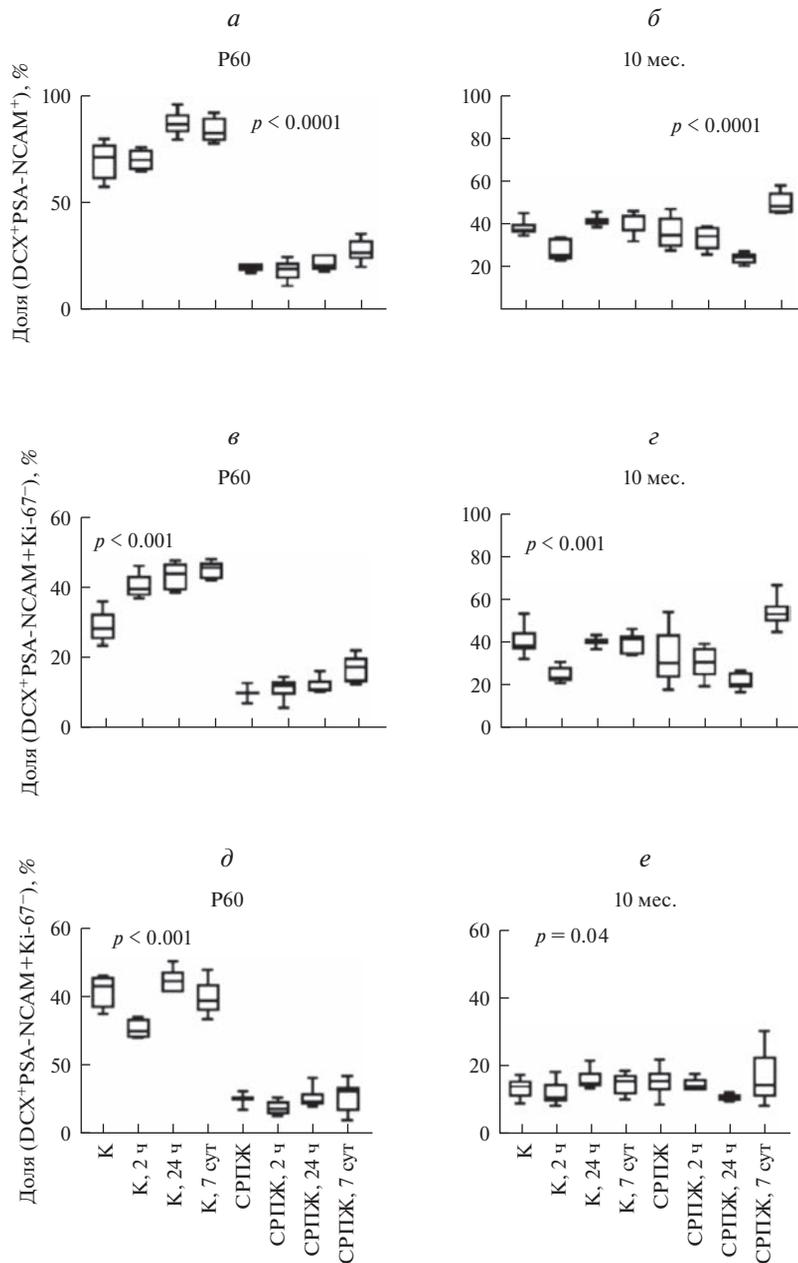


Рис. 2. Содержание маркеров DCX⁺, PSA-NCAM⁺ и Ki-67⁺ в пириформной коре мышей в возрасте P60 (слева) и 10 мес. (справа) *а, б* – Колоколизация DCX⁺ и PSA-NCAM⁺. *в, г* – Колоколизация DCX⁺, PSA-NCAM⁺ и Ki-67⁺. *д, е* – Колоколизация DCX⁺, PSA-NCAM⁺ и Ki-67⁻. К – интактные мыши (контроль) через 2, 24 ч и 7 сут после обонятельной стимуляции (ОС). СРПЖ – животные с СРПЖ (стрессом раннего периода жизни) до стимуляции и с СРПЖ через 2, 24 ч и 7 сут после ОС. Представлены средние значения и их стандартные отклонения (анализировали по 5 животных из группы, 5 срезов от каждого животного и 5 полей зрения на срезе), использован дисперсионный двухфакторный анализ; различия между всеми группами достоверны при $p < 0.05$.

пользовали дисперсионный двухфакторный анализ Н-Краскала–Уоллеса. Результаты представлены в виде среднего значения и его стандартного отклонения. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$ и менее.

Результаты поведенческого теста обрабатывали с использованием методов дисперсионного анализа (двухфакторный Н-Краскала–Уоллеса) с последую-

щим post-hoc-тестом Бонферрони. Результаты представлены в виде среднего значения и его стандартной ошибки. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$ и менее.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Животные, перенесшие СРПЖ, демонстрируют в отдаленном периоде онтогенеза изменения в попу-

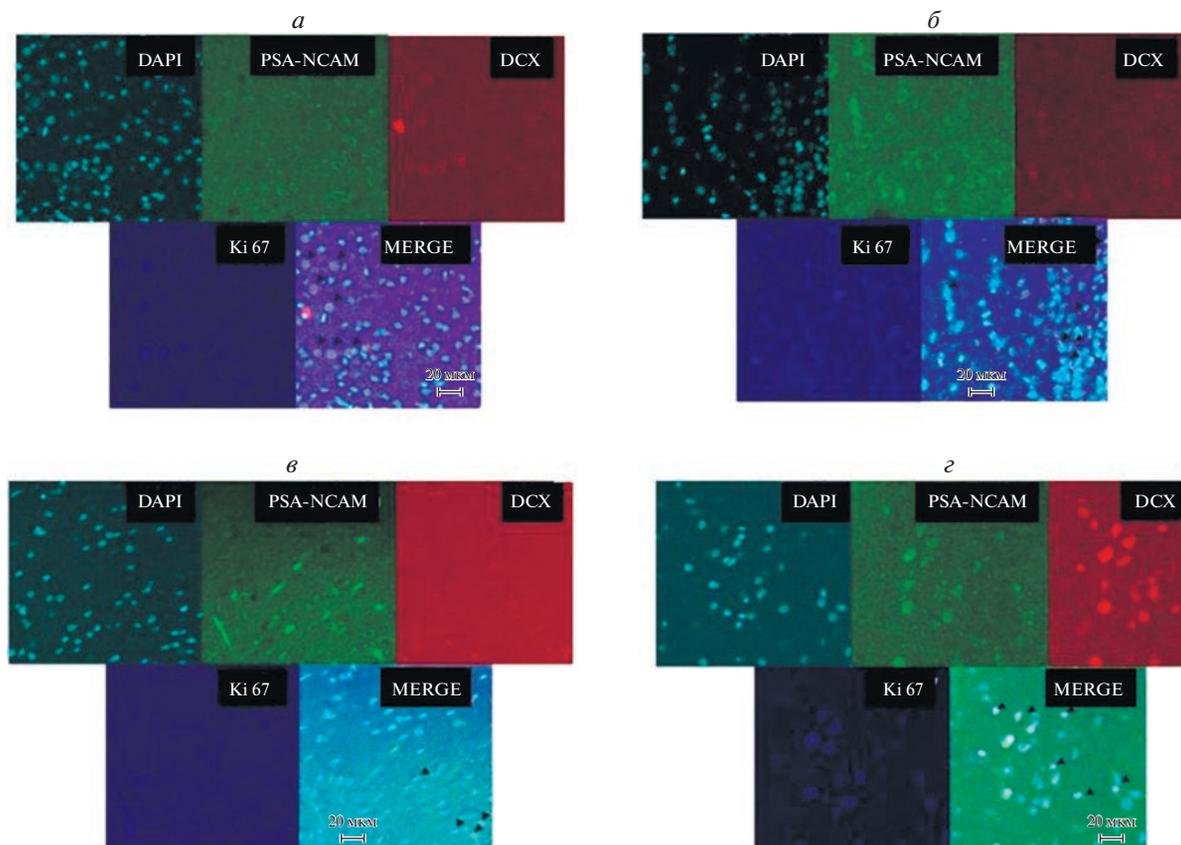


Рис. 3. Пример наличия маркеров PSA-NCAM, DCX и Ki-67 на клетках пириформной коры мышей в группе с СРПЖ в возрасте 10 мес. без ОС (контроль, *a*) и через 2 ч (*б*), 24 ч (*в*) и 7 сут (*г*) после стимуляции. Головки стрелок (черные) указывают на клетки с колокализацией маркеров.

ляционном составе клеток пириформной коры. В частности, при оценке количества клеток с белковыми маркерами DCX и PSA-NCAM, мы обнаружили, что в отличие от животных контрольной группы, животные с СРПЖ на стадии развития P60 имели значимо сниженное количество этих двух маркеров (рис. 2*a*). Примечательно, что такое изменение было характерным как для клеток $DCX^+PSA-NCAM^+Ki67^+$ (пролиферирующих нейробластов, вероятно, мигрирующих в этот регион головного мозга из субвентрикулярной нейрогенной ниши (рис. 2*в*), так и для клеток $DCX^+PSA-NCAM^+Ki67^-$ (непролиферирующих незрелых клеток, которые фенотипически соответствуют $pnq-IN$, сохранившимся в коре с периода эмбрионального развития) (рис. 2*д*). Полученные результаты соответствуют данным о влиянии СРПЖ на aberrantное созревание мозга, которые могут лежать в основе прогрессирующей уязвимости к развитию нейродегенерации, поскольку белок DCX характеризует процессы нейрогенеза и маркирует незрелые клетки: PSA-NCAM (маркер развивающихся и мигрирующих нейробластов), Ki-67 (маркер митотической активности клетки). В частности, предполагают, что СРПЖ, особенно в перинатальном периоде, влияет на созревание областей мозга, отвеча-

ющих за когнитивные способности и эмоции, усиливает депрессивно-подобное поведение и вызывает метаболический дисбаланс (Ruiz et al., 2018; Herzberg, Gunnar, 2020).

При предъявлении ОС мы обнаружили, что животные с СРПЖ не демонстрировали характерного для животных контрольной группы изменения количества клеток $DCX^+PSA-NCAM^+Ki67^-$, а именно, снижения их числа ко 2-му ч после действия стимула, которое мы интерпретировали как результат индукции заключительных этапов дифференцировки и трансформацию в глутаматергические или ГАМКергические нейроны коры (рис. 2*д*, *е*). У животных, перенесших СРПЖ, количество $DCX^+PSA-NCAM^+Ki67^-$ клеток оставалось стабильно низким на протяжении всего периода наблюдения после ОС (через 2 и 24 ч). Аналогичная тенденция касалась и клеток $DCX^+PSA-NCAM^+Ki67^+$ (рис. 2*в*, *г*). Примечательно, что к 7-м сут после ОС число клеток $DCX^+PSA-NCAM^+Ki67^+$ увеличивалось у животных в возрасте 10 мес., перенесших СРПЖ, что может быть объяснено миграцией нейробластов из субвентрикулярной зоны (рис. 2*г*).

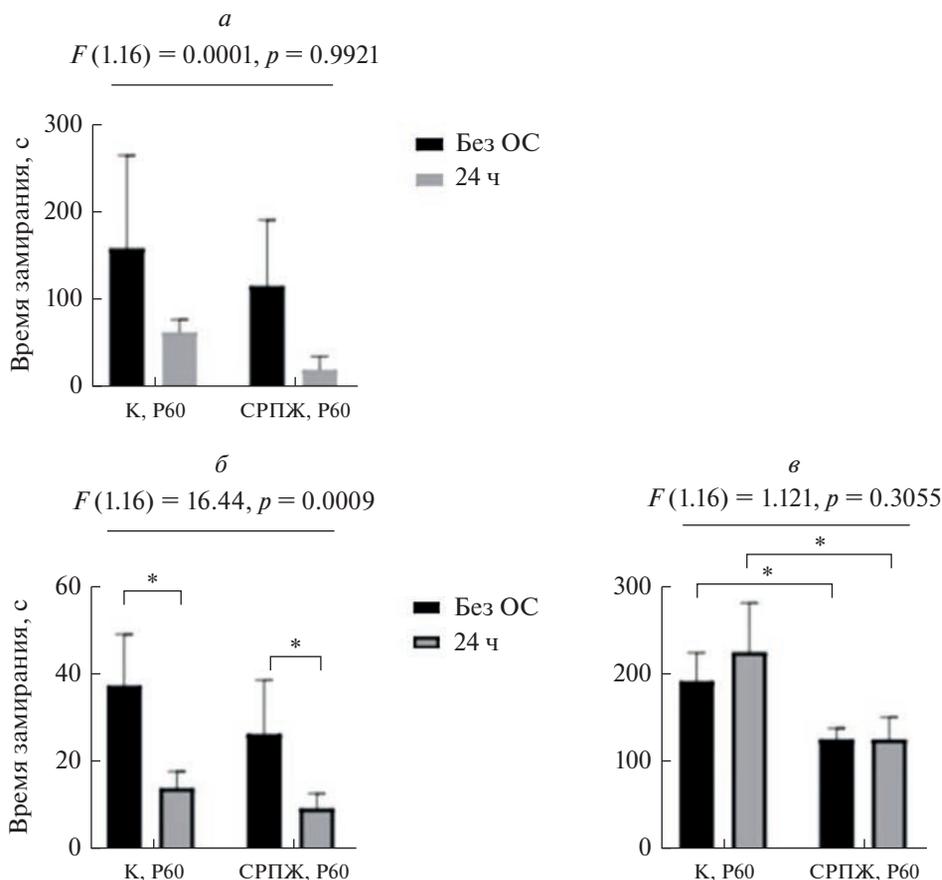


Рис. 4. Результаты теста для оценки контекстной памяти (“Fear conditioning” – контекстуальное кондиционирование страха) у животных в возрасте P60. *а* – Первый день, стимуляция электрическим током и звуком; *б* – 2-й день, стимуляция белым шумом; *в* – 3-й день, условия контекста без стимуляции. К – контрольная группа (без ОС). 24 ч – предварительная ОС за 24 ч до проведения теста. Представлены средние значения и их стандартные ошибки (дисперсионный двухфакторный анализ Н-Краскала–Уоллеса с последующим post-hoc-тестом Бонферрони); * различия достоверны при $p < 0.05$.

Животные на 10-м мес. постнатального развития, перенесшие СРПЖ, характеризовались тем, что общее количество нейронов DCX⁺PSA-NCAM⁺ в пириформной коре соответствовало уровню контроля (рис. 2б), что могло бы быть интерпретировано как некое закономерное для животных этого возраста изменение количества незрелых нейронов в этом регионе головного мозга. Действительно, считается, что по мере старения организма популяция nng-IN нейронов коры и миндалевидного тела может сокращаться, но не за счет гибели, а за счет постоянной – в течение жизни организма – конверсии в глутаматергические нейроны (Rotheneichner et al., 2018; Sorrells et al., 2019).

У животных возраста 10 мес. количество клеток DCX⁺PSA-NCAM⁺, которые не обладают митотической активностью (клетки Ki67⁻), не отличалось в группах контроля и после перенесенного СРПЖ, как, впрочем, и не изменялось в обеих группах после предъявления ОС (2, 24 ч и 7 сут после стимуляции). Однако иным было изменение числа клеток DCX⁺PSA-NCAM⁺Ki67⁺ в пириформной коре: ис-

ходное (без стимуляции) их количество было одинаковым в контроле и в группе животных с СРПЖ, но снижение было зарегистрировано ко 2-му ч после ОС в контрольной группе животных, но не в группе животных, перенесших СРПЖ (рис. 2, 3).

Таким образом, в пириформной коре животных, перенесших СРПЖ, в отдаленном периоде развития регистрируется сниженное количество незрелых клеток нейрональной природы, в том числе нейронов с пролонгированной незрелостью, обладающих низкой респонсивностью при предъявлении ОС. Такая количественная разница маркеров незрелых нейронов животных контрольной группы особенно очевидна на сроке P60 постнатального развития животных, который соответствует окончанию юношеского периода развития человека. С учетом данных о том, что именно в юношеском периоде значительная часть незрелых нейронов, в том числе, вероятно, nng-IN конвертируется в зрелые глутаматергические нейроны (Sorrells et al., 2019), не удивительно, что к 10-му мес. развития мышей (что соответствует зрелому возрасту человека) (Liu et al., 2020) такие отлич-

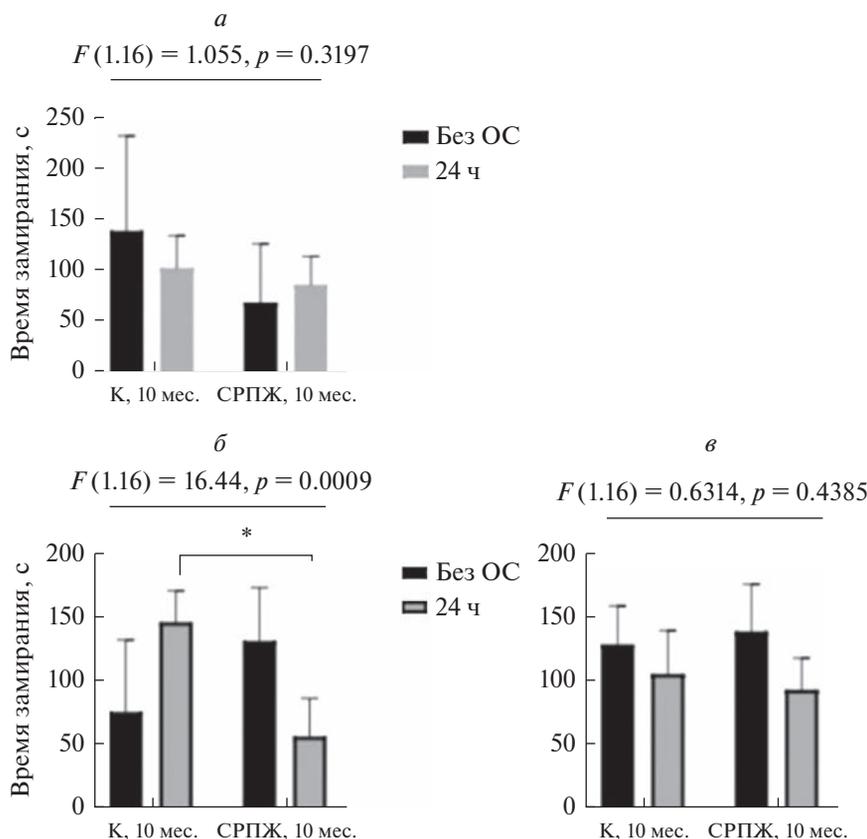


Рис. 5. Результаты теста “Fear conditioning” (контекстуальное кондиционирование страха) у животных в возрасте 10 мес. *а* – Первый день, стимуляция электрическим током и звуком; *б* – 2-й день, стимуляция белым шумом; *в* – 3-й день, условия контекста без стимуляции. К – контрольная группа (без ОС). 24 ч – предварительная ОС за 24 ч до проведения теста. Другие объяснения см. в подписи к рис. 1.

чия в популяции незрелых клеток пириформной коры фактически утрачиваются.

При оценке когнитивного статуса было обнаружено, что обонятельная стимуляция снижала чувствительность к неприятным раздражителям в молодом возрасте (P60) у животных с СРПЖ (рис. 4), тогда как в возрасте 10 мес. подобного влияния не наблюдали (рис. 5). Также ответ в сессиях на запоминание и контекстуальную кратковременную память был более выражен в молодом возрасте (P60) у обеих экспериментальных групп.

Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить, как (пато)физиологические условия на разных этапах онтогенеза влияют на популяцию незрелых нейронов в коре головного мозга, связано ли это с метаболическими изменениями, которые характерны для процессов дифференцировки незрелых нейронов (Agostini et al., 2016; Iwata, Vanderhaeghen, 2021), как это характерно, например, для клеток нейрогенной ниши гиппокампа (Wang et al., 2020). Логично предполагать, что разработка технологий, уменьшающих влияние стресса на популяцию незрелых нейронов в коре головного мозга, способных конвертироваться в зрелые, функцио-

нально компетентные клетки, поможет предотвратить или замедлить развитие нейродегенерации.

Таким образом, в результате проведенного исследования получены новые данные об отсроченном изменении популяции незрелых нейронов пириформной коры после перенесенного СРПЖ. Установлено, что СРПЖ редуцирует число незрелых нейронов с фенотипом $DCX^+PSA-NCAM^+$ в пириформной коре головного мозга и их ответ на индукцию обонятельной памяти в отдаленном периоде после перенесенного стресса (P60, 10 мес.). Такие изменения касаются обеих субпопуляций незрелых клеток – $Ki67^+$ и $Ki67^-$ (соответственно незрелые клетки, мигрирующие в этот регион мозга из нейрогенных ниш, и собственно нейроны с пролонгированной незрелостью, сохранившие свое присутствие в коре с периода эмбриогенеза). Обонятельная стимуляция снижает чувствительность к неприятным раздражителям в молодом возрасте (P60) и стимулирует процессы кратковременного запоминания, тогда как в возрасте 10 мес. такой эффект менее выражен.

В целом, стимуляция ольфакторной памяти у животных, перенесших СРПЖ, демонстрирует дефи-

цит присутствия в пириформной коре незрелых нейронов. Коль скоро незрелые нейроны коры в норме способны дифференцироваться в зрелые клетки при действии стимулов, индуцирующих механизмы пластичности мозга, снижение количества таких клеток в пириформной коре в отдаленном периоде после перенесенного СРПЖ свидетельствует в пользу вовлеченности клеток DCX⁺PSA-NCAM⁺ в механизмы формирования феномена раннего программирования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00472 (АБС, ЮАП, ОЛЛ)).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с животными проводили с соблюдением принципов гуманности, которые изложены в Директиве Совета Европейского сообщества (2010/63/ЕС). Протоколы экспериментов были утверждены биоэтической комиссией по работе с животными при локальном этическом комитете Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Успенская Ю.А., Малиновская Н.А., Волкова В.В., Панина Ю.А., Рябоконе Р.В., Фролова О.В., Салмина А.В.* 2015. Особенности развития неврологической дисфункции после перинатальной гипоксии головного мозга и стресса раннего периода жизни у экспериментальных животных. Сибирское медицинское обозрение. № 5. С. 49. (*Uspenskaya Yu.A., Malinovskaya N.A., Volkova V.V., Panina Yu.A., Ryabokon R.V., Frolova O.V., Salmina A.B.* 2015. Development of neurological deficit after perinatal hypoxia and early life stress in laboratory animals. *Siberian Medical Review.* V. 5. P. 49.)
- Agostini M., Romeo F., Inoue S., Niklison-Chirou M.V., Elia A.J., Dinsdale D., Morone N., Knight R.A., Mak T.W., Melino G.* 2016. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death Differ.* V. 23. P. 1502.
- Benedetti B., Dannehl D., König R., Coviello S., Kreutzer C., Zaunmair P., Jakubecova D., Weiger T.M., Aigner L., Nacher J., Engelhardt M., Couillard-Després S.* 2020. Functional integration of neuronal precursors in the adult murine piriform cortex. *Cereb. Cortex.* V. 30. P. 1499.
- Berdugo-Vega G., Arias-Gil G., López-Fernández A., Artergiani B., Wasielewska J.M., Lee C.-C., Lippert M.T., Kempermann G., Takagaki K., Calegari F.* 2020. Increasing neurogenesis refines hippocampal activity rejuvenating navigational learning strategies and contextual memory throughout life. *Nat. Commun.* V. 11. P. 135.
- Besnard A., Sahay A.* 2021. Enhancing adult neurogenesis promotes contextual fear memory discrimination and activation of hippocampal-dorsolateral septal circuits. *Behav. Brain Res.* V. 399. P. 112917.
- Bonfanti L., Seki T.* 2021. The PSA-NCAM-positive “immature” neurons: an old discovery providing new vistas on brain structural plasticity. *Cells.* V. 10. P. 2542.
- Coviello S., Gramuntell Y., Castillo-Gomez E., Nacher J.* 2020. Effects of dopamine on the immature neurons of the adult rat piriform cortex. *Front. Neurosci.* V. 14. P. 574234.
- Fogelman N., Canli T.* 2019. Early life stress, physiology, and genetics: a review. *Front. Psychol.* V. 10. P. 1668.
- Gómez-Climent M.A., Castillo-Gómez E., Varea E., Guirado R., Blasco-Ibáñez J.M., Crespo C., Martínez-Guijarro F.J., Nacher J.* 2008. A population of prenatally generated cells in the rat paleocortex maintains an immature neuronal phenotype into adulthood. *Cereb. Cortex.* V. 18. P. 2229.
- Gómez-Climent M.A., Guirado R., Castillo-Gómez E., Varea E., Gutierrez-Mecinas M., Gilabert-Juan J., García-Mompó C., Vidueira S., Sanchez-Mataredona D., Hernández S., Blasco-Ibáñez J.M., Crespo C., Rutishauser U., Schachner M., Nacher J.* 2011. The polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) is expressed in a subpopulation of mature cortical interneurons characterized by reduced structural features and connectivity. *Cereb. Cortex.* V. 21. P. 1028.
- Herzberg M.P., Gunnar M.R.* 2020. Early life stress and brain function: activity and connectivity associated with processing emotion and reward. *Neuroimage.* V. 209. P. 116493.
- Huang L.-T.* 2014. Early-life stress impacts the developing hippocampus and primes seizure occurrence: cellular, molecular, and epigenetic mechanisms. *Front. Mol. Neurosci.* V. 7. P. 8.
- Iwata R., Vanderhaeghen P.* 2021. Regulatory roles of mitochondria and metabolism in neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* V. 69. P. 231.
- Kronman H., Torres-Berrío A., Sidoli S., Issler O., Godino A., Ramakrishnan A., Mews P., Lardner C.K., Parise E.M., Walker D.M., van der Zee Y.Y., Browne C.J., Boyce B.F., Nave R., Garcia B.A. et al.* 2021. Long-term behavioral and cell-type-specific molecular effects of early life stress are mediated by H3K79me2 dynamics in medium spiny neurons. *Nat. Neurosci.* V. 24. P. 667.
- La Rosa C., Parolisi R., Bonfanti L.* 2020. Brain structural plasticity: from adult neurogenesis to immature neurons. *Front. Neurosci.* V. 14. P. 75.
- Liu J.-H., Wang Q., You Q.-L., Li Z.-L., Hu N.-Y., Wang Y., Jin Z.-L., Li S.-J., Li X.-W., Yang J.-M., Zhu X.-H., Dai Y.-F., Xu J.-P., Bai X.-C., Gao T.-M.* 2020. Acute EPA-induced learning and memory impairment in mice is prevented by DHA. *Nat. Commun.* V. 11. P. 5465.
- Malinovskaya N.A., Morgun A.V., Lopatina O.L., Panina Y.A., Volkova V.V., Gasymlly E.L., Taranushenko T.E., Salmina A.B.* 2018. Early life stress: consequences for the development of the brain. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2018. V. 48. P. 233.

- Mirescu C., Peters J.D., Gould E. 2004. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat. Neurosci.* V. 7. P. 841.
- Piumatti M., Palazzo O., La Rosa C., Crociara P., Parolisi R., Luzzati F., Lévy F., Bonfanti L. 2017. Non-newly generated, “immature” neurons in the sheep brain are not restricted to cerebral cortex. *J. Neurosci.* V. 38. P. 826.
- Rotheneichner P., Belles M., Benedetti B., König R., Dannehl D., Kreutzer C., Zaubmair P., Engelhardt M., Aigner L., Nacher J., Couillard-Despres S. 2018. Cellular plasticity in the adult murine piriform cortex: continuous maturation of dormant precursors into excitatory neurons. *Cereb. Cortex.* V. 28. P. 2610.
- Ruiz R., Roque A., Pineda E., Licona-Limón P., Valdéz-Alarcón J.J., Lajud N. 2018. Early life stress accelerates age-induced effects on neurogenesis, depression, and metabolic risk. *Psychoneuroendocrinol.* V. 96. P. 203.
- Salmina A.B., Gorina Y.V., Komleva Y.K., Panina Y.A., Malinovskaya N.A., Lopatina O.L. 2021. Early life stress and metabolic plasticity of brain cells: impact on neurogenesis and angiogenesis. *Biomed.* V. 9. P. 1092.
- Schellinck H.M., Forestell C.A., LoLordo V.M. 2001. A simple and reliable test of olfactory learning and memory in mice. *Chem. Senses.* V. 26. P. 663.
- Sorrells S.F., Paredes M.F., Velmeshev D., Herranz-Pérez V., Sandoval K., Mayer S., Chang E.F., Insausti R., Kriegstein A.R., Rubenstein J.L., Garcia-Verdugo J.M., Huang E.J., Alvarez-Buylla A. 2019. Immature excitatory neurons develop during adolescence in the human amygdala. *Nat. Commun.* V. 10. P. 2748.
- Vadodaria K.C., Yanpallewar S.U., Vadhvani M., Toshniwal D., Cameron Liles L., Rommelfanger K.S., Weinshenker D., Vaidya V.A. 2017. Noradrenergic regulation of plasticity marker expression in the adult rodent piriform cortex. *Neurosci. Lett.* V. 644. P. 76.
- Wang X., Liu H., Morstein J., Novak A.J.E., Trauner D., Xiong Q., Yu Y., Ge S. 2020. Metabolic tuning of inhibition regulates hippocampal neurogenesis in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 117. P. 25818.

Changes in the Population of Immature Neurons in the Piriform Cortex of Experimental Animals after Early Life Stress

A. B. Salmina^{a, b}, Yu. A. Uspenskaya^{c, *}, Yu. A. Panina^{a, d}, Ya. V. Gorina^{a, d}, and O. L. Lopatina^d

^aResearch Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022 Russia

^bBrain Science Institute, Research Center of Neurology, Moscow, 125367 Russia

^cKrasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, 660049 Russia

^dDepartment of Biochemistry, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022 Russia

*e-mail: yulia.uspensskaya@mail.ru

Early life stress is an important factor predisposing to the development of pathology of the nervous system in animals and humans in the late period of ontogenesis. We used an early life stress model to assess the activation of the piriform cortex upon presentation of olfactory stimuli in experimental animals (CD1 mice, P60 and 10 months old) as well as to assess the expression of markers of neurons with prolonged immaturity involved in the processes of plasticity of the adult brain and its recovery. We found that early life stress reduces the number of immature neurons with the DCX⁺PSA-NCAM⁺ phenotype in the piriform cortex and the response to olfactory memory induction. In addition, olfactory stimulation reduces sensitivity to unpleasant stimuli at a young age (P60), stimulates short-term memory. However, at the age of 10 months, these effects are less evident. The results obtained indicate a possible contribution of immature neurons of the piriform cortex to the mechanisms of aberrant neuroplasticity after early life stress.

Keywords: early life stress, neurons with prolonged immaturity, olfactory stimulation, piriform cortex, neuroplasticity