

СОДЕРЖАНИЕ

Том 63, номер 2, 2021

Содержание нуклеиновых кислот в адгезирующих Т-лимфоцитах линии Jurkat и их подвижность *in vitro*

Л. С. Литвинова, В. В. Шуплецова, К. А. Юрова, О. Г. Хазиахматова, Н. Д. Газатова, Н. М. Тодосенко, М. Ю. Хлусова, В. В. Малащенко, Е. О. Шунькин, Е. Д. Порохова, И. А. Хлусов

105

Содержание железа и пролиферация клеток в тимусе и селезенке мышей при росте гепатомы 22А

Е. А. Зеленский, К. В. Рутто, И. В. Кудрявцев, А. В. Соколов, Е. П. Киселева

116

Становление клеточной линии HindIII^G-1, полученной после облучения устойчивых к апоптозу клеток HindIII^G, характеризуется нестабильностью генома, нарушением системы репарации ДНК и активацией аутофагии

Ж. В. Шитикова, Н. М. Ярцева, Т. В. Быкова, С. Г. Зубова, Е. Ю. Кочеткова, В. А. Поспелов, Т. В. Поспелова

127

Сравнительная характеристика линий мезенхимных стволовых клеток различных видов животных

Е. Ю. Закирова, А. М. Аймалетдинов, М. А. Тамбовский, А. А. Ризванов

139

Анализ ядерно-цитоплазматического перераспределения актин-связывающего белка альфа-актинина-4 и сигнального белка RhoA в процессе репликативного старения клеток линии ADH-MSC, выделенных из эпикардальной жировой ткани человека

Д. Ф. Гончарова, А. В. Полянская, А. С. Мусорина, Г. Г. Полянская, Д. Е. Бобков

147

Тучные клетки и контроль трансэндотелиального транспорта. Роль гистамина

П. Г. Назаров, О. Н. Мальцева, Д. А. Танянский, Е. В. Агеева, С. С. Лутфуллоева, А. Д. Денисенко, П. В. Пигаревский

156

Влияние пренатальной гипоксии на citoархитектонику и ультраструктурную организацию отделов мозга, связанных с обонятельной функцией у крыс

Н. Л. Туманова, Д. С. Васильев, Н. М. Дубровская, Н. Н. Наливаева, И. А. Журавин

163

Оценка уровня RAGE в клетках гематоэнцефалического барьера при экспериментальной болезни Альцгеймера

Я. В. Горина, Е. Д. Осипова, А. В. Моргун, Е. Б. Бойцова, О. Л. Лопатина, А. Б. Салмина

176

Опыт применения инкапсуляции в альгинат для исследования влияния EGF и FGF2 на пролиферацию клеток колоректального рака в условиях пониженной адгезии *in vitro*

С. Ю. Филиппова, А. О. Ситковская, Е. С. Бондаренко, И. А. Новикова, Д. А. Харагезов, В. В. Позднякова, О. В. Хохлова, О. И. Кит

184

Сравнительный анализ методов выделения экзосом из культуральной среды

А. Н. Горшков, Л. В. Пурвиньш, А. В. Протасов, П. А. Некрасов, А. А. Шалдзян, А. В. Васин

193

Contents

Vol. 63, No. 2, 2021

Content of nucleic acids and motility of adherent Jurkat T lymphoblasts <i>in Vitro</i> <i>L. S. Litvinova, V. V. Shupletsova, K. A. Yurova, O. G. Khaziakhmatova, N.D. Gazatova, N. M. Todosenko, M. Yu. Khlusova, V. V. Malashchenko, E. O. Shunkin, E. D. Porokhova, I. A. Khlusov</i>	105
Iron content and cellular proliferation in thymus and spleen of hepatoma 22a bearing mice <i>E. A. Zelensky, K. V. Rutto, I. V. Kudryavtsev, A. V. Sokolov, E. P. Kisseleva</i>	116
Establishment of HindIIIIG-1 cell line obtained after irradiation of apoptosis resistant HindIIIIG cells characterizes by genomic instability, altered DNA repair mechanisms, and activation of autophagy <i>Z. V. Chitikova, N. M. Yartseva, T. V. Bykova, S. G. Zubova, E. Yu. Kochetkova, V. A. Pospelov, T. V. Pospelova</i>	127
Comparative characteristics of mesenchymal stem cell lines from different animal species <i>E. Yu. Zakirova, A. M. Aimaletdinov, M. A. Tambovsky, A. A. Rizvanov</i>	139
Analysis of nuclear-cytoplasmic redistribution of actin-binding protein apha-actinin-4 and signaling protein RhoA in the process of replicative senescence of human epicardial adipose tissue-derived ADH-MSc cell line <i>D. F. Goncharova, A. V. Polyanskaya, A. S. Musorina, G. G. Poljanskaya, D. E. Bobkov</i>	147
Mast cells in control of transendothelial transport. The role of histamine <i>P.G. Nazarov, O. N. Maltseva, D. A. Tanyanskiy, E. V. Ageeva, S. S. Lutfulloeva, A. D. Denisenko, P. V. Pigarevsky</i>	156
Effect of prenatal hypoxia on cytoarchitectonics and ultrastuctural organisation of brain regions related to olfaction in rats <i>N. L. Tumanova, D. S. Vasilev, N. M. Dubrovskaya, N. N. Nalivaeva, I. A. Zhuravin</i>	163
Assessment of the level of rage in cells blood-brain barrier in experimental Alzheimer's disease <i>Ya. V. Gorina, E D. Osipova, A. V. Morgun, E. B. Boytsova, O. L. Lopatina, A. B. Salmina</i>	176
The use of alginate encapsulation to study EGF and FGF2 effect on colorectal cancer cells proliferation in low adhesion conditions <i>in Vitro</i> <i>S. Yu. Filippova, A. O. Sitkovskaya, E. S. Bondarenko, I. A. Novikova, D. A. Kharagezov, V. V. Pozdnyakova, O. V. Khokhlova, O. I. Kit</i>	184
Comparative analysis of methods for isolating exosomes from the culture medium <i>A. N. Gorshkov, L. V. Purvinsh, A. V. Protasov, P. A. Nekrasov, B. A. Shaldzhyan, B. V. Vasin</i>	193

УДК 57.085.23

СОДЕРЖАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В АДГЕЗИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОБЛАСТАХ ЛИНИИ JURKAT И ИХ ПОДВИЖНОСТЬ *IN VITRO*

© 2021 г. Л. С. Литвинова^{1, *}, В. В. Шуплецова¹, К. А. Юрова¹, О. Г. Хазиахматова¹, Н. Д. Газатова¹, Н. М. Тодосенко¹, М. Ю. Хлусова², В. В. Малащенко¹, Е. О. Шунькин¹, Е. Д. Порохова², И. А. Хлусов^{3, 4}

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

²Кафедра патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета, Томск, 634034 Россия

³Кафедра морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета, Томск, 634050 Россия

⁴Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий Национального исследовательского Томского политехнического университета, Томск, 634034 Россия

*E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.10.2020 г.

После доработки 17.11.2020 г.

Принята к публикации 17.11.2020 г.

Т-лимфобластоподобные лейкозные клетки человека линии Jurkat (Jurkat-Т-клетки) образуют в суспензионной культуре полиплоидные формы с повышенным содержанием ДНК. Это способствует, вследствие выраженной генетической нестабильности, дальнейшей трансформации и развитию клонального разнообразия (поликлоновости) клеточной линии. Об адгезирующей субпопуляции Jurkat-Т-клеток сведения немногочисленны. В настоящей работе анализировали содержание нуклеиновых кислот в суспензионной (ДНК) и адгезионной (ДНК, РНК) субпопуляциях Jurkat-Т-клеток с использованием проточной цитометрии и красителя иодида пропидия, а также конфокальной лазерной микроскопии и красителя акридинового оранжевого. Морфологию и подвижность крупных (с диаметром более 15 мкм) прикрепившихся к пластику Jurkat-Т-клеток изучали с использованием Cell-IQ фазово-контрастной микроскопии в реальном времени. По интенсивности флюоресценции в условно зеленом диапазоне длин волн (300–530 нм: от УФ до зеленого) и в условно красном (565–800 нм: от красного до дальнего красного) выделили 3 субпопуляции адгезирующих Jurkat-Т-клеток: с высоким, средним, и низким содержанием нуклеиновых кислот. Таким образом, Jurkat Т-клетки, адгезирующие к пластиковой поверхности планшетов, сохраняют выраженную гетерогенность в содержании ДНК, характерную для суспензионной фракции, что предполагает различие морфофункциональных свойств (поликлоновость) данной субпопуляции клеточной культуры. При резком нарастании общей клеточной массы доля крупных (гигантских; 15–50 и более мкм) клеток, прикрепившихся к пластику, на протяжении 21 сут культивирования оставалась постоянной и составляла 1% адгезирующей фракции. Установлено, что крупные Jurkat-Т-клетки (медианное значение диаметра 31 мкм) передвигались по пластику с линейной (по медиане) скоростью 38 мкм/ч. Морфологически идентифицируется полинуклеарность Jurkat-Т-клеток на пластике; выявлен линейный рост подвижности адгезирующих клеток с увеличением их диаметра (коэффициент регрессии $r = 0.33$; $p < 0.02$; $n = 52$). Обсуждаются возможные клеточно-молекулярные механизмы повышенного числа копий ДНК в части адгезирующих Jurkat-Т-клеток. Предполагается, что обнаруженное новое свойство (двигательная активность) может обеспечивать полиплоидным (многоядерным) адгезирующим Jurkat-Т-клеткам существенное преимущество направленной миграции (хемотаксиса) в растущей клеточной популяции в условиях недостатка нутриентов, обусловленного сменой питательной среды через 3–4 сут культивирования.

Ключевые слова: проточная цитометрия, конфокальная сканирующая лазерная микроскопия, миграция адгезирующих клеток, Cell-IQ фазово-контрастная микроскопия, компьютерная морфометрия

DOI: 10.31857/S004137712102005X

Т-лимфобластоподобные лейкозные клетки человека линии Jurkat (Jurkat-Т-клетки) с 80-х годов XX века являются наиболее известной и популярной

моделью для изучения внутриклеточного сигналинга и Т-клеточной активации (Abraham, Weiss, 2004), исследования экспрессии генов, иммунных и цитотоксических реакций на различные раздражители (Tuomela et al., 2013; Khlusov et al., 2018). Многие аспекты жизнедеятельности штаммов Jurkat-Т-клеток

Принятые сокращения: ППС – полная питательная среда; PI – йодистый пропидий.

актуальны и в настоящее время (Fabre et al., 2008; Yang et al., 2019).

Высокая генетическая нестабильность культуры Jurkat-T-клеток, обусловленная вариациями числа и структуры хромосом, генными мутациями (Мамаева, 2002; Gioia et al., 2018), приводит к гетерогенности генома, которая в суспензионной части клеточной культуры возрастает со временем культивирования (Snow, Judd, 1987). Часть мутаций имеет место в генах, вовлекаемых в сигнальные пути T-клеточного рецептора (Gioia et al., 2018), определяющего, в том числе, перестройки цитоскелета в этих клетках (Abraham, Weiss, 2004). Тем не менее, при общем количестве ссылок в базе Pubmed порядка 700–900 в год за период 2000–2015 гг., касающихся всех проблем изучения клеточной линии Jurkat (Gioia et al., 2018), статьи, описывающие свойства ее адгезирующей субпопуляции, немногочисленны. Например, Jurkat-T-клетки адгезируют к различным субстратам (Cárcamo et al., 2006), что может провоцировать процессы дефектного цитокинеза и эндоцитоза, приводящего к усилению мутагенеза, образованию анеуплоидных, а также многоядерных клеток, способствующих появлению новых клонов клеточной линии (Huang et al., 2005). Однако авторы отмечают, что описанные клеточно-молекулярные процессы менее характерны для Jurkat-T-клеток в сравнении с другими лейкозными линиями. Кроме того, при общем интересе к подвижности T-лимфоцитов (Arkhipov, Maly, 2015) большинство публикаций в отношении Jurkat-T-клеток посвящено инвазии (хемотаксису) их суспензионной фракции через полупроницаемые мембраны в камере Бойдена (Edmond et al., 2015). Таким образом, существует явный дефицит сведений о морфофункциональных свойствах адгезирующей субпопуляции лейкозных T-лимфобластов линии Jurkat и возможном биологическом значении ее формирования.

В связи с этим, цель исследования заключалась в определении содержания нуклеиновых кислот и подвижности *in vitro* Jurkat-T-клеток, прикрепляющихся к пластику, с использованием конфокальной сканирующей лазерной микроскопии и Cell-IQ фазово-контрастной микроскопии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток. Использовали иммортализованную линию Jurkat лейкозных T-лимфобластоподобных клеток человека из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН, Санкт-Петербург), стандартизованную до 5.25×10^4 клеток в 1 мл полной питательной среды (ППС) при 95%-ной жизнеспособности. Клетки культивировали в 12-луночных планшетах (Orange Scientific, Бельгия) в ППС, содержащей RPMI 1640 с L-глутамином (Gibco Life Technologies, Великобритания), 10% инактивированной (при 56°C в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров

(Gibco, Германия), 0.5 мкмоль/л β-меркаптоэтанола (AcrosOrganics, США), 100 мкг/мл пенициллин и 100 Ед./мл стрептомицина (Gibco Life Technologies, США). Клетки культивировали в течение 7 сут при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂ с однократной сменой среды на 3 сут. При 21-суточном культивировании исходное число Jurkat-T-клеток при посеве составило 1.05×10^6 клеток (при 95% жизнеспособности) в 1 мл той же ППС. Замену среды проводили каждые 3–4 сут.

Проточная цитометрия. Через 7 сут культивирования клеток собирали надосадочную жидкость с фракцией суспензионных клеток, которые далее анализировали методом проточной цитометрии, используя цитофлуориметр MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия). Долю (%) жизнеспособных клеток и клеток, погибших путем апоптоза или некроза, определяли при помощи набора реагентов ViaCount® (Merck, США) (рис. 1) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Для детекции содержания нуклеиновых кислот клетки фиксировали в холодном 70%-ном этаноле (30 мин при 4°C) с последующей двукратной отмывкой в фосфатно-солевом буфере (PBS) с помощью центрифугирования (1500 об./мин в течение 15 мин), обрабатывали РНКазой А (Sigma-Aldrich, США) и окрашивали йодидом пропидия (PI) в соответствии с инструкцией производителя (Thermo Fisher Scientific, США). Цитофлуориметрические результаты обрабатывали с помощью программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США).

Световая микроскопия. Адгезирующие к пластику Jurkat-T-клетки через 21 сут культивирования сушили на воздухе, фиксировали и окрашивали 2%-ным раствором ализаринового красного S (Sigma-Aldrich, США). Цитологические препараты микроскопировали в проходящем свете на микроскопе AxioScope 40 (Carl Zeiss, Jena, Германия) при увеличении объектива (4–20)×, фотографировали с помощью фотоаппарата Canon Power Shot G10 (Canon Inc., Япония) с разрешением 14.7 мегапикселей и аппаратно-программного комплекса AxioVision 4.6 (Carl Zeiss, Jena, Германия).

Конфокальная лазерная микроскопия. В 7-суточной культуре прикрепившиеся к пластику клетки окрашивали флуорохроматическим красителем акридиновым оранжевым (Sigma-Aldrich, США), который связывается с нуклеиновыми кислотами (Pletmel, 2016). Акридиновый оранжевый существует в растворе как в мономерной, так и димерной форме. Мономеры красителя образуют комплексы с двухспиральной нуклеиновой кислотой (ДНК, двуспиральной РНК некоторых вирусов), в то время как димеры – с односпиральными нуклеиновыми кислотами (РНК, односпиральными ДНК некоторых вирусов и бактериофагов, деполимеризованной ДНК). При воздействии на клетку ультрафиолетового (405 нм) и голубого (488 нм) излучения комплексы акридинового оранжевого с РНК флуоресцируют в

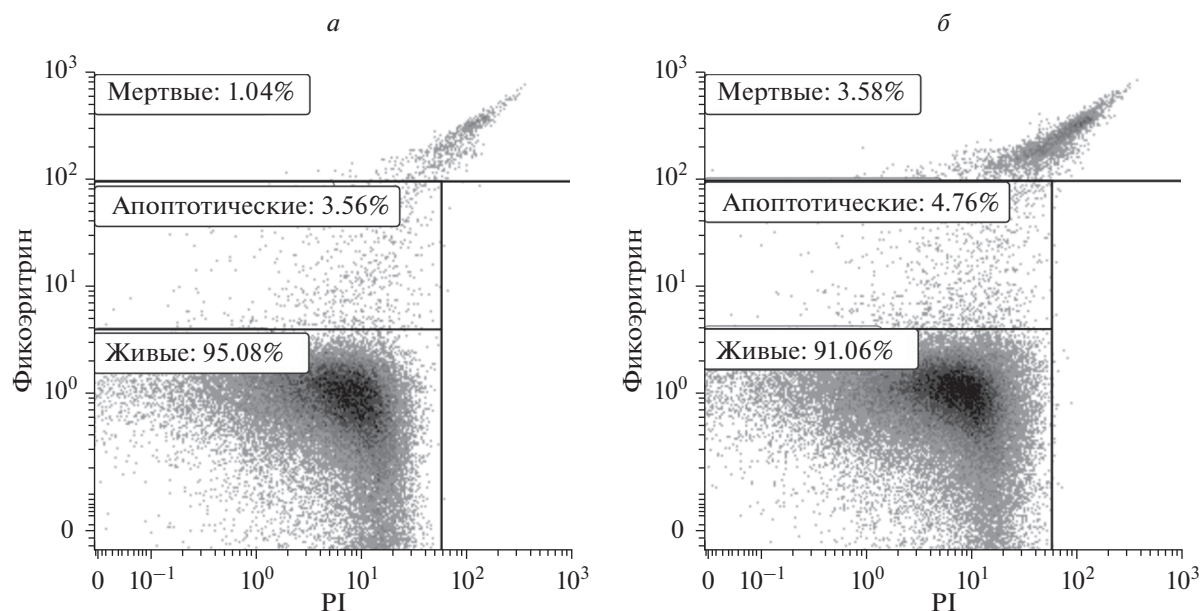


Рис. 1. Гистограмма распределения суспензионных Jurkat-T-клеток по жизнеспособности до начала культивирования (а) и через 7 сут культивирования (б). Проточная цитометрия с использованием набора реактивов для определения жизнеспособности Guava ViaCount® (Merck, США); PI – йодистый пропидий.

красном диапазоне (650 нм), с двунитевой ДНК – в зеленом спектре длин (527 нм).

Раздельная съемка условно зеленого (300–530 нм; от УФ до зеленого спектра) и красного (565–800 нм; от красного до дальнего красного спектра) каналов флуоресценции с использованием конфокальной сканирующей лазерной микроскопии (микроскоп LSM-700; Carl Zeiss, Германия) позволила провести оценку интенсивности окрашивания ДНК и РНК. Для каждой из 3-х лунок планшета с клетками выбирали 10 областей визуализации. Цитоморфометрическое исследование площади и числа клеток проводили с использованием инструментов компьютерной программы Adobe Photoshop CS6 (Adobe Inc., США), как описано ранее (Шахов и др., 2004), в соответствии с принципами компьютерной морфометрии цифровых изображений (Автандилов, 2006). Интенсивность флуоресценции 433 клеток после окраски определяли в каждой из 3-х лунок в 10 областях визуализации (всего 30 областей).

Фазово-контрастная микроскопия. Морфологию и подвижность прикрепившихся к пластику Jurkat-T-клеток изучали в течение 7 сут с использованием интегрированной платформы для непрерывной фазово-контрастной визуализации живых клеток в реальном времени Cell-IQ® v2 MLF (CM Technologies, Финляндия) как описано ранее для мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (Litvinova et al., 2017). При ручной обработке цифровых видеозаписей определяли линейную скорость свободного движения клеток до их вступления в межклеточные контакты. В связи с вариабельностью

формы и различными размерами мигрирующих Jurkat-T-клеток расстояние, пройденное клеткой, оценивали по перемещению ядра.

Статистический анализ. При анализе полученных данных использовали возможности стандартного пакета STATISTICA for Windows версия 13.3. Нормальность распределения в выборке проверяли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Рассчитывали параметры распределений: медиану (Me), 25%-ный (Q_1) и 75%-ный (Q_3) квартили, определяли корреляционные (r_s – по Спирмену) и регрессионные (r) зависимости показателей. Различия считали статистически значимыми согласно критерию Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В суспензионной культуре Jurkat T-клеток после 7-суточного культивирования доля жизнеспособных клеток (рис. 1) составила в среднем 91% при 9% клеток, погибших путем апоптоза (5%) или некроза (4%) при исходных (до культивирования) значениях 95, 4 и 1% соответственно. Проточная цитометрия (рис. 2) показала присутствие нескольких субпопуляций в суспензии Jurkat-T-клеток, статистически значимо ($p < 0.05$) различающихся по интенсивности флуоресценции (ИФ) нуклеиновых кислот при окраске PI (табл. 1). Так, обнаружены слабо окрашенные клетки (медиана ИФ 3.59 усл. ед), предположительно апоптотические тельца, содержащие фрагментированную ДНК, а также гаплоидные формы, доля которых в геноме клеток линии Jurkat мо-

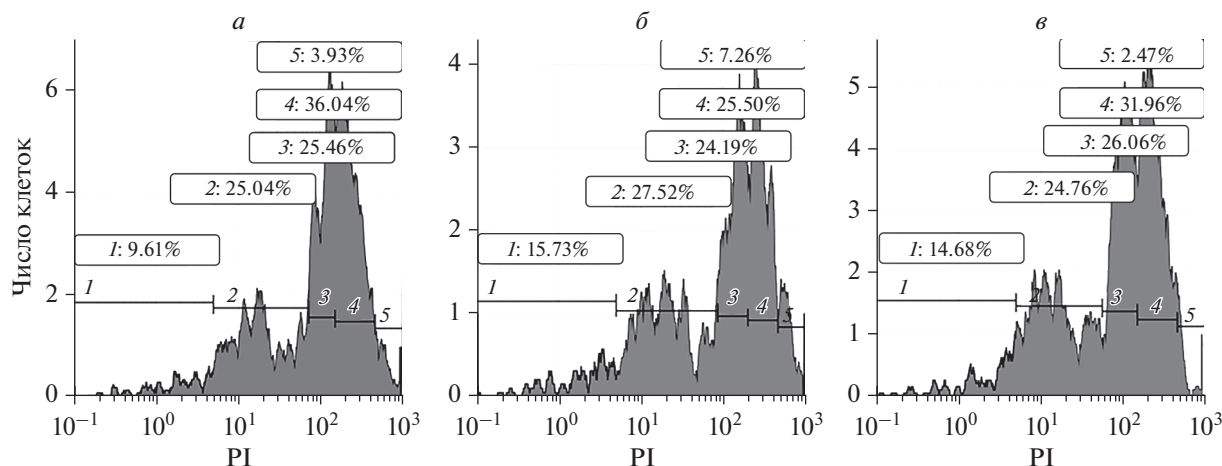


Рис. 2. Распределение суспензионных Jurkat-T-клеток по интенсивности флуоресценции после окраски йодидом пропидия (PI) через 7 сут культивирования. Проточная цитометрия, показаны данные трех экспериментов (а, б, в). Выделены фракции: слабо окрашенных клеток (1), гетерогенной по размерам и интенсивности флуоресценции (2, 3, 4) и клеток с максимальной интенсивностью флуоресценции (5).

жет достигать нескольких процентов согласно данным из литературы (Gioia et al., 2018). Выявлена и неоднородная фракция клеток по медиане ИФ (в диапазоне 21.29–117.05–232.61) (рис. 2) и размерам (рис. 3). В сумме их относительное количество в популяции достигает 82.46% по медианам. Вероятно, это клетки с 2–4 копиями ДНК, доля которых является основной в геноме линии Jurkat, поскольку составляет не менее 79% (Gioia et al., 2018). Малая фракция клеток (3.93%) с максимальной ИФ (более 600 усл. ед.) включала, скорее всего, полиплоидные формы (5 и более копий ДНК).

По данным из литературы, Jurkat-T-клетки являются, преимущественно, тетраплоидами (более 65% генома) с анеуплоидными вариациями и частотой полиплоидии до 8% (Мамаева, 2002; Marie et al., 2013; Gioia et al., 2018). Наши данные по окраске нуклеиновых кислот в целом соответствуют сведениям о гетерогенности суспензионной культуры этих клеток, полученным при кариологическом анализе и секвенировании генома (Snow, Judd, 1987; Мамаева, 2002; Marie et al., 2013; Gioia et al., 2018). В связи с

этим методический подход, основанный на флуоресцентной окраске нуклеиновых кислот, использовали для изучения адгезирующей фракции Jurkat-T-клеток.

При культивировании на протяжении 7 сут часть Jurkat-T-клеток адгезировала к пластиковой поверхности культуральных планшетов (рис. 4) и не смывалась при удалении суспензионной части клеточной культуры. При этом выявлена субпопуляция крупных клеток с диаметром до 50 мкм и более, способных прикрепляться к пластиковой поверхности культуральных планшетов и принимающих неправильную, иногда фибробластоподобную, форму (рис. 4).

С использованием Cell-IQ фазово-контрастной микроскопии нами измерена подвижность Jurkat-T-клеток, прикрепившихся к пластику. Время начала движения клеток варьировало в интервале 10–60 ч культивирования. В последующие сроки резкое увеличение клеточной массы (рис. 5) не позволяло визуализировать отдельные клетки на пластиковой поверхности планшетов.

Таблица 1. Доля суспензионных Jurkat-T-клеток с различным содержанием нуклеиновых кислот и интенсивность их флуоресценции (ИФ) после 7-суточного культивирования. Проточная цитометрия, окраска фиксированных клеток йодидом пропидия

Доля клеток в суспензии, %	14.68 (9.61–15.73)	25.04 (24.76–27.52)	25.46 (24.19–26.06)	31.96 (25.50–36.04)	3.93 (2.47–7.26)
ИФ, усл. ед.	3.59 (3.02–4.02)	21.29 (20.74–23.29)	117.05 (102.17–135.98)	232.61 (221.54–285.15)	618.97 (459.31–664.15)

Примечание. В табл. 1–3 результаты представлены как Me (Q1–Q3), выборки включали клетки из 3 лунок планшета (n). Различия между ИФ всех субпопуляций статистически значимы ($p < 0.05$).

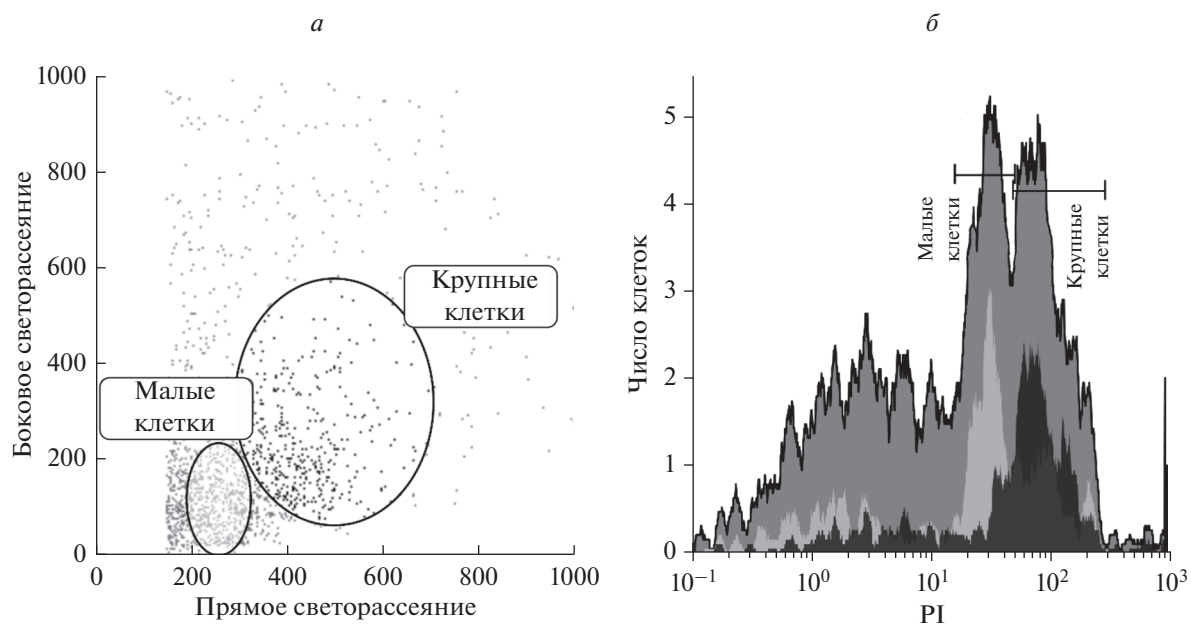


Рис. 3. Гетерогенность суспензионных Jurkat-T-клеток по размерам и интенсивности флуоресценции при гейтировании по прямому и боковому светорассеянию (*a*) и окраске йодидом пропидия (PI, *б*) через 7 сут культивирования согласно данным проточной цитометрии.

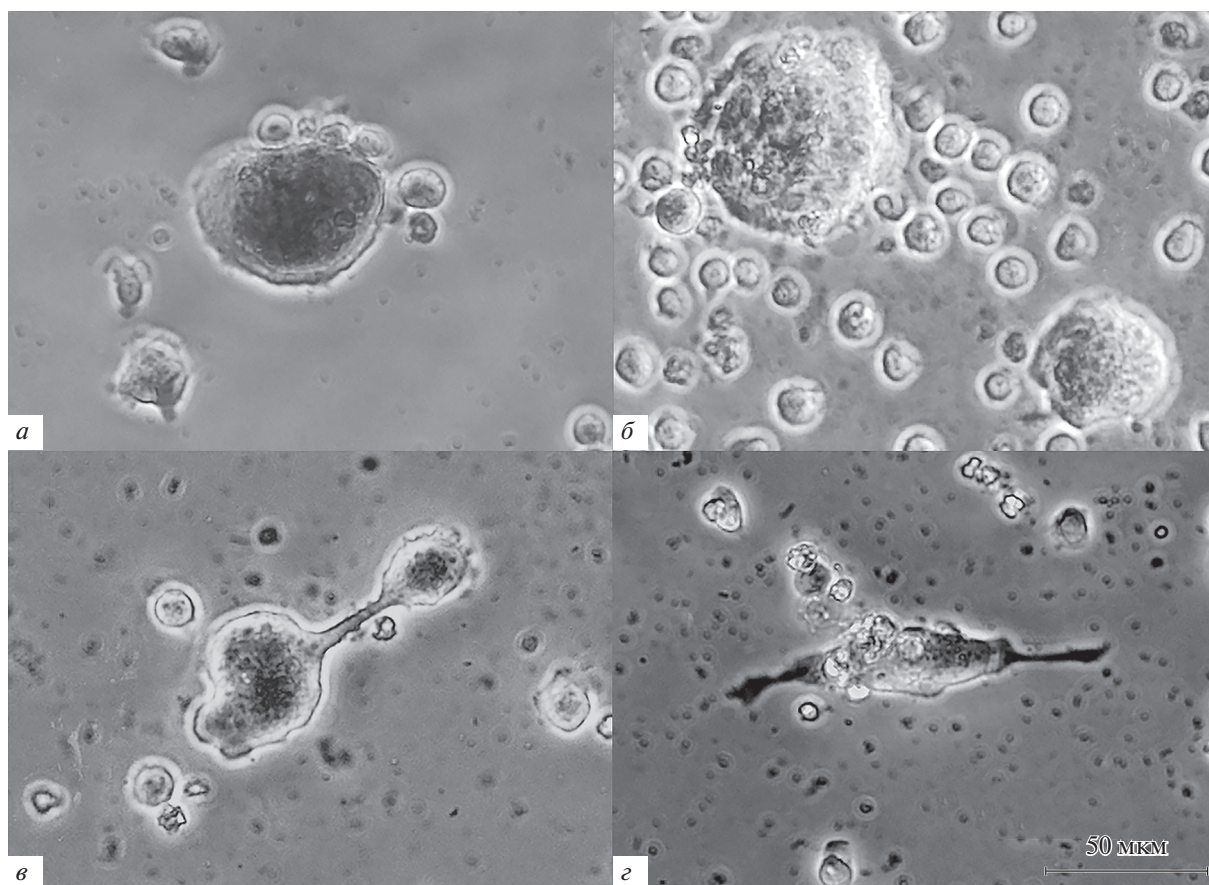


Рис. 4. Варианты морфологии крупных Jurkat-T-клеток, адгезированных на пластике через 21 сут культивирования. *a*, *в*, *г* – окраска ализариновым красным; *б* – 7-суточная культура, неокрашенные клетки в фазовом контрасте. Показаны многоядерные клетки (*a*, *б*), делящаяся клетка (*в*) и фибробластоподобная клетка (*г*).

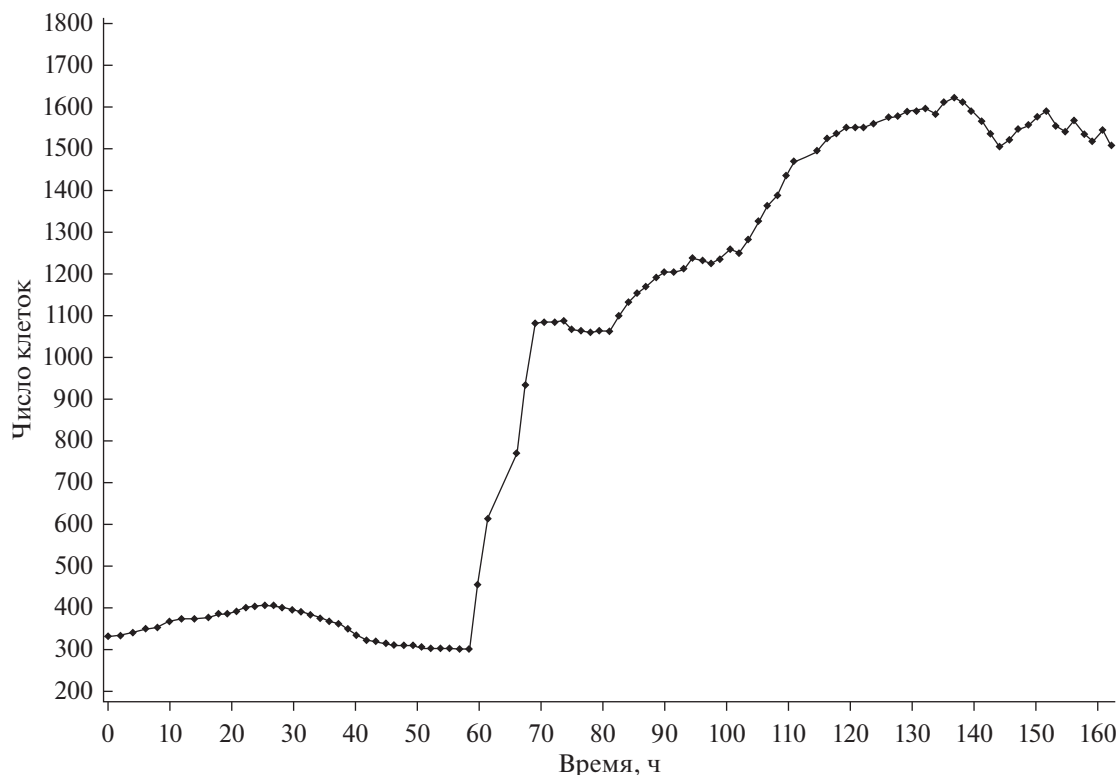


Рис. 5. Динамика изменения числа Jurkat-T-клеток в течение 7 сут культивирования. Наблюдение с помощью Cell-IQ фазово-контрастной микроскопии.

Корреляционная зависимость скорости движения клеток от времени начала их движения не выявлена, что позволило объединить данные в одну выборку (табл. 2). Диаметр изученных клеток варьировал от 16 до 42 мкм, поскольку при микроскопии мелкие клетки сливались с общей массой, а клетки с диаметром 50 мкм (рис. 2) встречались редко. Крупные клетки (медианный диаметр 31 мкм) передвигались по неправильной траектории с короткими (2-часовыми) линейными участками движения с медианной скоростью 38 мкм/ч (табл. 2), что сопоставимо с таковой для мезенхимных стволовых клеток жировой ткани человека (Литвинова и др., 2017). Линейная связь скорости миграции Jurkat-T-клеток с их диаметром (коэффициент регрессии $r = 0.33$; $p < 0.02$; $n = 52$; $y = -5.3 + 1.92x$) свидетельствует в пользу жизнеспособности части субпопуляции крупных Т-лимфоцитов.

Согласно данным конфокальной микроскопии площадь и диаметр прилипающих к пластику Jurkat-T-клеток тесно коррелировали ($r_s = 0.98$; $p < 0.0001$; $n = 433$), поэтому в дальнейшем использовали линейный размер клеток. Основная часть (95%) прикрепившихся к пластику лейкозных клеток имела диаметр в пределах 8–18 мкм с медианой 15 мкм. Единичные клетки (12 кл.) обладали крупным размером – более 20 мкм (рис. 6a). По интенсивности флуоресценции нуклеиновых кислот в зеленой части спектра (рис. 6a) были выделены 3 следующие субпопуляции прилипающих Jurkat T-клеток.

1) Клетки с интенсивностью флуоресценции двунизовой ДНК менее 5000 усл. ед. (24.5%; вероятно, это диплоидные, анеуплоидные и мертвые клетки). Возможно, в этой фракции находятся гаплоидные формы вследствие редуктивного митоза тетраплоид-

Таблица 2. Подвижность крупных Jurkat-T-клеток в 7-суточной культуре

Диаметр клеток, мкм	Измеренное время линейного движения клеток, ч	Пройденное расстояние, мкм	Линейная скорость свободного движения клеток, мкм/час
30.6 (25.0–33.3)	2.0 (1.5–3.0)	102.8 (44.4–151.3)	38.4 (24.0–72.9)

Измерены 52 клетки.

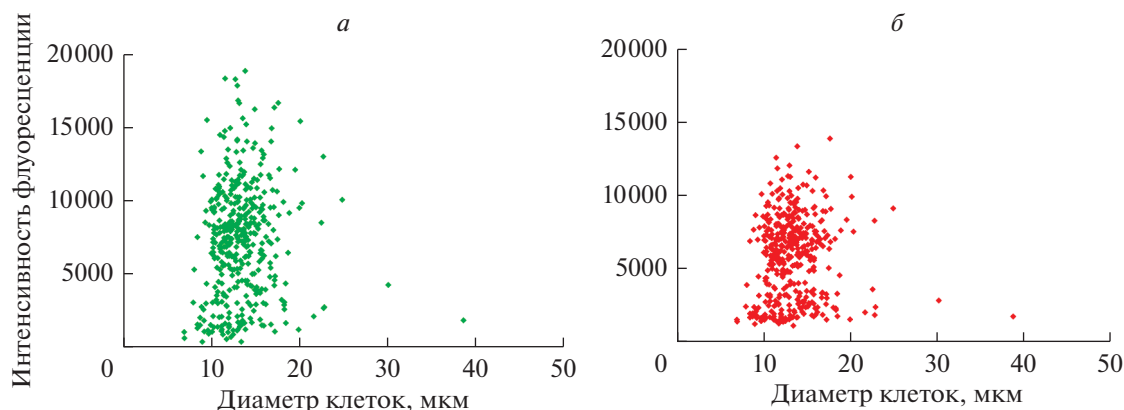


Рис. 6. Распределение интенсивности флуоресценции акридинового оранжевого в Jurkat-T-клетках, адгезированных на пластике, в зеленой (527 нм, *a*) и красной (650 нм, *б*) частях спектра. В зеленом цвете флуоресцирует двунитевая ДНК, в красном – РНК.

дов (Storchova, Pellman, 2004), составляющих более половины всей клеточной популяции (табл. 1).

2) Клетки с интенсивностью флуоресценции 5000–14000 усл. ед. (70.5%; предположительно, это тетраплоидные и анеуплоидные клетки).

3) Клетки с интенсивностью флуоресценции более 14000 усл. ед. (5%; по-видимому, это полиплоидные и анеуплоидные клетки).

Jurkat T-клетки склонны к анеуплоидии, которая усиливается при их адгезии к субстрату (Huang et al., 2005). Этот факт учитывали при интерпретации полученных данных. При этом результаты, полученные на адгезионной и суспензионной субпопуляциях клеток при окраске различными флюорохромными красителями (PI и акридиновым оранжевым), во многом совпадают (табл. 1, рис. 6*a*), прежде всего, по доле полиплоидных форм.

Из рис. 6*a* следует, что в общей популяции лейкозных клеток с увеличением линейных размеров клетки интенсивность зеленого свечения ДНК снижалась, достигая 2000 усл. ед. при диаметре 40 мкм. Однако статистически значимая линейная регрессия не выявлена ($r = 0.05$; $p > 0.49$; $n = 433$). Из общей популяции клеток была изучена выборка крупных прикрепляющихся Jurkat T-клеток с диаметром выше медианного (>15 мкм; 95 клеток) и высокими значениями интенсивности флуоресценции (14000 усл. ед. и выше) при предположении, что это соответствует полиплоидному набору хромосом. Подобных клеток оказалось всего 6 из 95, и достоверная линейная связь полиплоидии и клеточного диаметра также не установлена ($r = 0.24$; $p > 0.64$; $n = 6$).

Одним из очевидных объяснений отсутствия корреляции содержания ДНК и размеров ядра может быть повышенная гибель части Jurkat-T-клеток с увеличением их диаметра, снижающая интенсивность окраски двунитевой ДНК вследствие ее дегра-

дации. В какой-то мере это действительно имеет место, поскольку часть крупных клеток и их ядер прокрашивалась ализариновым красным (рис. 4*a*), что нехарактерно для данного красителя и свидетельствует, по-видимому, о пермеабиллизации клеточных мембран. Повышенную тенденцию к клеточной гибели можно предполагать при диаметре адгезирующих Jurkat-T-клеток более 24 мкм, когда отчетливо снижается интенсивность флуоресценции не только ДНК (рис. 6*a*), но и молекул РНК (рис. 6*б*). В остальных случаях при окраске акридиновым оранжевым адгезирующих Jurkat-T-клеток с диаметром до 20 мкм интенсивность флуоресценции их РНК в красной части спектра (рис. 6*б*) так же, как и ДНК (рис. 6*a*), разделялась на 3 кластера: менее 4000, 4000–10000 и более 10000 усл. ед. Тесная корреляционная связь флуоресценции ДНК и РНК ($r_s = 0.91$; $p < 0.001$; $n = 95$) в крупных (>15 мкм) адгезирующих к пластику Jurkat-T-клетках характеризует, по-видимому, их сбалансированную синтетическую активность (Plemel et al., 2017), говорящую о метаболической активности клеток.

В пользу жизнеспособности части ($r^2 = 0.33^2 = 0.11$) субпопуляции крупных Т-лимфобластов, прикрепившихся к пластику, свидетельствует также их подвижность, описанная выше и растущая с увеличением линейных размеров клеток, приводящая к появлению фибробластоподобных форм (рис. 4*г*). Эти клетки делились, но достаточно редко и, как правило, асимметрично с неравномерным расхождением генетического материала (рис. 4*в*). Действительно, полиплоидные опухолевые клетки делятся мало вследствие G_0/G_1 -блока фаз клеточного цикла (Coward, Harding, 2014). Согласно Cell-IQ-фазово-контрастной микроскопии, общая клеточность в культуре Jurkat-T-клеток росла (рис. 5); в адгезирующей фракции (табл. 3) скорость прироста при пери-

Таблица 3. Количество крупных (диаметр >15 мкм) адгезированных Jurkat-T-клеток при культивировании в течение 7 и 21 сут

7 сут ($n = 3$)		21 сут ($n = 6$)	
крупные клетки, %	число всех клеток в поле зрения	крупные клетки, %	число всех клеток в лунке
0.70 (0.53–1.69) $n_1 = 18$	1413 (675–1575) $n_1 = 18$	1.11 (0.66–1.84)	10093 (3443–32968)

n_1 – число полей зрения.

оде наблюдений 165 ч (7 сут) составила 8.56 (4.09–9.55) кл./ч.

При этом данный показатель положительно коррелировал ($r_s = 0.75$; $p < 0.001$; $n = 18$) со скоростью миграции крупных клеточных форм (0.087 (0.073–0.125 кл./ч)). Однако доля крупных адгезирующих T-клеток, независимо от времени наблюдения (7 или 21 сут) и исходного числа клеток в культуре, оставалась постоянной и варьировала в пределах 1% (табл. 3). По-видимому, часть активно растущей субпопуляции адгезирующих моноклеарных клеток трансформируется в консервативные полиплоидные (многоядерные) формы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Вопрос интерпретации полученных *in vitro* данных достаточно сложен. Известно, что Jurkat-T-клетки адгезируют на других клетках (Kurita-Ochiai et al., 2004), а также на поверхностях, обработанных поли-L/D-лизином (Huang et al., 2005), галектином-8 (Cárcamo et al., 2006), фибронектином (Kim et al., 1999) и, по-видимому, другими молекулами внеклеточного матрикса, взаимодействующими с антигеном CD44 на клеточной мембране (Kurita-Ochiai et al., 2004) и способствующими хемотаксису. Способность крупных Jurkat T-клеток адгезировать не только к пластику, но и к рельефным металлическим поверхностям (Khlusov et al., 2018), в совокупности с обнаруженной двигательной активностью (табл. 2) свидетельствуют об интересных свойствах, нехарактерных для пролиферирующих лимфоцитов.

Существенный прирост линейных размеров клетки с увеличением плоидности ядра и (или) многоядерностью является общеизвестным фактом. Например, прикрепление к пластику ослабляет цитокинез клеток L1210 лимфомы мыши, что в период 2–4 сут культивирования приводит к эндомитозу, нарастанию плоидности и количества многоядерных клеточных форм с резким увеличением клеточного объема (Huang et al., 2005). Однако в субпопуляции крупных (гигантских: 15–50 мкм и более) Jurkat-T-клеток, адгезирующих к пластику при 7-суточном культивировании, тесная связь содержания ДНК и клеточного диаметра нами не обнаружена. Тем не менее, полинуклеарность

крупных Jurkat-T-клеток идентифицируется морфологически (рис. 4).

Полиплоиды (поликарионы) образуются за счет трех механизмов: эндорепликации (эндомитоза), abortивного клеточного цикла (приводит к тетраплоидии) или клеточного слияния, в том числе, в ответ на механический стресс (Storchova, Pellman, 2004), связанный, в частности, с адгезией к искусственной пластиковой поверхности. По-видимому, медленный темп делений обуславливает постоянность клеточной популяции крупных адгезирующих клеток (табл. 3) и способствует росту их размеров согласно данным обзорной статьи (Storchova, Pellman, 2004).

Значительные вариации содержания ДНК, обнаруженные в ядре крупных адгезирующих клеток (рис. 6a), предполагают сосуществование форм с 2–10 и более копиями ДНК, как это описано для суспензионной культуры Jurkat-T-клеток (Gioia et al., 2018). Как показано ранее другими авторами (Huang et al., 2005), механизм эндомитоза нехарактерен для формирования полиплоидии (многоядерности) Jurkat-T-клеток. Мы предполагаем, что активность этого механизма снижается при клеточном диаметре более 18–20 мкм, поскольку наблюдается тенденция к снижению содержания ДНК (рис. 6a). В результате возникает гипотеза, что при диаметре Jurkat-T-клеток более 15 мкм снижается их митотическая активность, которая может сопровождаться повышенным слиянием клеток в многоядерные формы (третий механизм полиплоидии). Гаплоидные формы, образующиеся в результате редуктивного митоза тетраплоидных клеток (Storchova, Pellman, 2004), могут, по-видимому, тоже сливаться в немногочисленные многоядерные формы с низким (менее 3000–4000 усл. ед.) содержанием нуклеиновых кислот (рис. 6), предположительно, с целью избегания апоптоза, характерного для гаплоидных клеток (Storchova, Pellman, 2004).

При этом часть гигантских полиплоидных (многоядерных) клеток сохраняет жизнеспособность и способна, вероятно, менять свою физиологию, приобретая, например, экспрессию генов инвазивного роста (Storchova, Pellman, 2004), а также генов *oct4* и *nanog*, регулирующих самоподдержание опухолевых стволовых клеток (Salmina et al., 2010). Кроме того, возрастает устойчивость полиплоидных форм к хи-

миотерапии (Coward, Harding, 2014). После воздействия ксенобиотиков свою жизнеспособность сохраняет небольшая часть таких клеток; однако они могут быстро генерировать “вторичные” ядра и, в последующем, новые мутантные клетки (Storchova, Pellman, 2004; Coward, Harding, 2014). Как следствие, полиплоидия (многоядерность) рассматривается как один из механизмов “эволюции опухолей” *in vivo* (Storchova, Pellman, 2004; Coward, Harding, 2014), в том числе посредством формирования клонального разнообразия лейкозных клеток, отражающего, в свою очередь, историю инициации гемобластоза и его потенциал к опухолевой прогрессии (Huang et al., 2005; Morita et al., 2020).

Данные, полученные нами *in vitro*, показали, что субпопуляция Jurkat-T-клеток, адгезирующих к пластиковой поверхности планшетов, сохраняет выраженную гетерогенность в содержании нуклеиновых кислот (рис. 6), характерную для суспензионной фракции, что предполагает различие морфофункциональных свойств (поликлоновость) клеточной культуры. Часть крупных адгезирующих T-клеток приобретает новое свойство — двигательную активность (табл. 2), увеличивающуюся с ростом их размерности. Это может давать существенное преимущество направленной миграции клеток в условиях недостатка нутриентов, обусловленного сменой ППС через 3–4 сут культивирования.

В случае реализации подобного сценария в тканях после метастазирования, адгезирующие, подвижные, полиплоидные (многоядерные) лейкозные лимфобласты могут обеспечить клональную эволюцию (опухолевую прогрессию) *in vivo* за счет положительного (негативного) хемотаксиса по градиенту концентраций кислорода и химиотерапевтических препаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-10031).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Автандилов Г.Г. 2006. Диагностическая медицинская плоидометрия. М.: Медицина. (Avtandilov G.G. 2006. Diagnostic medical ploidyometry, M.: Medicine.)
Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Хлусова М.Ю., Шаркеев Ю.П., Комарова Е.Г., Седельникова М.Б., Мелащенко В.В.,

Мелащенко Е.С., Хлусов И.А. 2017. Cell-IQ-визуализация подвижности, клеточной массы и остеогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при культивировании с рельефным кальцийфосфатным покрытием. ДАН. Т. 476. № 4. С. 470. (Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Todosenko N.M., Khlusova M.Yu., Slepchenko G.B., Cherempey E.G., Sharkeev Yu.P., Komarova E.G., Sedelnikova M.B., Malashchenko V.V., Melashchenko E.S., Khlusov I.A. 2017. Cell-IQ visualization of motility, cell mass, and osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells cultured with relief calcium phosphate coating. Dokl. Biochem. Biophys. V. 476. P. 310. <https://doi.org/10.1134/S1607672917050076>. <https://doi.org/10.7868/S0869565217280258>

Мамаева С.Е. 2002. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Науч. Мир. (Mamaeva S.E. 2002. Atlas of chromosomes of permanent cell lines of humans and animals. M.: Nauchnii Mir.)

Шахов В.П., Хлусов И.А., Дамбаев Г.Ц., Зайцев К.В., Егорова А.Б., Шахова С.С., Загребин Л.В., Волгушев С.А. 2004. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей. Томск: STT. (Shahov V.P., Hlusov I.A., Dambaev G.C., Zajcev K.V., Egorova A.B., SHahova S.S., Zagrebin L.V., Volgushev S.A. 2004. Introduction to methods of cell culture, bioengineering of organs and tissues. Tomsk: STT.)

Abraham R.T., Weiss A. 2004. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. Nat. Rev. Immunol. V. 4. P. 301. <https://doi.org/10.1038/nri1330>

Arkhipov S.N., Maly I.V. 2015. Microtubule appendages mediating T-cell motility and polarity. Integr. Biol. (Camb). V. 7. P. 1143. <https://doi.org/10.1039/c4ib00300d>

Cárcamo C., Pardo E., Oyanadel C., Bravo-Zehnder M., Bull P., Cáceres M., Martínez J., Massardo L., Jacobelli S., González A., Soza A. 2006. Galectin-8 binds specific beta1 integrins and induces polarized spreading highlighted by asymmetric lamellipodia in Jurkat T cells. Exp. Cell Res. V. 312. P. 374. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.10.025>

Coward J., Harding A. 2014. Size does matter: why polyploid tumor cells are critical drug targets in the war on cancer. Front. Oncol. V. 4. P. 123. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00123>

Edmond V., Dufour F., Poiroux G., Shoji K., Malleter M., Fouqué A., Tauzin S., Rimokh R., Sergent O., Penna A., Dupuy A., Levade T., Theret N., Micheau O., Ségui B., Legembre P. 2015. Downregulation of ceramide synthase-6 during epithelial-to-mesenchymal transition reduces plasma membrane fluidity and cancer cell motility. Oncogene. V. 34. P. 996. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.55>

Fabre S., Carrette F., Chen J., Lang V., Semichon M., Denoyelle C., Lazar V., Cagnard N., Dubart-Kupperschmitt A., Mangeney M., Fruman D.A., Bismuth G. 2008. FOXO1 regulates L-selectin and a network of human T cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. J. Immunol. V. 181. P. 2980. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.2980>

Gioia L., Siddique A., Head S.R., Salomon D.R., Su A.I. 2018. A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line.

- BMC Genomics. V. 19. P. 334.
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-4718-6>
- Huang X., Dai W., Darzynkiewicz Z. 2005. Enforced adhesion of hematopoietic cells to culture dish induces endomitosis and polyploidy. *Cell Cycle*. V. 4. P. 801.
<https://doi.org/10.4161/cc.4.6.1695>
- Khlusov I., Litvinova L., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Melashchenko E., Yurova K., Leitsin V., Khlusova M., Pichugin V., Sharkeev Y. 2018. Rough titanium oxide coating prepared by micro-arc oxidation causes down-regulation of hTERT expression, molecular presentation, and cytokine secretion in tumor Jurkat T Cells. *Materials*. V. 11. P. 360.
<https://doi.org/10.3390/ma11030360>
- Kim Y.J., Mantel P.L., June C.H., Kim S.H., Kwon B.S. 1999. 4-1BB Costimulation promotes human T Cell adhesion to fibronectin. *Cell Immunol*. V. 192. P. 13.
<https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1435>
- Kurita-Ochiai T., Seto S., Ochiai K. 2004. Role of cell-cell communication in inhibiting butyric acid-induced T-Cell apoptosis. *Infect. Immun*. V. 72. P. 5947.
<https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5947-5954.2004>
- Marie R., Pedersen J.N., Bauer D.L., Rasmussen K.H., Yusuf M., Volpi E., Flyvbjerg H., Kristensen A., Mir K.U. 2013. Integrated view of genome structure and sequence of a single dna molecule in a nanofluidic device. *Proc. Natl. Acad. Sci*. V. 110. P. 4893.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1214570110>
- Morita K., Wang F., Jahn K., Hu T., Tanaka T., Sasaki Y., Kuipers J., Loghavi S., Wang S.A., Yan Y., Furudate K., Matthews J., Little L., Gumbs C., Zhang J. et al. 2020. Clonal evolution of acute myeloid leukemia revealed by high-throughput single-cell genomics. *Nat. Commun*. V. 11. P. 5327.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19119-8>
- Plemel J.R., Caprariello A.V., Keough M.B., Henry T.J., Tsutsui S., Chu T.H., Schenk G.J., Klaver R., Yong V.W., Stys P.K. 2017. Unique spectral signatures of the nucleic acid dye acridine orange can distinguish cell death by apoptosis and necroptosis. *J. Cell Biol*. V. 216. P. 1163.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201602028>
- Salmina K., Jankevics E., Huna A., Perminov D., Radovica I., Klymenko T., Ivanov A., Jascenko E., Scherthan H., Cragg M., Erenpreisa J. 2010. Up-regulation of the embryonic self-renewal network through reversible polyploidy in irradiated p53-mutant tumour cells. *Exp. Cell Res*. V. 316. P. 2099.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.04.030>
- Snow K., Judd W. 1987. Heterogeneity of a human T-lymphoblastoid cell line. *Exp. Cell Res*. V. 171. P. 389.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(87\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(87)90171-6)
- Storchova Z., Pellman D. 2004. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. V. 5. P. 45.
<https://doi.org/10.1038/nrm1276>
- Tuomela S., Autio R., Buerki-Thurnherr T., Arslan O., Kunzmann A., Andersson-Willman B., Wick P., Mathur S., Scheynius A., Krug H.F., Fadeel B., Lahesmaa R. 2013. Gene expression profiling of immune-competent human cells exposed to engineered zinc oxide or titanium dioxide nanoparticles. *PLoS One*. V. 8. P. e68415.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068415>
- Yang T., Peng J., Shu Z., Sekar P.K., Li S., Gao D. 2019. Determination of the membrane transport properties of Jurkat cells with a microfluidic device. *Micromachines (Basel)*. V. 10. P. 832.
<https://doi.org/10.3390/mi10120832>

Content of Nucleic Acids and Motility of Adherent Jurkat T Lymphoblasts *in Vitro*

L. S. Litvinova^{a, *}, V. V. Shupletsova^a, K. A. Yurova^a, O. G. Khaziakhmatova^a, N. D. Gazatova^a,
 N. M. Todosenko^a, M. Yu. Khlusova^a, V. V. Malashchenko^a, E. O. Shunkin^a,
 E. D. Porokhova^b, and I. A. Khlusov^{c, d}

^aCenter for Immunology and Cellular Biotechnology of the Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236000 Russia

^bDepartment of Pathophysiology Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

^cDepartment of Morphology and General Pathology Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

^dResearch School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, 634034 Russia

*e-mail: larisalitvinova@yandex.ru

T-lymphoblast-like human leukemia cells of the Jurkat line (Jurkat T cells) form polyploid forms with an increased DNA content in suspension culture. This promotes, due to pronounced genetic instability, further transformation and development of clonal diversity (polyclonal) of the cell line. Little information is available on the adherent subpopulation of Jurkat T cells. In this work, we analyzed the content of nucleic acids in suspension (DNA) and adhesion (DNA, RNA) subpopulations of Jurkat T cells using flow cytometry (dye – propidium iodide) and confocal laser microscopy (dye – acridine orange), respectively. The morphology and mobility of large (more than 15 μm in diameter) adherent Jurkat T cells were studied using Cell-IQ real-time phase contrast microscopy. According to the fluorescence intensity in the conditionally green wavelength range (300–530 nm: from UV to green) and conditionally red (565–800 nm: from red to far red), 3 subpopulations of adherent Jurkat T cells were identified: with high, medium, and low nucleic acid content. Thus, Jurkat T cells adhering to the plastic surface of the plates retain the pronounced heterogeneity in the DNA content characteristic of the suspension fraction, which suggests a difference in the morphofunctional properties (polyclonicity) of this subpopulation of cell culture. With a sharp increase in the total cell mass, the proportion of large (giant) (15–50 μm or more) cells attached to the plastic remained constant for 21 days of cultivation and amounted to 1% of the adhesion fraction. It was found that large Jurkat T cells (median diameter 31 μm) moved along the plastic with a linear (along the median) speed of 38 μm/h. Polynuclearity of Jurkat

T cells into plastic ones is morphologically identified; a linear growth (regression coefficient $r = 0.33$; $p < 0.02$; $n = 52$) of the mobility of adherent cells with an increase in their diameter was revealed. Possible cellular and molecular mechanisms of an increased number of DNA copies in the part of adherent Jurkat T cells are discussed. It is assumed that the discovered new property (locomotor activity) can provide polyploid/multinucleated adherent Jurkat T cells with a significant advantage of directed migration (chemotaxis) in a growing cell population under conditions of nutrient deficiency caused by a change in the nutrient medium after 3–4 days of cultivation.

Keywords: flow cytometry, confocal scanning laser microscopy, adhesive cell migration, Cell-IQ phase-contrast microscopy, computer morphometry

УДК 616.36-006:612.017.1+571.27

СОДЕРЖАНИЕ ЖЕЛЕЗА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК В ТИМУСЕ И СЕЛЕЗЕНКЕ МЫШЕЙ ПРИ РОСТЕ ГЕПАТОМЫ 22А

© 2021 г. Е. А. Зеленский¹, К. В. Рутго^{1, *}, И. В. Кудрявцев¹, А. В. Соколов¹, Е. П. Киселева^{1, 2}

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

²Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, 195067 Россия

*E-mail: krispins-90@mail.ru

Поступила в редакцию 10.12.2020 г.

После доработки 18.12.2020 г.

Принята к публикации 18.12.2020 г.

Известно, что опухолевый рост подавляет Т-клеточный иммунитет, но также вызывает значительные нарушения метаболизма железа. Мы предположили, что дефицит железа может быть одной из причин иммунодепрессии при опухолевом росте. В работе впервые были сопоставлены показатели пролиферативной активности двух органов иммунной системы – тимуса и селезенки с содержанием в них негемового железа в динамике роста перевиваемой гепатомы 22а. Из общих показателей исследовали концентрацию железа в сыворотке крови и печени. Начиная с третьей недели опухолевого роста у мышей отмечали прогрессирующее снижение массы и клеточности тимуса, а также увеличение массы и клеточности селезенки. У этих животных выявлено снижение пролиферативной активности клеток только в тимусе, но не в селезенке. Однако при этом содержание негемового железа в тимусе было повышено, а в селезенке – снижено. Следовательно, можно предположить, что железа в селезенке, и в тимусе достаточно для обеспечения потребностей клеточной пролиферации в этих органах. Также в тимусе не выявлено снижения экспрессии трансферринового рецептора (CD71) на тимоцитах и активности каталазы, что подтверждает отсутствие дефицита железа в этом органе. Показатели метаболизма железа в тимусе были исследованы при росте перевиваемой опухоли впервые. Таким образом, причиной иммунологических нарушений в организме мышей с гепатомой 22а, таких как инволюция тимуса и снижение пролиферативной активности тимоцитов, не является дефицит железа, а механизмы, лежащие в основе этих процессов, не связаны напрямую с содержанием железа в этом органе. Настоящая работа проливает свет на один из аспектов метаболического влияния опухоли на иммунитет, связанного с обменом железа.

Ключевые слова: железо, пролиферация лимфоцитов, инволюция тимуса, экспериментальные опухоли, трансферриновый рецептор, каталаза

DOI: 10.31857/S0041377121020103

Железо является микроэлементом, необходимым для всех живых клеток и играет важную роль в регуляции клеточной пролиферации, поскольку служит кофактором рибонуклеотид редуктазы – ключевого фермента для биосинтеза дезоксирибонуклеотидов (Zohora et al., 2018). Железо особенно важно для функционирования пролиферирующих клеток, таких как тимоциты и активированные Т-лимфоциты. Установлено, что удаление железа из культуральной среды приводит к подавлению пролиферации клеток, а добавление железа – к восстановлению этого процесса (Pourcelot et al., 2015).

У животных, содержащихся на диете со сниженным содержанием железа, наблюдаются признаки иммунодефицита: атрофия тимуса с уменьшением общего числа тимоцитов и подавлением их пролиферативной активности (Soyano et al., 1982; Kuvibidila et al., 1990), а также снижение пролиферативного ответа Т-лимфоцитов селезенки на митогены (Kuvibi-

dila et al., 1983, 2012; Omara, Blakley, 1994; Klecha et al., 2005).

Известно, что рост многих опухолей также сопровождается и гипоферремией (Kim et al., 2014; Skrajnowska et al., 2015; Chen, Chen, 2018) и иммунологическими нарушениями – инволюцией тимуса, подавлением пролиферации тимоцитов (Киселева, Малыгин, 1998; Shanker et al., 2000; Song et al., 2013) и периферических Т-клеток (Kikuchi, 1982; Rashid et al., 2005). Однако никто не сопоставлял иммунологические характеристики с показателями содержания железа, и они были получены на разных экспериментальных моделях.

Между тем, еще в середине прошлого века были высказаны предположения о том, что описанные изменения могут быть взаимосвязаны и зависеть от веществ, продуцируемых малигнизированными тканями. Накахара и Фукуока (Nakahara, Fukuoka, 1958) выделили из опухоли полипептид, названный ими

“токсогормоном”, который при введении интактным животным вызывал, с одной стороны, инволюцию тимуса, а с другой — изменения, связанные с обменом железа, а именно, уменьшение концентрации железа и гемоглобина в крови, а также снижение активности каталазы в печени. К сожалению, несмотря на многочисленные исследования, активное вещество “токсогормона” так и не было идентифицировано (Kampschmidt, 1965). Однако эти работы позволили нам сделать предположение о том, что одной из многих причин нарушения центрального и периферического Т-клеточного иммунитета при опухолевом росте может быть, в том числе, и дефицит железа.

Для проверки этого предположения мы провели сопоставление пролиферативной активности тимоцитов и спленоцитов с содержанием негемового железа в этих органах в динамике роста перевиваемой опухоли — гепатомы 22а у мышей. Для выявления дефицита железа мы также исследовали экспрессию трансферринового рецептора CD71 на поверхности клеток, активность железосодержащего фермента каталазы в органах и уровень содержания железа в сыворотке крови и печени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. Работу проводили на мышах-самцах СЗНА весом 16–18 г, полученных из питомника “Рапполово”, Санкт-Петербург. Животные находились на стандартной диете, содержащей 18 мг железа/кг. Мыши имели свободный доступ к еде и питьевой воде (централизованное водоснабжение) *ad libitum*. Световой режим день/ночь был установлен по 12 ч, температура в помещении — 22°C. Эксперименты проводили с соблюдением этических принципов в работе с лабораторными животными, исследование было одобрено локальным этическим комитетом при ФГБНУ “ИЭМ” (протокол № 2/15 от 26.02.2015).

Клеточные культуры. Культура клеток гепатомы 22а (МН-22а/МГ-22а), была получена из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Великобритания), 0.1 мг/мл гентамицина (Биолот, Россия) и 0.6 мг/мл глутамина (Биолот, Россия) при 5% CO₂ и 37°C.

Опухолевая модель. Для получения солидных опухолей животным подкожно инокулировали в область спины 2×10^5 живых клеток гепатомы 22а в 0.2 мл забуференного физиологического раствора (PBS). Контрольные животные получали инъекцию только PBS. Животных убивали методом цервикальной дислокации на 7, 14, 21, 28 и 35 сут после инокуляции опухоли, тимус и селезенку взвешивали и определяли содержание негемового железа. Других мышей обескровливали для получения сыворотки

крови и определения содержания негемового железа и гемоглобина.

Определение содержания негемового железа в сыворотке крови и тканях. Концентрацию железа определяли колориметрическим методом (Rebouche et al., 2004) с использованием хромогенного агента феррозина. Тканевые гомогенаты приготавливали в деионизированной воде 1 : 10 (масса/объем) и смешивали с равным объемом раствора, преципитирующего белки (1 М HCl и 10% трихлоруксусной кислоты), а к 50 мкл сыворотки добавляли 150 мкл преципитирующего раствора. Пробы нагревали при 95°C в течение 1 ч, затем охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали при 8200 g 10 мин. После чего 30 мкл супернатанта смешивали с 30 мкл хромогенного субстрата, состоящего из 0.508 мМ феррозина, 1.5 М ацетата натрия и 1.5% тиогликолевой кислоты; в контрольные пробы феррозин не добавляли. Через 30 мин оптическую плотность раствора измеряли на микропланшетном спектрофотометре (ClarioStar, BMG Labtech, Германия) при длине волны 562 нм. Построение калибровочных кривых проводили в день эксперимента с использованием 0–20 мкг/мл железа (в виде раствора NH₄Fe(SO₄)₂ · 12H₂O в 0.4 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.5) в качестве стандарта.

Определение содержания гемоглобина в крови. Уровень общего гемоглобина определяли спектрофотометрическим методом путем добавления 1 мл 0.04% водного раствора аммиака к 10 мкл крови. Оптическую плотность раствора измеряли в 96-луночных планшетах при длине волны 415 нм и выражали в процентах по отношению к контрольному уровню.

Определение активности каталазы. Активность каталазы в гомогенатах тимуса и селезенки проводили по описанному ранее методу (Hadwan, Ali, 2018), адаптированному для микропланшетов. 50 мкл тканевого гомогената, разведенного в 2, 4 и 8 раз 50 мМ натрий-фосфатным буфером (pH 7.0) смешивали со 100 мкл 10 мМ H₂O₂. После инкубации в течение 2 мин на термощейкере при 270 оборотах в минуту и 37°C реакцию останавливали путем добавления 50 мкл хромогенного раствора, содержащего 10 мМ NH₄VO₃ в 0.5 М H₂SO₄. Оптическую плотность раствора измеряли на микропланшетном спектрофотометре при длине волны 452 нм. Для построения калибровочной кривой 100 мкл последовательных двукратных разведений 10 мМ H₂O₂ смешивали с 50 мкл 50 мМ натриево-фосфатного буфера, pH 7.0 (вместо тканевого гомогената) и через 2 мин добавляли 50 мкл 10 мМ NH₄VO₃ в 0.5 М H₂SO₄. После определения белка по Бредфорду специфическую активность каталазы в пробах выражали в микромолях поглощенной H₂O₂ в течение 1 мин на 1 мг общего белка.

Определение пролиферативной активности лимфоцитов. Тимусы и селезенки выделяли в стерильных условиях и приготавливали клеточную суспензию в среде RPMI-1640 (GIBCO, США) с добавлением

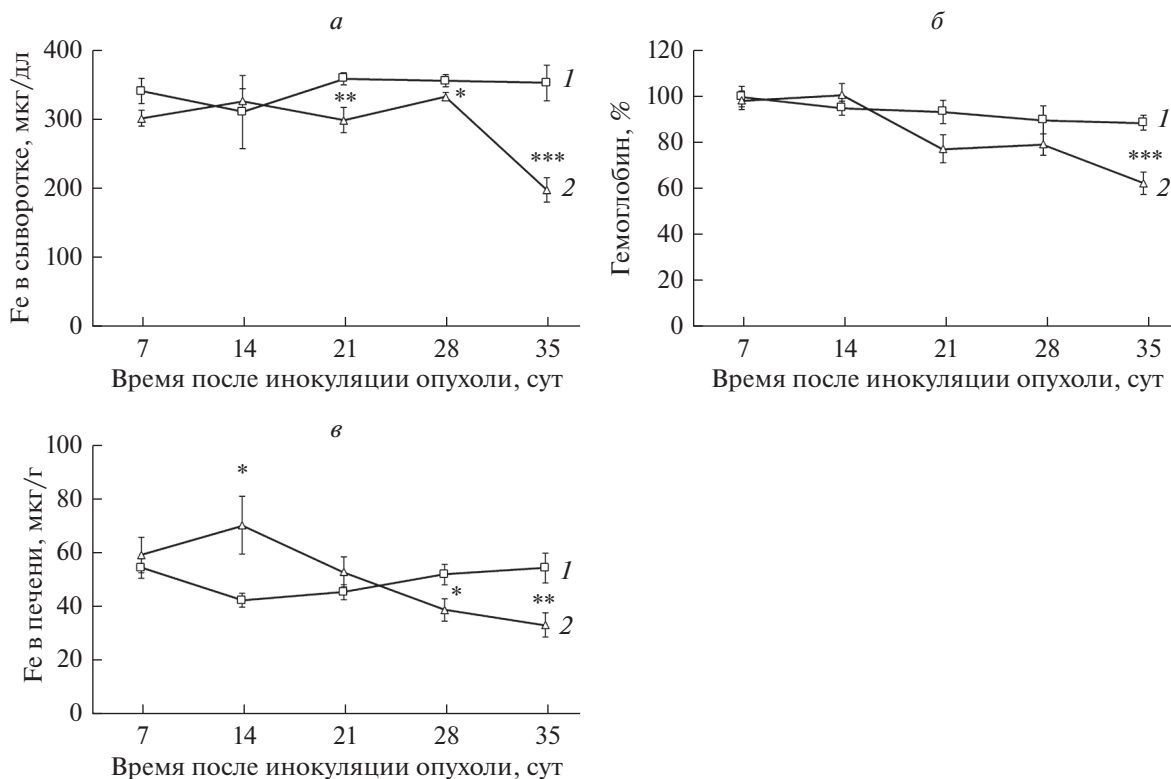


Рис. 1. Общие показатели содержания железа в организме контрольных животных (кривая 1) и мышей с гепатомой 22а (кривая 2). По оси ординат: а – концентрация железа в сыворотке крови, мкг/дл ($n = 10-15$); б – относительное содержание гемоглобина в крови, % ($n = 10$); в – содержание негемового железа в печени, мкг на 1 г сырой ткани ($n = 15-20$). Здесь и далее данные представлены в виде средней величины и ошибки среднего ($M \pm m$), звездочками обозначены достоверные различия между опухолевой и контрольной группами животных: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

10%-ной фетальной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, USA), 50 мкМ 2-меркаптоэтанола и 80 мкг/мл гентамицина. Клетки в количестве $2 \times 10^5/200$ мкл помещали в 96-луночные планшеты в трех повторностях и инкубировали при 37°C с 5% CO_2 в течение 1 ч (для тимоцитов) и 72 ч (для спленоцитов). В качестве Т-клеточного митогена использовали конканавалин А в концентрации 2.5 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США). Проллиферативный ответ оценивали путем добавления 1 мкКи ^3H -тимидина на пробу (удельная активность 23 Ки/мМ). Клетки собирали на фильтры, промывали, высушивали и помещали в сцинтилляционную жидкость для измерения радиоактивности на счетчике (Beckman, США).

Проточная цитофлуориметрия. Фенотипирование тимоцитов проводили с использованием моноклональных антител против CD4 мыши, меченных PE-Cy7 (BD Pharmingen, США), и против CD8, меченных PE-Cy5 (BD Pharmingen, США); рецептор трансферрина выявляли с помощью моноклональных антител к CD71 мыши, меченных фикоэритрином (BD Pharmingen, США), а также соответствующих изотипических контролей на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Для каждого образца анализировали не менее 15000 оди-

ночных клеток. Данные обрабатывали с помощью программы Kaluza™ версия 1.3 (Beckman Coulter, США).

Статистическая обработка. Данные обрабатывали статистически с помощью t -теста (критерий Стьюдента).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общие показатели содержания железа. Для оценки общих показателей исследовали концентрацию железа в сыворотке крови и гемоглобина в крови. Концентрация железа в сыворотке мышей с гепатомой 22а начинала уменьшаться на третьей неделе опухолевого роста и затем прогрессивно снижалась, составляя на поздних сроках исследования около половины контрольного уровня (рис. 1а). Концентрация гемоглобина в крови была более стабильна и снижалась только на терминальной фазе опухолевого роста (рис. 1б). Начиная с 28 сут опухолевого роста снижалось также и содержание негемового железа в печени (рис. 1в).

Исследование тимуса. Рост гепатомы 22а вызывал прогрессирующее снижение массы тимуса, начиная с третьей недели опухолевого роста (рис. 2а), кото-

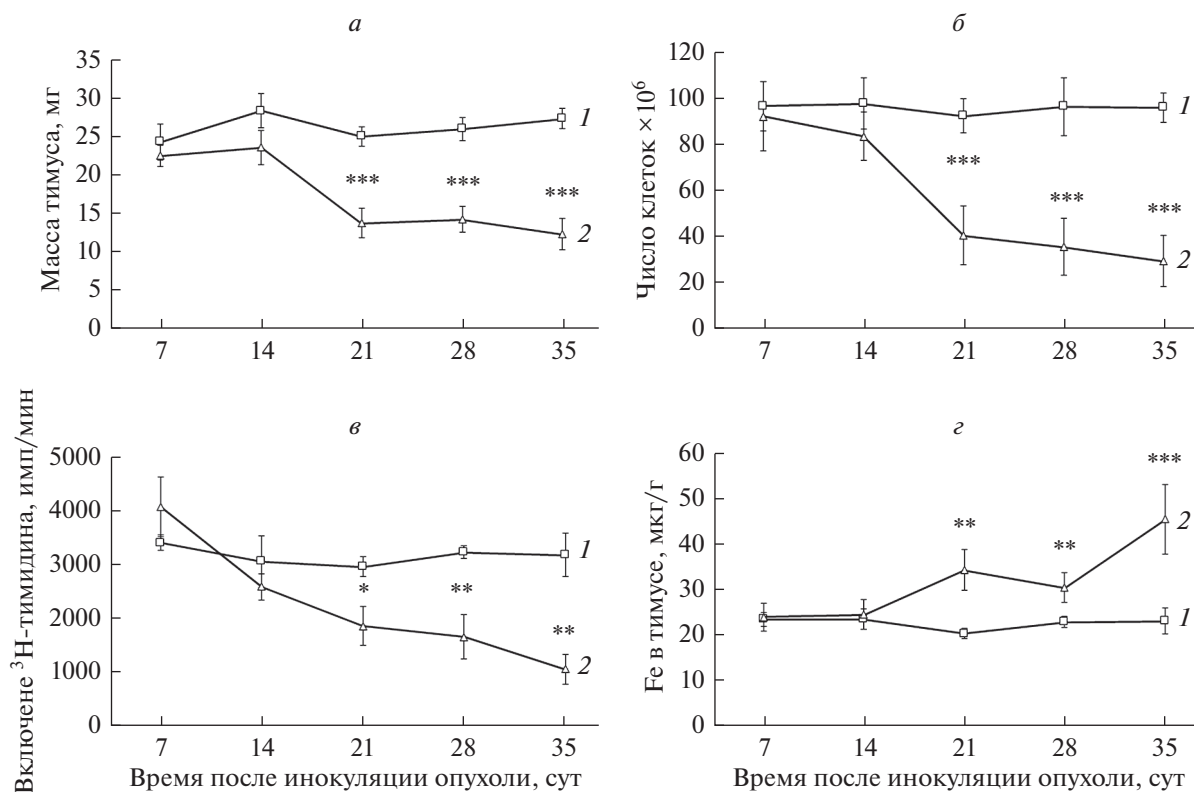


Рис. 2. Показатели состояния тимуса у контрольных мышей (кривая 1) и животных с гепатомой 22а (кривая 2). По оси ординат: а – масса тимуса, мг ($n = 15-20$); б – число клеток в тимусе, млн; в – пролиферация тимоцитов, включение ^3H -тимидина, импульсы/мин ($n = 6$); г – содержание негемового железа в тимусе, мкг/г сырой ткани ($n = 15-20$).

рое сопровождалось снижением числа клеток в органе (рис. 2б). Параллельно со снижением массы и клеточности тимуса была подавлена также и пролиферативная активность тимоцитов (рис. 2в). Задачей нашего исследования было сопоставить динамику этих показателей с содержанием железа в тимусе. Поскольку содержание железа в сыворотке крови у

животных с гепатомой 22а было снижено, мы предполагали наличие возможного дефицита этого микроэлемента и в тимусе.

Для решения этого вопроса исследовали три показателя: содержание негемового железа в тимусе, активность железосодержащего фермента – каталазы и экспрессию трансферринового рецептора (CD71). Насколько нам известно, эти показатели в тимусе при опухолевом росте ранее никто не исследовал.

Неожиданным оказалось повышение содержания негемового железа в тимусе, которое наблюдали, начиная с третьей недели опухолевого роста (рис. 2г). При исследовании специфической активности каталазы в тимусе было также обнаружено ее повышение в гомогенатах тимуса мышей на 21 сут роста гепатомы 22а по сравнению с этим же показателем у контрольных животных (рис. 3). Кроме того, была также оценена специфическая активность этого фермента в селезенке и показано, что она не отличается от контроля у животных на 21 сут роста гепатомы 22а.

Считается, что трансферрин и его рецептор необходимы для нормальной дифференцировки тимоцитов *in vivo* (Macedo et al., 2003). Трансферриновый рецептор отвечает за поступление железа в клетку и

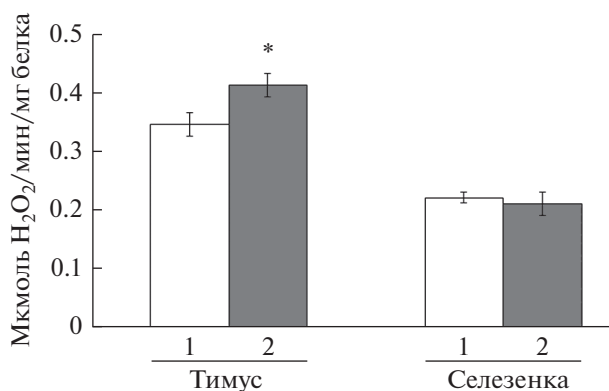


Рис. 3. Специфическая активность каталазы в тимусе и селезенке контрольных мышей (белые столбцы) и животных с гепатомой 22а на 21 сут опухолевого роста (серые столбцы), мкмоль H_2O_2 /мин, поглощенной за 1 мин на 1 мг общего белка ($n = 10$).

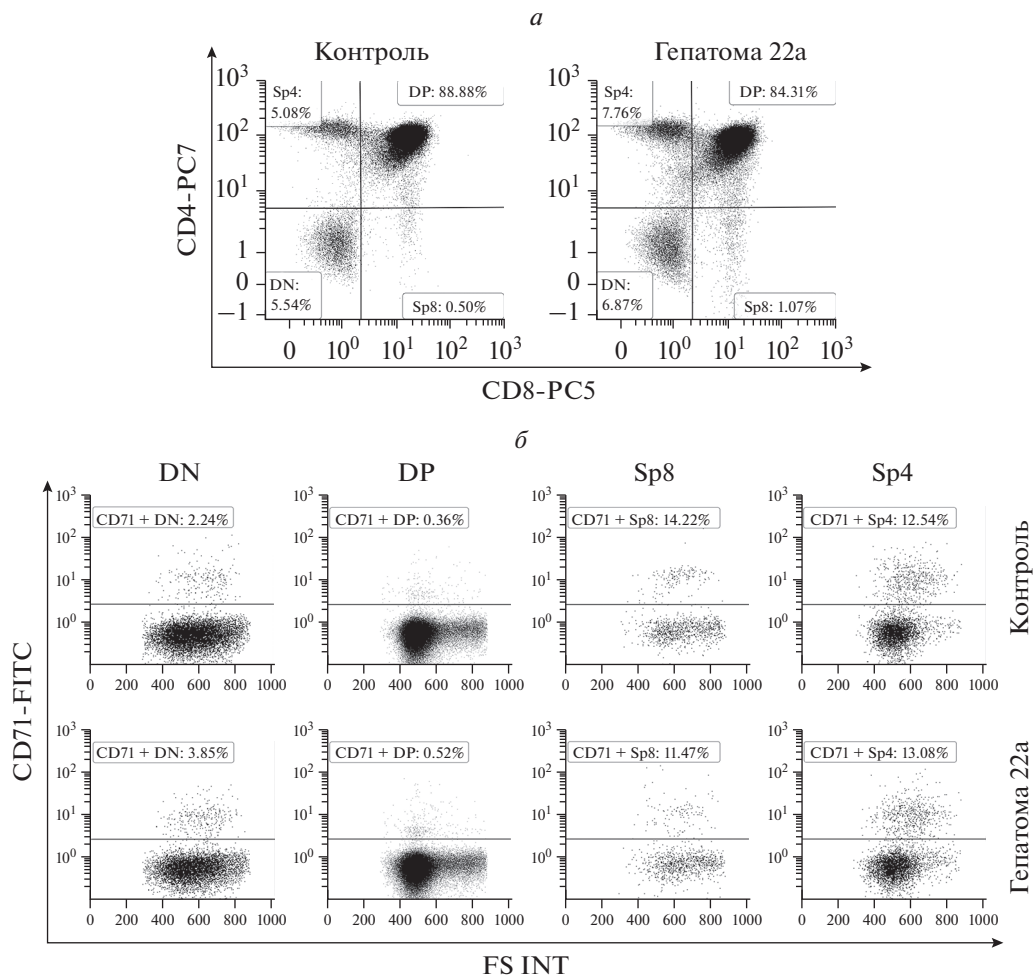


Рис. 4. Основные популяции тимоцитов (*а*) и относительное содержание $CD71^+$ тимоцитов (*б*) на 21-е сут роста гепатомы 22а по данным проточной цитометрии. Представлены результаты одного из трех репрезентативных экспериментов: *а* – распределение тимоцитов по экспрессии CD4/CD8 антигенов у контрольных животных (*слева*) и животных с опухолями (*справа*); *б* – относительное содержание $CD71^+$ -клеток среди $CD4^-CD8^-$ (DN), $CD4^+CD8^+$ (DP), $CD4^-CD8^+$ (Sp8) и $CD4^+CD8^-$ (Sp4) тимоцитов у контрольных мышей (*верхний ряд*) и мышей с опухолями (*нижний ряд*). Число $CD71^+$ -клеток указано в верхней области диаграммы.

в случае железодефицита его мембранная экспрессия повышается (Saldanha-Araujo et al., 2009).

Сначала было исследовано относительное содержание $CD71$ -положительных клеток среди всех тимоцитов и было показано, что в тимусе животных на 21 сут опухолевого роста этот показатель не отличался от контроля и был довольно низким в обеих группах: $1.51 \pm 0.08\%$ – у животных с опухолями и $1.27 \pm 0.08\%$ – в контроле. Поэтому в дальнейшем оценивали число $CD71$ -позитивных клеток среди четырех основных популяций тимоцитов, а именно, среди $CD4^+CD8^+$, $CD4^-CD8^-$, $CD4^+CD8^-$ и $CD4^-CD8^+$ клеток. Имеются данные о том, что у взрослых мышей появление $CD71$ характерно для ранних фаз дифференцировки тимоцитов и данный маркер выявляется в основном на большинстве незрелых делящихся бластных клеток (Breckelmans et al., 1994).

Известно, что инволюция тимуса на поздних сроках роста экспериментальных опухолей приводит не только к резкому сокращению всех клеток, но и к выраженному перераспределению тимоцитов по основным популяциям за счет гораздо большей убыли основной популяции $CD4^+CD8^+$ клеток по сравнению с остальными (Fu et al., 1989; Shanker et al., 2000). В связи с этим необходимо было выяснить, не меняется ли распределение тимоцитов по четырем основным популяциям к 21 сут опухолевого роста. Действительно, как показано на рис. 4а, на этом сроке роста гепатомы 22а показатели распределения тимоцитов еще не отличались от тех же показателей у контрольных животных.

Выявление $CD71$ совместно с маркерами CD4/CD8 не выявило разницы частоты встречаемости $CD71$ -позитивных клеток среди основных популяций по сравнению с контролем (рис. 4б) и состави-

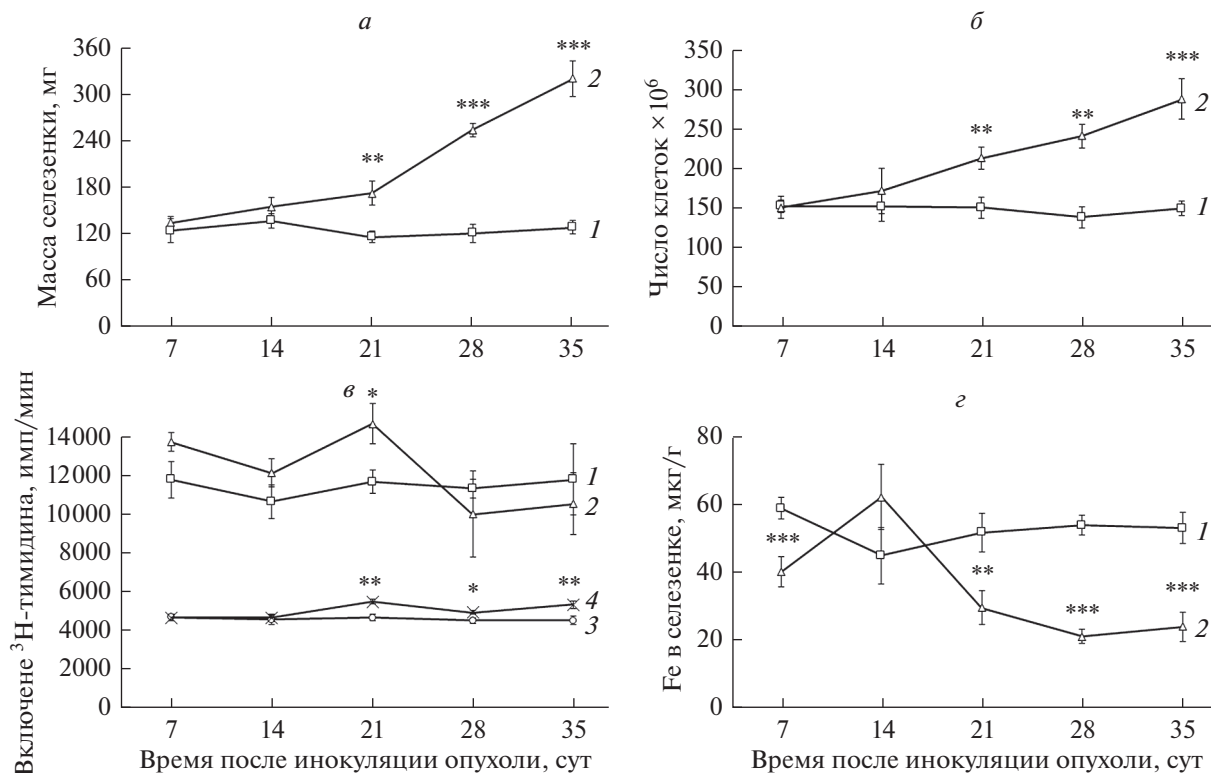


Рис. 5. Показатели состояния селезенки у контрольных мышей (кривая 1) и животных с гепатомой 22а (кривая 2). По оси абсцисс: время после инокуляции опухолевых клеток, сут. По оси ординат: а – масса селезенки, мг ($n = 15-20$); б – число клеток в селезенке, млн; в – пролиферация спленоцитов в присутствии 2.5 мкг/мл конканавалина А (1, 2) и без него (3, 4) у контрольных животных (1, 3) и животных с опухолями (2, 4), включение ³H-тимидина, импульсы/мин ($n = 8$); г – содержание негемового железа в селезенке, мкг/г сырой ткани ($n = 15-20$).

ло соответственно: $0.24 \pm 0.05\%$ против $0.17 \pm 0.06\%$ для $CD4^+CD8^+$ (DP) клеток; $3.64 \pm 1.24\%$ против $3.81 \pm 1.11\%$ для $CD4^-CD8^-$ (DN) клеток; $12.66 \pm 0.91\%$ против $11.06 \pm 0.45\%$ для $CD4^+CD8^-$ (Sp4) клеток и $13.11 \pm 2.43\%$ против $11.73 \pm 2.07\%$ для $CD4^-CD8^+$ (Sp8) клеток. Аналогичные результаты были также получены при анализе относительного содержания $CD71^+$ клеток на 7 и 14 сут эксперимента (данные не приводятся). Одинаковая экспрессия $CD71$ на поверхности тимоцитов у животных с опухолями и контрольных животных косвенно указывает на отсутствие дефицита железа в тимусе мышей с гепатомой 22а.

Таким образом, в тимусе мышей с гепатомой 22а нами не было обнаружено признаков железодефицита, которые могли бы рассматриваться в качестве причины резкого снижения массы тимуса и пролиферации тимоцитов у этих животных.

Исследование селезенки. При исследовании другого органа иммунной системы – селезенки, начиная с третьей недели опухолевого роста наблюдали увеличение массы (рис. 5а), которое также сопровождалось увеличением числа клеток в этом органе (рис. 5б).

Содержание негемового железа в селезенке мышей с опухолями было снижено на всех сроках исследования, кроме 14 сут (рис. 5г). На поздних сроках роста гепатомы 22а этот показатель был приблизительно в 2 раза ниже, чем у контрольных животных.

При сопоставлении этих данных с пролиферативной активностью спленоцитов оказалось, что спонтанная пролиферация спленоцитов повышена у животных, начиная с третьей недели опухолевого роста, по сравнению с контрольным уровнем (рис. 5в). Известно, что селезенка мышей является не только лимфоидным, но и кроветворным органом. Поскольку ранее было показано, что увеличение объема селезенки при росте гепатомы 22а связано в основном с разрастанием красной, а не белой пульпы (Киселева, Малыгин, 1984), можно рассматривать повышение показателей включения радиоактивной метки в спленоциты без добавления митогена как отражение активации нелимфоидных клеток этого органа, что также характерно и для роста других опухолей (Kikuchi et al., 1982; Radoja et al., 2000).

Для более прицельного анализа ответа Т-лимфоцитов было проведено исследование пролиферации спленоцитов в присутствии Т-клеточного митогена конканавалина А. В этом случае также не было обна-

Таблица 1. Сравнительный анализ процессов, происходящих в организме животных с опухолями и животных, содержащихся на железодефицитной диете

Характеристика	Работы, в которых описаны соответствующие изменения у животных	
	с опухолями	на железодефицитной диете
Инволюция тимуса	Fu et al., 1989; Киселева и др., 1998; Carrio, Lopez, 2013	Kuvibidila et al., 2012
Снижение пролиферации тимоцитов	Киселева и др., 1998; Shanker et al., 2000; Song et al., 2013	Kuvibidila et al., 1990; Soyano et al., 1982
Спленомегалия	Fu et al., 1989; Киселева и др., 1984; Radoja et al., 2000	Kuvibidila et al., 1990, 2012
Снижение ответа спленоцитов на Т-митогены	Kikuchi, 1982; Rashid et al., 2005	Kuvibidila et al., 1983, 2012; Omara, Blakley, 1994; Klecha et al., 2005
Гипоферремия	Kim et al., 2014; Skrajnowska et al., 2015; Chen et al., 2018	Kuvibidila et al., 1983; Soyano, 1982
Снижение содержания железа в печени на единицу массы ткани	Kim et al., 2014; Skrajnowska et al., 2015	Kuvibidila et al., 1990, 2012; Klecha et al., 2005; Omara, Blakley, 1994
Снижение активности каталазы печени	Kampschmidt, 1965	Vieyra-Reyes et al., 2017

ружено признаков снижения пролиферации по сравнению с контролем, более того, было отмечено повышение показателя на 21 сут опухолевого роста (рис. 5в).

Полученные данные указывают, что несмотря на снижение содержания негемового железа в селезенке, рассчитанного на единицу массы ткани, этого микроэлемента в органе достаточно для обеспечения пролиферации спленоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что опухолевый рост оказывает подавляющее влияние на Т-клеточный иммунитет, которое в настоящее время связывают с многими причинами, такими как ингибиторные рецепторы, активация Т-регуляторных и миелоидных супрессорных клеток, синтез иммуносупрессорных цитокинов и метаболитов (Xia et al., 2019), но не с нарушениями обмена железа. Между тем известно, что опухолевый рост вызывает в организме значительные нарушения метаболизма и появление дефицита железа (Zohora et al., 2018), которые также могут сказываться на функционировании клеток иммунной системы.

Обращает на себя внимание большое сходство системных явлений, которые можно наблюдать в организме животных с опухолями и животных, находящихся на железодефицитной диете (табл. 1). В обоих случаях наблюдаются изменения, связанные с обменом железа — гипоферремия, снижение содержания

железа и активности каталазы в печени, а также иммунологические нарушения, такие как инволюция тимуса и спленомегалия, которые могут сопровождаться снижением пролиферативной активности тимоцитов и Т-лимфоцитов селезенки. Несмотря на большую разницу процессов, можно предположить, что в организме животных с опухолями и животных с пищевым недостатком железа, действуют общие системные механизмы регуляции нарушенного тканевого гомеостаза. Однако конкретные механизмы происходящих сдвигов в иммунной системе ни в том, ни в другом случае недостаточно ясны (Kuvibidila et al., 2012; Carrio, Lopez, 2013).

При этом даже у животных, находящихся на железодефицитной диете, у которых снижение пролиферативной активности тимоцитов и Т-лимфоцитов селезенки непосредственно связывают с недостатком железа, прямого сопоставления функциональной активности клеток с содержанием железа в этих органах не проводили; исследователи лишь регистрировали факт наличия дефицита железа по его уровню содержания в крови и печени (Soyano, 1982; Kuvibidila et al., 1983; Omara, Blakley, 1994; Klecha et al., 2005). Также никто не проводил подобных сопоставлений при опухолевом росте.

В настоящей работе впервые было проведено сопоставление показателей пролиферативной активности тимоцитов и спленоцитов с содержанием негемового железа в тимусе и селезенке в динамике роста переви-



Рис. 6. Суммарная схема влияния роста гепатомы 22a в организме животных на показатели метаболизма железа и состояние лимфоидных органов. Обозначения: ↑ повышение, ↓ подавление, = нет эффекта.

ваемой опухоли гепатомы 22a. Суммарные результаты исследования представлены на схеме (рис. 6).

У животных с опухолями начиная с третьей недели морфологические изменения в двух органах иммунной системы имели противоположный характер: инволюция тимуса и спленомегалия. Пролиферативная активность клеток этих органов также была различной: снижена у тимоцитов, не изменена у спленоцитов в ответ на Т-клеточный митоген и повышена у спленоцитов без индуктора.

Полученные результаты были сопоставлены с содержанием негемового железа в тимусе и селезенке. При этом оценивали удельное содержание железа на единицу массы ткани, а не на весь орган, поскольку нас интересовало содержание железа в микроокружении клеток.

Наша гипотеза заключалась в том, что подавление пролиферативной активности клеток лимфоидных органов может быть связано с дефицитом железа. Поскольку снижение пролиферации клеток было выявлено только в тимусе, то следовало ожидать, что в этом органе содержание железа будет снижено, а в селезенке — нет. Однако содержание негемового железа в тимусе было не только не снижено, но даже повышено. Отсутствие дефицита железа в вилочко-

вой железе было подтверждено также и нормальным уровнем экспрессии CD71 на мембране тимоцитов.

При этом в селезенке содержание негемового железа изменялось противоположным образом — было снижено. Эти изменения совпадали во времени с изменениями массы органов — уменьшения массы тимуса и увеличения массы селезенки.

Данные литературы о содержании железа при росте экспериментальных опухолей весьма противоречивы. Гипоферремия является наиболее частым признаком дефицита железа у животных с опухолями (Kim et al., 2014; Skrajnowska et al., 2015; Chen, Chen, 2018). Однако другие исследователи ее не наблюдали (Youn et al., 2009). Содержание железа в печени и селезенке может также значительно варьировать при росте различных опухолей и быть как сниженным (Kim et al., 2014; Skrajnowska et al., 2015), так и повышенным (Kim et al., 2014), или же оставаться на нормальном уровне (Eagon et al., 1999).

Из общих показателей метаболизма железа в организме животных с гепатомой 22a оценивали концентрацию железа в сыворотке крови и содержание железа в печени. Оба показателя были снижены также, как и содержание железа в селезенке. Однако при пересчете содержания негемового железа в орга-

нах с учетом изменения их массы оказалось, что эти показатели для тимуса, селезенки и печени не отличаются у животных с опухолями от контрольных показателей (табл. 2). Данные приводятся на 35 сут опухолевого роста, когда изменения всех показателей были наиболее выраженными.

Таким образом, несмотря на снижение концентрации железа в сыворотке крови, содержание негемового железа в тимусе, селезенке и печени при расчете на весь орган оставалось стабильным и достаточным для обеспечения полноценного функционирования клеток (о чем можно судить по отсутствию подавления пролиферации клеток селезенки). При этом изменения показателей железа, рассчитанные на единицу массы органов, по-видимому, являются следствием достаточно выраженных сдвигов массы и клеточности органов, но не их причиной.

Тем не менее, нами были зарегистрированы снижение концентрации железа в крови и противоположные изменения удельного содержания негемового железа в тимусе и селезенке при расчете на единицу массы. Известно, что недостаток железа может оказывать не только прямой антипролиферативный эффект в отношении лимфоцитов, но также и существенным образом модифицировать клеточное микроокружение, например, вызывать окислительный стресс вследствие недостаточной продукции железосодержащих белков антиоксидантной системы, таких как каталаза и др. (Vieyra-Reyes et al., 2017).

Для того чтобы оценить возможные тканевые эффекты противоположных изменений содержания железа в тимусе и селезенке, провели измерение специфической активности гемосодержащего фермента — каталазы. Ее активность в селезенке мышей с опухолями не отличалась от контрольного уровня, в то время как в тимусе мышей с гепатомой 22а была выше, чем у контрольных животных. Отсутствие снижения активности каталазы в обоих органах является еще одним аргументом в пользу того, что в них нет дефицита железа.

Полученные нами результаты по отсутствию изменений активности каталазы в селезенке согласуются с данными других авторов, полученными при росте канцероген-индуцированной опухоли желудка у мышей (Gagandeep et al., 2005). Оценка активности каталазы в тимусе при росте экспериментальных опухолей не проводилась.

Таким образом, впервые было определено содержание железа в тимусе животных с перевиваемой опухолью. У этих животных также впервые проанализировали экспрессию CD71 на мембране тимоцитов и активность каталазы в тимусе. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии дефицита железа в этом органе и, следовательно, дефицит железа не может быть причиной развития инволюции тимуса и снижения пролиферативной активности тимоцитов при росте гепатомы 22а. Тем самым, наше изначальное предположение не было подтвер-

Таблица 2. Содержание негемового железа в органах мышей на 35 сут роста гепатомы 22а

Органы	Содержание железа, мкг/орган	
	контроль	мышы с опухолями
Тимус	0.61 ± 0.1 (n = 14)	0.53 ± 0.1 (n = 9) P > 0.05
Селезенка	6.6 ± 0.7 (n = 18)	8.0 ± 1.4 (n = 11) P > 0.05
Печень	91.0 ± 9.5 (n = 18)	80.5 ± 13.9 (n = 12) P > 0.05

ждено. В основе этих процессов, по-видимому, могут лежать механизмы, не связанные напрямую с содержанием железа.

Еще многое предстоит узнать о механизмах опухоль-индуцированной инволюции тимуса и других системных проявлениях опухолевого роста. Существует мнение, что раковая ткань может исполнять роль “системного метаболического диктатора”, перестраивая обмен веществ в организме для покрытия своих потребностей (Lee et al., 2016). Клетки иммунной системы, так же как и любые другие клетки организма, должны испытывать на себе воздействие этой перестройки, что, однако, изучено недостаточно. Настоящая работа проливает свет на один из аспектов этого влияния, связанный с обменом железа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках плановой темы НИР ФГБНУ “ИЭМ” №0557-2019-0006.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные принципы использования лабораторных животных. Исследование одобрено локальным этическим комитетом при ФГБНУ “ИЭМ” (протокол № 2/15 от 26.02.2015).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Киселева Е.П., Малыгин А.М.* 1984. Функциональная активность спленоцитов мышей при росте сингенной перевиваемой гепатомы 22а. Цитология. Т. 26. № 12. С. 1409. (*Kiseleva E.P., Malygin A.M.* 1984. Splenocyte functional activity in mice growing the syngeneic transplantable hepatoma 22a. Tsitologiya. V. 26. № 12. P. 1409.)
- Киселева Е.П., Суворов А.Н., Огурцов Р.П.* 1998. Роль апоптоза в процессе инволюции тимуса при росте сингенной перевиваемой опухоли у мышей. Изв. АН Сер. Биология. № 2. С. 172. (*Kiseleva E.P., Suvorov A.N., Ougurtsov R.P.* 1998. Role of apoptosis in the process of thymus involution in mice growing the syngeneic transplantable hepatoma 22a. Izv. AN Ser. Biologiya. № 2. P. 172.)

- Ogurtsov R.P.* 1998. The role of apoptosis in the thymic involution during growth of the syngeneic transplanted tumor in mice. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* № 2. P. 172.)
- Breckelmans P., van Soest P., Leenen P.J., van Ewijk W.* 1994. Inhibition of proliferation and differentiation during early T cell development by anti-transferrin receptor antibody. *Eur. J. Immunol.* V. 24. P. 2896.
- Carrio R., Lopez D.M.* 2013. Insights into thymic involution in tumor-bearing mice. *Immunol. Res.* V. 57. P. 106.
- Chen R., Chen G.* 2018. Tumor-induced disorder of iron metabolism in major organs: a new insight from chemical speciation of iron. *J. Int. Med. Res.* V. 46. P. 70.
- Eagon P.K., Teepe A.G., Elm M.S., Tadic S.D., Epley M.J., Beiler B.E., Shinozuka H., Rao K.N.* 1999. Hepatic hyperplasia and cancer in rats: alterations in copper metabolism. *Carcinogenesis.* V. 20. P. 1091.
- Fu Y., Paul R.D., Wang Y., Lopez D.M.* 1989. Thymic involution and thymocyte phenotypic alterations induced by murine mammary adenocarcinomas. *J. Immunol.* V. 143. P. 4300.
- Gagandeep, Rao A.R., Kale R.K.* 2005. Oxidative stress in tumour-bearing fore-stomach and distant normal organs of Swiss albino mice. *Ind. J. Biochem. Biophys.* V. 42. P. 216.
- Hadwan M.H., Ali S.K.* 2018. New spectrophotometric assay for assessments of catalase activity in biological samples. *Anal. Biochem.* V. 542. P. 29.
- Kampschmidt R.F.* 1965. Mechanism of liver catalase depression in tumor-bearing animals: a review. *Cancer Res.* V. 25. P. 34.
- Kikuchi Y., Hiramoto R.N., Ghanta V.* 1982. Mitogen response of peripheral blood and splenic lymphocytes and effect of 2-mercaptoethanol in tumor-bearing mice. *Cancer Immunol. Immunother.* V. 12. P. 225.
- Kim A., Rivera S., Shprung D., Limbrick D., Gabayan V., Nemeth E., Ganz T.* 2014. Mouse models of anemia of cancer. *PLoS One.* V. 9. e93283.
- Klecha A.J., Salgueiro J., Wald M., Boccio J., Zubillaga M., Leonardi N.M., Gorelik G., Cremaschi G.A.* 2005. In vivo iron and zinc deficiency diminished T- and B-selective mitogen stimulation of murine lymphoid cells through protein kinase C-mediated mechanism. *Biol. Trace Elem. Res.* V. 104. P. 173.
- Kuvibidila S.R., Dardenne M., Savino W., Lepault F.* 1990. Influence of iron-deficiency anemia on selected thymus functions in mice: thymulin biological activity, T-cell subsets, and thymocyte proliferation. *Am. J. Clin. Nutr.* V. 51. P. 228.
- Kuvibidila S.R., Gardner R., Velez M., Yu L.* 2012. Iron deficiency, but not underfeeding reduces the secretion of interferon-gamma by mitogen-activated murine spleen cells. *Cytokine.* V. 52. P. 230.
- Kuvibidila S.R., Nauss K.M., Baliga S.B., Suskind R.M.* 1983. Impairment of blastogenic response of splenic lymphocytes from iron-deficient mice. *In vitro* repletion by hemin, transferrin, and ferric chloride. *Am. J. Clin. Nutr.* V. 37. P. 557.
- Lee Y.-M., Chang W.-C., Ma W.-L.* 2016. Hypothesis: solid tumours behave as systemic metabolic dictators. *J. Cell. Mol. Med.* V. 20. P. 1076.
- Macedo M.F., de Sousa M., Ned R.M., Mascarenhas C., Andrews N.C., Correia-Neves M.* 2004. Transferrin is required for early T-cell differentiation. *Immunology.* V. 112. P. 543.
- Nakahara W., Fukuoka F.* 1958. The newer concept of cancer toxin. *Adv. Cancer Res.* V. 5. P. 157.
- Omara F.O., Blakley B.R.* 1994. The effects of iron deficiency and iron overload on cell-mediated immunity in the mouse. *Br. J. Nutr.* V. 72. P. 899.
- Pourcelot E., Lénonn M., Mobilia N., Cahn J.-Y., Arnaud J., Fanchon E., Moulis J.-M., Mossuz P.* 2015. Iron for proliferation of cell lines and hematopoietic progenitors: nailing down the intracellular functional iron concentration. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1853. P. 1596.
- Radoja S., Rao T.D., Hillman D., Frey A.B.* 2000. Mice bearing late-stage tumors have normal functional systemic T cell responses in vitro and in vivo. *J. Immunol.* V. 164. P. 2619.
- Rashid R.M., Achille N.J., Lee J.M., Lathers D.M., Young M.R.* 2005. Decreased T-cell proliferation and skewed immune responses in LLC-bearing mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* V. 24. P. 175.
- Rebouche C.J., Wilcox C.L., Widness J.A.* 2004. Microanalysis of non-heme iron in animal tissues. *J. Biochem. Biophys. Methods.* V. 58. P. 239.
- Saldanha-Araujo F., Souza A.M.* 2009. Early effects on T lymphocyte response to iron deficiency in mice, Short communication. *Biol. Trace Elem. Res.* V. 127. P. 95.
- Shanker A., Singh S.M., Sodhi A.* 2000. Impairment of T-cell functions with the progressive ascitic growth of a transplantable T-cell lymphoma of spontaneous origin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* V. 27. P. 247.
- Skrajnowska D., Korczak B.B., Tokarz A., Kazimierczuk A., Klepacz M., Makowska J., Gadzinski B.* 2015. The effect of zinc and phytoestrogen supplementation on the changes in mineral content of the femur of rats with chemically induced mammary carcinogenesis. *J. Trace Elem. Med. Biol.* V. 32. P. 79.
- Song Y., Yu R., Wang C., Chi F., Guo Z., Zhu X.* 2013. Disruption of the thymic microenvironment is associated with thymic involution of transitional cell cancer. *Urol. Int.* V. 92. P. 104.
- Soyano A., Candellel D., Layrisse M.* 1982. Effect of iron deficiency on the mitogen-induced proliferative response of rat lymphocytes. *Int. Archs Allergy Appl. Immun.* V. 69. P. 353.
- Vieyra-Reyes P., Millán-Aldaco D., Palomero-Rivero M., Jiménez-Garcés C., Hernández-González M., Caballero-Villarraso J.* 2017. An iron-deficient diet during development induces oxidative stress in relation to age and gender in Wistar rats. *J. Physiol. Biochem.* V. 73. P. 99.
- Xia A., Zhang Y., Xu J., Yin T., Lu X.-J.* 2019. T Cell dysfunction in cancer immunity and immunotherapy. *Front. Immunol.* V. 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01719>
- Youn P., Kim S., Ahn J.H., Kim Y., Park J.D., Ryu D.Y.* 2009. Regulation of iron metabolism-related genes in diethylnitrosamine-induced mouse liver tumors. *Toxicol. Lett.* V. 184. P. 151.
- Zohora F., Bidad K., Pourpak Z., Moin M.* 2018. Biological and immunological aspects of iron deficiency anemia in cancer development: a narrative review. *Nutr. Cancer.* V. 70. P. 546.

Iron Content and Cellular Proliferation in Thymus and Spleen of Hepatoma 22a Bearing Mice

E. A. Zelenskiy^a, K. V. Rutto^{a,*}, I. V. Kudryavtsev^a, A. V. Sokolov^a, and E. P. Kisseleva^{a,b}

^a*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia*

^b*Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, 195067 Russia*

**e-mail: krispins-90@mail.ru*

Tumor growth is known to induce depression of T-cell immunity, but on the other hand it also induces significant changes of iron metabolism. We hypothesized that iron deficiency may be one of the factors linked to the development of immunodepression observed in tumor growth. Here for the first time we assessed cell proliferation in two lymphoid organs – thymus and spleen, in comparison to iron status of these organs in mice bearing transplantable tumor. General iron status was evaluated on the basis of serum iron levels and liver iron. Thymus weight and cellularity were dramatically decreased from the third week of tumor growth, while spleen weight and cellularity increased. These animals also showed down-regulation of thymocyte proliferation but no decrease of splenocyte proliferation. But, at the same time thymus non-heme iron content was increased and in spleen – decreased. Thus, it may be supposed that spleen and thymus iron contents are sufficient to cover demands for cell proliferation in these organs. There was also no decline of surface transferrin receptor (CD71) expression on thymocytes and catalase activity, which confirm the absence of iron deficiency in the thymus. Parameters of iron metabolism were investigated in the thymus during the growth of transplantable tumor for the first time. Finally, iron deficiency is not the cause of immunological disorders, such as thymic involution and down-regulation of thymocyte proliferation, in mice bearing hepatoma 22a; iron-independent mechanisms may play a role in these processes. This data elucidate one, related to iron, aspect of tumor-induced metabolic influence on the immune system.

Keywords: iron, lymphocyte proliferation, thymic involution, experimental tumors, transferrin receptor, catalase

СТАНОВЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HindIII^G-1, ПОЛУЧЕННОЙ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ К АПОПТОЗУ КЛЕТОК HindIII^G, ХАРАКТЕРИЗУЕТСЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬЮ ГЕНОМА, НАРУШЕНИЕМ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ ДНК И АКТИВАЦИЕЙ АУТОФАГИИ

© 2021 г. Ж. В. Шитикова^{2, *}, Н. М. Ярцева¹, Т. В. Быкова¹, С. Г. Зубова¹, Е. Ю. Кочеткова¹, В. А. Поспелов¹, Т. В. Поспелова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Женевский университет, Женева, 1205 Швейцария

*E-mail: zhanna.chitikova@gmail.com

Поступила в редакцию 23.10.2020 г.

После доработки 20.11.2020 г.

Принята к публикации 21.11.2020 г.

Генетическая нестабильность и гетерогенность популяции относятся к ключевым характеристикам опухолевых клеток, позволяющим им выживать в неблагоприятных условиях. Глобальная перестройка генома в результате явления, известного как хромотрипсис, приводит к возникновению множества мутаций за одно катастрофическое событие, что способствует прогрессии опухоли и приобретению устойчивости к терапии. Сложные хромосомные перестройки, возникающие при хромотрипсисе, обусловлены случайной сшивкой множества хромосомных фрагментов в результате ненадежной репарации путем негомологичного соединения концов. В настоящей работе изучена активация ответа на повреждение ДНК и репарации путем негомологичного соединения концов в качестве маркеров генетической нестабильности клеток HindIII^G-1, возникших после деплоидизации облученных клеток HindIII^G, устойчивых к апоптозу. Кроме того, исследовано возможное участие хромотрипсиса и аутофагии в формировании клеточной линии HindIII^G-1. Наши результаты показывают, что клетки HindIII^G-1 характеризуются высокой нестабильностью генома, активацией ответа на повреждение ДНК и репарации путем негомологичного соединения концов. Фрагментация хромосом в облученных клетках HindIII^G и необлученных клетках HindIII^G-1, а также активация репарации путем негомологичного соединения концов предполагают участие подобного хромотрипсису процесса в образовании линии HindIII^G-1. Показано, что в отличие от исходной линии HindIII^G, клетки HindIII^G-1 приобрели способность к инвазии и пролиферации независимо от прикрепления к субстрату, указывающую на возможность развития метастатического потенциала. Дегградация поврежденной ДНК, ядер и микроядер в клетках HindIII^G-1 путем аутофагии говорит о ее вовлечении в процессы регуляции выживания и гибели, и, тем самым, об участии в становлении новой клеточной линии.

Ключевые слова: устойчивость к апоптозу, аутофагия, фрагментация хромосом, хромотрипсис, хромосомная нестабильность, повреждение ДНК, репарация

DOI: 10.31857/S0041377121020073

Нестабильность генома является одной из ключевых характеристик опухолевых клеток, которая позволяет им выживать и пролиферировать в неблагоприятных условиях. Хромосомная нестабильность является одним из видов генетической нестабильности. Она проявляется в численных и структурных перестройках хромосом, включая транслокации, делеции, вставки, инверсии участков хромосом и слияние теломер. Эти перестройки влекут за собой изменения экспрессии генов, в частности, онкогенов и опухолевых супрессоров (Negri et al., 2010).

На стабильность генома влияют как внешние факторы, так и внутриклеточные процессы. ДНК-

повреждающие агенты, окислительный стресс и ионизирующее излучение приводят к двуцепочечным разрывам ДНК, и тем самым вносят вклад в хромосомную нестабильность. Двуцепочечные разрывы являются наиболее опасными повреждениями ДНК. Нарушение их репарации лежит в основе генетической нестабильности. При обнаружении разрывов клетки активируют ответ на повреждение ДНК и репарацию. В местах разрывов ДНК происходит фосфорилирование гистона H2AX, активация белка 53BP1 и формирование фокусов, содержащих различные факторы ответа на повреждение ДНК и репарации (Rogakou et al., 1998; Rappold et al., 2001).

Главными механизмами репарации двуцепочечных разрывов ДНК являются гомологичная рекомбинация и негомологичное соединение концов ДНК. Гомологичная рекомбинация активируется в S и G₂ фазах клеточного цикла и требует наличия гомологичной последовательности для аккуратной репарации ДНК (Mao et al., 2008). Негомологичное соединение концов не требует наличия гомологичной последовательности и является менее надежным механизмом репарации, который активируется в течение всего клеточного цикла (Mao et al., 2008). Нарушения репликации ДНК или вступление клетки в фазу митоза при незавершенной репликации также приводят к разрывам ДНК, которые влекут за собой фрагментацию хромосом. Хаотическая сборка фрагментов хромосом в ходе катастрофического события, известного как хромотрипсис, приводит к возникновению большого числа мутаций (Stephens et al., 2011; Zhang et al., 2015). Повреждение ДНК, фрагментация хромосом, образование микроядер и полиплоидизация способствуют хромотрипсису (Stephens et al., 2011; Crasta et al., 2012; Hatch, Hetzer, 2015; Cortés-Ciriano et al., 2020). При хромотрипсисе процессу фрагментации могут подвергаться одна или несколько хромосом (Cortés-Ciriano et al., 2020). Одним из характерных признаков хромотрипсиса является лигация фрагментов хромосом путем негомологичного соединения концов, приводящая к многочисленным структурным перестройкам (Jones, Jallepalli, 2012). Хромотрипсис, наряду с хромоанасинтезом и хромоплексией, различающихся по механизмам, количеству точек разрывов и перестроенных хромосом, относится к такому явлению как хромоанагенез (Zhang et al., 2013).

Аутофагия представляет собой катаболический процесс, который способствует деградации поврежденных компонентов клетки, тем самым поддерживает клеточный гомеостаз. Она необходима для выживания и гибели клеток, развития, репрограммирования и поддержания фенотипа стволовых клеток (Levine, Yuan, 2005; Mizushima, Levine, 2010; Mendez et al., 2011). Показано, что аутофагия участвует в ответе клетки на повреждение ДНК и репарации, способствуя таким образом поддержанию целостности генома (Mathew et al., 2007; Guan et al., 2013; Vanzo et al., 2020).

Ранее мы показали, что трансформированные районом *HindIII*G аденовируса 5-ого типа эмбриональные фибробласты крысы, характеризующиеся устойчивостью к апоптозу, преодолевают индуцированное облучением старение (Chitikova et al., 2014). Обратимое старение ассоциировалось с формированием гигантских полиплоидных клеток, задержкой активации ответа на повреждение ДНК и ее репарации, а также персистенцией разрывов ДНК. Восстановление популяции происходило за счет SA-β-Gal-негативных клеток с околодиплоидным содержанием ДНК, образовавшихся, по-видимому, в результате деплоидизации гигантских клеток (Chitikova et al.,

2014). Наши дальнейшие исследования показали, что в процессе становления линии *HindIII*G-1 в облученных клетках *HindIII*G и необлученных *HindIII*G-1 наблюдаются клональные и неклональные хромосомные перестройки, отмечается гетерогенность популяции (Ярцева и др., 2020).

В настоящей работе мы исследовали функционирование системы репарации ДНК, аутофагии и процесса, подобного хромотрипсису, в становлении клеточной линии *HindIII*G-1. Кроме того, проанализированы фенотипические изменения клеток *HindIII*G-1, являющиеся характерными признаками развития метастатического потенциала. Мы обнаружили, что новая линия *HindIII*G-1, полученная после облучения клеток *HindIII*G, характеризуется многочисленными хромосомными абберациями и длительной активацией системы репарации ДНК. Наши результаты указывают на возможное участие механизма подобного хромотрипсису, а также аутофагии в формировании и поддержании клеточной линии *HindIII*G-1. Клетки линии *HindIII*G-1 характеризуются способностью к пролиферации независимо от прикрепления к субстрату и миграции через поры мембраны, покрытой Матригелем, что может указывать на приобретение метастатического потенциала. Полученные данные показывают, что подобные хромотрипсису явления и аутофагия играют роль в восстановлении популяции опухолевых клеток после действия ионизирующего излучения, а также в приобретении устойчивости к облучению.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные линии. Клетки *HindIII*G были получены из эмбриональных фибробластов крысы в результате котрансфекции районом *HindIII*G аденовируса Ad5 человека и плазмидой pSV-2neo. Линия *HindIII*G-1 получена в результате однократного воздействия рентгеновского излучения на клетки *HindIII*G в дозе 6 Гр и последующего культивирования облученных клеток в течение 27 сут до достижения монослоя, после чего клетки пересевали на новые культуральные чашки и начинали отсчет пассажей линии *HindIII*G-1. Клетки культивировали в среде Игла в модификации Дальбекко (Биолот, Россия), содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США), 1% пенициллина и стрептомицина в условиях 5% CO₂ и 37°C.

Имунофлуоресценция и конфокальная микроскопия. Анализировали активацию ответа на повреждение ДНК, процессы репарации ДНК путем негомологичного соединения концов и аутофагию. Клетки высевали на покровные стекла, через 24 ч их фиксировали и окрашивали как описано ранее (Chitikova et al., 2014). Препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия).

Активацию ответа на повреждение ДНК оценивали по формированию фокусов, содержащих гистон H2AX, фосфорилированный по серину в положении 139 (γ H2AX), и p53-связывающий белок (53BP1). Активацию репарации ДНК путем негомологического соединения концов оценивали по фосфорилированию каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы по серину в положении 2056 (pDNA-PKcs^{Ser2056}). Количество фокусов γ H2AX и 53BP1, а также наличие pDNA-PKcs^{Ser2056} оценивали при подсчете 100 ядер. Аутофагию оценивали по колокализации белков LAMP1 и LC3, указывающую на формирование аутолизосом.

В работе использованы первичные антитела против белков 53BP1 и LAMP1 (Cell Signaling Technology, США), γ H2AX и pDNA-PKcs^{Ser2056} (Abcam, США), LC3 (MBL, США) и вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентными красителями Alexa-fluor 488 и Alexa-fluor 568 (Invitrogen, США).

Выявление хромосомных aberrаций, фрагментации хромосом и активных ядрышковых организаторов. Клетки культивировали в присутствии 0.6 мкг/мл колхицина в течение 90 мин при 37°C и 5% CO₂. Затем клетки трипсинизировали, собирали в конические пробирки объемом 15 мл и центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Далее клетки ресуспензировали в 6 мл 0.075M раствора KCl, нагретого до 37°C, и инкубировали 12 мин при 37°C. Затем клетки центрифугировали и фиксировали в смеси метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1 в течение 15 мин при 20°C. Процедуру центрифугирования и фиксации повторяли дважды. Суспензию клеток в смеси метанола и ледяной уксусной кислоты наносили на предметные стекла над водяной баней при температуре 53°C. После этого препараты оставляли до полного высыхания. Хромосомы окрашивали раствором Гимза, как описано в литературе (Ozkinay et al., 1979). Ядрышковые организаторы выявляли с помощью окрашивания препаратов хромосом 50%-ным раствором нитрата серебра (Sigma, США), как описано ранее (Howell, Black, 1980). Анализ проводили при помощи светового микроскопа с использованием объективов с увеличением 10 \times и 100 \times . Число хромосом определяли при анализе 100 клеток, количество клеток с фрагментацией хромосом определяли при анализе 1000 метафазных пластинок.

Анализ инвазивной способности клеток. Анализ выполнялся по описанной ранее методике (Pospelova et al., 2013). Для оценки инвазивной способности клеток были использованы камеры с мембраной, покрытой Матригелем, с размером пор 8 мкм (BD Biosystems).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клетки линии HindIII^G-1 характеризуются высокой генетической нестабильностью. Ранее мы показали, что в связи с нарушением процессов репарации в

облученных клетках HindIII^G длительное время сохраняются повреждения ДНК, а также формируются микроядра (Chitikova et al., 2014). Мы проанализировали нарушения хромосом в клетках HindIII^G через 1 и 4 сут после облучения, а в клетках HindIII^G-1 — на 22–34-ом пассажах. При анализе облученных клеток HindIII^G и необлученных клеток HindIII^G-1 были обнаружены метафазы с фрагментацией хромосом, выявлены дицентрические и кольцевые хромосомы, а также двойные микрохромосомы (рис. 1а), тогда как в контрольных необлученных клетках HindIII^G данные нарушения не выявлены (рис. 1б). Кроме того, в многоядерных клетках HindIII^G-1, но не в контрольных клетках HindIII^G, была выявлена асинхронная конденсация хромосом (рис. 1б). Фрагментации подвергалось различное число хромосом. Мы обнаружили клетки с фрагментами множества хромосом, образовавшихся, вероятно, в результате фрагментации целого ядра, а также клетки с одной фрагментированной хромосомой (рис. 1в).

Фрагментация хромосом была обнаружена в 0.8% необлученных клеток HindIII^G и в 0.7% клеток через 1 сут после облучения. Количество клеток HindIII^G с фрагментированными хромосомами возросло до 9.3% на четвертые сутки после облучения, а через 13 сут снизилось до 1.6%. При дальнейшем культивировании доля клеток с фрагментацией хромосом продолжала снижаться. Так, в необлученных клетках HindIII^G-1 мы обнаружили 0.6% и 0.8% клеток с фрагментацией хромосом на 4- и 22-ом пассажах соответственно.

Полученные данные указывают на высокую хромосомную нестабильность и наличие фрагментации хромосом в облученных клетках HindIII^G и клетках HindIII^G-1, не подвергнутых действию рентгеновского излучения.

В популяции клеток HindIII^G-1 долговременно активированы ответ на повреждение ДНК и репарация путем негомологического соединения концов. Наши предыдущие данные показывают, что в облученных клетках HindIII^G нарушены ответ на повреждение ДНК и репарация, отмечается их длительная активация, а также наблюдается персистенция поврежденных ДНК (Chitikova et al., 2014). Мы решили исследовать, связана ли фрагментация хромосом в клетках HindIII^G-1 с активацией ответа на повреждение ДНК и с репарацией путем негомологического соединения концов.

Активацию ответа на повреждение ДНК определяли по формированию и колокализации фокусов γ H2AX и 53BP1 в ядрах исследуемых клеток. Так как незначительное количество фокусов γ H2AX и 53BP1 обнаруживается в клетках в норме, при подсчете доли ядер с фокусами мы учитывали ядра, содержащие более трех фокусов. В необлученных клетках HindIII^G-1 формирование и колокализацию фокусов γ H2AX и p53BP1 наблюдали на 10- и 22-ом пассажах, тогда как в необлученных клетках HindIII^G фокусы γ H2AX и

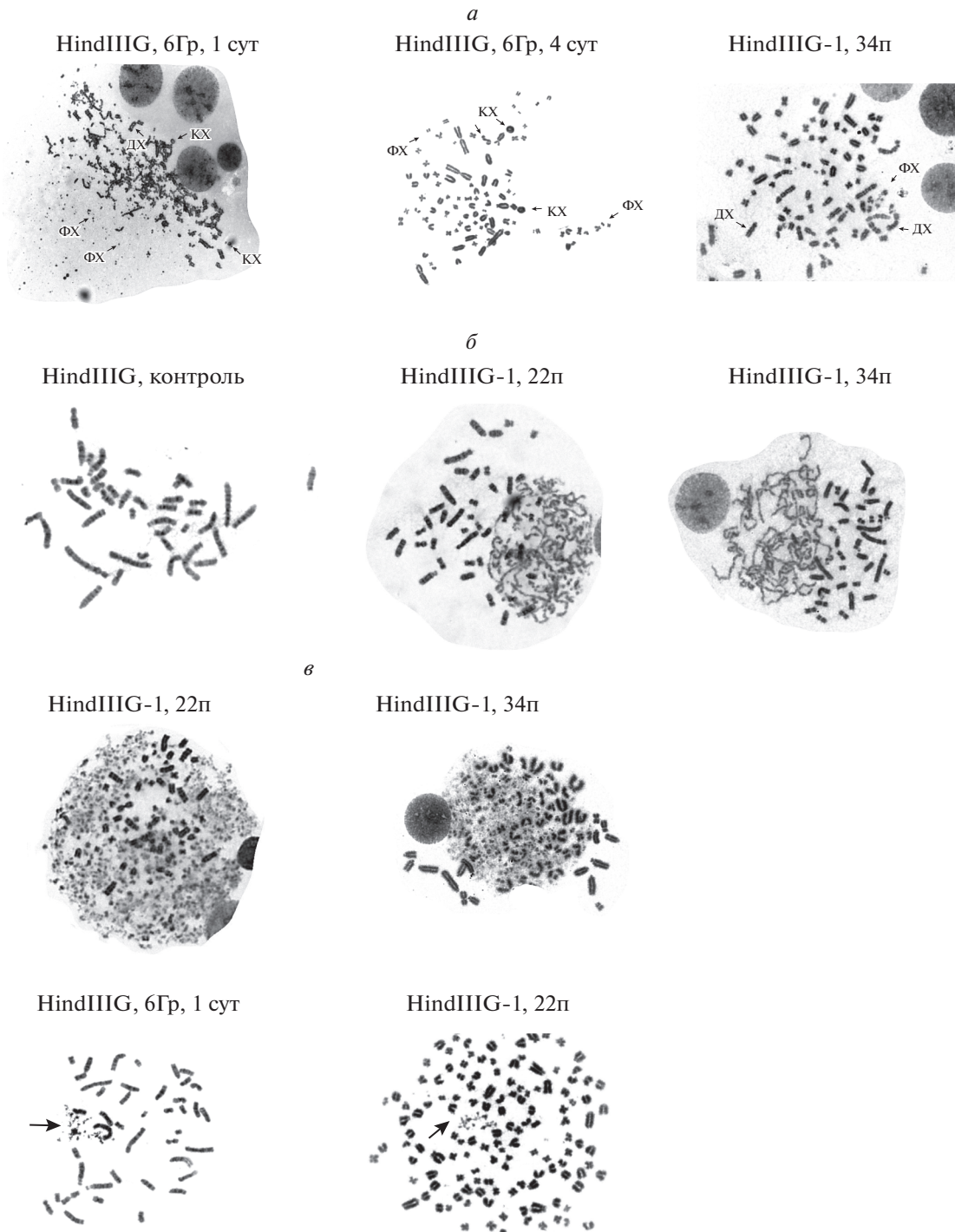


Рис. 1. Хромосомные aberrации, нарушение конденсации и фрагментация хромосом в клетках HindIIIГ после действия рентгеновского излучения в дозе 6 Гр и в необлученных клетках HindIIIГ-1. *а* – Фрагменты хромосом (ФХ), дицентрические (ДХ) и кольцевые (КХ) хромосомы. *б* – Асинхронная конденсация хромосом в многоядерных клетках HindIIIГ-1. *в* – Фрагментация хромосом в клетках HindIIIГ-1. *Стрелками* указана фрагментация одной хромосомы, наблюдаемая в клетках HindIIIГ после облучения и в клетках HindIIIГ-1. Показаны изображения, полученные через 1 и 4 сут после облучения клеток HindIIIГ, а также клеток HindIIIГ-1 на пассажах 1, 22 и 34 (1п, 22п, 34п).

p53BP1 не колокализовались (рис. 2а). Кроме того, γ H2AX был выявлен в микроядрах клеток HindIIIГ-1 (рис. 2б). На 10-ом пассаже клеток

HindIIIГ-1 более трех фокусов ответа на повреждение ДНК было выявлено в $91.2 \pm 2.3\%$ ядер, при этом среднее число фокусов γ H2AX в одном ядре состави-

ло 12.9 ± 7.8 , а фокусов 53BP1 — 11.3 ± 6.9 . На 22-ом пассаже более трех фокусов было выявлено в $87.2 \pm 4.2\%$ ядер, а среднее число фокусов на ядро составило 13.5 ± 7.7 для γ H2AX и 11.9 ± 5.4 для 53BP1. В отличие от клеток HindIIIГ-1, в необлученных клетках HindIIIГ среднее число фокусов γ H2AX и 53BP1 в ядре составило 2.8 ± 1.4 и 1.7 ± 1.2 соответственно, при этом $4.7 \pm 2.3\%$ ядер содержало фокусы γ H2AX и $3.5 \pm 2.1\%$ ядер — фокусы 53BP1.

В связи с тем, что репарация путем негомولوجичного соединения концов принимает участие в опосредованных хромотриписом хромосомных перестройках (Stephens et al., 2011), мы проанализировали ее активацию в необлученных клетках HindIIIГ-1. Действительно, мы обнаружили фосфорилирование каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PKcs) по серину в положении 2056 (pDNA-PKcs^{Ser2056}) в клетках HindIIIГ-1 (рис. 3), что говорит об активации репарации ДНК путем негомولوجичного соединения концов. Кроме того, pDNA-PKcs^{Ser2056} колокализовалась с фокусами γ H2AX на пассажах 10 и 22 (рис. 3) Так, $27.1 \pm 3.4\%$ клеток HindIIIГ-1 на 10-ом пассаже содержали pDNA-PKcs^{Ser2056} и $54.4 \pm 6.4\%$ клеток — на 22-ом пассаже. Среднее количество фокусов pDNA-PKcs^{Ser2056} в ядре составило $27.1 \pm 8.2\%$ и $54.4 \pm 5.5\%$ на пассажах 10 и 22 соответственно. В отличие от HindIIIГ-1, только $6.9 \pm 4.8\%$ необлученных клеток HindIIIГ содержали pDNA-PKcs^{Ser2056}, а среднее количество фокусов в ядре составило 1.8 ± 1.4 .

Таким образом, наши результаты говорят о возрастании генетической нестабильности в клетках HindIIIГ-1 по сравнению с исходной линией HindIIIГ.

В облученных клетках HindIIIГ и необлученных клетках HindIIIГ-1 поврежденная ДНК, ядра и микроядра подвергаются аутофагической деградации.

Поврежденная ДНК, хромосомы и фрагменты хромосом изолируются в микроядрах, а затем элиминируются из клетки или подвергаются деградации с помощью аутофагии (Rello-Varona et al., 2012). Кроме того, ядра могут быть деградированы посредством нуклеофагии, представляющей собой особую форму аутофагии (Mijaljić, Devenish, 2013). Ранее мы показали, что в облученных клетках HindIIIГ отмечается активация аутофагии одновременно со снижением активности киназы mTOR (Chitikova et al., 2014).

Мы проанализировали активацию аутофагии и ее участие в деградации генетического материала в клетках HindIIIГ через 4 сут после облучения и в необлученных клетках HindIIIГ-1 на 22-ом пассаже согласно колокализации маркера аутофагосом белка LC3 и лизосом-связанного мембранного белка LAMP1 с ДНК. Согласно полученным данным, в отличие от контрольных клеток HindIIIГ, в исследованных клетках маркеры LC3 и LAMP1 колокализуются с отдельными ядрами многоядерных клеток, микроядрами и диспергированным ДНК-содержа-

щим материалом, являющимся, по-видимому, фрагментами хромосом (рис. 4). В связи с этим мы предполагаем, что аутофагия может служить механизмом селекции генетического материала и деградации поврежденной ДНК в облученных клетках HindIIIГ и необлученных клетках HindIIIГ-1.

Клетки HindIIIГ-1 характеризуются способностью к инвазии и пролиферации независимо от прикрепления к субстрату. Ранее мы показали, что облучение клеток HindIIIГ приводило к активации обратимой программы старения, экспрессии маркеров стволовых клеток и формированию новой околодиплоидной популяции (Chitikova et al., 2014) HindIIIГ-1. В этом исследовании мы обнаружили, что в процессе культивирования линия HindIIIГ-1 разделилась на две субпопуляции. Тогда как прикрепленные клетки представляли собой большую часть популяции, часть клеток была способна пролиферировать независимо от прикрепления к субстрату. Так как подобное свойство может указывать на приобретение клетками способности к метастазированию, мы проанализировали способность обеих субпопуляций к инвазии. В отличие от исходных необлученных клеток HindIIIГ обе субпопуляции клеток HindIIIГ-1 продемонстрировали способность к миграции через поры мембраны, покрытой Матригелем. При этом инвазивная способность клеток, не прикрепленных к субстрату, оказалась в два раза выше, чем адгезированных. Так, 49.6% клеток из плавающей фракции и 26.4% клеток из адгезированной субпопуляции мигрировали через поры мембраны покрытой Матригелем, тогда как контрольные необлученные клетки HindIIIГ не были способны проходить через поры мембраны.

Предположив, что формирование двух субпопуляций может быть связано с перестройками хромосом, возникающими в результате облучения, мы проанализировали кариотип обеих субпопуляций на 17-ом пассаже. Обе эти популяции были гетерогенны и характеризовались сходными структурными перестройками, показанными нами ранее (Ярцева и др., 2020). Окрашивание нитратом серебра выявило, что 30% прикрепленных к субстрату и 23% суспензионных клеток с числом хромосом 41 были представлены клоном с активными ядрышковыми организаторами на коротком плече хромосомы 3, описанным нами ранее (Ярцева и др., 2020).

Так как субпопуляции клеток HindIIIГ-1 не имеют значительных различий на хромосомном уровне, мы предполагаем, что их фенотип определяется другими механизмами регуляции экспрессии генов. Принимая во внимание увеличение числа клеток с активными ядрышковыми организаторами в популяции, растущей независимо от прикрепления к субстрату, можно предположить, что одним из таких механизмов может быть регуляция трансляции.

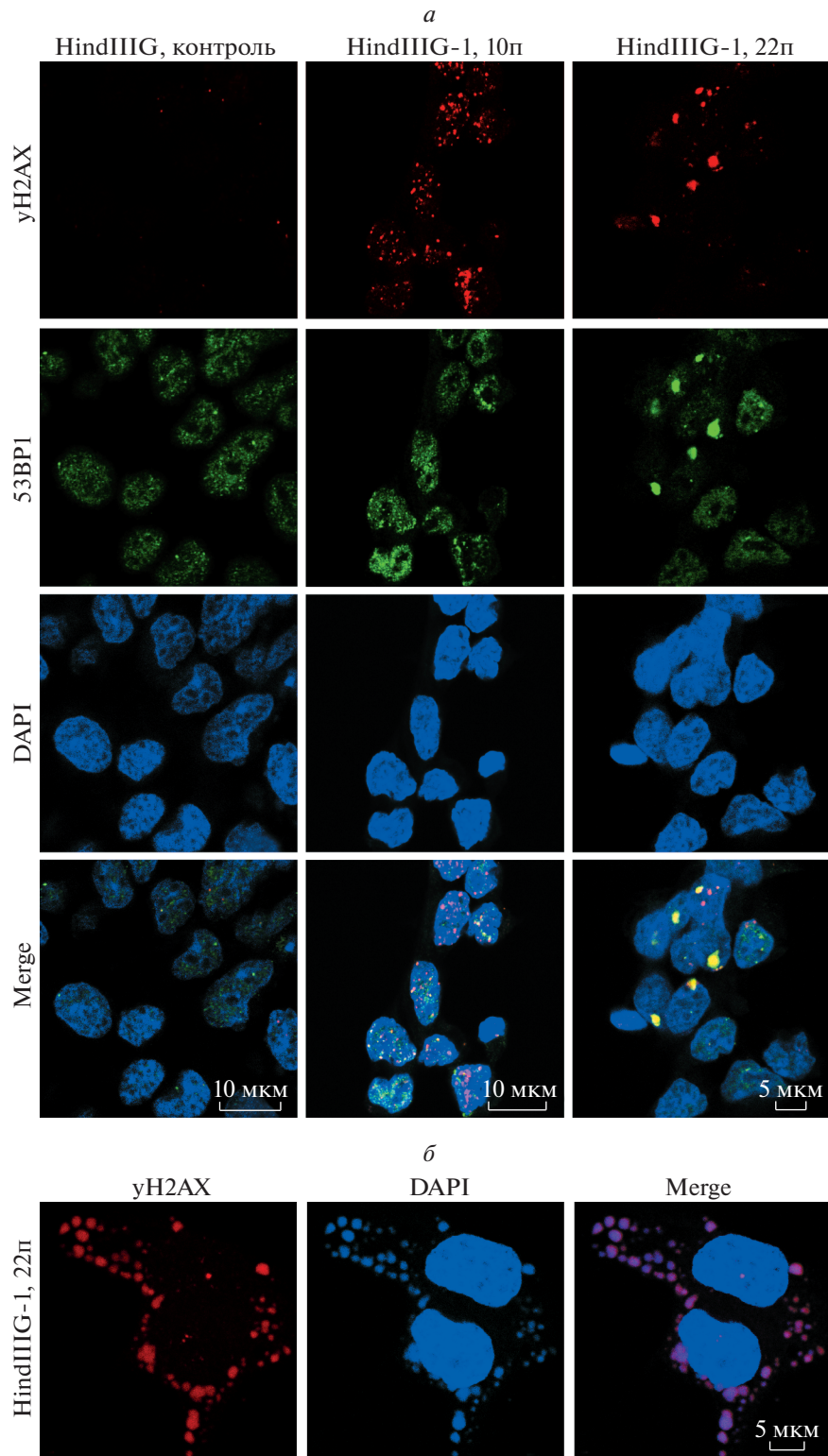


Рис. 2. Активация ответа на повреждение ДНК и нарушение механизмов репарации в необлученных клетках HindIIIГ-1 согласно формированию, колокализации и персистенции фокусов γ H2AX и 53BP1. *a* – Маркированные соответствующими антителами к γ H2AX и 53BP1 фокусы ответа на повреждение ДНК и их колокализация (merge) в ядрах клеток. *б* – Формирование микроядер, содержащих γ H2AX. Показаны результаты иммуноцитохимического окрашивания клеток на 10- и 22-ом пассажах (10п и 22п). Ядра окрашены DAPI. Изображения получены с помощью конфокального микроскопа.

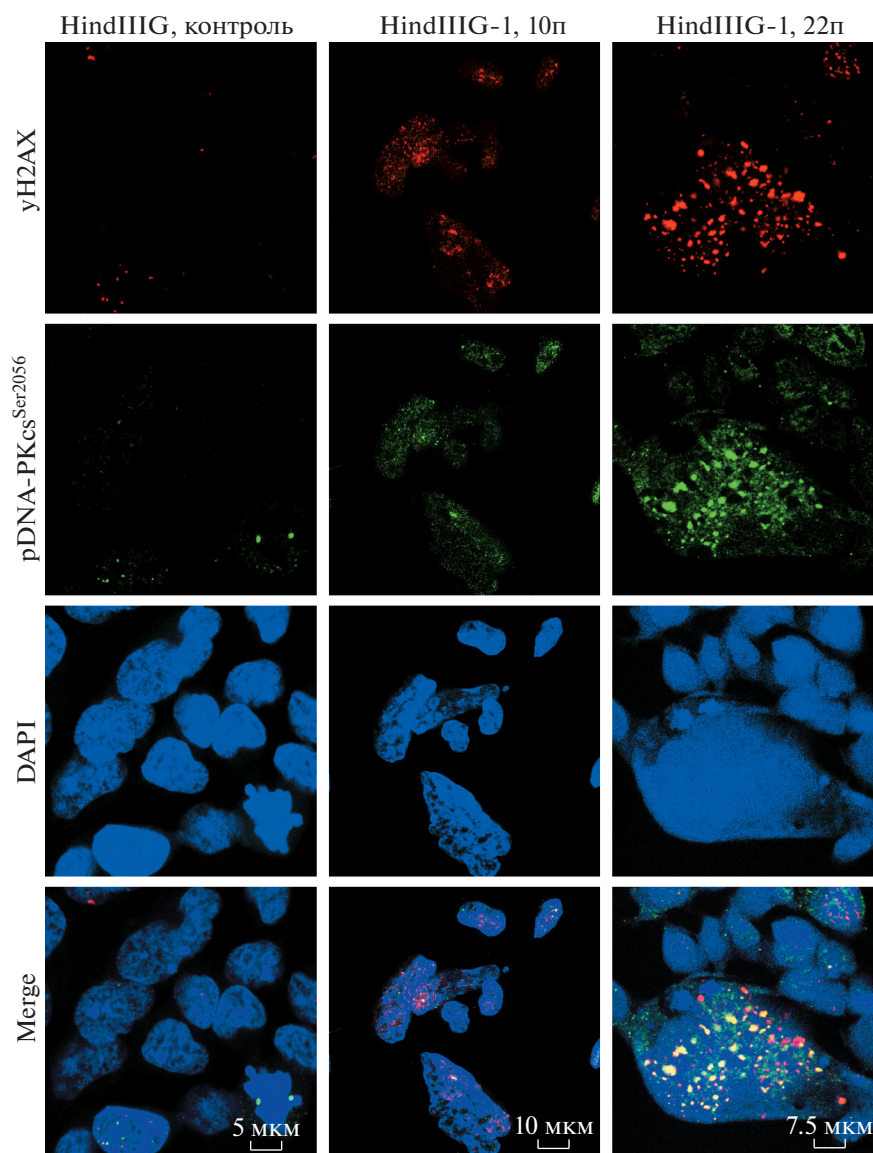


Рис. 3. Активация репарации ДНК путем нехомологичного соединения концов в необлученных клетках HindIIIГ-1 согласно фосфорилированию каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы (pDNA-ПКcs^{Ser2056}) и ее колокализация (merge) с фокусами γ H2AX. Показаны результаты иммуноцитохимического окрашивания с использованием соответствующих антител на 10- и 22-ом пассажах (10п и 22п). Ядра окрашены DAPI. Изображения получены с помощью конфокального микроскопа.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наше предыдущее исследование показало, что активация обратимого старения после облучения устойчивых к апоптозу клеток HindIIIГ сопровождается образованием гигантских полиплоидных клеток, способных реплицировать ДНК и характеризующихся нарушениями ответа на повреждение ДНК и ее репарации, а также персистенцией поврежденных ДНК (Chitikova et al., 2014). В частности, транслокация 53BP1 и Rad51 к местам повреждений ДНК происходила с задержкой. Кроме того, ферменты репарации ДНК Rad51 и pDNA-ПКcs^{Ser2056} длительное время оставались активированными и колокализо-

вались с фокусами повреждений ДНК до конца эксперимента (20-е сут после облучения), тогда как в нормальных фибробластах крысы репарация завершалась через 1 сут после воздействия ионизирующего излучения (Chitikova et al., 2014).

В настоящей работе мы показали, что в клетках HindIIIГ-1, полученных из околодиплоидных клеток, образовавшихся после облучения клеток HindIIIГ, наблюдается персистенция фокусов γ H2AX и 53BP1, а также активация репарации ДНК путем нехомологичного соединения концов. Нужно отметить, что количество клеток с фокусами γ H2AX и 53BP1, а также количество фокусов на клетку на

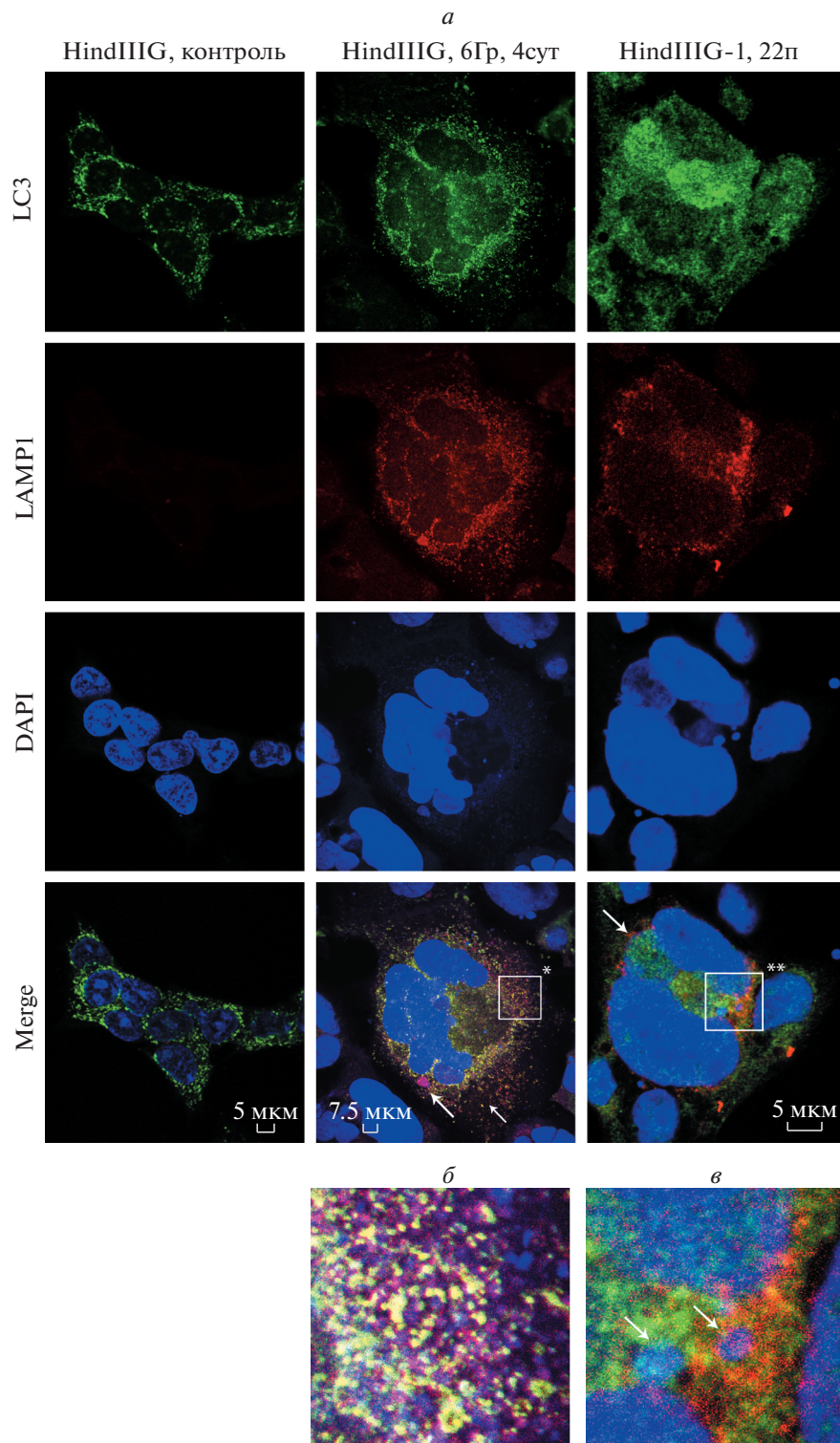


Рис. 4. Активация аутофагии в клетках HindPIIG после облучения в дозе 6 Гр и в необлученных клетках HindPIIG-1 (*a*). *Стрелками* указаны микроядра, содержащие маркеры аутофагии LAMP-1 и LC3. Увеличенные изображения *внизу* показывают ко-локализацию LAMP-1 и LC3 с ДНК, окрашенной DAPI в фрагментах хромосом (*б*) и в микроядрах, указанных *стрелками* (*в*). Активацию аутофагии анализировали на 4-е сут после облучения клеток HindPIIG (*), и на 22-ом пассаже (**)(22п) клеток HindPIIG-1. ДНК и ядра окрашены DAPI. Визуализация с помощью соответствующих антител, конфокальная микроскопия.

пассажах 10 и 22 практически не отличалось. В то же время количество клеток с рDNA-PKcs^{Ser2056} на 22-ом пассаже увеличилось вдвое по сравнению с пассажем 10, что может говорить об усилении репарации путем негомологического соединения концов. Количество клеток HindIII^G-1 с фрагментацией хромосом также уменьшалось со временем. Интересно, что количество клеток HindIII^G-1, содержащих фокусы ответа на повреждение ДНК, было выше, чем у клеток HindIII^G на 20-е сут после облучения, описанное нами ранее (Chitikova et al., 2014). В то же время количество фокусов γ H2AX в клетках HindIII^G-1 на пассаже 10 было ниже, чем обнаруженное нами ранее содержание фокусов в клетках HindIII^G на 20-е сут после облучения (Chitikova et al., 2014), а количество фокусов 53BP1 осталось прежним.

Известно, что белок 53BP1 играет ключевую роль в выборе пути репарации ДНК и способствует негомологическому соединению концов, противодействуя гомологичной рекомбинации (Panier, Boulton, 2014). Таким образом, сохранение количества фокусов 53BP1 и длительная активация репарации путем негомологического соединения концов в исследованных клетках могут быть взаимосвязаны. Наши данные говорят о возросшей генетической нестабильности в клетках HindIII^G-1 по сравнению с клетками HindIII^G, а также о достижении равновесия между возникновением повреждений ДНК и их репарацией и стабилизации генома в клетках HindIII^G-1 в процессе культивирования.

Персистенция повреждений ДНК может быть связана не только с нарушением репарации двуцепочечных разрывов, вызванных действием ионизирующего облучения, но также и с возникновением новых разрывов ДНК вследствие остановки вилок репликации (Mehta, Haber, 2014). Тогда как в облученных клетках HindIII^G могут сохраняться индуцированные облучением двойные разрывы ДНК, повреждения ДНК, возникшие из-за нарушения репликации, могут наблюдаться в клетках HindIII^G и HindIII^G-1 независимо от того, были ли они подергнуты облучению.

Исследованные клетки экспрессируют аденовирусный белок E1A, способный связываться с Rb и тем самым способствовать E2F1-зависимой транскрипции и прогрессии клетки по клеточному циклу (Chellapan et al., 1991; Niebert et al., 1992), что может вызывать репликативный стресс как в облученных, так и необлученных клетках. Нарушения репликации ДНК могут приводить к асинхронной конденсации хромосом, нарушению их сегрегации, а также фрагментации ДНК. Клетки элиминируют отстающие хромосомы, фрагменты ДНК и поврежденные хромосомы путем заключения их в микроядра (Thompson et al., 2011; Crasta et al., 2012), которые затем должны быть секретированы из клеток или деградированы с помощью аутофагии.

Известно, что при вхождении в митоз в клетке, содержащей микроядра, может происходить фрагментация хромосом (Crasta et al., 2012; Hatch, Hetzer 2015; Zhang et al., 2015). В настоящее время считается, что опосредованная микроядрами фрагментация хромосом является одним из основных механизмов хромотрипсиса (Zhang et al., 2015; Kneissig et al., 2019). Формирование микроядер, содержащих поврежденную ДНК, на что указывает наличие в них γ H2AX, наблюдалось как в облученных клетках HindIII^G (Chitikova et al., 2014), так и в клетках HindIII^G-1. Кроме того в этих клетках была обнаружена фрагментация хромосом. Несмотря на то, что нам не удалось секвенировать ДНК для подтверждения хромотрипсиса, мы, принимая во внимание фрагментацию хромосом, образование микроядер и активацию репарации ДНК путем негомологического соединения концов, предполагаем, что подобный хромотрипсису механизм может играть роль в перестройках генома исследованных нами клеток, а также в выживании облученных клеток HindIII^G и формировании новой линии HindIII^G-1.

Ранее мы показали, что в облученных клетках HindIII^G наблюдается активация маркеров стволовых клеток (Chitikova et al., 2014). Факторы ответа на повреждение ДНК и репарации имеют важное значение в репрограммировании и получении индуцированных стволовых клеток (González et al., 2013). Кроме того, большое число делеций, транслокаций и инверсий, возникающих вследствие хромотрипсиса, может приводить к нарушению экспрессии генов, в том числе онкогенов, опухолевых супрессоров и факторов репрограммирования. Как и в опухолевых клетках, подобный хромотрипсису механизм в клетках HindIII^G и HindIII^G-1 может способствовать гетерогенности популяции, дающей возможность быстрой адаптации к стрессу и выживанию. Кроме того, устойчивость к апоптозу, обеспечиваемая экспрессией аденовирусного белка E1B с мол. массой 19 кДа, позволяет клеткам HindIII^G и HindIII^G-1 выживать и осуществлять репарацию ДНК, несмотря на персистенцию повреждений ДНК и значительную фрагментацию хромосом.

Хромотрипсис наблюдается в различных типах опухолей (Stephens et al., 2011; Cortés-Ciriano et al., 2020). Он способствует прогрессии опухоли, приобретению устойчивости к терапии, а также метастазированию. Мы обнаружили, что в отличие от клеток HindIII^G, клетки HindIII^G-1 могли пролиферировать независимо от прикрепления к субстрату и мигрировать в поры мембраны покрытой Матригелем, что указывает на их способность к инвазии и может говорить о развитии метастатического потенциала. Кроме того, в клетках HindIII^G-1 отмечалась активация ядрышковских организаторов. Такое явление часто наблюдается в опухолевых клетках и коррелирует с повышенным биогенезом рибосом, необходимым для быстрого роста и развития опухоли (Pelletier et al., 2018).

В облученных клетках HindIII^G (Chitikova et al., 2014) и клетках HindIII^G-1 наблюдается активация аутофагии. Кроме киназы mTOR, к ключевым регуляторам аутофагии относятся такие факторы, как транскрипционный фактор p53 и киназа ATM (Feng et al., 2005; Alexander et al., 2010; Triparthi et al., 2013), участвующие в ответе на повреждение и ДНК репарации. Кроме того, транскрипционный фактор E2F1 может контролировать аутофагию на уровне транскрипции белков семейства Atg и LC3 (Polager et al., 2008). Аутофагия играет важную роль в ответе на повреждение ДНК и репарации, тем самым способствуя поддержанию целостности генома. Она участвует в деградации микроядер, селекции ДНК и деплоидизации клеток (Egenpreisa et al., 2011, 2012). Тогда как элиминация поврежденной ДНК и фрагментов хромосом способствует выживанию клетки, аутофагическая деградация всего ядра приводит к клеточной гибели. Аутофагия может способствовать селекции ДНК в одно- и многоядерных клетках или служить механизмом гибели в устойчивых к апоптозу клетках HindIII^G и HindIII^G-1, таким образом способствуя становлению линии HindIII^G-1.

Наши результаты показали, что линия HindIII^G-1, полученная в результате облучения и последующего длительного культивирования устойчивых к апоптозу клеток HindIII^G, характеризуется высокой нестабильностью генома и длительной активацией механизмов ответа на повреждение и репарации ДНК. Мы предполагаем участие подобного хромотрипси-су механизма в становлении линии HindIII^G-1 основываясь на наблюдениях значительной фрагментации ДНК и долгосрочной активации репарации ДНК путем негомологичного соединения концов в облученных клетках HindIII^G (Chitikova et al., 2014) и в клетках HindIII^G-1. Клетки HindIII^G-1 приобрели такие свойства, как способность к пролиферации независимо от прикрепления к субстрату и инвазии, что может указывать на развитие метастатического потенциала. Аутофагия участвует в деградации поврежденной ДНК, фрагментов хромосом, микроядер и ядер клеток HindIII^G и HindIII^G-1. Она может служить механизмом селекции генетического материала и выживания клеток, тем самым способствуя становлению новой линии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет бюджетного финансирования Института цитологии РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ярцева Н.М., Шитикова Ж.В., Быкова Т.В., Зубова С.Г., Кочеткова Е.Ю., Поспелов В.А., Поспелова Т.В. 2020. Изменения кариотипа устойчивых к апоптозу клеток крысы линии HindIII^G при длительном культивировании после действия ионизирующего облучения. Цитология. Т. 62. № 12. С. 880. (*Yartseva N.M., Chitikova Z.V., Bykova T.V., Zubova S.G., Kochetkova E.U., Pospelov V.A., Pospelova T.V.* 2020. Alterations of Karyotype in Irradiated Apoptosis-Resistant HindIII^G Cells after Prolonged Cultivation. *Tsitologiya*. V. 62. № 12. P. 880.)
- Alexander A., Cai S.L., Kim J., Nanéz A., Sahin M., MacLean K.H., Inoki K., Guan K.L., Shen J., Person M.D., Kusewitt D., Mills G.B., Kastan M.B., Walker C.L. 2010. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 107. P. 4153. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913860107>
- Chellappan S.P., Hiebert S., Mudryj M., Horowitz J.M., Nevins J.R. 1991. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*. V. 65. P. 1053. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90557-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90557-F)
- Chitikova Z.V., Gordeev S.A., Bykova T.V., Zubova S.G., Pospelov V.A., Pospelova T.V. 2014. Sustained activation of DNA damage response in irradiated apoptosis-resistant cells induces reversible senescence associated with mTOR downregulation and expression of stem cell markers. *Cell Cycle*. V. 13. P. 1424. <https://doi.org/10.4161/cc.28402>
- Cortés-Ciriano I., Lee J.J., Xi R., Jain D., Jung Y., Yang L., Gordenin D., Klimczak L.J., Zhang C.-Z., Pellman D., PCWAG Structural Variation Working Group, Park P.J., and PCWAG Consortium. 2020. Comprehensive analysis of chromothripsis in 2.658 human cancers using whole-genome sequencing. *Nat. Genet.* V. 52. P. 331. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0576-7>
- Crasta K., Ganem N.J., Dagher R., Lantermann A.B., Ivanova E.V., Pan Y., Nezi L., Protopopov A., Chowdhury D., Pellman D. 2012. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature*. V. 482. P. 53. <https://doi.org/10.1038/nature10802>
- Erenpreisa J., Huna A., Salmina K., Jackson T.R., Cragg M.S. 2012. Macroautophagy-aided elimination of chromatin: sorting of waste, sorting of fate? *Autophagy*. V. 8. P. 1877. <https://doi.org/10.4161/auto.21610>
- Erenpreisa J., Salmina K., Huna A., Kosmacek E.A., Cragg M.S., Ianzini F., Anisimov A.P. 2011. Polyploid tumour cells elicit paradiploid progeny through depolyploidizing divisions and regulated autophagic degradation. *Cell. Biol. Int.* V. 35. P. 687. <https://doi.org/10.1042/CBI20100762>
- Feng Z., Zhang H., Levine A.J., Jin S. 2005. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 102. P. 8204. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502857102>
- González F., Georgieva D., Vanoli F., Shi Z.D., Stadtfeld M., Ludwig T., Jasin M., Huangfu D. 2013. Homologous recombination DNA repair genes play a critical role in reprogramming to a pluripotent state. *Cell Rep.* V. 3. P. 651. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.005>
- Guan J.-L., Simon A.K., Prescott M., Menendez J.A., Liu F., Wang C., Wolvetang E., Vazquez-Martin A., Zhang J. 2013.

- Autophagy in stem cells. *Autophagy*. V. 9. P. 830. <https://doi.org/10.4161/auto.24132>
- Hatch E.M., Hetzer M.W. 2015. Linking micronuclei to chromosome fragmentation. *Cell*. V. 161. P. 1502. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.005>
- Hiebert S.W., Chellappan S.P., Horowitz J.M., Nevins J.R. 1992. The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev*. V. 6. P. 177. <https://doi.org/10.1101/gad.6.2.177>
- Howell W., Black D. A. 1980. Controller silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia*. V. 36. P. 1014. <https://doi.org/10.1007/BF01953855>
- Jones M.J.K., Jallepalli P.V. 2012. Chromothripsis: chromosomes in crisis. *Dev. Cell*. V. 23. P. 908. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.010>
- Kneissig M., Keuper K., de Pagter M.S., van Roosmalen M.J., Martin J., Otto H., Passerini V., Campos Sparr A., Renkens I., Kropveld F., Vasudevan A., Sheltzer J.M., Kloosterman W.P., Storchova Z. 2019. Micronuclei-based model system reveals functional consequences of chromothripsis in human cells. *eLife*. 8: e50292. <https://doi.org/10.7554/eLife.50292>
- Levine B., Yuan J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest*. V. 115. P. 2679. <https://doi.org/10.1172/JCI26390>
- Mao Z., Bozzella M., Seluanov A., Gorbunova V. 2008. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*. V. 7. P. 2902. <https://doi.org/10.4161/cc.7.18.6679>
- Mathew R., Kongara S., Beaudoin B., Karp C.M., Bray K., Degenhardt K., Chen G., Jin S., White E. 2007. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev*. V. 21. P. 1367. <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1545107>
- Mehta A., Haber J.E. 2014. Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. V. 6. P. a016428. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016428>
- Menendez J.A., Vellon L., Oliveras-Ferraro C., Cufí S, Vazquez-Martin A. 2011. mTOR-regulated senescence and autophagy during reprogramming of somatic cells to pluripotency: a roadmap from energy metabolism to stem cell renewal and aging. *Cell Cycle*. V. 10. P. 3658. <https://doi.org/10.4161/cc.10.21.18128>
- Mijaljica D., Devenish R.J. 2013. Nucleophagy at a glance. *J. Cell Sci*. V. 126. P. 4325. <https://doi.org/10.1242/jcs.133090>
- Mizushima N., Levine B. 2010. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat. Cell Biol*. V. 12. P. 823. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-823>
- Negrini S., Gorgoulis V.G., Halazonetis T.D. 2010. Genomic instability – an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. V. 11. P. 220. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>
- Ozkinay C., Mitelman F. 1979. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas*. V. 90. P. 1. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1979.tb01287.x>
- Panier S., Boulton S.J. 2014. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. V. 15. P. 7. <https://doi.org/10.1038/nrm3719>
- Pelletier J., George Thomas G., Volarević S. 2018. Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nat. Rev. Cancer*. V. 18. P. 51. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.104>
- Polager S., Ofir M., Ginsberg D. 2008. E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene*. V. 27. P. 4860. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.117>
- Pospelova T.V., Chitikova Z.V., Pospelov V.A. 2013. An integrated approach for monitoring cell senescence. *Methods Mol. Biol*. V. 965. P. 383. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_26
- Rappold I., Iwabuchi K., Date T., Chen J. 2001. Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *J. Cell Biol*. V. 153. P. 613. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.3.613>
- Rello-Varona S., Lissa D., Shen S., Niso-Santano M., Senovilla L., Mariño G., Vitale I., Jemaá M., Harper F., Pierron G., Castedo M., Kroemer G. 2012. Autophagic removal of micronuclei. *Cell Cycle*. V. 11. P. 170. <https://doi.org/10.4161/cc.11.1.18564>
- Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem*. V. 273. P. 5858. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>
- Stephens P.J., Greenman C.D., Fu B., Yang F., Bignell G.R., Mudie L.J., Pleasance E.D., Lau K.W., Beare D., Stebbings L.A., McLaren S., Lin M.-L., McBride D.J., Varela I., Nik-Zainal S., Leroy C. et al. 2011. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*. V. 144. P. 24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.055>
- Thompson S.L., Duane A. Compton D.A. 2011. Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore-microtubule attachment errors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 108. P. 17974. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109720108>
- Tripathi D.N., Chowdhury R., Trudel L.J., Tee A.R., Slack R.S., Walker C.L., Wogan G.N. 2013. Reactive nitrogen species regulate autophagy through ATM-AMPK-TSC2-mediated suppression of mTORC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 110. P. E2950. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307736110>
- Vanzo R., Bartkova J., Merchut-Maya J.M., Hall A., Bouchal J., Dyrskjot L., Frankel L.B., Gorgoulis V., Maya-Mendoza A., Jäättelä M., Bartek J. 2020. Autophagy role(s) in response to oncogenes and DNA replication stress. *Cell Death Differ*. V. 27. P. 1134. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0403-9>
- Zhang C.-Z., Leibowitz M.L., Pellman D. 2013. Chromothripsis and beyond: rapid genome evolution from complex chromosomal rearrangements. *Genes Dev*. V. 27. P. 2513. <https://doi.org/10.1101/gad.229559.113>
- Zhang C.-Z., Spektor A., Cornils H., Francis J.M., Jackson E.K., Liu S., Meyerson M., Pellman D. 2015. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature*. 522, 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature14493>

Establishment of HindIIIIG-1 Cell Line Obtained after Irradiation of Apoptosis Resistant HindIIIIG Cells Characterizes by Genomic Instability, Altered DNA Repair Mechanisms, and Activation of Autophagy

Z. V. Chitikova^{b, *}, N. M. Yartseva^a, T. V. Bykova^a, S. G. Zubova^a, E. Yu. Kochetkova^a,
V. A. Pospelov^a, and T. V. Pospelova^a

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

^b*University of Geneva, Geneva, 1205 Switzerland*

**e-mail: zhanna.chitikova@gmail.com*

Genomic instability and genetic heterogeneity are among key features of cancer cells that allow their survival under environmental stress. A rapid accumulation of a great number of mutations in a single event due to a massive rearrangement of fragmented chromosomes termed chromothripsis favors cancer progression and resistance to therapy. Complex chromosomal rearrangements caused by chromothripsis are associated with a random ligation of multiple chromosome fragments by an error prone non-homologous end joining (NHEJ) DNA repair. Here we studied the activation of DNA damage response (DDR) and NHEJ as markers of genomic instability in non-irradiated HindIIIIG-1 cells obtained after depolyploidization of irradiated HindIIIIG cells resistant to apoptosis. The implication of chromothripsis and autophagy in establishment of novel HindIIIIG-1 cell line has been also investigated. Our results demonstrate that non-irradiated HindIIIIG-1 cells characterize by high genomic instability, persistent activation of DDR and NHEJ. Chromosome fragmentation in irradiated HindIIIIG and non-treated HindIIIIG-1 cells taken together with the activation of NHEJ suggest the implication of chromothripsis-like mechanism in the establishment of HindIIIIG-1 cell line. Unlike HindIIIIG cells, HindIIIIG-1 acquired such features as adhesion-independent cell growth and migration through the pores of Matrigel-coated membrane that may indicate their metastatic potential. Degradation of damaged DNA, nuclei and micronuclei by autophagy in HindIIIIG and HindIIIIG-1 cells suggests its role in genome maintenance, cell survival and death.

Keywords: apoptosis resistance, autophagy, chromosome fragmentation, chromotripsis, chromosomal instability, DNA damage response, DNA repair

УДК 576.532

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

© 2021 г. Е. Ю. Закирова^{1, *}, А. М. Аймалетдинов¹, М. А. Тамбовский^{1, **}, А. А. Ризванов^{1, 2}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

²Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан, Казань, 420064 Россия

*E-mail: lenahamzina@yandex.ru

**E-mail: maxim.tambovsky.kfu@gmail.com

Поступила в редакцию 07.11.2020 г.

После доработки 11.12.2020 г.

Принята к публикации 18.12.2020 г.

В последние годы в ветеринарной медицине все чаще появляются сообщения о клеточной терапии с использованием мезенхимных стволовых клеток (МСК) животных. В большинстве случаев МСК животных описываются без необходимой иммунофенотипической характеристики, а дифференцировка *in vitro* проводится редко. Отсутствие единого маркера, специфичного для МСК и ограниченная доступность антител для МСК животных затрудняют эти исследования. В настоящей работе описаны иммунофенотипы линий МСК, выделенных из подкожно-жировой ткани собаки, кошки, лошади, свиньи, мыши, крысы и человека. Показана успешная дифференцировка в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях полученных нами клеток.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, идентификация, животные

DOI: 10.31857/S0041377121020097

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) являются очень перспективной субпопуляцией взрослых стволовых клеток, применяемых как в регенеративной медицине, как и в ветеринарии. МСК жировой ткани взрослого человека представляют собой фибробластоподобные мультипотентные стволовые клетки, способные к адгезии на пластике при культивировании в лабораториях. Считается, что минимальными признаками для идентификации выделенных из жировой ткани клеток как МСК является наличие на цитоплазматической мембране маркеров CD105, CD73, CD90, CD44, HLA-ABC, и отсутствие маркеров CD45, CD34 и HLA-DR. Предполагаемые МСК должны дифференцироваться в остеобласты, адипоциты и хондробласты *in vitro* (Dominici et al., 2006). Те же рекомендации были приняты и для характеристики МСК животных (Gugjoo et al., 2019).

В ветеринарной практике для терапии заболеваний и травм животных, которые не поддаются лечению классическими методами, также используют МСК (Закирова и др., 2015; Ardanaz et al., 2016). Исследования в области ветеринарной регенеративной медицины были сосредоточены, главным образом, на домашних и спортивных животных. Однако критическое прочтение опубликованных результатов в сочетании с избранными работами, в которых ис-

пользовали разные виды домашнего скота, позволяет получить ценную информацию о будущем применении регенеративной медицины в животноводстве. У животных были идентифицированы два класса стволовых клеток: эмбриональные стволовые клетки и взрослые (соматические) стволовые клетки. Соматические стволовые клетки включают в себя мезенхимные, гемопоэтические и тканеспецифичные (клетки-предшественники) стволовые клетки (Hill et al., 2019).

Однако в лечебной ветеринарной практике в случае применения МСК остро стоит вопрос идентификации полученных от животных клеток (Zakirova et al., 2017). Это связано с тем, что в настоящее время ограничена доступность моноклональных антител для МСК домашних и сельскохозяйственных животных. При этом успешная дифференциация клеток в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях является дополнительным этапом проверки их биологической активности и принадлежности к пулу МСК (De Schauwer et al., 2012).

Для проведения научно-исследовательских работ в рамках медицинских и ветеринарных проектов нами были получены фибробластоподобные клетки, выделенные из подкожной жировой ткани мыши, крысы, собаки, кошки, свиньи, лошади и человека. Целью данного исследования было подтвердить их принадлежность к МСК.

Принятые сокращения: МСК – мезенхимные стволовые клетки.

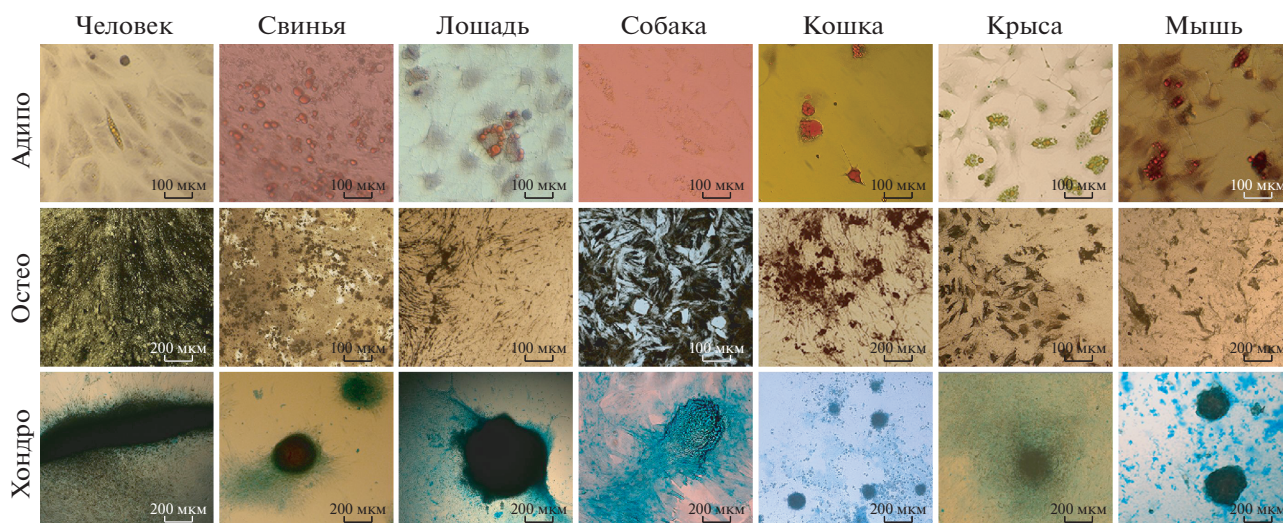


Рис. 1. МСК животных адипогенного происхождения после индукции дифференцировки в трех направлениях: адипогенном (Адипо), остеогенном (Остео) и хондрогенном (Хондро). Вновь образованные жировые включения в клетках (Адипо) окрашены липофильным красителем Суданом-3 в желто-оранжевый цвет; ядра на препаратах докрашены гематоксилин-эозином (синий цвет). Минеральные кальциевые отложения, образующиеся во время дифференцировки МСК (Остео), окрашиваются в серо-коричневый цвет при проведении реакции von Kossa. Кислые мукополисахариды внеклеточного матрикса, образующиеся при дифференцировке МСК в хондроциты (Хондро), окрашиваются в голубой цвет красителем Альциановым голубым.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. В работе использовали лабораторных животных: белых беспородных мышей (*Mus albus*) и крыс (*Rattus albus*), а также мини-пигов (*Sus scrofa domestica*), которых содержали на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде. У домашних животных – кошки (*Felis catus*), собаки (*Canis lupus*), лошади (*Equus caballus*) и человека (*Homo sapiens*) забор жировой ткани производили во время плановых операций.

Получение культуры МСК жировой ткани. У мышей и крыс забор жировой ткани производили после декапитации с целью избежать влияния наркотизирующего средства на ход и результаты эксперимента. У свиней, собак и кошек под общей анестезией в условиях ветеринарной операционной выделяли фрагмент жировой ткани. У лошади подкожную жировую клетчатку получали иссечением под местной анестезией в области основания хвоста. У человека забор жировой ткани был осуществляли методом липосакции.

Все клетки были выделены из жировой ткани по стандартной методике (Закирова и др., 2014). Полученные образцы жировой ткани от животных и человека доставляли в лабораторию в стерильном контейнере с буферным фосфатно-солевым раствором (PBS, Биолот, Россия), содержащем смесь пенициллина и стрептомицина (ПанЭко, Россия). Затем проводили выделение стромально-васкулярной фракции: жировую ткань механически измельчали на фрагменты объемом около 1 мм³ и инкубировали в растворе коллагеназы краба (Биолот, Россия) в конечной

концентрации 0.2% в течение 1 ч при температуре 37°C при покачивании на шейкере. Полученную суспензию клеток осаждали путем центрифугирования при 1500 об./мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли. Третье осадок ресуспензировали в 0.9%-ном NaCl (ПанЭко, Россия) и осаждали центрифугированием. Полученные клетки культивировали в среде α -MEM (Пан-Эко, Россия), содержащей 10% сыворотки плодов коров (FBS, ПанЭко, Россия), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия). Через 24 ч питательную среду заменяли на свежую ростовую среду. При этом удалялись не прикрепившиеся к культуральному пластику клетки. В последующем смену ростовой среды проводили 1 раз в течение 3 сут. При достижении 80%-ной плотности монослоя МСК рассевали. Пересев осуществляли методом трипсинизации, используя 0.25%-ную смесь трипсин–EDTA (ПанЭко, РФ).

В работе анализировали клетки 4–5-ого пассажей, полученные от 3–5 доноров. Это связано с тем, что МСК 3-го пассажа оцениваются как уже однородные и стабильные популяции, а клетки 8-го пассажа являются стареющими клетками, которые уже проявляют признаки генетической нестабильности и снижение дифференцировочного потенциала (Yang et al., 2018; Alonso-Goulart et al., 2018).

Дифференцировка МСК. Для исследования способности полученных клеточных культур к дифференцировке клетки третьего пассажа высевали в 12-луночные планшеты по 30 тыс. клеток на лунку и инкубировали в ростовой среде до получения моно-

слоя. В дальнейшем для индукции дифференцировки клеточные культуры культивировали в специальных дифференцировочных средах. Дифференцировку осуществляли в трех направлениях: в остеогенном, адипогенном и хондрогенном. Фиксировали результаты дифференциации с помощью инвертированного микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Остеогенная дифференцировка. Использовали среду α -MEM, содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 100 нМ дексаметазона (Sigma, США), 0,5 мкМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты (Sigma, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия). В качестве контрольной среды использовали среду α -MEM того же состава, но не содержащую дексаметазон. Через 10 сут культивирования в среду для остеогенной дифференцировки так же, как и в контрольную, добавляли 0,2 мкМ раствора β -глицерофосфата (Sigma, США). Смену сред проводили каждые 3 сут. Дифференцировку проводили в течение 21 сут.

Для определения минерализации, являющейся признаком остеогенной дифференцировки, использовали окрашивание с помощью реакции von Kossa. Эта реакция основана на связывании ионов серебра с фосфатными группами. Полученное соединение подвергается фотохимической деградации с выделением ионов серебра, придающим минеральным депозитам серо-коричневый цвет. Для этого перед окрашиванием удаляли питательную среду из лунок планшета, клетки промывали 0,9%-ным NaCl и фиксировали 4%-ным раствором формалина 30 мин при комнатной температуре. Затем тщательно промывали лунки достаточным количеством дистиллированной воды 3 раза, заливали 2%-ным раствором нитрата серебра в дистиллированной воде и инкубировали в темноте в течение 10 мин. Затем клетки промывали дистиллированной водой и инкубировали при ярком свете в течение 1 ч.

Адипогенная дифференцировка. Для ее индукции использовали среду DMEM High glucose (ПанЭко, Россия), содержащей 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин, 1 мкМ дексаметазона, 100 мкМ индометацина (Sigma, США), 500 мкМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX, Sigma, США) и 10 мкг/мл инсулина (Sigma, США). Через 10 сут среду заменяли на поддерживающую, отличающуюся отсутствием дексаметазона, индометацина и IBMX. В качестве контрольной среды на всех этапах использовали среду DMEM High glucose, содержащую 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин. Смену сред проводили каждые 3 сут. Дифференцировку проводили в течение 21 сут.

Для выявления дифференцировки в адипогенном направлении использовали окрашивание жировых включений красителем Суданом-3 (Sigma, США). Для этого удаляли питательную среду и фиксировали

клетки 4%-ным раствором формалина 30 мин при комнатной температуре. Перед окрашиванием тщательно промывали лунки достаточным количеством дистиллированной воды 3 раза по 5 мин.

При окрашивании Суданом-3 ядра клеток докрашивали гематоксилин-эозином. Краситель Судан-3 готовили растворением 0,02 г порошка в 10 мл 70%-ного этилового спирта. Смесь инкубировали 2 ч при 58°C. Затем раствор фильтровали, окрашивали образцы при комнатной температуре 15–30 мин, промывали 0,9%-ным NaCl и окрашивали гематоксилин-эозином. Для приготовления раствора гематоксилина-эозина и окраски клеток использовали стандартную методику (Bancroft, Gamble, 2002).

Хондрогенная дифференцировка. И для дифференцировки, и для контрольного варианта использовали 9×10^5 клеток 3–6 пассажа. Клетки отмывали от питательной среды, осаждали и ресуспендировали в 90 мкл дифференцировочной среды или в 90 мкл контрольной среды. Суспензии (контрольную и экспериментальную) наносили капельно по 10 мкл в лунки 24-х луночного планшета, используя 3 лунки для каждого варианта клеток. Клетки культивировали при 37°C в течение 2 ч для их адгезии, после чего добавляли по 500 мкл соответствующей среды в каждую лунку. В качестве контрольной среды использовали α -MEM с добавлением 10% FBS, 0,5 мкМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты (Sigma, США), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин. Хондрогенная среда DMEM-High glucose содержала 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин, 100 мкМ/л пирувата натрия (ПанЭко, Россия), 1-кратный ITS, 1 мкМ дексаметазона, 0,5 мкМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты и 10 нг/мл TGF- β 1 (все от Sigma, США). Смену сред проводили каждые 3 сут. Дифференцировку проводили в течение 21 сут.

Для выявления хондрогенной дифференцировки клетки окрашивали на присутствие кислых мукополисахаридов, являющихся маркером хондрообразования. Для этого клеточные культуры фиксировали по 5 мин в 95%-, затем в 70%-ном этиловом спирте. Клетки промывали дистиллированной водой по 30 с 3 раза и окрашивали в течение 1 ч раствором Альцианового голубого (Alcian Blue; Sigma, США). После этого клетки промывали под проточной водой 2 мин. Образцы заливали дистиллированной водой и визуализировали в видимом свете с помощью инвертированного микроскопа. Раствор Альцианового голубого готовили, растворяя 1 г порошка в 100 мл 0,1 н HCl.

Дифференцировку МСК человека проводили по тем же методикам, но с использованием коммерческих наборов дифференцировочных сред (Gibco, США).

Проточная цитофлюорометрия. МСК снимали с культурального пластика методом трипсинизации как описано выше. Затем промывали натрий-фосфатным буфером Дульбекко (DPBS; ПанЭко, Россия) ме-

Таблица 1. Используемые в работе антитела к маркерам, присутствующим на поверхности МСК разных животных

Маркер	Моноклональные антитела			
	клон	видовая реактивность	хозяин	фирма
Thy-1 (CD90)/PE-Cy5	5E10	Человек, африканская зеленая мартышка, павиан, макака-резус, свинья	Мышь	Biolegend, США
CD90/FITC	30-H12	Мышь	Крыса	Sigma-Aldrich, США
CD44/PE	IM7	Мышь, человек, павиан, шимпанзе, цино-молгус, макака-резус, белка, обезьяна, лошадь, крупный рогатый скот, свинья, собака, кошка	Крыса	Biolegend, США
CD44/PE	BJ18	Человек, африканская зеленая мартышка, бабуин, макака-резус	Мышь	Biolegend, США
CD73/PE	AD2	Человек, африканская зеленая мартышка, бабуин	Мышь	Biolegend, США
CD29/PE	HMβ1-1	Мышь, крыса	Армянский хомяк	Biolegend, США
CD29/APC	TS2/ 16	Человек, африканская зеленая мартышка, павиан, крупный рогатый скот (корова), собака, лошади, макака-резус	Мышь	Sony, США
Антитела, использованные в качестве изотипического контроля				
PE/IgG1	МОРС-21	Не известно	Мышь	Biolegend, США
APC-Cy7/ Mouse IgG1	МОРС-21	Не известно	Мышь	Biolegend, США
Ig/FITC	F(ab') ₂	Не известно	Козел	Сорбент, Россия
IgG2b PerCP-Cy5.5	MPC-11	Не известно	Мышь	Biolegend, США

Примечание. Антитела мечены PE, APC, APC-Cy7, E-Cy5, PerCP-Cy5.5 или FITC.

тодом центрифугирования 5 мин 1500 об./мин и фиксировали 4%-ным формалином 20 мин при комнатной температуре. После этого отмывали DPBS, ресуспендировали и аликвоты окрашивали с помощью антител, конъюгированных с красителями, согласно инструкции фирм-производителей (табл. 1). Анализ клеток на наличие мембранных маркеров проводили с помощью проточного цитофлуориметра FACS Aria III (BD Biosciences, США). Результат проточной цитометрии выражен в % от общего числа клеток в образце (не менее 100 тыс. клеток на 1 аликвоту). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием методов первичного статистического анализа при помощи программы Excel 2016, результаты которого представлены в виде среднего арифметического значения по выборке и стандартного отклонения. Вторичную статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все клетки, изолированные из жировой ткани животных и человека, адгезировались на культу-

ральном пластике и имели фибробластоподобную морфологию. Маркеры и их содержание в клетках разных животных и человека, выявленных с помощью проточной цитометрии, отражены в табл. 2.

Маркер Thy-1 (CD90). Все МСК, выделенные из всех животных, включенных в настоящую работу, имели на клеточной мембране маркер Thy-1 (CD90). Этот маркер представляет собой гликопротеин, связанный с гликозилфосфатидилинозитолом (GPI) и присутствует на мембранах МСК, а также у взрослых клеток и раковых стволовых клеток. Изучено его участие во многих биологических событиях, включающих активацию клеток, миграцию и адгезию, а также подавление роста опухоли (Park et al., 2016). Согласно литературным данным, маркер Thy-1 был детектирован на МСК адипогенного происхождения у человека (Fitzsimmons et al., 2018), свиньи (Park et al., 2016), крысы (Davies et al., 2015), мыши (Yamamoto et al., 2014), лошади (Bundgaard et al., 2018), кошки (Kim et al., 2017) и собаки (DePompeo et al., 2019). Хотя некоторые авторы, как и в нашем случае, говорят о небольшом количестве МСК адипогенного происхождения этот маркер (Takemitsu et al., 2012).

Таблица 2. Поверхностные маркеры МСК разных животных и человека. Проточная цитометрия

Маркер	Производитель антител (США)	Содержание маркера МСК животного, %						
		мышь <i>n</i> = 5	крыса <i>n</i> = 5	лошадь <i>n</i> = 3	свинья <i>n</i> = 5	кошка <i>n</i> = 5	собака <i>n</i> = 5	человек <i>n</i> = 5
Thy-1 (CD90)	Biolegend	НИ	95 ± 3	99 ± 1	98 ± 2	97 ± 3	30 ± 5	98 ± 1
CD90	Sigma-Aldrich	90 ± 2	НИ	НИ	НИ	НИ	НИ	НИ
CD44	Biolegend, клон IM7	80 ± 2	НИ	83 ± 3	0	0	95 ± 3	97 ± 3
	Biolegend, клон BJ18	НИ	98 ± 1	НИ	НИ	НИ	НИ	НИ
CD29	Biolegend	99 ± 1	99 ± 1	7 ± 1	0	55 ± 6	83 ± 3	НИ
	Sony	НИ	НИ	НИ	97 ± 3	НИ	НИ	98 ± 2
CD73	Biolegend	44 ± 3	94 ± 5	94 ± 3	95 ± 5	НИ	97 ± 1	99 ± 1

Примечание. НИ – не исследовано; 0 – отрицательные результаты окрашивания. Результаты представлены в виде среднего арифметического значения по выборке (*n*) и стандартного отклонения.

Маркер CD44. В нашей работе, даже несмотря на наличие заявленной производителем антител кросс-реактивности CD44, выделенные МСК из свиньи и кошки не несли на своих клеточных мембранах этот маркер. Согласно литературным данным, CD44 присутствует на клеточной мембране МСК адипогенного происхождения человека (Hamid et al., 2012), крысы (Bayati et al., 2013), собаки (Takemitsu et al., 2012), свиньи (Hu et al., 2016), лошади (Bundgaard et al., 2018) мыши (Huang et al., 2013), кошки (Kim et al., 2017). Он идентифицирован как маркер для стволовых клеток нескольких типов, а также является молекулярным маркером стволовых раковых клеток и представляет собой некиназный трансмембранный гликопротеин. Гиалуронан, являющийся основным лигандом для CD44, связывается и активирует CD44. Это приводит к активации клеточных сигнальных путей, которые индуцируют пролиферацию клеток, увеличивают выживание клеток, модулируют изменения цитоскелета и повышают клеточную подвижность (Chen et al., 2018).

Маркер CD73. Полученные нами результаты говорят о том, что этот маркер находится на цитоплазматической мембране практически всех МСК исследуемых нами животных, за исключением МСК кошки (исследования нами не проводились). Известно, что CD73 является мембранным гликопротеином и связан с функциональным статусом МСК (Goza et al., 2018). Он идентифицирован в МСК человека (Hamid et al., 2012), крысы (Bayati et al., 2018) и лошади (De Schauwer et al., 2012). Согласно данным из литературы, CD73 не найден в МСК кошки (Kim et al., 2017). Мы не нашли в литературе данных о наличии маркера CD73 на клеточной мембране МСК свиней и мыши. Есть упоминание о небольшом количестве клеток (63%), несущих этот маркер, на цитоплазматической мембране МСК собаки (Russell et al., 2016). Наши результаты демонстрируют наличие CD73 на клеточной мембране 95% МСК свиней, 97% МСК собак и 44% МСК мыши (табл. 2).

Маркер CD29. Согласно полученным нами результатам почти 100% МСК мыши, крысы, свиньи и человека имели CD29 на цитоплазматических мембранах. В то время как чуть меньшее количество МСК кошки и собаки несло данный маркер, а на МСК лошади его практически нет. Хотя данные из литературы говорят о том, что CD29 найден на клеточной мембране МСК лошади (Bundgaard et al., 2018), а также МСК из жировой ткани человека (Katz et al., 2005), свиньи (Hu et al., 2016), кошки (Kim et al., 2017), собаки (Takemitsu et al., 2012), крысы (Davies et al., 2015) и мыши (Zheng et al., 2006).

При окрашивании МСК свиньи на наличие CD29 мы столкнулись с явлением афинности антител. Нами показано, что антитела к CD29 от производителя Sony (США) положительно окрашивали МСК свиньи, тогда как антитела к CD29 от производителя Biolegend (США) не выявляли их наличие на цитоплазматической мембране тех же клеток. Оба варианта использованных нами антител не имели заявленной кросс-реактивности к МСК свиней. Но антитела к CD29 от производителя Sony (США) имели большее число кросс-реактивно окрашиваемых МСК животных, чем антитела к CD29 от фирмы Biolegend (США). Вероятно, поэтому они и выявляли маркер CD29 на клеточной мембране МСК свиньи.

Мембранный клеточный маркер CD29 является интегрином $\beta 1$, рецептором для фибронектина. Согласно опубликованным данным, он является маркером МСК и участвует в миграции клеток *in vivo* (Ode et al., 2011).

Полученные нами результаты, вместе с данными из литературы, говорят о том, что отсутствие или ограниченная доступность моноклональных антител к МСК животных, в частности МСК лошади, сильно затрудняют иммунофенотипическую характеристику МСК. Это является проблемой не только для российских, но и зарубежных ученых. В связи с этим, зарубежные коллеги рекомендуют в качестве дополнительного подтверждения результатов ис-

пользовать дифференцировку в адипо-, остео- и хондрогенном направлениях (De Schauwer et al., 2012). Все МСК адипогенного происхождения, полученные нами от разных животных, дифференцировались в адипо-, хондро- и остеогенном направлении при культивировании в соответствующих дифференцировочных средах (рис. 1).

Полученные нами данные согласуются с имеющимися в литературе. Так, например, в 3-х направлениях дифференцируются МСК адипогенного происхождения от кошки (Kim et al., 2017), собаки (Teshima et al., 2019), лошади (Vidal et al., 2008), мыши, крысы (Zheng et al., 2018). Однако согласно тем же данным, МСК свиньи дифференцируются только в адипо- и остеогенном направлениях (Williams et al., 2008). Но в условиях нашей лаборатории МСК свиньи успешно дифференцировались по всем трем классическим направлениям.

В литературе описаны случаи, когда дифференцировка предполагаемых МСК животных не проходит в заданном направлении. Авторы связывают ее отсутствие с некорректно подобранной средой (Patricio et al., 2013). Полученные нами результаты дифференцировки МСК человека, крысы, мыши, свиньи, кошки, собаки и лошади подчеркивают, что корректировка условий культивирования и среды дифференцировки в отношении МСК имеет важное значение для достижения необходимого результата.

Таким образом, клетки, выделенные нами из подкожной жировой ткани человека, мыши, крысы, свиньи, кошки, собаки и лошади являются МСК, т.к. имеют характерные свойства и признаки. Однако иммунофенотипирование МСК животных все еще остается сложной задачей из-за ограниченной доступности подходящих антител высокого качества и стабильной эффективности в разных лабораториях. Поэтому принадлежность выделенных и культивируемых клеток к пулу МСК подтверждается их дифференцировкой в трех направлениях.

В ходе нашей работы получены типированные МСК животных, которые могут использоваться для создания новых клеточных систем с заданными свойствами на основе стволовых клеток млекопитающих (Mukhamedshina et al., 2017), в том числе сельскохозяйственных животных для ветеринарии, вирусологии и биотехнологии, а также для применения в лечебных целях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-016-00022), а также в рамках Госзадания Казанского федерального университета (№ 0671-2020-0058). Работу выполняли согласно программе повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

На проведение процедур по забору жировой ткани было получено разрешение локального этического комитета Казанского федерального университета (№ 1 от 23.02.2015 на проведение научного исследования по теме “Генная и клеточная терапия в регенеративной ветеринарной медицине”). На проведение всех операций по забору жировой ткани были получены письменные согласия владельцев животных, если они имелись. Было получено от пациентов письменное информированное согласие на проведение процедуры липосакции, а также разрешение локального этического комитета в рамках темы Государственного автономного учреждения здравоохранения “Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан” “Усовершенствование методов лечения повреждений и заболеваний крупных суставов”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Закирова Е.Ю., Журавлева М.Н., Масгутов Р.Ф., Усманов Р.А., Ризванов А.А. 2014. Выделение, анализ и применение аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани собаки для лечения ложного сустава большеберцовой кости. Клетки и гены. Т. 9. № 3. С. 70. (Zakirova E.Y., Zhuravleva M.N., Masgutov R.F., Usmanov R.A., Rizvanov A.A. 2014. Isolation, analysis and application of authogenic adipose derived multipotential mesenchymal stromal cells from dog for therapy pseudoarthrosis of tibial bone. Genes and Cells. V. 9. № 3. P. 70.)
- Закирова Е.Ю., Валеева А.Н., Файзуллина Р.Р., Ахметшин Р.Ф., Неведовская Л.В., Ризванов А.А. 2015. Использование мезенхимальных стромальных клеток для лечения посттравматических язв роговицы у кошек. Гены и Клетки. Т. 10. № 3. С. 49. (Zakirova E.Y., Valeeva A.N., Faizullina R.R., Akhmetshin R.F., Nefedovskaya L.V., Rizvanov A.A. 2015. Transplantation of allogeneic mesenchymal stromal cell for treating corneal ulcers in cats. Gene and Cells. V. 10. № 3. P. 49.)
- Alonso-Goulart V., Ferreira L., Duarte C., de Lima I., Ferreira E., de Oliveira B., Vargas L., de Moraes D., Silva I., Faria R., de Souza A., de Souza Castro-Filice L. 2018. Mesenchymal stem cells from human adipose tissue and bone repair: A literature review. Biotechnol. Res. Innovation. V. 2. P. 74. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.10.005>
- Ardanaz N., Vazquez F. J., Romero A., Remacha A. R., Barrachina L., Sanz A., Ranera B., Vitoria A., Albareda J., Prades M., Zaragoza P., Martin-Burriel I. and Rodellar C. 2016. Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. BMC Vet. Res. V. 12. P. 65.
- Bayati V., Hashemitabar M., Gazor R., Nejatbakhsh R. and Bijannejad D. 2013. Expression of surface markers and myogenic potential of rat bone marrow- and adipose-derived stem cells: a comparative study. Anat. Cell Biol. V. 46. P. 113.

- Bancroft J.D., Gamble M.* 2002. Theory and practice of histological techniques. Edinburgh et al.: Churchill Livingstone.
- Bundgaard L., Stensballe A., Elbaek K.J., Berg L.C.* 2018. Mapping of equine mesenchymal stromal cell surface proteomes for identification of specific markers using proteomics and gene expression analysis: an in vitro cross-sectional study. *Stem Cell Res. Ther.* V. 9. P. 288.
- Chen C., Zhao S., Karnad A., Freeman J.W.* 2018. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J. Hematol. Oncol.* V. 11. P. 64.
- Davies O.G., Cooper P.R., Shelton R.M., Smith A.J., Scheven B.A.* 2015. Isolation of adipose and bone marrow mesenchymal stem cells using CD29 and CD90 modifies their capacity for osteogenic and adipogenic differentiation. *J. Tiss. Eng.* 6. P. 2041731415592356. <https://doi.org/10.1177/2041731415592356>
- De Schauwer, Piepers C., S., Van de Walle G.R., Demeyere K., Hoogewijs M.K., Govaere J.L., Braeckmans K., Van Soom A., Meyer E.* 2012. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. *Cytometry A.* V. 81. P.312.
- DePompeo C.M., Giassetti M.I., Elnaggar M.M., Oatley J.M., Davis W.C., Fransson B.A.* 2019. Isolation of canine adipose-derived mesenchymal stem cells from falciiform tissue obtained via laparoscopic morcellation: A pilot study. *Vet. Surg.* V. 49. S. 1. P. O28. <https://doi.org/10.1111/vsu.13267>
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E.* 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Int. Soc. Cel. Ther. Position Statement. Cytotherapy.* V. 8. P. 315.
- Fitzsimmons Ross E.B., Mazurek M.S., Simmons A., Craig A.* 2018. Mesenchymal stromal/stem cells in regenerative medicine and tissue engineering. *Stem Cells Int.* V. 2018. P. 8031718. <https://doi.org/10.1155/2018/8031718>
- Goya U., Jaiswal C., Ta M.* 2018. Isolation and establishment of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of human umbilical cord. *Bio-Protocol.* V. 8. P. e2735. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2735>
- Gugjoo M.B., Fazili M.R., Gayas M.A., Ahmad R., Dhama K.* 2019. Animal mesenchymal stem cell research in cartilage regenerative medicine – a review. *Vet. Q.* V. 39. P. 95.
- Hamid A.A., Idrus R.B., Saim A.B., Sathappan S., Chua K.H.* 2012. Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation. *Clinics (Sao Paulo).* V. 67. P. 99.
- Hill A.B.T., Bressan F.F., Murphy B.D., Garcia J.M.* 2019. Applications of mesenchymal stem cell technology in bovine species. *Stem Cell Res. Ther.* V. 10. P. 44.
- Hu C., Zhou N., Li J., Shi D., Cao H., Li J., Li L.* 2016. Porcine adipose-derived mesenchymal stem cells retain their stem cell characteristics and cell activities while enhancing the expression of liver-specific genes after acute liver failure. *Int. J. Mol. Sci.* V. 17. P. 62. <https://doi.org/10.3390/ijms17010062>
- Huang S.J., Fu R.H., Shyu W.C., Liu S.P., Jong G.P., Chiu Y.W., Wu H.S., Tsou Y.A., Cheng C.W., Lin S.Z.* 2013. Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell Transplant.* V. 22. P. 701.
- Katz A.J., Tholpady A., Tholpady S.S., Shang H., Ogle R.C.* 2005. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells.* V. 23. P. 412.
- Kim H.R., Lee J., Byeon J.S., Gu N.Y., Lee J., Cho I.S., Cha S.H.* 2017. Extensive characterization of feline intra-abdominal adipose-derived mesenchymal stem cells. *J. Vet. Sci.* V. 18. P. 299.
- Mukhamedshina Y.O., Zakirova E.Y., Galieva L.R., Kostennikov A.A., Akhmetzyanova E.R., Rizvanov A.A.* 2017. Distribution and survival of transplanted adipose-derived mesenchymal stem cells in the spinal cord injury. *BioNanoSci.* V. 7. P. 608. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0440-0>
- Ode A., Kopf J., Kurtz A, Schmidt-Bleek K., Schrade P., Kolar P., Buttgerit F., Lehmann K., Hutmacher D.W., Duda G.N., Kasper G.* 2011. CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells. *Eur. Cells Mat.* V. 22. P. 26.
- Park K., Kim J., Choi C.Y., Bae J., Kim S.H., Kim Y.H., Chun T.* 2016. Molecular cloning and expression analysis of pig CD90. *Anim. Biotechnol.* V. 27. P. 133.
- Patricio L.F.L., Rebelatto C.L.K., Brofman P., Maciel B.B., Beltrame O., Brito H., Ditttrich R.* 2013. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arquivo Bras. Med. Vet. Zootec.* V. 65. P. 946.
- Russell K.A., Chow N.H., Dukoff D., Gibson T.W., LaMarre J., Betts D.H., Koch T.G.* 2016. Characterization and immunomodulatory effects of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *PLoS One.* V. 11. P. e0167442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167442>
- Takemitsu H., Zhao D., Yamamoto I., Harada Y., Michishita M., Arai T.* 2012. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet. Res.* V. 8. P. 150.
- Teshima T., Matsuoka A., Shiba M., Dairaku K., Matsumoto H., Suzuki R., Koyama H.* 2019. Comparison of properties of stem cells isolated from adipose tissue and lipomas in dogs. *Stem Cells Int.* V. 2019. P. 1609876. <https://doi.org/10.1155/2019/1609876>
- Vidal M.A., Robinson S.O., Lopez M.J., Paulsen D.B., Borkhse-nious O., Johnson J.R., Moore R.M., Gimble J.M.* 2008. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Vet. Surg.* V. 37. P. 713. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2008.00462.x>
- Williams K.J., Picou A.A., Kish S.L., Giraldo A.M., Godke R.A., Bondioli K.R.* 2008. Isolation and characterization of porcine adipose tissue-derived adult stem cells. *Cells Tiss. Organs.* V. 188. P. 251.
- Yamamoto M., Nakata H., Hao J., Chou J., Kasugai S., Kuroda S.* 2014. Osteogenic potential of mouse adipose-derived stem cells sorted for CD90 and CD105 in vitro. *Stem Cells Int.* V. 2014. P. 576358. <https://doi.org/10.1155/2014/576358>
- Yang Y.H.K., Ogando C.R., Wang See C., Chang T., Barabino G.* 2018. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell*

Res. Ther. V. 9. P. 131.

<https://doi.org/10.1186/s13287-018-0876-3>

Zakirova E.Y., Valeeva A.N., Masgutov R.F., Naumenko E.A., Rizvanov A.A. 2017. Application of allogenic adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells from cat for tibial bone pseudoarthrosis therapy (case report). *Bionan-*

nosci. V. 7. P. 207.

<https://doi.org/10.1007/s12668-016-0306-x>

Zheng Cao B.B., Li G., Huard J. 2006. Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation in vivo. *Tiss. Eng.* V. 12. P. 1891.
<https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1891>

Comparative Characteristics of Mesenchymal Stem Cell Lines from Different Animal Species

E. Yu. Zakirova^{a,*}, A. M. Aimaletdinov^a, M. A. Tambovsky^{a,**}, and A. A. Rizvanov^{a,b}

^a*Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, 420008 Russia*

^b*Republican Clinical Hospital of the Ministry of Health of the Republic of Tatarstan, Kazan, 420064 Russia*

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

***e-mail: maxim.tambovsky.kfu@gmail.com*

In recent years, in veterinary medicine, there have been increasing reports of cell therapy using animal mesenchymal stem cells (MSCs). In most of these investigations, animal MSCs are described without the necessary immunophenotypic characteristics, and in vitro differentiation is rarely performed. The lack of specific single marker for MSCs and limited availability of animal MSCs antibodies complicate these studies. In this work, we described the immunophenotypes of MSCs lines isolated from the subcutaneous adipose tissue of dogs, cats, horses, pigs, mice, rats, and humans. The data obtained showed a successful differentiation in the osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineage for all cells.

Keywords: mesenchymal stem cells, identification, animals

УДК 576.5

АНАЛИЗ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА АЛЬФА-AKТИНИНА-4 И СИГНАЛЬНОГО БЕЛКА RhoA В ПРОЦЕССЕ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ КЛЕТОК ЛИНИИ ADH-MSC, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЭПИКАРДИАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. Д. Ф. Гончарова¹, А. В. Полянская¹, А. С. Мусорина², Г. Г. Полянская², Д. Е. Бобков², *

¹Кафедра биофизики Санкт-Петербургского государственного политехнического университета, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: bobkov@incras.ru

Поступила в редакцию 14.12.2020 г.

После доработки 26.12.2020 г.

Принята к публикации 28.12.2020 г.

В работе проведен молекулярный анализ некоторых механизмов реорганизации актинового цитоскелета в процессе длительного культивирования мезенхимных стволовых клеток человека. С помощью методов иммунофлуоресценции и анализа конфокальных изображений исследовано распределение актин-связывающего белка α -актинина-4 и малой ГТФазы RhoA в мезенхимных стволовых клетках линии ADH-MSC, выделенных из эпикардиальной жировой ткани взрослого человека. Установлено, что в процессе репликативного старения на протяжении 8–17 пассажей в этих клетках происходит перераспределение исследуемых белков из цитоплазмы в ядра клеток, которое сопровождается изменениями в организации актинового цитоскелета. Для оценки организации актинового цитоскелета использовали коэффициент локальной связанной фрактальной размерности (LCFD), который характеризует локальные нарушения геометрии неоднородных геометрических объектов и является косвенной мерой оценки структурной целостности такого сложного геометрического объекта, каким является актиновый цитоскелет распластанных клеток. С помощью измерения LCFD конфокальных изображений клеток, окрашенных родамин-фаллоидином, количественно оценивали изменения структурной целостности актинового цитоскелета в процессе репликативного старения. Обнаружено, что с 8-ого по 11 пассаж происходит частичная разборка актинового цитоскелета с последующей сборкой к 17-му пассажи.

Ключевые слова: актиновый цитоскелет, α -актинин-4, RhoA, мезенхимные стволовые клетки, репликативное старение

DOI: 10.31857/S0041377121020036

Актуальной задачей клеточной и молекулярной биологии является получение и сравнительные характеристики МСК человека, выделенных из разных источников. В настоящее время наблюдается тенденция к расширению и углублению исследований по различным характеристикам МСК. Этому посвящено множество работ, перечисленных в недавно вышедшей обзорной статье (Бобков, Полянская, 2020). Эта тенденция отражает значимость таких работ как для понимания функционирования различных клеточных систем, так и для расширения возможностей использования МСК в регенеративной медицине.

Одной из характеристик, свойственной всем не-иммортизированным клеточным линиям, включая МСК, является репликативное старение, на завершающей стадии которого, как правило, происходит дегенерация и гибель клеток. Но известны и случаи как длительного существования живых клеток с очень низкой пролиферативной активностью без спонтанного приобретения неограниченного пролиферативного потенциала, так и возможного переключения клеток на другой метаболический путь (Haefliger, 1965; Matsumura et al., 1979; Гаврилов, Гаврилова, 1991).

Репликативное старение МСК человека, наступающее в процессе длительного культивирования клеточных популяций, представляет собой комплексный динамический процесс, индуцированный генетическими и эпигенетическими нарушениями

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стволовые клетки; LCFD — локальная связанная фрактальная размерность.

(Бобков, Полянская, 2020). Одной из характеристик, широко не освещенных в литературе, является состояние цитоскелета в процессе репликативного старения. В нашей предыдущей работе, проведенной на клетках линии MSCWJ-1, полученной из Вартонова студня пупочного канатика человека, было показано, что на поздних стадиях репликативного старения в клетках увеличивается структурная целостность акто-миозиновой сократительной системы, увеличивается концентрация малой ГТФазы RhoA в цитоплазме, изменяется характер клеточного движения (миграция) – оно становится более прямолинейным (Bobkov et al., 2020).

Представленная работа является продолжением предыдущих исследований. В работе исследована роль α -актинина-4 и RhoA в организации актинового цитоскелета. Молекулы малых ГТФаз Rho, к которым относится RhoA, образуют сигнальную сеть, которая получает и обрабатывает информацию от клеточного микроокружения, а затем регулирует перестройку актинового цитоскелета. RhoA, в частности, принимает непосредственное участие в регуляции образования актиновых стресс-фибрилл и сокращения актомиозина (Kim et al., 2018; Aslan, 2019). Роль α -актинина-4 заключается в том, что он связывает актиновые микрофиламенты в пучки и способствует постоянному обновлению актиновых фибрилл, конкурируя с тропомиозином (Kemp, Brieher, 2018).

В работе стояли следующие задачи: 1) длительное культивирование клеток линии ADH-MSC, выделенных из эпикардиальной жировой ткани человека; 2) характеристика процесса репликативного старения с помощью сравнительного анализа доли клеток, проявляющих активность фермента β -галактозидазы на различных пассажах; 3) анализ колоколизации белков RhoA и альфа-актинин-4 как с F-актином, так и с ядрами; 4) измерение локальной связной фрактальной размерности актинового цитоскелета с целью численной оценки его структурной целостности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Клеточная линия мезенхимных стволовых клеток ADH-MSC, выделенная из эпикардиальной жировой ткани человека в процессе аортокоронарного шунтирования, получена и охарактеризована в ЦКП “Коллекции культур клеток позвоночных” ИИЦ РАН (Санкт-Петербург) (Мусорина и др., 2019). Микробиологический анализ подтвердил отсутствие бактериальной, грибковой и микоплазменной контаминации в полученной линии. Линию клеток культивировали, используя ростовую среду, состоящую из 85% среды α -MEM (Биолот, Россия), 15% эмбриональной бычьей сыворотки FBS (HyClone, США), 5 нг/мл фактора роста β -FGF (Sigma-Aldrich, США).

Морфологический анализ. Клетки исследуемой линии в процессе длительного культивирования анализировали с помощью инвертированного микроскопа, оснащенного объективами с увеличением 20 \times и 40 \times (Nicon, Япония).

Репликативное старение клеток. Оценивали активность фермента β -галактозидазы. Клетки ADH-MSC выращивали в чашках Петри диаметром 3.5 см до образования субконфлюента. Затем среду удаляли и окрашивали клетки с помощью набора реактивов (Senescence β -galactosidase staining kit; Cell Signaling, США) согласно инструкции. У клеток, вступающих в фазу репликативного старения, цитоплазма имеет ярко-синюю окраску. Анализ проводили с помощью инвертированного микроскопа (Nicon, Япония) на 9-, 12- и 17-м пассажах. Долю окрашенных клеток (%) определяли путем подсчета более 700 клеток в разных полях зрения на одну временную точку.

Иммунофлуоресцентное окрашивание и конфокальная микроскопия для выявления белков RhoA и α -актинина-4. Перед иммунофлуоресцентным окрашиванием клетки ADH-MSC, выращенные на стеклах, фиксировали 3%-ным раствором параформальдегида на фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) в течении 10 мин при комнатной температуре. Пермеабиллизацию клеток проводили 10 мин в растворе 0.1%-ного Triton-X100 в PBS. Для предотвращения неспецифического связывания антител стекла с клетками выдерживали 20 мин в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина. В качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные антитела, выработанные против синтетического пептида, соответствующего аминокислотному участку 28–38 α -актинина-4 человека (Enzo Biochem, США) и кроличьи поликлональные антитела к аминокислотному участку 177–189 белка RhoA человека (Sigma-Aldrich, США). Вторичными антителами были козьи антитела, выработанные против антител кролика, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США). Время инкубирования клеток с первичными и вторичными антителами – 1 ч. Далее клетки инкубировали 20 мин в PBS, содержащем родамин-фаллоидин (50 мкг/мл), для визуализации актинового цитоскелета (Thermo Fisher Scientific, США). Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst33342 в концентрации 1.5 мкг/мл (Thermo Fisher Scientific, США). После каждого этапа окрашивания клетки трижды промывали PBS. Препарат с клетками монтировали на стекло с помощью ProLong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, США).

Изображения окрашенных клеток получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TSC SP8 (Германия), используя 63-кратный объектив с масляной иммерсией (Leica, Германия). Для возбуждения флуоресценции родамин-фаллоидина и Alexa Fluor 488 использовали HeNe- (543 нм) и аргоновый (488 нм) лазер соответ-

ственно. Для возбуждения флуоресценции Hoechst 33342 использовали диодный лазер (405 нм). Флуоресценцию детектировали с помощью фотоумножителей в следующих спектральных диапазонах: 493–540 нм для Alexa Fluor 488, 552–792 нм для родамин-фаллоидина и 410–500 нм для Hoechst 33342. Ширина оптического среза (пинхол) составляла 100 мкм. Производили раздельное сканирование в трех каналах: Alexa Fluor 488, родамин-фаллоидин, Hoechst 33342.

Анализ колокализации RhoA и α -актинина-4 с ядром и с актиновым цитоскелетом. Для анализа колокализации использовали изображения с разрешением 1024×1024 пикселя. В программе ImageJ 1.52i на изображениях выделяли вручную области интереса с помощью функции ROI (Rueden et al., 2017). С помощью плагина Coloc2 в выбранных ROI рассчитывали непараметрический коэффициент корреляции Кендалла (bTau) в качестве коэффициента колокализации. Был выбран именно коэффициент Кендалла, так как ранее в нашей работе с клетками линии MSCWJ-1 было показано, что этот коэффициент лучше остальных отражает изменения колокализации актин-связывающих белков (Bobkov et al., 2020). В качестве отрицательного контроля вычисляли коэффициент bTau для оценки колокализации сигналов от конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor 488 вторичных антител (без применения первичных) с родамин-фаллоидином или Hoechst 33342. Для регистрации изображений использовали те же настройки конфокального микроскопа.

Оценка локальной связной фрактальной размерности актинового цитоскелета. Чтобы охарактеризовать морфологию цитоскелета, оценивали коэффициент, называемый локальной связной фрактальной размерностью актинового цитоскелета (local connected fractal dimension – LCFD). Коэффициент LCFD характеризует локальные нарушения геометрии неоднородных геометрических объектов. В отличие от глобальной фрактальной размерности, рассчитываемой для всего изображения, набор значений локальной фрактальной размерности рассчитывается для каждого пикселя, принадлежащего анализируемому объекту (Waliszewski, 2016). Измерение коэффициента LCFD является косвенной мерой связности для количественной оценки такого сложного геометрического объекта, как актиновый цитоскелет любой фибробластоподобной клетки при монослойном культивировании (Qian et al., 2012; Alhusein et al., 2016; Bobkov et al., 2020). Этот коэффициент изменяется в диапазоне от 0 до 2 в зависимости от степени сложности структуры (от количества деталей в структуре). LCFD актинового цитоскелета считали с помощью плагина FgacLac в программе ImageJ (Karperien, 2013). Обработывали конфокальные изображения в разрешении 1024×1024 пикселя, полученные при регистрации сигнала от родамин-фаллоидина, на которых вручную выделяли с помощью функции ROI области интереса, содержащие распластанные клетки.

Методы статистического анализа. Результаты по оценке репликативного старения обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $P < 0.05$. Сбор информации для статистической обработки остальных результатов происходил с помощью электронных таблиц Office Excel 2016 (Microsoft, США). Учитывали следующие данные для клеток каждого пассажа: коэффициент колокализации (bTau) RhoA с ядром, RhoA с F-актином, α -актинина-4 с ядром и α -актинина-4 с F-актином (для каждого эксперимента число повторов $n = 20$), а также параметр LCFD. Всю статистическую обработку результатов вели в свободной программной среде R версии 3.6.3 (Team, 2020). Данные, полученные при анализе колокализации, не прошли тест Шапиро–Уилка (Shapiro, Francia, 1972) на нормальность распределения, объем выборки был небольшим ($n < 100$), поэтому для выявления достоверных отличий между группами измерений использовали непараметрический метод Вилкоксона (Wilcoxon, 1945). Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфология клеток. Проведенная в процессе культивирования оценка морфологии клеток линии ADH-MSC показала однородность клеточных популяций со средними по размеру вытянутыми фибробластоподобными клетками, проявляющими тенденцию к увеличению размеров и распластанности в процессе репликативного старения (данные не представлены).

Репликативное старение. Процесс репликативного старения клеток линии ADH-MSC оценивали по активности β -галактозидазы в клеточных популяциях (табл. 1). Уже на 9-м пассаже обнаружена небольшая доля стареющих клеток, которая существенно увеличивается к 12-му пассажу ($P < 0.01$). Процесс репликативного старения протекает быстро, и к 17-му пассажу доля стареющих клеток увеличивается в 3.2 раза по сравнению с пассажем 9 ($P < 0.01$), что свидетельствует о наступлении активного репликативного старения. Эти результаты совпадают с полученными ранее для клеток этой же линии (Мусорина и др., 2019; Воронкина и др., 2020).

Колокализация. Чтобы проследить за динамикой реорганизации сократительного аппарата в процессе репликативного старения клеток линии ADH-MSC, мы использовали метод иммунофлуоресценции. Были получены изображения клеток на 8–17-ом пассажах, окрашенных на белки RhoA и α -актинин-4, актиновый цитоскелет и ядра. Примеры таких изображений представлены на рис. 1. На изображениях можно видеть клетки с характерно окрашенными ядрами (крупные объекты овальной формы; рис. 1а, г), а также с окрашенным актиновым цитоскелетом (нити филаментов, тянущиеся через всю клетку и

Таблица 1. Доля клеток (%) с выраженной активностью β -галактозидазы (β -гал) в процессе культивирования клеток ADH-MSC

Пассажаж	Число проанализированных клеток	Доля клеток, окрашенных на β -гал, %
9	743	17.6 ± 1.4
12	726	32.8 ± 1.7
17	1287	56.5 ± 1.4

Примечание. Даны средние значения и их ошибки для доли клеток на каждом пассаже.

собранные в пучки в областях, близких к цитоплазматической мембране; рис. 1*в, е*) и с окрашенными белками RhoA и α -актинином-4 (точечные объекты, концентрирующиеся преимущественно в цитоплазме и в ядрах; рис. 1*б, д*).

При дальнейшем анализе полученных результатов была построена линейная регрессия для коэффициентов колокализации RhoA и α -актина-4 с ядром и F-актином клетки с целью выяснения их распределения относительно ядра и актиновых фибрилл в процессе длительного культивирования клеточной линии. В результате было обнаружено, что

по мере культивирования с увеличением номера пассажа происходит снижение колокализации с F-актином как α -актина-4, так и RhoA на 8–17 пассажах (рис. 2*в, г*; табл. 2). Колокализация α -актина-4 и RhoA с ядрами, наоборот, увеличивается при увеличении номера пассажа (рис. 2*а, б*; табл. 2).

Значения коэффициентов корреляции b_{Tau} в каждом эксперименте и результат непараметрического теста Вилкоксона на значимость отличий средних значений коэффициентов b_{Tau} от начального, измеренного на 8-ом пассаже, представлены в табл. 3. Большинство значений b_{Tau} для разных пассажей достоверно отличаются от пассажа 8. Средние значения (и стандартное отклонение) отрицательного контроля для коэффициентов колокализации составляли 0.03 ± 0.03 для колокализации с ядром, 0.03 ± 0.07 для колокализации с F-актином ($n=10$).

Локальная связная фрактальная размерность цитоскелета. Анализ LCFD актинового цитоскелета при культивировании клеток линии ADH-MSC от 8-го до 17-го пассажа свидетельствует об изменении параметра LCFD в процессе репликативного старения (рис. 3). Приведенные в табл. 4 средние значения коэффициента LCFD для пассажей 8–11 свидетельствуют о его постепенном снижении. На 11-м пассаже его значение минимально. После пассажа 11 наблюдается повышение коэффициента LCFD,

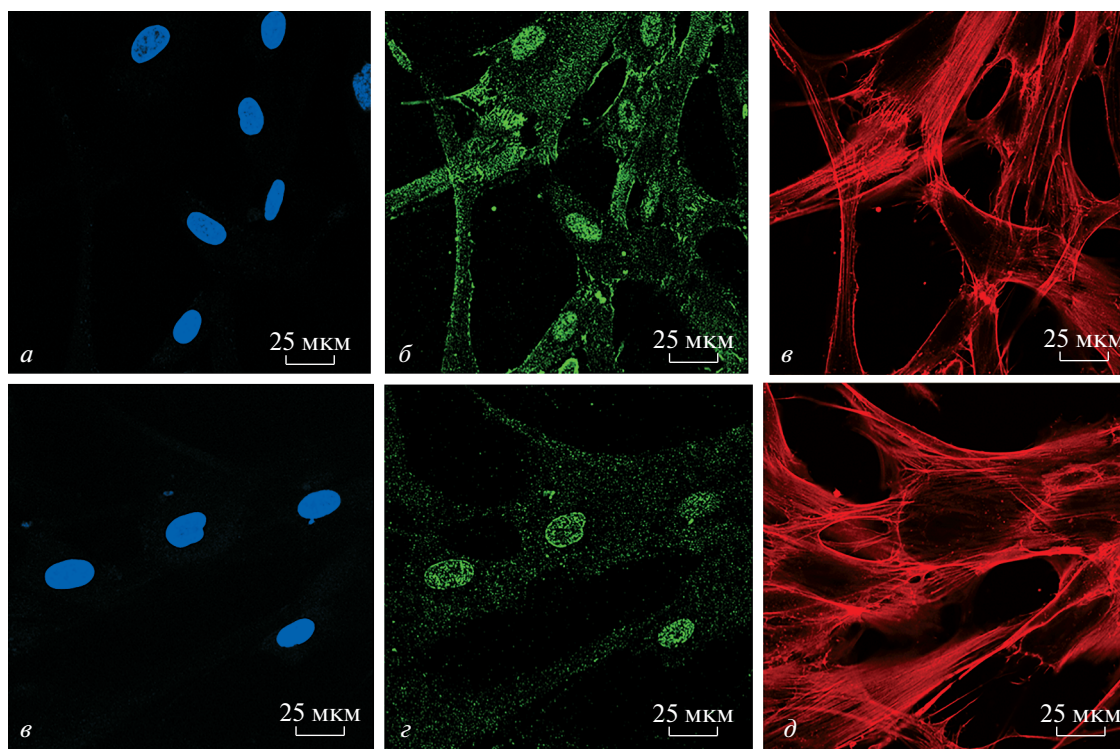


Рис. 1. Конфокальные изображения клеток линии ADH-MSC, выращенных на стеклах и зафиксированных на 16-ом пассаже. Клетки окрашены красителем Hoechst 33342 для визуализации ядер (*а, с*), флуоресцентно мечеными антителами против α -актина-4 (*б*) и против малой ГТФазы RhoA (*д*), а также родамин-фаллоидином для окраски F-актина (*в, е*). Масштабный отрезок : 25 мкм.

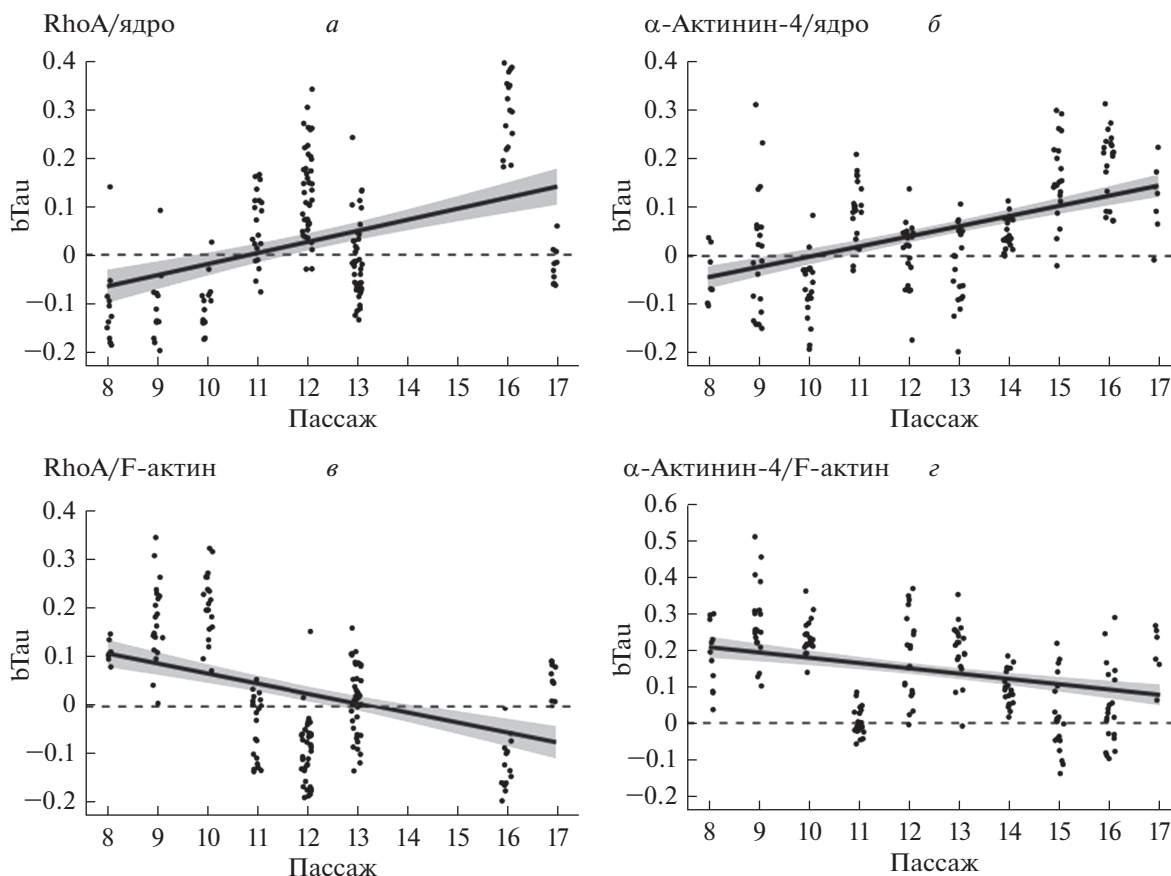


Рис. 2. Зависимость коэффициента колокализации $b\tau_{\text{ау}}$ от времени культивирования (номера пассажа) в клетках ADH-MSC в процессе репликативного старения. На диаграммах *точками* представлены результаты измерений коэффициента колокализации RhoA (а) и α -актинина-4 (б) с ядром, RhoA (в) и α -актинина-4 (г) с F-актином. Номера пассажей считали от выделения клеток из ткани донора. *Прямые линии* – результат расчета линейной регрессии коэффициентов $b\tau_{\text{ау}}$ в зависимости от номера пассажа. *Вдоль линий регрессии серая полоса* показывает 95%-ые доверительные области. *Штриховая линия* – уровень $b\tau_{\text{ау}} = 0$.

который к пассажиру 14 достигает значения, не отличающегося от пассажа 8, и остается на этом уровне до пассажа 17 (рис. 3). Таким образом, коэффициент LCFD на пассаже 8 значительно отличается от других значений только на пассажах 9–13.

ОБСУЖДЕНИЕ

Тенденция клеток линии ADH-MSC к увеличению размеров и расплывчатости в процессе репликативного старения была наглядно продемонстрирована ранее (Мусорина и др., 2019).

Таблица 2. Параметры линейной регрессии коэффициентов колокализации $b\tau_{\text{ау}}$ в зависимости от номера пассажа в процессе репликативного старения клеток линии ADH-MSC

Колокализация	Параметр регрессии a	Параметр регрессии b	R^2	P
RhoA с F-актином	0.308	-0.024	0.220	1.407e-12
RhoA с ядром	-0.357	0.031	0.265	3.816e-15
α -Актинин-4/F-актин	0.324	-0.015	0.112	7.431e-07
α -Актинин-4/ядро	-0.218	0.021	0.294	<2.2e-16

Примечание. Представлены параметры a, b уравнения линейной регрессии $y = (a + b)x$, где x – номера пассажей, y – коэффициент колокализации $b\tau_{\text{ау}}$. Для каждой линейной регрессии указаны коэффициент детерминации (R^2) и уровень значимости P . Экстремально низкие значения P представлены в экспоненциальной нотации.

Таблица 3. Значения коэффициента b_{Tau} , вычисленные для колокализации с F-актином или ядром белка RhoA и α -актинина-4 в клетках ADH-MSC, выращенных на стеклах и зафиксированных на различных пассажах

Пассаж	RhoA–F-актин	RhoA–ядро	α -Актинин-4–F-актин	α -Актинин-4– ядро
8	0.113 ± 0.044	-0.111 ± 0.078	0.188 ± 0.073	-0.025 ± 0.073
9	$0.177 \pm 0.084^{\text{б}}$	-0.161 ± 0.094	$0.274 \pm 0.104^{\text{б}}$	0.009 ± 0.128
10	$0.218 \pm 0.084^{\text{г}}$	-0.152 ± 0.087	$0.235 \pm 0.048^{\text{а}}$	$-0.079 \pm 0.083^{\text{а}}$
11	$-0.045 \pm 0.067^{\text{г}}$	$0.058 \pm 0.073^{\text{г}}$	$0.003 \pm 0.039^{\text{г}}$	$0.092 \pm 0.066^{\text{г}}$
12	$-0.109 \pm 0.076^{\text{г}}$	$0.133 \pm 0.091^{\text{г}}$	0.180 ± 0.116	0.005 ± 0.068
13	$0.010 \pm 0.070^{\text{г}}$	$-0.008 \pm 0.081^{\text{г}}$	0.199 ± 0.080	-0.021 ± 0.081
14	–	–	$0.094 \pm 0.046^{\text{г}}$	$0.049 \pm 0.032^{\text{б}}$
15	–	–	$0.017 \pm 0.101^{\text{г}}$	$0.160 \pm 0.084^{\text{г}}$
16	$-0.160 \pm 0.078^{\text{г}}$	$0.312 \pm 0.082^{\text{г}}$	$0.043 \pm 0.110^{\text{г}}$	$0.187 \pm 0.073^{\text{г}}$
17	$0.049 \pm 0.036^{\text{г}}$	$-0.027 \pm 0.043^{\text{б}}$	0.190 ± 0.083	$0.112 \pm 0.067^{\text{г}}$

Примечание к табл. 3 и 4. Представлены средние значения и стандартные отклонения. Значимость отличий от пассажа 8 (тест Вилкоксона на множественную проверку гипотез): ^а $P < 0.05$, ^б $P < 0.01$, ^в $P < 0.001$, ^г $P < 0.0001$.

По результатам исследования колокализации RhoA и α -актинина-4 с ядром и актиновым цитоскелетом можно предположить, что в процессе репликативного старения клеток линии ADH-MSC участники реорганизации цитоскелета RhoA и α -актинин-4 частично выходят из цитоплазмы, перестают взаимодействовать с актиновым цитоскелетом и направляются в ядро. При этом результаты измерений параметра LCFD свидетельствуют о том, что снижение содержания α -актинина-4 в цитоплазме не приводит к уменьшению структурной целостности актинового цитоскелета. Мы предполагаем, что такой эффект может объясняться тем, что на поздних пассажах основную роль в стабилизации пучков актиновых микрофиламентов в клетках этой линии на-

чинают играть другие актин-связывающие белки, например α -актинин-1 или различные изоформы тропомиозинов, что, как следствие, может изменять параметры клеточной подвижности. Однако для подтверждения этого предположения необходимы дополнительные эксперименты.

О роли белков RhoA и α -актинина-4 в цитоплазме известно достаточно много (Ridley, Hall, 1992; Burridge, Wennerberg, 2004; Senger et al., 2019), тогда как функции этих белков в ядре в настоящее время активно изучаются (Хотин и др., 2009; Guilluy et al., 2011; Dubash et al., 2011). Можно предположить, что RhoA и α -актинин-4 в процессе репликативного старения направляются в ядро для регуляции организации ядерного актинового цитоскелета. Известно, что актин является частью ядерного протеома, хотя в ядре он выявляется в значительно меньшем количестве, чем в цитоплазме (Grosse, Vartiainen, 2013). В ядрах клеток самых разных организмов был обнаружен актин как в G-, так и в F-форме. Актин в ядре способен влиять на такие процессы, как регуляция транскрипции, репарация ДНК, регуляция клеточного цикла и апоптоз (Miyamoto et al., 2011; Miyamoto, Gurdon, 2013; Parisi et al., 2017; Kelsch, Tootle, 2018; Plessner, Grosse, 2019).

Следует отметить, что RhoA и α -актинин-4 могут направляться в ядро для участия в процессах, не связанных с актиновым цитоскелетом. В недавнем исследовании на клетках остеосаркомы было показано, что α -актинин-4 может активировать сигнальный путь транскрипционного фактора NF- κ B (Huang et al., 2020). Ранее на раковых клеточных линиях было показано, что RhoA способен связываться с анти-апоптотическим фактором P50 (компонент NF- κ B) в ядре и частично в ядрышках (Xu et al., 2013). Позже было выяснено, что ядрышковая локализация RhoA может быть связана с активным синтезом рРНК, ингибирование которого вызывает пе-

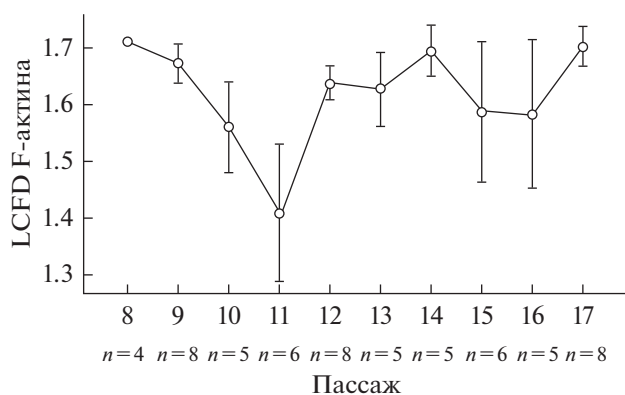


Рис. 3. Изменение коэффициента локальной связной фрактальной размерности (LCFD) актинового цитоскелета на различных пассажах в процессе репликативного старения клеток линии ADH-MSC. По вертикальной оси представлены значения LCFD, по горизонтальной оси — номера пассажей клеточной культуры. Показаны средние значения и стандартные отклонения (вертикальные отрезки) значений LCFD. n — число независимых измерений на каждом пассаже.

перераспределение ядрышкового RhoA в нуклеоплазме (Li et al., 2016).

Следует подчеркнуть, что картина изменений локализации RhoA и α -актина-4 с ядром в клетках линии ADH-MS, выявленная в данном исследовании, значительно отличается от тех результатов, которые были получены нами ранее при исследовании репликативного старения клеток линии MSCWJ-1. В клетках MSCWJ-1 мы обнаружили, что на поздних пассажах и RhoA, и α -актинин-4 в значительной мере выходят из ядра и локализуются, в основном, в цитоплазме (Bobkov et al., 2020), а в настоящей работе эти белки, наоборот, к поздним пассажам накапливаются в ядрах. Кроме того, клетки линий MSCWJ-1 и ADH-MS выделены из разных источников, клетки линии MSCWJ-1 выделены из Вартонова студия пупочного канатика здорового донора, а клетки линии ADH-MS – из эпикардиальной жировой ткани донора при аортокоронарном шунтировании, т.е. донора с сердечным заболеванием.

Подробный анализ линии ADH-MS показал, что она существенно отличается по ряду других характеристик от МСК, выделенных из разных других источников, но от здоровых доноров. К таким характеристикам относятся: преждевременное репликативное старение, существенные цитогенетические нарушения, изменение содержания белков ВКМ и активностей металлопротеиназ при репликативном старении. Возможно, причиной таких различий является нездоровое микроокружение, в котором клетки находились еще до перевода в состояние *in vitro* (Мусорина и др., 2019; Воронкина и др., 2020). Для того, чтобы понять, является ли характер ядерно-цитоплазматического распределения актин-связывающих белков в процессе репликативного старения специфическим признаком конкретной линии, или является признаком линий клеток, выделенных из здорового микроокружения, необходимо проведение исследований линий МСК, полученных из разных источников, но от здоровых доноров.

Результаты измерения параметра LCFD актинового цитоскелета свидетельствуют о том, что в ходе репликативного старения в клетках линии ADH-MS происходит обратимая реорганизация структур актинового цитоскелета: с 8 по 11 пассаж происходит частичная разборка актинового цитоскелета с последующей сборкой к пассажи 17. Можно предположить, что такая реорганизация актинового цитоскелета может быть связана с сигнальными событиями, сопровождающими изменение активности малых ГТФ-аз и их эффекторов и обусловленные генетическими или эпигенетическими факторами. Для проверки этого предположения необходимы дальнейшие исследования по сравнительному анализу роли малых ГТФ-аз в процессе репликативного старения в различных клеточных линиях МСК.

Таблица 4. Значения коэффициента LCFD F-актина в процессе репликативного старения клеток линии ADH-MS

Пассаж	LCFD F-актина
8	1.712 ± 0.005
9	1.675 ± 0.043 ^a
10	1.562 ± 0.066 ^b
11	1.408 ± 0.119 ^b
12	1.640 ± 0.036 ^b
13	1.628 ± 0.054 ^a
14	1.697 ± 0.037
15	1.588 ± 0.118
16	1.585 ± 0.106
17	1.704 ± 0.043

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах животные и люди не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bobkov D.E., Polyanskaya G.G. 2020. Клеточные и молекулярные характеристики репликативного старения мезенхимных стволовых клеток человека. Цитология. Т. 62. № 11. С. 782. (Bobkov D.E., Poljanskaya G.G. 2020. Cellular and molecular characteristics of replicative senescence of human mesenchymal stem cells. Tsitologiya. V. 62. P. 782.)
- Воронкина И.В., Смагина Л.В., Бильдюг Н.Б., Мусорина А.С., Полянская Г.Г. 2020. Динамика активности матричных металлопротеиназ и содержания белков внеклеточного матрикса в процессе репликативного старения линий мезенхимных стволовых клеток человека. Цитология. Т. 62. № 3. С. 210. (Voronkina I.V., Smagina L.V., Bilydug N.B., Musorina A.S., Polyanskaya G.G. 2020. Dynamics of matrix metalloproteinases activity and extracellular matrix proteins content of human mesenchymal stem cell lines during replicative aging. Tsitologiya. V. 62. № 3. P. 210 (Cell. Tiss. Biol. V. 14. P. 349).)
- Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. 1991. Биология продолжительности жизни. М.: Наука. 280 с. (Gavrilov L.A., Gavrilova N.S. 1991. The biology of life span: A quantitative approach. M.: Nauka. 280 pp.)
- Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2019. Характеристика неиммortalизованной 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., Polyanskaya G.G. 2019. Characterization of a nonimmortalized mesenchymal stem cell

- line isolated from human epicardial adipose tissue. *Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya)* V. 13. № 4. P. 247).
- Хотин М.Г., Туроверова Л.В., Подольская Е.П., Краснов И.А., Соловьёва А.В., Аксенова В.Ю., Магнуссон К.-Э., Пинаев Г.П., Тентлер Д.Г.* 2009. Исследование ядерных белковых комплексов α -актинина-4 методами двумерного электрофореза и масс-спектрометрии. *Цитология*. Т. 51. № 8. С. 684. (*Khotin M.G., Turoverova L.V., Podolskaya E.P., Krasnov I.A., Solovyeva A.V., Aksenova V.Y., Magnusson K.E., Pinaev G.P., Tentler D.G.* 2009. Analysis of nuclear protein complexes comprising α -actinin-4 by 2D-electrophoresis and mass spectrometry. *Cell Tiss. Biol.* V. 3. № 5. P.431. <https://doi.org/519X09050058>) <https://doi.org/10.1134/S1990>
- Alhussein G., Shanti A., Farhat I.A.H., Timraz S.B.H., Alwahab N.S.A., Pearson Y.E., Martin M.N., Christoforou N., Teo J.C.M.* 2016. A spatiotemporal characterization method for the dynamic cytoskeleton. *Cytoskeleton*. V. 73. P. 221. <https://doi.org/10.1002/cm.21297>
- Aslan J.E.* 2019. Platelet Rho GTPase regulation in physiology and disease. *Platelets*. V. 30. P. 17. <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1475632>
- Bobkov D., Polyanskaya A., Musorina A., Lomert E., Shabelnikov S., Poljanskaya G.* 2020. Replicative senescence in MSCWJ-1 human umbilical cord mesenchymal stem cells is marked by characteristic changes in motility, cytoskeletal organization, and RhoA localization. *Mol. Biol. Rep.* V. 47. P. 3867. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05476-6>
- Burridge K., Wennerberg K.* 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell*. V. 116. P. 167. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00003-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00003-0)
- Dubash A.D., Guilluy C., Srougi M.C., Boulter E., Burridge K., García-Mata R.* 2011. The small GTPase RhoA localizes to the nucleus and is activated by Net1 and DNA damage signals. *PLoS One*. V. 6. P. e17380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017380>
- Grosse R., Vartiainen M.K.* 2013. To be or not to be assembled: Progressing into nuclear actin filaments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 14. P. 693. <https://doi.org/10.1038/nrm3681>
- Guilluy C., Dubash A.D., García-Mata R.* 2011. Analysis of RhoA and Rho GEF activity in whole cells and the cell nucleus. *Nat. Protoc.* V. 6. P. 2050. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.411>
- Hayflick L.* 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* V. 37. P. 614.
- Huang Q., Li X., Huang Z., Yu F., Wang X., Wang S., He Z., Lin J.* 2020. ACTN4 promotes the proliferation, migration, metastasis of osteosarcoma and enhances its invasive ability through the NF- κ B pathway. *Pathol. Oncol. Res.* V. 26. P. 893. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00637-w>
- Karperien A.* 2013. FracLac for ImageJ. Charles Sturt University. Colombo. <https://doi.org/10.13140/2.1.4775.8402>
- Kelsch D.J., Tootle T.L.* 2018. Nuclear actin: From discovery to function. *Anatomical Record*. V. 301. P. 1999. <https://doi.org/10.1002/ar.23959>
- Kemp J.P., Brierley W.M.* 2018. The actin filament bundling protein α -actinin-4 actually suppresses actin stress fibers by permitting actin turnover. *J. Biol. Chem.* V. 293. P. 14520. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004345>
- Kim J.G., Islam R., Cho J.Y., Jeong H., Cap K.C., Park Y., Hosain A.J., Park J.B.* 2018. Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway. *J. Cell. Physiol.* V. 233. P. 6381. <https://doi.org/10.1002/jcp.26487>
- Li Y., Hu Y., Che L., Jia J., Chen M.* 2016. Nucleolar localization of Small G protein RhoA is associated with active RNA synthesis in human carcinoma HEP-2 cells. *Oncol. Lett.* V. 11. P. 3605. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4450>
- Matsumura T., Zerrudo Z., Hayflick L.* 1979. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *J. Gerontol.* V. 34. P. 328.
- Miyamoto K., Gurdon J.B.* 2013. Transcriptional regulation and nuclear reprogramming: Roles of nuclear actin and actin-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 70. P. 3289. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1235-7>
- Miyamoto K., Pasque V., Jullien J., Gurdon J.B.* 2011. Nuclear actin polymerization is required for transcriptional reprogramming of Oct4 by oocytes. *Genes Dev.* V. 25. P. 946. <https://doi.org/10.1101/gad.615211>
- Parisis N., Krasinska L., Harker B., Urbach S., Rossignol M., Camasses A., Dewar J., Morin N., Fisher D.* 2017. Initiation of DNA replication requires actin dynamics and formin activity. *EMBO J.* V. 36. P. 3212. <https://doi.org/10.15252/embj.201796585>
- Plessner M., Grosse R.* 2019. Dynamizing nuclear actin filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* V. 56. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.08.005>
- Qian A.R., Li D., Han J., Gao X., Di S.M., Zhang W., Shang P.* 2012. Fractal dimension as a measure of altered actin cytoskeleton in MC3T3-E1 cells under simulated microgravity using 3-D/2-D clinostats. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* V. 59. P. 1374. <https://doi.org/10.1109/TBME.2012.2187785>
- Ridley A.J., Hall A.* 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. V. 70. P. 389. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90163-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90163-7)
- Rueden C.T., Schindelin J., Hiner M.C., DeZonia B.E., Walter A.E., Arena E.T., Eliceiri K.W.* 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*. V. 18. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Shapiro S.S., Francia R.S.* 1972. An approximate analysis of variance test for normality. *J. Am. Stat. Assoc.* V. 67. P. 215. <https://doi.org/10.1080/01621459.1972.10481232>
- Senger F., Pitaval A., Ennomani H., Kurzawa L., Blanchoin L., Théry M.* 2019. Spatial integration of mechanical forces by alpha-actinin establishes actin network symmetry. *J. Cell Sci.* V. 132. P. 236604. <https://doi.org/10.1242/jcs.236604>
- Team R.C.* 2020. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Vienna, Austria. <http://www.r-project.org/index.html>
- Xu J., Li Y., Yang X., Chen Y., Chen M.* 2013. Nuclear translocation of small G protein RhoA via active transportation in

gastric cancer cells. *Oncol. Rep.* V. 30. P. 1878.
<https://doi.org/10.3892/or.2013.2638>

Waliszewski P. 2016. The quantitative criteria based on the fractal dimensions, entropy, and lacunarity for the spatial distribution of cancer cell nuclei enable identification of low or high aggressive prostate carcinomas. *Front. Physiol.* V. 7. P. 34.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00034>

Wilcoxon F. 1945. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bulletin.* V. 1. P. 80.
<https://doi.org/10.2307/3001968>

Analysis of Nuclear-Cytoplasmic Redistribution of Actin-Binding Protein α -Actinin-4 and Signaling Protein RhoA in the Process of Replicative Senescence of Human Epicardial Adipose Tissue-Derived ADH-MS C Cell Line

D. F. Goncharova^a, A. V. Polyanskaya^a, A. S. Musorina^b, G. G. Poljanskaya^b, and D. E. Bobkov^{b,*}

^a*Saint Petersburg State Polytechnic University, Department of Biophysics, St. Petersburg, 194064 Russia*

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

**e-mail: bobkov@incras.ru*

In this work, a molecular analysis of some mechanisms of the actin cytoskeleton reorganization in the process of long-term cultivation of human mesenchymal stem cells was carried out. The distribution of actin-binding protein α -actinin-4 and small GTPase RhoA in mesenchymal stem cells of the ADH-MS C line isolated from adipose tissue of an adult human was studied using immunofluorescence methods and analysis of confocal images. It was found that in the process of replicative senescence during 8–17 passages in ADH-MS C cells, the redistribution of the studied proteins from the cytoplasm to the cell nuclei occurs, which is accompanied by changes in the organization of the actin cytoskeleton. To assess the organization of the actin cytoskeleton, we used the coefficient of local connected fractal dimension (LCFD), which characterizes local disturbances in the geometry of heterogeneous geometric objects and is an indirect measure for assessing the structural integrity of such a complex geometric object as the actin cytoskeleton of spread cells. By measuring the LCFD of confocal images of cells stained with rhodamine phalloidin, changes in the structural integrity of the actin cytoskeleton during replicative senescence were quantified. It was found that from passages 8 to 11, a partial reversible disassembly of the actin cytoskeleton occurs, followed by assembly by the passage 17.

Keywords: actin cytoskeleton, local connected fractal dimension, α -actinin-4, RhoA, mesenchymal stem cells, replicative senescence

УДК 576.54

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ И КОНТРОЛЬ ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ТРАНСПОРТА. РОЛЬ ГИСТАМИНА

© 2021 г. **П. Г. Назаров**^{1,2}, **О. Н. Мальцева**¹, **Д. А. Таянский**^{1,3, *}, **Е. В. Агеева**¹, **С. С. Лутфуллоева**¹,
А. Д. Денисенко^{1,3}, **П. В. Пигаревский**¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
Санкт-Петербург, 197022 Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*E-mail: dmitry.athero@gmail.com

Поступила в редакцию 17.03.2020 г.

После доработки 22.12.2020 г.

Принята к публикации 26.12.2020 г.

Исследовали влияние тучных клеток (ТК) человека (линия МНС-1) на трансэндотелиальный транспорт (ТЭТ) альбумина и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), используя двухкамерную систему с порами диаметром 1 мкм. Эндотелиальные клетки (ЭК) человека (линия EA.hy926) помещали в верхнюю камеру на подложке из коллагена I типа и выращивали 2–3 сут до формирования визуального монослоя. После этого в верхнюю камеру добавляли 200 мкг/мл ЛПНП и 200 мкг/мл альбумина, а в нижнюю – ТК интактные или активированные агрегированным IgG человека, либо соединением 48/80. ТЭТ белков (прохождение из верхней камеры в нижнюю через монослой ЭК) оценивали через 5 и 24 ч. Оказалось, что присутствие в нижних камерах ТК (интактных, либо активированных) вызывало замедление ТЭТ ЛПНП и альбумина через 24 ч, но не через 5 ч. Транспорт ЛПНП оказался более чувствителен к ингибирующему влиянию ТК, чем транспорт альбумина. Супрессивное действие ТК зависело в основном от гистамина и отменялось блокатором гистаминовых рецепторов H1 (но не H2).

Ключевые слова: эндотелиальные клетки EA.hy926, тучные клетки МНС-1, гистамин, трансэндотелиальный транспорт, липопротеины низкой плотности, альбумин

DOI: 10.31857/S0041377121020061

В последнее время все большее внимание исследователей привлекает роль ТК как источника регуляторных влияний на кровеносные и лимфатические сосуды. В тканях ТК располагаются вокруг кровеносных и лимфатических сосудов и способны вступать в непосредственный контакт с ЭК (Guidolin et al., 2017). Подобно эндотелию, ТК содержат NO-синтазу и продуцируют окись азота (Kritas et al., 2013) и, как предполагается, могут влиять на тонус сосудов и активность эндотелия. Несмотря на близость анатомического расположения сосудов и ТК, функциональные последствия их контактов для обоих типов клеток изучены недостаточно (Kunder et al., 2011; Zhang et al., 2011).

ТК являются одним из основных источников гистамина в организме, выделяя его при активации иммунными комплексами, содержащими иммуно-

глобулин E, либо G (IgG), и многими другими факторами. Известно, что гистамин повышает проницаемость сосудов (Tessier et al., 2007; Kumar et al., 2009). Предполагается, что в сосудах с мышечным слоем механизм сосудорасширяющего действия гистамина реализуется через гладкомышечный слой благодаря расслаблению гладкомышечных волокон и “раздвиганию” клеток эндотелия (Чернух, 1976). Влияние гистамина на эндотелий изучено меньше. Между тем, вопрос о роли тучных клеток и гистамина в регуляции эндотелиальной проницаемости важен для понимания физиологии сосудов в норме и при воспалении. Хорошо известно, что индукция IgG-содержащими иммунными комплексами (в результате взаимодействия с Fcγ-рецепторами) дегрануляции ТК приводит к освобождению большого числа биологически активных веществ, которые являются важнейшими участниками воспалительного процесса. Следовательно, необходимо учитывать потенциал этих клеток врожденного иммунитета в инициации иммунопатологических механизмов, запускаемых таким, почти бытовым, фактором, как иммунные ком-

Принятые сокращения: апоВ – аполипопротеин В; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ТК – тучные клетки; ТЭТ – трансэндотелиальный транспорт; ЭК – эндотелиальные клетки; IgG – иммуноглобулин класса G; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор.

плексы, сопровождающие любое инфекционное заболевание, любой иммунный ответ.

Учитывая неодинаковое строение разных анатомических сегментов сосудистой сети (артерий и артериол, вен и венул, лимфатических сосудов), центральным может оказаться вопрос о влиянии ТК и гистамина на проницаемость общего для сосудистой сети эндотелия.

Вопрос о влиянии гистамина на эндотелий неясен. Наряду с многочисленными данными о стимулирующем действии гистамина на проницаемость эндотелия (Tessier et al., 2007; Kumar et al., 2009), есть данные и о его угнетающем действии (Takeda et al., 1992; Lua et al., 2010). Так, у мышей с эндотелий-специфичной сверхэкспрессией гена гистаминового рецептора H1 наблюдали не повышение, а снижение проницаемости гематоэнцефалического барьера при индукции экспериментального аллергического энцефаломиелита (Lua et al., 2010).

Цель настоящей работы – изучить взаимодействие ТК и ЭК *in vitro*, используя модель, в которой клетки находятся в двухкамерном культуральном сосуде: монослой ЭК – в верхней камере на ее пористом дне, ТК – в нижней камере. Исследовали влияние ТК на трансэндотелиальный транспорт (ТЭТ) компонентов плазмы (ЛПНП и альбумина) из верхней камеры в нижнюю.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Использовали эндотелиоциты человека линии EA.hy926 и ТК человека перевиваемой линии НМС-1. Клетки линии EA.hy926 с подтвержденным эндотелиальным фенотипом (наличием основного маркера эндотелия фактора фон Виллебранда) получены от д-ра Coq-Jean S. Edgell (Университет Северной Каролины, США), ТК линии НМС-1 – от д-ра Joseph H. Butterfield (Mayo Clinics, США).

Двухкамерная система. Исследование проводили в 2-камерной системе, верхние камеры которой представляют собой пористые вставки (трансвеллы) с диаметром пор 1 мкм (353104; Costar, США), а нижние – лунки 24-луночного планшета (Sarstedt, Германия), в которых расположены указанные вставки. Вставки предварительно обрабатывали раствором коллагена I типа (Биолот, Россия) (70 мкг/мл в 20 мМ уксусной кислоте) в течение 1 ч при комнатной температуре, далее их промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) (Биолот, Россия) и выдерживали в среде DMEM (D6546; Sigma, США), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS) (HyClone, США), в течение 3 ч в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂).

Ход экспериментов. Вставки засеивали клетками линии EA.hy926, по 10⁵ клеток на вставку. Клетки растили в среде DMEM с 10% FCS при 37°C и 5% CO₂ в течение 2–3 сут до формирования визуального монослоя. Далее монослой ЭК переводили в бессы-

вороточную среду. Для этого клетки предварительно выдерживали в среде DMEM, содержащей 0.5% бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США), в течение 1 сут. Затем во вставки добавляли по 200 мкл среды DMEM, содержащей 200 мкг/мл выделенных ЛПНП человека и 200 мкг/мл очищенного альбумина человека (Sigma, США). ЛПНП (1.024–1.055 г/мл) были выделены из донорской плазмы методом последовательного ультрацентрифугирования (Havel et al., 1955) в роторе 70Ti на ультрацентрифуге Beckman Optima L90-K (США). Выделенные ЛПНП диализовали против PBS. Содержание белка в препаратах ЛПНП определяли ВСА-реактивом (Pierce, США).

В нижние камеры вносили по 10⁶ ТК линии НМС-1 на 700 мкл среды. Клетки культивировали на среде IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Биолот, Россия), содержащей 10% FCS и 1.2 мМ монотиглицерола, в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂). Перед добавлением в нижние камеры ТК предварительно выдерживали в культуральной среде в течение 1 ч в присутствии раствора термоагрегированного (при 63°C, 10 мин) нормального IgG человека (Имтек, Россия), либо с либератором гистамина соединением 48/80 (полимер, произведенный с помощью конденсации из N-метил-p-метоксибензилэтиламина с формальдегидом; Sigma-Aldrich, США) в заранее подобранных оптимальных концентрациях (300 мкг/мл и 20 мкг/мл соответственно). Во избежание преждевременной дегрануляции клеток, нагрузку мембранных рецепторов IgG и веществом 48/80 проводили при 4°C. Контролем служили клетки НМС-1, к которым вместо активаторов добавляли PBS. Затем клетки дважды отмывали холодным PBS и вносили в нижние камеры 2-камерной системы (с монослоем ЭК в верхних) и далее помещали в CO₂-инкубатор.

В ряде экспериментов в верхние камеры добавляли гистамин. Гистамин (Sigma-Aldrich, США) использовали в финальной концентрации 10⁻⁶ М, подобранной предварительно как минимальной и достаточной для получения эффекта. Блокаторы гистаминовых рецепторов H1 и H2 (супрастин (Эгис, Венгрия) и квател (Гедеон Рихтер, Венгрия) соответственно) использовали в концентрации 6.7 мкг/мл, принятой в клинической практике.

Через 5 и 24 ч от начала совместного культивирования ЭК и ТК отбирали по 50 мкл аликвот из нижних камер для определения концентраций аполипопротеина В (apoB), основного аполипопротеина ЛПНП, и альбумина человека.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Концентрацию apoB в культуральных средах определяли при помощи “сэндвич”-варианта ИФА с использованием нижних поликлональных антител кролика к apoB человека (ИМТЕК, Россия) в разведении 1 : 500 и конъюгатов антител к apoB с пероксидазой хрена (Sigma, США), приготовленных по описанному ме-

тоту (Кэтти, Райкундалия, 1991), в разведении 1 : 50. Концентрацию альбумина определяли при помощи прямого варианта ИФА с использованием поликлональных антител кролика к альбумину человека (ИМТЕК, Россия) в разведении 1 : 100000 и конъюгатов козьих антител к кроличьим Ig с пероксидазой хрена (Abscam, США) в разведении 1 : 20000.

Показатель ТЭТ. Показатель ТЭТ макромолекул рассчитывали как отношение количества апоВ или альбумина (нг) в нижней камере к количеству соответствующего белка (нг), добавленного в верхнюю камеру, и выражали в процентах.

Статистическая обработка результатов. Использовали пакет Microsoft Excel. Результаты основаны на данных 4–5 экспериментов, причем на каждое условие эксперимента использовали по 3–4 вставки, т.е. общее число повторов составило 12–16 на 1 точку. Данные представлены в виде средних значений и их ошибок. Достоверность различий оценивали по непарному *t*-критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно из рис. 1, *Ia–г*, в течение первых 5 ч культивирования присутствие в нижней камере как не активированных, так и активированных ТК не оказывало заметного влияния на ТЭТ альбумина. Количество альбумина, проникшего через монослой ЭК из верхней камеры в нижнюю, было практически одинаковым как в присутствии ТК, так и без них, независимо от того, были ли ТК активированы и чем именно, или нет. Однако через 24 ч совместного культивирования клеток влияние ТК на ТЭТ альбумина становилось вполне очевидным и, как видно на рис. 1, *Id–з*, практически не зависело от того, активированы ТК или нет. Так, присутствие в системе неактивированных ТК приводило к практически двукратному снижению ТЭТ альбумина по сравнению с культивированием в отсутствие ТК (рис. 1, *Ie*; $P < 0.05$). ТК, активированные агрегированным IgG, либо соединением 48/80, также подавляли ТЭТ альбумина (рис. 1, *Iж, з*; $P < 0.05$).

Факт влияния ТК из нижней камеры системы на эндотелиальный монослой в верхней камере указывает на действие гуморальных посредников. Наиболее вероятным действующим агентом является гистамин – известный продукт ТК, к которому у ЭК клеток линии EA.hy926 есть рецепторы H1 и H2 (Esposito et al., 2011). Для проверки роли гистамина как действующего фактора ТК, ответственного за ингибирование ТЭТ альбумина, мы использовали блокаторы гистаминовых рецепторов H1 и H2 – супрастин и квамател соответственно.

Как видно на рис. 1, *Ie–з*, супрастин во всех случаях снижал ингибирующее действие ТК, как интактных, так и стимулированных агрегированным IgG или соединением 48/80, на ТЭТ альбумина, то-

гда как блокатор H2-рецепторов квамател не оказывал влияния на этот процесс. Полученные данные, во-первых, свидетельствуют о том, что секреторируемый ТК гистамин является, как минимум, основным агентом, если не единственным, посредством которого эти клетки оказывают влияние на ТЭТ альбумина. Кроме того, свое действие на ЭК гистамин осуществляет через H1-рецептор.

Мы также выяснили, каково влияние ТК на ТЭТ ЛПНП. Как следует из рис. 1, *II*, ТК оказывают более сильное влияние на прохождение через эндотелий ЛПНП, чем альбумина. Если в течение 5 ч ТЭТ альбумина был устойчив не только к интактным, но и к активированным ТК, то транспорт ЛПНП на этом раннем сроке уже демонстрировал высокую чувствительность к влиянию ТК, хотя только активированных IgG или соединением 48/80 (рис. 1, *Iв, г*).

Через 24 ч совместного культивирования отчетливое подавление ТЭТ ЛПНП вызывали уже не только активированные, но и интактные ТК (рис. 1 *Ie–з*). Снижение транспорта ЛПНП ($P < 0.05$) частично отменялось блокатором гистаминовых рецепторов H1 супрастином, но не блокатором H2-рецепторов квамателом (рис. 1, *Ie–з*). Это однозначно указывает на участие H1-рецепторов в обеспечении чувствительности механизмов ТЭТ альбумина и ЛПНП к гистамину тучных клеток.

Сводные сравнительные данные по ТЭТ альбумина и ЛПНП через 24 ч культивирования представлены на рис. 2. Видно, что скорость ТЭТ альбумина значительно выше, чем ЛПНП: количество проникшего в нижнюю камеру альбумина в пять раз больше (приблизительно 15%), чем ЛПНП (около 3%). В присутствии ТК транспорт и альбумина, и ЛПНП снижается. Влияние ТК на транспорт апоВ-содержащих ЛПНП значительно сильнее, чем на транспорт альбумина ($P < 0.05$) (рис. 2).

Для дополнительной идентификации гистамина как молекулы, обеспечивающей супрессивные эффекты ТК на ТЭТ макромолекул, исследовали влияние гистамина на ТЭТ ЛПНП в той же двухкамерной системе, где в верхней камере по-прежнему находился монослой клеток EA.hy926, а в нижней – только среда. Гистамин в разных концентрациях вносили в среду верхней камеры с эндотелием (рис. 3). Как следует из рис. 3, действие гистамина проявляется через 24 ч ($P < 0.05$) и выражается подавлением ТЭТ апоВ-содержащих ЛПНП (через 1 ч эффект не замечен). Это совпадает с описанной выше супрастин-чувствительной супрессией транспорта ЛПНП, вызываемой ТК. Как и в экспериментах с ТК, супрессивный эффект гистамина отменялся блокатором рецепторов H1, но не H2.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что эндотелиальная дисфункция играет существенную роль в патогенезе атеросклероза и

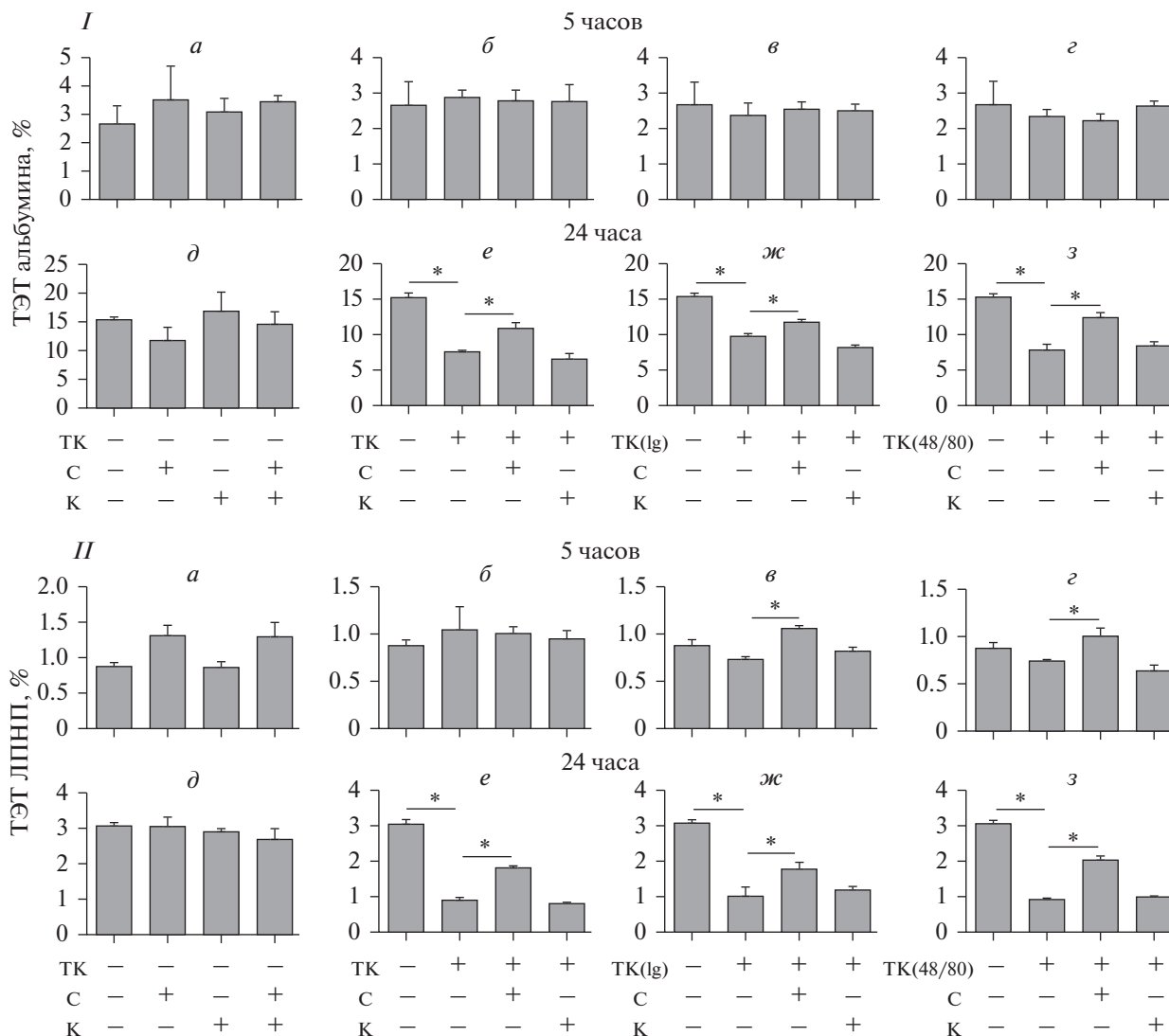


Рис. 1. Влияние тучных клеток (ТК) на трансэндотелиальный транспорт (ТЭТ) альбумина (I) и ЛПНП (II) и его зависимость от гистамина и гистаминовых рецепторов H1 и H2. ТЭТ оценивали через 5 (а–г) и 24 (д–з) ч культивирования в отсутствие (а, д) или в присутствии не активированных ТК (б, е), либо ТК, активированных агрегированным иммуноглобулином G (Ig; в, ж) или соединением 48/80 (з, з). Супрастин (С) и кватмател (К) использовали в качестве блокаторов H1- и H2-рецепторов соответственно. Здесь и на рис. 2, 3 представлены средние значения и их ошибки (вертикальные отрезки); достоверность различий при $P < 0.05$ показана звездочкой.

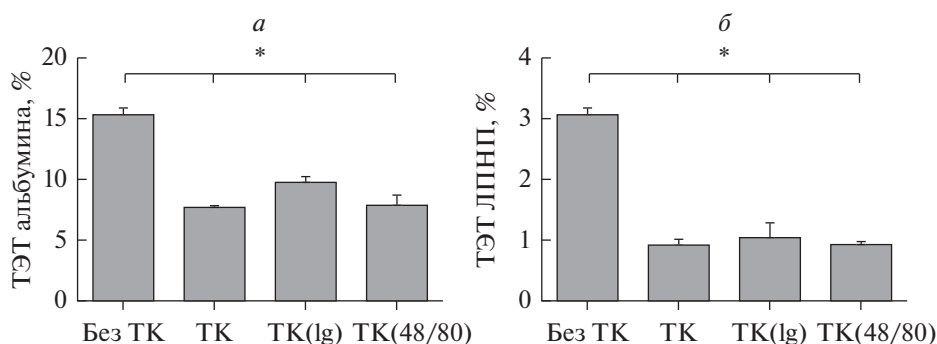


Рис. 2. Влияние тучных клеток (ТК), не активированных, либо активированных агрегированным иммуноглобулином G (Ig) или соединением 48/80, на трансэндотелиальный транспорт (ТЭТ) альбумина (а) и ЛПНП (б). ТЭТ оценивали через 24 ч культивирования.

характеризуется дисбалансом между факторами релаксации и сокращения, прокоагулянтными и антикоагулянтными субстанциями, а также между провоспалительными и противовоспалительными медиаторами (Poredos, 2001). Основными факторами эндотелиальной дисфункции, способствующей атерогенезу, считают чрезмерную продукцию супероксидных анионов, экспрессию эндотелиальными клетками молекул адгезии и увеличение адгезии моноцитов и макрофагов, а также повышение проницаемости эндотелиального слоя. Ранее нами показано, что факторы воспаления, связанные с развитием атеросклероза, такие как провоспалительный цитокин TNF α и С-реактивный белок, стимулируют прохождение ЛПНП через эндотелиальный монослой (Назаров и др., 2015).

ТК располагаются вокруг небольших сосудов и, как показывают наблюдения, способны вступать в непосредственный контакт с ЭК как *in vitro*, так и *in vivo* (Ohtsuka, 2000; Brill et al., 2004; Kunder et al., 2011). На возможность таких контактов указывают данные о том, что при дегрануляции ТК участки их мембран, несущие, в частности, их маркерный антиген CD63, акцептируются мембранами ЭК и могут быть обнаружены с помощью проточной цитофлуориметрии (Schaefer et al., 2012).

Способность ТК влиять на состояние эндотелия не вызывает сомнения. Большой набор биологически активных веществ, освобождающихся при дегрануляции ТК, включает в себя такие вазоактивные соединения, как гистамин, оксид азота, липидные медиаторы, протеазы и т.д. Так, например, ТК синтезируют и выбрасывают при дегрануляции ренин — фермент, запускающий цепь реакций, ведущих к образованию ангиотензина II. Плейотропный биологически активный пептид ангиотензин II вызывает множественные эффекты, считающиеся проатерогенными: индуцирует генерацию супероксид-анионного радикала, появление на клетках эндотелия адгезионных молекул VCAM-1 и ICAM-1, синтез хемокина MCP-1 (Toba et al., 2006). На проницаемость эндотелия могут влиять и другие вещества, также являющиеся продуктами ТК — катепсин G, триптаза (Sendo et al., 2003). Содержание в крови еще одного вещества, продуцируемого ТК (фермента химазы), коррелирует с числом и величиной атеросклеротических бляшек у людей (Doggrell et al., 2004), что также может быть связано с влиянием этого фермента, прямо или опосредовано, на проникновение ЛПНП в интиму артерий.

Результаты настоящего исследования позволяют заключить, что ТК действительно участвуют в регуляции физиологического состояния сосудов, влияя непосредственно на эндотелий. Причем в наших экспериментах ТК уменьшали ТЭТ альбумина и ЛПНП. Одним из медиаторов, по-видимому основным, влияния ТК на ЭК является гистамин. И действительно, роль гистамина в этом процессе подтверждена нейтрализацией (смягчением) его эффек-

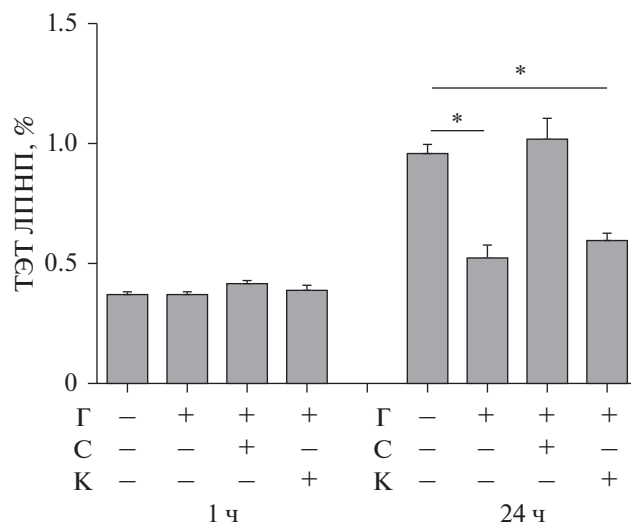


Рис. 3. Влияние гистамина (Г) на трансэндотелиальный транспорт (ТЭТ) ЛПНП. ТЭТ оценивали через 1 и 24 ч культивирования. Супрастин (С) и квамател (К) использовали в качестве блокаторов H1- и H2-рецепторов соответственно.

та с помощью блокатора гистаминовых рецепторов H1. Судя по полученным данным, рецепторы гистамина H2 не участвуют в регуляции проницаемости эндотелия.

Действие гистамина на проницаемость сосудов хорошо известно. Гистамин действует на сосуды через гистаминовые рецепторы H1 и H2 (Ash, Schild, 1966; Ohtsuka, 2000; Brill et al., 2004; McLeod et al., 2005; Esposito et al., 2011). Гистамин, взаимодействуя с рецептором H1, повышает проницаемость венозного эндотелия, как считается, за счет увеличения промежутков между клетками. Через этот рецептор антигистаминные препараты гасят основные сосудистые эффекты гистамина. Хотя действие гистамина на кратковременно (около 20 мин), оно может быть пролонгировано в условиях хронического воспаления при непрекращающейся активации пула ТК циркулирующими иммунными комплексами (любыми комплексами, содержащими IgG-антитела и соответствующие антигены).

Несмотря на многолетнюю историю изучения влияния гистамина на состояние эндотелия, к настоящему времени мало что известно о возможности избирательного влияния ТК и их основного медиатора гистамина на проникновение конкретных молекул через монослой ЭК. Особый интерес вызывает изучение влияния гистамина на поступление в сосудистую стенку ЛПНП, накопление которых в интиме артерий является одним из самых ранних событий в атерогенезе. Имеются сведения, что гистамин, действуя через H1-рецепторы способствует развитию экспериментального атеросклероза у мышей с дефицитом аполипопротеина E (Rozenberg et al., 2010), по-видимому, повышая поступление ЛПНП в

интиму аорты. Вместе с тем, имеются весьма убедительные данные, что транцитоз ЛПНП через ЭК является рецептор-опосредованным и не может осуществляться по межклеточным пространствам (см. обзор: Jang et al., 2020). Это позволяет предполагать, что действие гистамина на эндотелий не ограничивается только увеличением межклеточных промежутков.

Среди многих работ, повторяющих и подтверждающих тезис о повышении проницаемости сосудов (и эндотелия) гистамином, имеется только несколько публикаций, в которых показано снижение проницаемости под влиянием гистамина (Takeda et al., 1992; Lua et al., 2010). Кажущееся противоречие между известными данными о гистамине как веществе, повышающем проницаемость сосудов, и результатами настоящего исследования, как нам кажется, убедительно показавшими “эндотелий-уплотняющий” эффект гистамина, скорее всего, объясняется следующими обстоятельствами.

Реакция на гистамин многослойной сосудистой стенки не есть реакция только ее эндотелия, а есть совокупная реакция всех слоев. И если в составе сосуда присутствует гладкомышечный слой, то, скорее всего, именно его мощная реакция будет доминирующей и перекроет реакции других слоев. Наши данные позволяют заключить, что самостоятельная реакция эндотелия на гистамин является реакцией “сжатия”, реакцией “закрытия сосуда”, что при наличии мышечного слоя может составлять компенсаторное противодействие паретической реакции гладкомышечных волокон. Кроме того, весьма вероятно, что характер влияния гистамина на ТЭТ макромолекул может в существенной степени зависеть от физико-химических свойств изучаемых молекул.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 15-04-08009).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кэтти Д., Райкундалия И. 1991. Иммуноферментный анализ. В кн.: Антитела: Методы. М.: Мир. Т. 2. 384 с. (Katie D., Raikundalia I. 1991. Enzyme-linked Immunosorbent assay. In: Antibodies: Methods. М.: Mir. V. 2. 384 p.)
- Назаров П.Г., Мальцева О.Н., Танянский Д.А., Агеева Е.В., Бородина Д.В., Денисенко А.Д. 2015. Влияние факторов
- воспаления на трансэндотелиальный транспорт липопротеинов сыворотки крови *in vitro*. Цитокины воспаления. Т. 14. № 4. С. 59. (Nazarov P.G., Malitseva O.N., Tanyanskiy D.A., Ageeva E.V., Borodina D.V., Denisenko A.D. 2015. Influence of inflammation factors on transendothelial transport of blood serum lipoproteins *in vitro*. Cytokines and Inflammation (Russ.). V. 14. № 4. P. 59.)
- Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В. 1975. Микроциркуляция. М.: Медицина. 456 с. (Chernukh A.M., Aleksandrov P.N., Alekseev O.V. 1975. Microcirculation. М.: Meditsina. 456 p.)
- Ash A.S., Schild H.O. 1966. Receptors mediating some actions of histamine. Br. J. Pharmacol. Chemother. V. 27. P. 427. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1966.tb01674.x>
- Brill A., Baram D., Sela U., Salamon P., Mekori Y.A., Hershkovich R. 2004. Induction of mast cell interactions with blood vessel wall components by direct contact with intact T cells or T cell membranes *in vitro*. Clin. Exp. Allergy. V. 4. P. 1725. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.02093.x>
- Doggrell S.A., Wanstall J.C. 2004. Vascular chymase: pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition. Cardiovasc. Res. V. 61. P. 653. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.11.029>
- Esposito B., Gambarà G., Lewis A.M., Palombi F., D'Alessio A., Taylor L.X., Genazzani A.A., Ziparo E., Galione A., Churchill G.C., Filippini A. 2011. NAADP links histamine H1 receptors to secretion of von Willebrand factor in human endothelial cells. Blood. V. 117. P. 4968. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-266338>
- Guidolin D., Ruggieri S., Annese T., Tortorella C., Marzullo A., Ribatti D. 2017. Spatial distribution of mast cells around vessels and glands in human gastric carcinoma. Clin. Exp. Med. V. 17. P. 531. <https://doi.org/10.1007/s10238-017-0452-7>
- Havel R.J., Eder H.A., Bragdon J.H. 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J. Clin. Invest. V. 34. P. 345. <https://doi.org/10.1172/JCI103182>
- Jang E., Robert J., Rohrer L., von Eckardstein A., Lee W.L. 2020. Transendothelial transport of lipoproteins. Atherosclerosis. V. 315. P. 111. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.09.020>
- Kritas S.K., Saggini A., Varvara G., Murmura G., Caraffa A., Antinolfi P., Toniato E., Pantalone A., Neri G., Frydas S., Rosati M., Tei M., Speziali A., Saggini R., Pandolfi F., Cerulli G., Theoharides T.C., Conti P. 2013. Impact of mast cells on the skin. Int. J. Immunopathol. Pharmacol. V. 26. P. 855. <https://doi.org/10.1177/039463201302600403>
- Kumar P., Shen Q., Pivetti C.D., Lee E.S., Wu M.H., Yuan S.Y. 2009. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: Implications in inflammation. Expert Rev. Mol. Med. V. 11. e19. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001112>
- Kunder C.A., St. John A.L., Abraham S.N. 2011. Mast cell modulation of the vascular and lymphatic endothelium. Blood. V. 118. P. 5383. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-358432>
- Lua C., Diehla S.A., Noubadea R., Ledoux J., Nelson M.T., Spacha K., Zachary J.F., Blankenhorn E.P., Teuscher C. 2010. Endothelial histamine H1 receptor signaling reduces blood-brain barrier permeability and susceptibility to au-

- toimmune encephalomyelitis. PNAS. V. 107. P. 18967. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008816107>
- McLeod R.L., Mingo G.G., Kreutner W., Hey J.A. 2005. Effect of combined histamine H1 and H3 receptor blockade on cutaneous microvascular permeability elicited by compound 48/80. Life Sci. V. 76. P. 1787. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.08.033>
- Ohtsuka T. 2000. Different interaction of mast cells with human endothelial cells and fibroblasts. Eur. J. Dermatol. V. 10. P. 115.
- Poredos P. 2001. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. Clin. Appl. Thromb. Hemost. V. 7. P. 276. <https://doi.org/10.1177/107602960100700404>
- Rozenberg I., Sluka S.H., Rohrer L., Hofmann J., Becher B., Akhmedov A., Soliz J., Mocharla P., Borén J., Johansen P., Steffel J., Watanabe T., Lüscher T.F., Tanner F.C. 2010. Histamine H1 receptor promotes atherosclerotic lesion formation by increasing vascular permeability for low density lipoproteins. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. V. 30. P. 923. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.201079>
- Schaefer T., Zajonz A., Lorentz P., Bohnacker T., Wymann M.P., Schweighoffer T. 2012. Luminal decoration of blood vessels by activated perivascular mast cells in allergic rhinitis. Allergy. V. 67. P. 510. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02790.x>
- Sendo T., Sumimura T., Itoh Y., Goromaru T., Aki K., Yano T., Oike M., Ito Y., Mori S., Nishibori M., Oishi R. 2003. Involvement of proteinase-activated receptor-2 in mast cell tryptase-induced barrier dysfunction in bovine aortic endothelial cells. Cell Signal. V. 15. P. 773. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(03\)00014-7](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(03)00014-7)
- Takeda T., Yamashita Y., Syuji S., Youji M. 1992. Histamine decreases the permeability of an endothelial cell monolayer by stimulating cyclic AMP production through the H2-receptor. J. Cell Sci. V. 101. P. 745.
- Tessier J., Green C., Padgett D., Zhao W., Schwartz L., Hughes M., Hewlett E. 2007. Contributions of histamine, prostanoids, and neurokinins to edema elicited by edema toxin from bacillus anthracis. Infect. Immun. V. 75. P. 1895. <https://doi.org/10.1128/IAI.01632-06>
- Toba H., Gomyo E., Miki S., Shimizu T., Yoshimura A., Inoue R., Sawai N., Tsukamoto R., Asayama J., Kobara M., Nakata T. 2006. Hyperinsulinaemia increases the gene expression of endothelial nitric oxide synthase and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat aorta. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. V. 33. P. 40. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04385.x>
- Zhang J., Alcaide P., Liu L., Sun J., He A. 2011. Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils. PLoS One. 6. e14525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014525>

Mast Cells in Control of Transendothelial Transport. The Role of Histamine

P. G. Nazarov^{a, b}, O. N. Maltseva^a, D. A. Tanyanskiy^{a, c, *}, E. V. Ageeva^a, S. S. Lutfulloeva^a, A. D. Denisenko^{a, c}, and P. V. Pigarevsky^a

^aInstitute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia

^bPavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, 197022 Russia

^cSt. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: dmitry.athero@gmail.com

The influence of human mast cells (MC) (HMC-1 line) on transendothelial transport of albumin and low-density lipoproteins (LDL) was studied using a two-chamber system with 1- μ m pore size. Human endothelial cells (line EA.hy926) were grown in the upper chamber coated with type I collagen for 2–3 days before forming a visual monolayer. After that, 200 mkg/mL of LDL and 200 mkg/mL of albumin were added to the upper chamber, and MC were added to the lower chamber, either intact or activated by aggregated human IgG or by compound 48/80. Transendothelial transport of proteins (their passage from the upper chamber to the lower chamber) was evaluated after 5 and 24 hours of incubation. In the presence of MC, either intact or activated with aggregated human IgG or compound 48/80, there was a significant decrease in transendothelial transport of albumin and LDL after incubation for 24 hours, but not for 5 hours. The LDL transport was more sensitive to the inhibitory effect of MC than the albumin one. The suppressive effect of MC was dependent mainly on histamine, since it was canceled by the histamine H1 (but not H2) receptor blocker.

Keywords: endothelium, EA.hy926, mast cells HMC-1, histamine, transendothelial transport, low-density lipoproteins, albumin

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ НА ЦИТОАРХИТЕКТониКУ И УЛЬТРАСТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ОТДЕЛОВ МОЗГА, СВЯЗАННЫХ С ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИЕЙ У КРЫС

© 2021 г. Н. Л. Туманова¹, Д. С. Васильев^{1, *}, Н. М. Дубровская¹, Н. Н. Наливаева¹, **И. А. Журавин¹**

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

*E-mail: dvasilyev@bk.ru

Поступила в редакцию 19.11.2020 г.

После доработки 29.11.2020 г.

Принята к публикации 30.11.2020 г.

С помощью светооптической и электронной микроскопии показано, что на двадцатые сутки после рождения у крысят, перенесших пренатальную гипоксию на 14-й день эмбрионального развития (E14, 7% O₂ в течение 3 ч), в энторинальной коре и гиппокампе наблюдаются нейродегенеративные изменения и снижается количество нейронов, в то время как в периферическом отделе обонятельного анализатора (обонятельных луковицах) существенных изменений в этот период развития не наблюдали. С помощью иммуногистохимического анализа также выявлены изменения в содержании и распределении нейтральной эндопептидазы неприлизина в энторинальной коре и гиппокампе. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что нарушение обонятельной функции у молодых крыс, возникающее в результате гипоксии матери во время беременности и проявляющееся в снижении эффективности поиска пищи, связано с патологическими изменениями клеток энторинальной коры и гиппокампа, а также со снижением в них содержания неприлизина.

Ключевые слова: онтогенез, пренатальная гипоксия, нейродегенерация, поведение, обоняние, гиппокамп, энторинальная кора, обонятельные луковицы, неприлизин

DOI: 10.31857/S0041377121020085

Одним из важнейших направлений современной биомедицины является выяснение причин возникновения и поиск способов ранней диагностики нейродегенеративных заболеваний, которые часто связаны с нарушением деятельности обонятельного анализатора. Ухудшение обоняния может указывать на развитие таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера (БА) и Паркинсона (Djordjevic et al., 2008; Doty, 2012; Морозова и др., 2014; Murphy, 2019), болезнь Хантингтона (Barresi et al., 2012) и другие формы деменции (Carnemolla et al., 2020). Нарушение обонятельной функции часто сопровождается повышенной смертностью у пожилых людей (Liu et al., 2019). Обонятельные расстройства проявляются раньше, чем когнитивные или двигательные нарушения и становятся все более явными и тяжелыми по мере прогрессирования нейродегенеративного процесса.

В последние годы с помощью функциональной МРТ проводится визуализация обонятельных структур

тур головного мозга, что способствует пониманию причин развития обонятельных расстройств при нейродегенеративных заболеваниях (Wang et al., 2010). Согласно данным МРТ, снижение объема обонятельных луковиц и трактов коррелирует со снижением когнитивных функций, анализируемых по краткой шкале оценки психического статуса MMSE (Thomann et al., 2009). При БА и болезни Паркинсона обонятельные расстройства могут быть связаны как с атрофией серого вещества обонятельных луковиц, первичной обонятельной коры, гиппокампа, таламуса и гипоталамуса, так и с ростом числа тормозных нейронов в обонятельных отделах (Wang et al., 2010). С другой стороны, бульбэктомия у разных видов грызунов (мышей, морских свинок и крыс) приводит к поведенческим, морфологическим, биохимическим и иммунологическим изменениям, характерным для развития нейродегенерации альцгеймеровского типа (см. обзор: Гуляева и др., 2017).

В работах нашей лаборатории было показано, что пренатальная гипоксия на 14-й день эмбрионального развития (E14, 7% O₂ в течение 3 ч) приводит у крыс к нарушению морфофункциональных свойств

Принятые сокращения: APP – предшественник β-амилоидного пептида; БА – болезнь Альцгеймера; Aβ – β-амилоидный пептид.

нервной ткани теменной коры и гиппокампа, снижению плотности дендритных шипиков и отставанию нейрогенеза, морфогенеза и формирования пластичности нервной системы (Vasilev et al., 2016; Туманова и др., 2018). Пренатальная гипоксия также приводит к изменению метаболизма β -амилоидного пептида (A β) и увеличению содержания его белка-предшественника (APP), а также к снижению активности α -секретазы и увеличению активности β -секретазы, расщепляющих APP, что ведет к сдвигу баланса катаболизма APP в сторону образования A β (Nalivaeva et al., 2004). Похожие изменения также наблюдаются при ишемии мозга взрослых крыс (Наливаева и др., 2005). При этих патологических изменениях в коре и гиппокампе также наблюдается дефицит амилоид-деградирующих ферментов неприлизина и эндотелин-превращающего фермента (Nalivaeva et al., 2004, 2012). У человека эти факторы в совокупности могут приводить к накоплению амилоидного пептида в нервной ткани, гибели нервных клеток, развитию нейродегенерации и деменции.

Помимо морфологических и биохимических изменений в ткани мозга, пренатальная гипоксия у крыс приводит к нарушению когнитивных функций в постнатальном онтогенезе, которые выявляются при тестировании животных в двухуровневом радиальном лабиринте, в тесте “Распознавание нового объекта” и при выработке инструментальных рефлексив (Дубровская, Журавин, 2009; Журавин и др., 2010). Таким образом, пренатальная гипоксия у крыс может рассматриваться в качестве зоотропной модели ранних стадий нейродегенеративных заболеваний человека. Однако исследования влияния пренатальной гипоксии на формирование структур, обеспечивающих обонятельную функцию животных, до сих пор не проводились.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния пренатальной гипоксии на морфофункциональные характеристики отделов мозга крыс, связанных с обонянием, а также на обоняние у крыс. В работе использовали методы световой и электронной микроскопии, иммуногистохимии, а также анализ результатов поиска пищи по запаху.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. Использовали самцов из потомства самок крыс линии Вистар контрольной и экспериментальной групп (с нормобарической гипоксией). Все эксперименты осуществляли в соответствии с протоколом использования лабораторных животных ИЭФБ РАН, основанного на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Com-

munities Council Directive #86/609 for the Care of Laboratory Animals).

Модель пренатальной нормобарической гипоксии. Самок экспериментальной группы на 14-е сутки беременности (E14) подвергали действию нормобарической гипоксии в специальной камере емкостью 100 л, содержащей системы терморегуляции, вентиляции, газового анализа и адсорбции выдыхаемого CO₂. В ходе эксперимента содержание кислорода в камере снижали с 20.7 до 7.0% и поддерживали на этом уровне в течение 3 ч. Концентрация углекислоты в камере не превышала 0.2%, а температура поддерживалась на уровне 22°C. В камеру одновременно сажали не более 10 крыс. Самки контрольной группы находились такое же время в камере при нормальном содержании кислорода. На 20-е сут беременности (за 1 сут до родов) самок экспериментальной и контрольной групп рассаживали по отдельным клеткам. На 2-е сут после рождения в каждом выводке оставляли по 8 крысят. При расчете возраста крысят нулевым считали день их появления на свет.

Световая микроскопия. Светооптическое исследование проводили на крысятах в возрасте 20 сут (P20) контрольной ($n = 10$) и экспериментальной групп ($n = 9$). Ткань мозга фиксировали методом транскардиальной перфузии 10%-ным нейтральным формалином на фосфатном буфере (PBS, 4°C, pH 7.4). Замороженные фронтальные срезы мозга толщиной 20 мкм изготавливали на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Germany). Для исследования отбирали срезы обонятельной луковицы (5.2–7.0 мм от линии Брегма) (Paxinos, Watson, 2005), гиппокампа и энторинальной коры мозга (4.5–5.5 мм от брегмы) и проводили окрашивание по Нисслю. С использованием микроскопа ImagerA (Zeiss, Германия) оценивали состояние нервной ткани мозга. Количественное сравнение клеток поля CA1 гиппокампа и энторинальной коры проводили на серии срезов толщиной 20 мкм, первый срез серии выбирали случайно, расстояние между последующими срезами в серии составляло 40 мкм. При проведении анализа использовали программу Video Test Master-Morphology (Video Test, Санкт-Петербург, Россия). По срезам (6 на каждое животное), содержащим дорсальный гиппокамп или энторинальную кору, вычисляли средние величины общего количества клеток и количества нейронов (на участке ткани площадью 10000 мкм²) для каждого животного контрольной ($n = 8$) и экспериментальной групп ($n = 8$).

Электронная микроскопия. Для анализа мозг крысят (в группе контроля $n = 5$, гипоксии $n = 4$) на 20-й день постнатального развития (P20) фиксировали методом транскардиальной перфузии смесью 1%-ного

глутарового альдегида и 1%-ного формальдегида на 0.1 М PBS, pH 7.4. Блоки, содержащие обонятельную луковицу, энторинальную кору или гиппокамп дополнительно фиксировали 1%-ным OsO₄, контрастировали уранилацетатом, обезвоживали и заливали в аралдит по стандартному протоколу (Туманова и др., 2018). На ультратоме LKB-III (LKB, Швеция) изготавливали срезы исследуемых отделов толщиной 50 нм, которые затем исследовали на электронном микроскопе FEI Tecnai V2 (FEI, США).

Иммуногистохимия. Для исследования отбирали срезы обонятельной луковицы (5.2–7.0 мм от bregma рис. 1а) (Paxinos, Watson, 2005), энторинальной области коры и поля CA1 дорсального гиппокампа (на уровне 4.5–5.5 мм от брегмы рис 2а, 3а) животных контрольной и экспериментальной групп ($n = 8$ в каждой возрастной группе). Мозг фиксировали раствором 10%-ного нейтрального формалина на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4), затем изготавливали срезы на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Германия). Для снижения аутофлуоресценции срезы инкубировали в 0.1 М растворе глицина (Sigma, Германия) на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4) под визуальным контролем до максимального ослабления свечения в диапазоне длин волн 490–550 нм. Блокировку неспецифического связывания антител осуществляли путем 1-часовой инкубации в 2%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Германия) на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4), в который добавляли 0.01% Тритона X100 для пермеабилзации клеточных мембран. При иммуногистохимическом исследовании распределения неприлизина использовали кроличьи поликлональные антитела Anti-CD10 (EPR5904, ab126593; Abcam, Великобритания разведение 1 : 100). Визуализацию осуществляли с помощью FITC-конъюгированных вторичных антител против IgG кролика (ab96902, Abcam; Великобритания разведение 1 : 500). В качестве негативного контроля неспецифического связывания проводили иммунохимическую реакцию в отсутствие первичных антител для исследованных областей мозга у каждого животного. В качестве позитивного контроля использовали ткань почки, характеризующуюся высоким содержанием неприлизина, взятой от контрольной крысы. Иммунофлуоресцентное свечение регистрировали с помощью микроскопа Leica DMR, оборудованном конфокальным сканером Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флуорохрома FITC осуществляли светом He/Ar-лазера при длине волны 488 нм. Свечение FITC регистрировали в диапазоне длин волн 496–537 нм. Яркость свечения FITC на поле нервной ткани площадью 10000 мкм² оценивали при помощи программы Video Test Master-Morphology (Video Test, Санкт-Петербург, Россия). Для каждого животного вычисля-

ли среднее значение по 6 срезам. Нормировку полученных значений для каждого животного осуществляли путем вычета среднего значения для негативного контроля (иммунохимическая реакция в отсутствие первичных антител) и сравнивали средние нормированные значения уровня сигнала FITC для животных контрольной ($n = 8$) и экспериментальной ($n = 8$) групп.

Исследование поведения животных. Эксперименты проводили на крысах, достигших возраста 30 сут контрольной группы (интактный контроль, $n = 15$) и перенесших пренатальную гипоксию (экспериментальная группа “гипоксия”, $n = 9$). В парадигме “поиск пищи” использовали модифицированную нами методику поиска корма (Sun et al., 2016). Тестирование животных проводили в специальной камере площадью 100 × 100 см с 16-ю отверстиями диаметром 2 см и непрозрачными стенками высотой 30 см. Во время эксперимента в два отверстия в полу закладывали по одному кусочку овсяного печенья диаметром 0.5 см. Кусочки печенья находились под слоем опилок ниже поверхности пола камеры на 0.5 см. Их расположение меняли при каждом новом тестировании. В эксперимент брали животных, прошедших 2-суточное пищевое голодание. Тестирование проводили ежедневно в течение 6 сут. В течение 15 мин теста оценивали в баллах количество добытых кусочков корма: 0, 1 или 2. Кроме того, за цикл тестирования регистрировали общее число обнюхиваний всех отверстий в полу экспериментальной камеры. После нахождения второго кусочка печенья тестирование прекращалось.

Статистическая обработка данных. Полученные данные обрабатывали с помощью пакета программ SigmaStat 3.0, используя непарный двусторонний t -критерий (two-tailed t -тест) и непараметрический критерий Манна–Уитни (U -критерий). Изменения считали достоверными при уровне значимости $p = 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфология отделов коры мозга. 1) Обонятельные луковицы. Исследование на светооптическом уровне окрашенных по методу Ниссля препаратов обонятельных луковиц (периферические отделы обонятельного анализатора) не выявило существенных различий в строении нервной ткани обонятельных луковиц контрольных и гипоксических крыс (рис. 1б, в). На рис. 1г показан слой митральных клеток, образованный несколькими концентрически расположенными рядами нейронов из обонятельных луковиц животного, перенесшего пренатальную гипоксию. На электроннограммах митральные клетки имели крупные размеры и большое ядро (рис. 1д) и не отличались от клеток данного слоя у контроль-

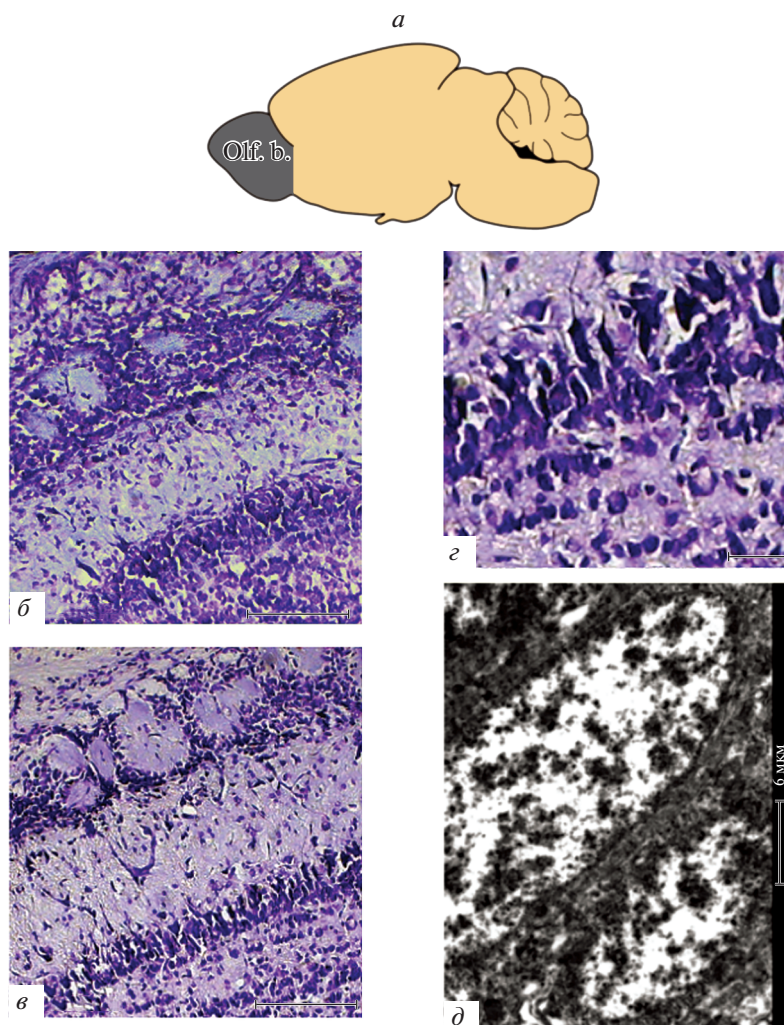


Рис. 1. Обонятельные луковицы 20-суточных крысят, перенесших пренатальную гипоксию. *a* – Схема расположения анализируемой области обонятельной луковицы (Olf. b.) (адаптация из: Paxinos, Watson, 2005). *б–г* – Репрезентативные микрофотографии ткани обонятельной луковицы крысят из контрольной (*б*) и экспериментальной (*в, г*) групп; окраска по Ниссля. *г* – Слой митральных клеток в обонятельных луковицах крысят, перенесших пренатальную гипоксию; окраска по Ниссля. Масштабная линейка: 200 (*б, в*) и 20 (*г*) мкм. *д* – Электронограмма обонятельной луковицы гипоксического животного; показаны митральные клетки с тонким ободком цитоплазмы

ных животных. Электронномикроскопическое исследование волокон и нейронов обонятельных луковиц также не выявило каких-либо различий между контрольными и гипоксическими животными.

2) Гиппокамп. С помощью светооптического метода Ниссля обнаружены структурные изменения нейронов в поле СА1 гиппокампа у крысят, перенесших пренатальную гипоксию, по сравнению с контрольными сверстниками. Среднее количество нейронов в пирамидном слое поля СА1 было ниже, чем в контроле (на $15.4 \pm 5.8\%$ от уровня контроля, $U = 8.1$ $p = 0.03$). В ряде нейронов видно набухание клеточных тел и их отростков, появление многочисленных вакуолей и лизис органоидов в цитоплазме (хроматолиз), в то время как у других нейронов на-

блюдали сморщивание клеточных тел и их отростков, а также уплотнение цитоплазмы (гиперхроматоз, рис. 2*б, в*). На электронограммах наряду с нормальными клетками (рис. 2*г*) у таких животных наблюдали нейроны с измененной структурой. Хроматолиз нейронов в гиппокампе крыс, перенесших гипоксию, встречался реже, чем гиперхроматоз. На рис. 2*д* представлен дегенерирующий по типу хроматолиза нейрон с набухшим телом и лизисом органоидов в цитоплазме, от тела которого отходит аксон с варикозным утолщением, а рядом с ним расположен измененный аксосоматический контакт с темной аксональной терминалью, принадлежащей гиперхромному нейрону. У таких нейронов (рис. 2*е*) в цитоплазме были трудно различимы органоиды (ЭПР и мито-

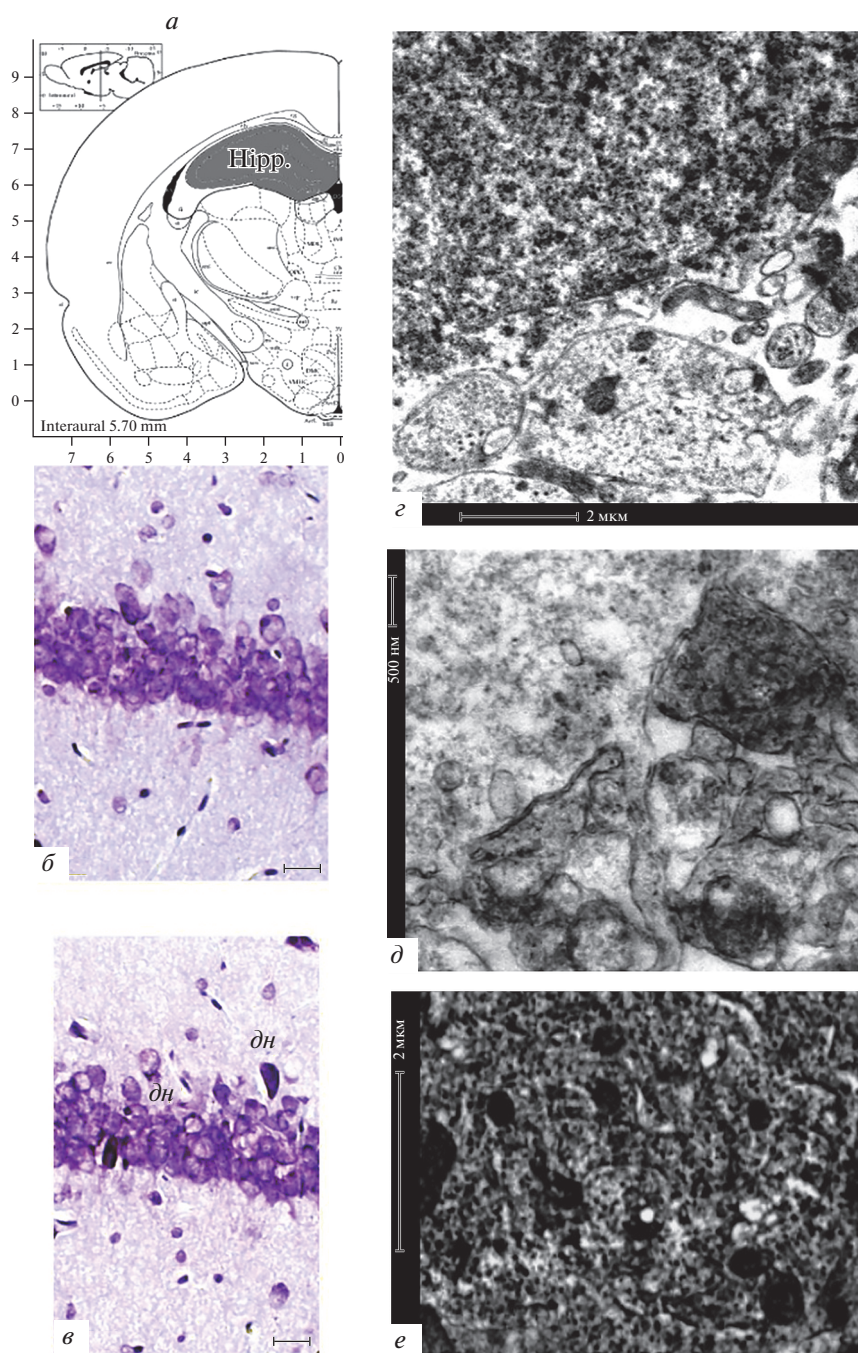


Рис. 2. Нейродегенеративные изменения в поле CA1 гиппокампа 20-суточных крысят после пренатальной гипоксии. *а* – Схема расположения анализируемой области гиппокампа (Hipp.) (адаптация из: Paxinos, Watson, 2005). *б, в* – Микрофотографии поля CA1 гиппокампа крысят из контрольной (*б*) и экспериментальной (*в*) групп; *дн* – дегенерирующий нейрон; окраска по Нисслю, масштабная линейка – 20 мкм. *з–е* – Электронограммы ткани поля CA1 гиппокампа крысят из контрольной (*з*) и экспериментальной (*д–е*) групп: нормальный нейрон (*з*), дегенерирующий нейрон с лизисом органоидов в цитоплазме (*д*), дегенерирующий нейрон с гиперхромной цитоплазмой и лизосомами (*е*).

хондрии), однако часто встречались лизосомы. В нейропиле гиппокампа наблюдали темные сморщенные дендритные отростки и терминали аксонов гиперхромных клеток с агглютинированными синнаптическими пузырьками.

3) Энторинальная кора. В энторинальной коре у крысят, перенесших пренатальную гипоксию, численность патологических изменений клеток по типу хроматолиза была выше, чем по гиперхроматозному типу. Это отмечали как на светооптическом, так и на

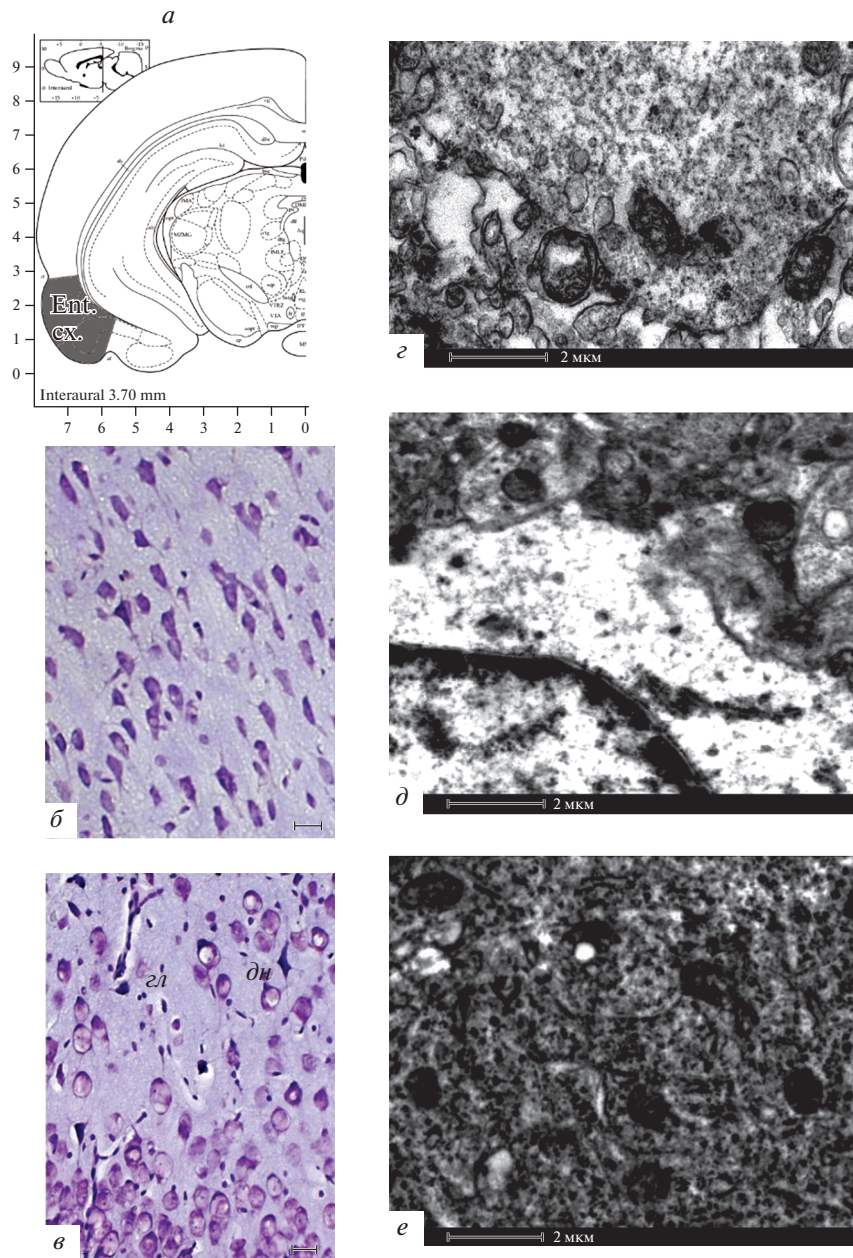


Рис. 3. Нейродегенеративные изменения в энторинальной коре 20-суточных крысят, перенесших пренатальную гипоксию. *а* – схема расположения анализируемой области энторинальной коры (Ent. cx.) (адаптация из: Paxinos, Watson, 2005). *б–в* – Микрофотографии поля энторинальной коры крысят контрольной (*б*) и экспериментальной (*в*) групп; *гл* – глиальная клетка *дн* – дегенерирующий нейрон, окраска по Нисслю, масштабная линейка – 20 мкм. *з–е* – Электроннограммы ткани энторинальной коры крысят из контрольной (*з*) и экспериментальной (*д–е*) групп: нормальный нейрон (*з*), дегенерирующий нейрон с лизисом органоидов в цитоплазме (*д*) и дегенерирующий нейрон с гиперхромной цитоплазмой и лизосомами (*е*).

электронномикроскопическом уровне, особенно во II и III слоях (рис. 3б–в). У экспериментальных животных наряду с нормальными клетками (рис. 3з) наблюдали нейроны с измененной структурой. На электронограммах видны признаки нейродегенеративных изменений по типу хроматолиза: набухание клеточных тел и их отростков, появление крупных вакуолей, лизис органоидов в цитоплазме (рис. 3д).

В редких случаях выявляли одиночные каналцы ЭПР с рибосомами. У дегенерирующих нейронов по типу гиперхроматоза происходило сморщивание клеточных тел и их отростков, цитоплазма становилась электронноплотной, объем клеточного ядра уменьшался, вокруг него наблюдали ободок темной цитоплазмы, в которой сложно различить органоиды (ЭПР и митохондрии) (рис. 3е). В цитоплазме та-

ких нейронов наблюдается повышенное число лизосом — признак деструктивных процессов. В энторинальной коре (так же как и в гиппокампе) крысят, перенесших пренатальную гипоксию, обнаружено большее количество глиальных клеток с отростками, расположенных вокруг дегенерирующих нейронов, по сравнению с контрольными крысятами того же возраста. Общее количество клеток снижалось (на $19.4 \pm 4.8\%$ от уровня контроля, $U = 5.2$, $p = 0.012$), среднее количество нейронов было также ниже, чем в контроле (на $21.7 \pm 3.5\%$ от уровня контроля, $U = 2.7$, $p = 0.007$).

Таким образом, морфологическое исследование двух важных отделов мозга, связанных с обонятельной функцией и имеющих центральное происхождение — энторинальной коры и гиппокампа — у крыс, перенесших пренатальную гипоксию, выявило наличие патологических изменений нейронов на ранней стадии постнатального развития.

Распределение неприлизина в нервной ткани. Иммуногистохимический анализ распределения нейрорептидазы НЕП в исследуемых структурах мозга проводили по сравнению с негативным контролем в отсутствие первичных антител к неприлизу (рис. 4а–у), когда не наблюдали заметной аутофлуоресценции и неспецифического мечения ткани мозга вторичными антителами. В ткани печени и почек крысы, использовавшихся в качестве позитивного контроля, отмечали флуоресцентный сигнал в области испускания FITC, что свидетельствовало в пользу работоспособности антител (рис. 4к, л).

Согласно результатам иммуногистохимического анализа распределения неприлизина в ткани головного мозга, этот белок локализован как в нейропиле, так и вблизи тел нейронов (рис. 4б, д, з). Вследствие достаточно широкой локализации неприлизина проводили количественный анализ средних значений уровня иммунохимической реакции к этому белку в наблюдаемом поле нервной ткани, включающей как клетки, так и нейропиле. У молодых крысят, перенесших пренатальную гипоксию (рис. 4в, е, и), интенсивность иммунохимической реакции на неприлизин в кортикальных отделах мозга была снижена относительно контрольных животных на 33.4% в энторинальной коре ($t = 3.81$; $p = 0.002$) и 17.4% в поле СА1 гиппокампа ($t = 2.81$; $p = 0.014$, рис. 4м). В ткани обонятельных луковиц различий в среднем уровне интенсивности иммунохимической реакции между контрольными животными и крысами, перенесшими пренатальную гипоксию, выявлено не было ($t = 0.66$; $p = 0.052$), однако наблюдали изменение топографии неприлизина с его преимущественной локализацией в центральной части обонятельной луковицы. Полученные данные свидетельствуют, что пренатальная гипоксия приводит к снижению

уровня неприлизина в энторинальной коре и гиппокампе развивающихся крысят.

Поведение животных. Результаты тестирования животных в тесте поиска пищи в течение фиксированного времени показали, что в среднем у интактных крысят ($n = 15$) эффективность поиска составляла 1.83 ± 0.06 баллов, а у их сверстников, перенесших пренатальную гипоксию ($n = 9$), этот параметр был на 43% ниже ($p < 0.01$ при $t = 4.1$) и составлял 1.04 ± 0.18 балла. Более детальный анализ исследуемого поведения показал, что у крысят, перенесших пренатальную гипоксию, чаще ($p < 0.01$ при $U = 21$) наблюдается безуспешный поиск с нулевым результатом и они реже ($p < 0.01$ при $t = 3.5$) находят оба куска печенья (рис. 5).

Количество обнюхиваний отверстий в полу экспериментальной камеры в процессе поиска корма у интактных и перенесших пренатальную гипоксию животных не различалось и составляло в этих группах 12.7 ± 0.86 и 14.9 ± 1.20 соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование обонятельной системы начинается уже в эмбриональный период, что важно для выживания новорожденных и развития сенсорных систем мозга в раннем постнатальном периоде (Franks, Isaacson, 2005), а ее нарушения ведут к значительным перестройкам в развитии нейрональных сетей, принимающих участие в обонятельном поведении животных (Pardo et al., 2018). Проведенное нами исследование показало, что пренатальная гипоксия оказывает существенное влияние на формирование молекулярно-клеточных характеристик обонятельной системы и ее функционирование у крысят в первый месяц постнатального развития.

Известно, что обонятельный анализатор состоит из нескольких отделов. Его периферическая часть представлена рецепторными клетками, расположенными в обонятельном эпителии слизистой оболочки полости носа, и обонятельным нервом, образованным их аксонами. Волокна обонятельного нерва заканчиваются в обонятельной луковице, где происходит передача сенсорной информации на вторичные нейроны. Из обонятельной луковицы аксоны нервных клеток идут в обонятельную кору, которая делится на 5 главных областей (переднее обонятельное ядро, пириформная кора, обонятельный бугорок, кортикомедиальные части миндалины, часть энторинальной коры), каждая из которых имеет связи с центральными и лимбическими структурами. Проекция нейронов обонятельных луковиц имеют довольно широкое представительство в кортикальных структурах (Ghosh et al., 2011; Sosulski et al., 2011), их активация приводит к стимуляции клеток в

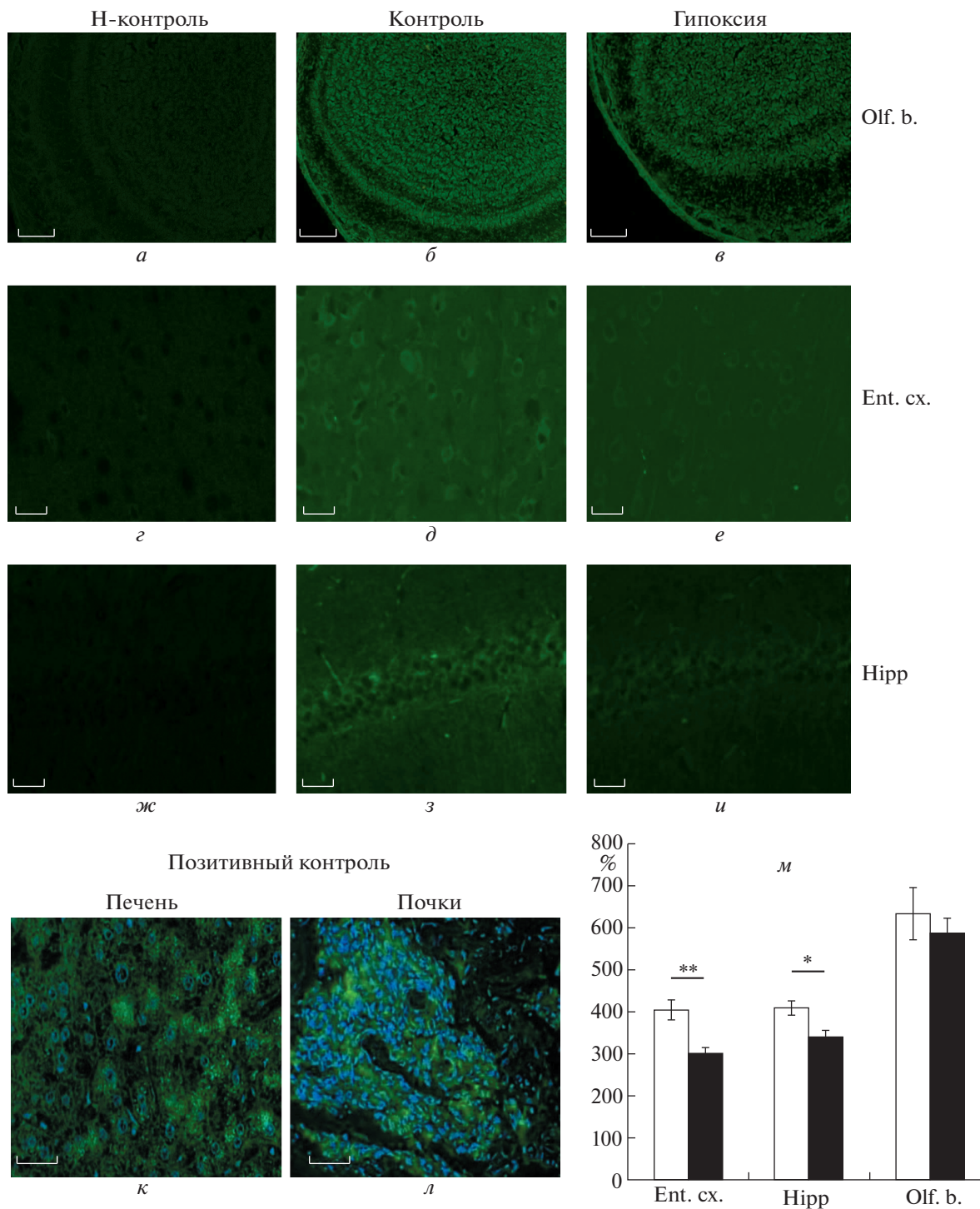


Рис. 4 Влияние пренатальной гипоксии на распределение металлопептидазы неприлизина (FITC-позитивный сигнал зеленого цвета) в ткани обонятельных луковиц (Olf. b.), энторинальной коры (Ent. cx.) и поля СА1 гиппокампа (Hipp.) у 20-суточных крысят (б, в, д, е, з, и). а, г, ж – Негативный (Н) контроль иммуногистохимического окрашивания ткани мозга в отсутствие первичных антител к неприлизину; иммунохимическая реакция отсутствует. к–л – Примеры позитивного контроля иммунохимической реакции на неприлизин; в качестве позитивного контроля использовали ткань печени (к) и почки (л) контрольного животного, которые характеризуются высоким содержанием неприлизина (зеленый цвет FITC); ядра окрашены DAPI (синий цвет). м – Результаты денситометрического анализа яркости свечения FITC-позитивных структур в ткани энторинальной коры (Ent. cx.), поля СА1 гиппокампа (Hipp) и обонятельной луковицы (Olf. b.) 20-суточных животных с нормальным развитием (контроль, белые столбики, n = 8) и крысят, перенесших пренатальную гипоксию (черные столбики, n = 8); данные представлены в виде среднего значения и его ошибки в % от уровня среднего значения свечения FITC в ткани Н-контроля; различия между контрольной и экспериментальной группами достоверны при * $p < 0.05$ и ** $p < 0.01$ (t-тест). Масштабная линейка: 100 (а–в) и 30 (г–л) мкм.

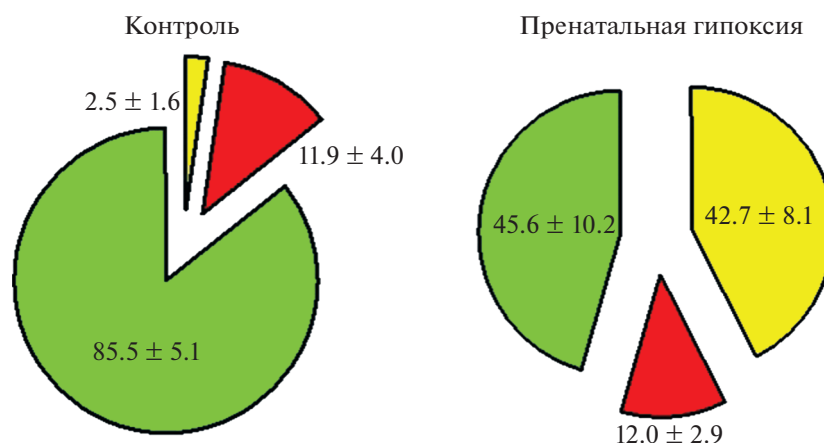


Рис. 5. Эффективность поиска пищи контрольными крысами ($n = 15$) и крысами, перенесшими пренатальную гипоксию ($n = 9$). Зеленый сектор – доля крысят, нашедших два куска корма, красный – нашедших один кусок, и желтый – доля крысят, не нашедших ни одного куска корма. Рядом с каждым сектором подписаны значения в процентах от суммарного количества животных (среднее \pm ошибка среднего). Различия между контрольной и экспериментальной группами по количеству животных, нашедших два куска корма или не нашедших ни одного куска, были статистически значимыми ($p < 0.01$).

различных отделах мозга (Arzi, Sobel, 2011). С другой стороны, к обонятельной луковице подходит множество центробежных волокон из головного мозга. По этим волокнам лимбические центры модулируют активность обонятельной луковицы, и таким образом один запах может иметь разное значение в зависимости от состояния животного и поведенческого контекста.

Проведенное нами морфологическое исследование обонятельных луковиц крыс, перенесших пренатальную гипоксию, не выявило каких-либо существенных структурных изменений нейронов и волокон обонятельного тракта, а также клеток митрального слоя, аксоны которого образуют проекционные пути от обонятельных луковиц в центральные отделы мозга. Этот факт может быть связан с тем, что основная масса нейронов обонятельных луковиц формируется у крысят после 15–16-х сут эмбрионального развития (Bailey et al., 1999), а в нашей работе экспериментальное патологическое воздействие на беременных самок осуществлялось на 14-й день беременности. Тем не менее, морфологическое исследование двух отделов мозга, связанных с обонятельной функцией (энторинальной коры и гиппокампа) крысят, перенесших пренатальную гипоксию, показало патологические изменения нейронов уже на ранней стадии развития мозга (P20). Описанные нами изменения характеризуют такие патологические состояния клеток, как хроматоллиз, гиперхроматоз и скопление лизосом. Кроме того, в обеих структурах мозга наблюдали снижение количества нейронов и активацию глиальных клеток и их отростков, окру-

жающих дегенерирующие нейроны. При этом в энторинальной коре наблюдали более глубокие изменения, чем в гиппокампе.

Как было показано нами ранее, пренатальная гипоксия на сроке E14 нарушает образование и миграцию нейробластов в нижние слои энторинальной коры, что приводит к снижению в них числа нейронов (Васильев и др., 2020). Гибель проекционных нейронов энторинальной коры также может приводить к нарушению афферентации нейронов гиппокампа и, как следствие, к их дегенерации. В свою очередь, нарушение связей между энторинальной корой и гиппокампом с другими кортикальными центрами и обонятельными луковицами может изменять характер реакции животных на обонятельные стимулы.

Использованная нами методика тестирования обонятельного поведения крысят основана на поиске пищи по запаху и может отражать как мотивацию, так и состояние обонятельной системы животного (Bianchi et al., 2014). В наших исследованиях эффективность поиска пищи у животных, перенесших пренатальную гипоксию, была значительно ниже, чем у интактных сверстников, и у них результат поиска чаще оказывался нулевым и реже стопроцентным. Вместе с тем число обнюхиваний отверстий в полу экспериментальной камеры в процессе поиска корма, отражающих мотивацию, у интактных животных и перенесших пренатальную гипоксию не различалось. Этот факт позволяет сделать вывод, что пренатальная гипоксия нарушает у животных именно обонятельную функцию, а не мотивацию пище-

вого поиска. Ранее в научной литературе сообщалось о влиянии неблагоприятных пренатальных воздействий на более сложные формы обонятельного поведения, связанные с ассоциативным обучением и памятью (Тюлькова, 2010; Akers et al., 2011). Полученные нами данные демонстрируют влияние пренатальной гипоксии на выполнение поиска пищи по запаху уже на ранних этапах развития животных, что, несомненно, связано с выявленными нами морфологическими изменениями в энторинальной коре и гиппокампе.

Обонятельные луковицы являются единственной структурой мозга, в которой неприлизин синтезируется в значительных количествах еще до рождения и в первые дни жизни крыс (Dutriez et al., 1992), что свидетельствует о его важной роли в функционировании обонятельной системы. В литературе активно обсуждаются данные об участии неприлизина в регуляции пептидэргической системы головного мозга (Nalivaeva et al., 2020). Известно, что неприлизин расщепляет соматостатин – основной медиатор пептидэргической передачи в обонятельных луковицах (Nocera et al., 2019) и гиппокампе (Barnes et al., 1995). Более того, неприлизин является основным амилоид-деградирующим ферментом, и дефицит его содержания и активности играет важную роль в патогенезе БА (см. обзор: Nalivaeva, Turner, 2019). При этом энторинальная кора и гиппокамп страдают первыми от накопления β -амилоидного пептида в ходе развития БА (Reilly et al., 2003).

Нарушение метаболизма соматостатина в обонятельных луковицах также лежит в основе нарушения обоняния при БА (Saiz-Sanchez et al., 2010). Полученные нами результаты иммунохимического окрашивания на неприлизин в обонятельных структурах согласуются с результатами других авторов, проводивших подобные окрашивания в ткани коры головного мозга и гиппокампа (Pacheco-Quinto et al., 2016) с преимущественной пресинаптической локализацией (Fukami et al., 2002; Iwata et al., 2004) и в телах парвалбумин-позитивных нейронов (Pacheco-Quinto et al., 2016).

Как было показано нами ранее, пренатальная гипоксия приводит к снижению экспрессии и активности неприлизина в коре и гиппокампе мозга крыс (Nalivaeva et al., 2012). Полученные нами результаты о различиях характера распределения и содержания белка неприлизина в обонятельных луковицах, энторинальной коре и гиппокампе крыс, перенесших пренатальную гипоксию, указывают на наличие функциональной связи между количеством этой пептидазы, изменениями в состоянии нервной ткани и обонятельным поведением животных. Снижение содержания неприлизина в энторинальной коре и гиппокампе мозга крыс после пренатальной

гипоксии может являться предпосылкой нарушения баланса А β в сторону его накопления, клеточной гибели и нейродегенерации. У человека такие изменения могут приводить к развитию спорадической формы БА и связанного с этим нарушением обоняния.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что нарушение обонятельной функции у молодых крыс, возникающее в результате пренатального гипоксического воздействия на 14-е сутки эмбрионального развития, может быть связано с патологическими изменениями нейронов энторинальной коры и гиппокампа и снижением в них содержания нейропептидазы неприлизина. При этом нейродегенеративные изменения в энторинальной коре животных, перенесших пренатальную гипоксию, выражены сильнее по сравнению с гиппокампом, что может свидетельствовать о более выраженном влиянии гипоксического воздействия на ее формирование.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность О.С. Алексеевой (ИЭФБ РАН) за оказание технической помощи в осуществлении гипоксического воздействия на крыс, а также Центру коллективного пользования научным оборудованием для физиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований (ЦКП) ИЭФБ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-015-00232) и согласно (частично) Госзаданию Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН № АААА-А18-118012290373-7.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с животными осуществляли в соответствии с утвержденным протоколом использования лабораторных животных Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, основанного на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Communities Council Directive #86/609 for the Care of Laboratory Animals).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Н.Л. Туманова: морфологические исследования, написание статьи; Д.С. Васильев: морфологические и иммуногистохимические исследования, статистическая обработка данных; Н.М. Дубровская: поведенческие эксперименты и статистическая обработка данных, Н.Н. На-

ливаева: анализ данных, написание и редактирование текста статьи; И.А. Журавин: модель пренатальной гипоксии, общее руководство выполнением работы и оценка полученных данных. Текст и графические изображения статьи одобрены всеми соавторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Калинина Д.С. 2020. Пренатальная гипоксия приводит к нарушению формирования нервной ткани энторинальной области коры мозга крыс. *Росс. Физиол. Журн.* Т. 106. № 10. С. 1278. (Vasilev D.S., Tumanova N.L., Kalinina D.S. 2020. Prenatal hypoxia disturbs the formation of pyramidal neurons in the entorhinal cortex of the rat brain. *Russ. J. Physiol.* V. 106. P. 1277).
<https://doi.org/10.31857/S086981392010012X>
- Гуляева Н.В., Бобкова Н.В., Колосова Н.Г., Самохин А.Н., Степаничев М.Ю., Стефанова Н.А. 2017. Молекулярно-клеточные механизмы патогенеза sporadicческой формы болезни Альцгеймера: исследование *in vivo* на моделях грызунов. *Биохимия.* Т. 82. С. 1427. (Gulyaeva N.V., Bobkova N.V., Kolosova N.G., Samokhin A.N., Stepanichev M.Yu., Stefanova N.A. 2017. Molecular and cellular mechanisms of sporadic Alzheimer's disease: Studies on rodent models *in vivo*. *Biochemistry M.* V. 82. P. 1088.)
<https://doi.org/10.1134/S0006297917100029>
- Дубровская Н.М., Журавин И.А. 2009. Онтогенетические особенности поведения крыс, перенесших гипоксию на 14-е или 18-е сутки эмбриогенеза. *Журн. Выssh. Нерв. Деят.* Т. 58. № 5. С. 616. (Dubrovskaya N.M., Zhuravin I.A. 2010. Ontogenetic characteristics of behavior in rats subjected to hypoxia on day 14 or day 18 of embryogenesis. *Neurosci. Behav. Physiol.* V. 40. P. 231).
<https://doi.org/10.1007/s11055-009-9235-2>
- Журавин И.А., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Багрова Д.И., Кочкина Е.Г., Плеснева С.А., Туманова Н.Л., Наливаева Н.Н. 2010. Когнитивные расстройства в онтогенезе млекопитающих при нарушении пренатального развития. *Психиатрия.* Т. 4. № 46. С. 36. (Zhuravin I.A., Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Bagrova D.I., Kochkina E.G., Plesneva S.A., Tumanova N.L., Nalivaeva N.N. 2010. Cognitive impairments in ontogenesis of mammals after disturbed prenatal development. *Psikhiatriia.* V. 4. № 46. P. 36.)
- Морозова С.В., Савватеева Д.М., Петрова Е.И. 2014. Обонятельные расстройства у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями. *Неврологический журн.* № 1. С. 4. (Morozova S.V., Savvateeva D.M., Petrova E.I. 2014. *Nevrologicheskii zhurnal.* № 1. P. 4.)
- Наливаева Н.Н., Бабусикова Е., Доброта Д., Тернер А. 2005. Влияние ишемии и реперфузии на содержание предшественника амилоидного пептида и продуктов его протеолиза в гиппокампе крыс. *Нейрохимия.* Т. 22. № 3. С. 207. (Nalivaeva N.N., Babusikova E., Dobrota D., Turner A.J. 2005. Effect of ischaemia and reperfusion on the content and degradation of amyloid precursor protein in the hippocampus of rats. *Neurochem. J.* V. 22. P. 207.)
- Туманова Н.Л., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Журавин И.А. 2018. Ультраструктурные изменения в сенсомоторной коре при отставании развития двигательного поведения в раннем онтогенезе крыс, перенесших пренатальную гипоксию. *Цитология.* Т. 60. № 5. С. 390. (Tumanova N.L., Vasiliev D.S., Dubrovskaya N.M., Zhuravin I.A. 2018. Changes in ultrastructure of the sensorimotor cortex accompanied by the motor behavior dysfunctions in the early ontogenesis of rats subjected to the prenatal hypoxia. *Tsitologiya.* V. 60. P. 390.)
<https://doi.org/10.31116/tsitol.2018.05.09>
- Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Самойлов М.О., Отеллин В.А. 2010. Механизмы формирования реакций мозга на действие гипербарической гипоксии в различные сроки пренатального периода развития у крыс. *Журн. акушерства и женских болезней.* Т. 59. № 4. С. 99. (Tul'kova E.I., Vataeva L.A., Samoilov M.O., Otellin V.A. 2010. Mechanisms of formation of brain reactions to hypobaric hypoxia in different periods of prenatal development of rats. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznei.* V. 59. P. 99.)
- Akers K.G., Kushner S.A., Leslie A.T., Clarke L., van der Kooy D., Lerch J.P., Frankland P.W. 2011. Fetal alcohol exposure leads to abnormal olfactory bulb development and impaired odor discrimination in adult mice. *Mol. Brain.* V. 4. P. 29. <http://www.molecularbrain.com/content/4/1/29>
- Arzi A., Sobel N. 2011. Olfactory perception as a compass for olfactory neural maps. *Trends Cogn. Sci.* V. 15. P. 537.
<https://doi.org/10/1016/j.tics.2011.09.007>
- Barnes K., Doherty S., Turner A.J. 1995. Endopeptidase-24.11 is the integral membrane peptidase initiating degradation of somatostatin in the hippocampus. *J. Neurochem.* V. 64. P. 1826.
<https://doi.org/10/1046/j.1471-4159.1995.64041826.x>
- Barresi M., Ciurleo R., Giacoppo S., Foti Cuzzola V., Celi D., Bramanti P., Marino S. 2012. Evaluation of olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases. *J. Neurol. Sci.* V. 323. P. 16.
<https://doi.org/10/1016/j.jns.2012.08.028>
- Bailey M.S., Puche A. C., Shipley M. T. 1999. Development of the olfactory bulb: Evidence for glia-neuron interactions in glomerular formation. *J. Comp. Neurol.* T. 415. № 4. P. 423–448.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19991227\)415:4<423::AID-CNE2>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19991227)415:4<423::AID-CNE2>3.0.CO;2-G)
- Bianchi P., Bettini S., Guidi S., Ciani E., Trazzi S., Stagni F., Ragazzi E., Franceschini V., Bartesaghi R. 2014. Age-related impairment of olfactory bulb neurogenesis in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Exp. Neurol.* V. 251. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.10.018>
- Carnemolla S.E., Hsieh J.W., Sipione R., Landis B.N., Kumfor F., Piguet O., Manuel A.L. 2020. Olfactory dysfunction in frontotemporal dementia and psychiatric disorders: A systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* V. 118. P. 588.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.08.002>
- Djordjevic J., Jones-Gotman M., De Sousa K., Chertkow H. 2008. Olfaction in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* V. 29. P. 693.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.11.014>

- Doty R.L.* 2012. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* V. 8. P. 329.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.80>
- Dutriez I., Salès N., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P.* 1992. Pre- and post-natal ontogeny of neutral endopeptidase 24-11 (“enkephalinase”) studied by in vitro autoradiography in the rat. *Experientia.* V. 48. P. 290.
<https://doi.org/10.1007/BF01930479>
- Franks K.M., Isaacson J.S.* 2005. Synapse-specific downregulation of NMDA receptors by early experience: a critical period for plasticity of sensory input to olfactory cortex. *Neuron.* V. 47. P. 101.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.024>
- Fukami S., Watanabe K., Iwata N., Haraoka Jo, Bao Lu, Gerard N.P., Gerard C., Fraser P., Westaway D., St. George-Hyslop P., Saido T.C.* 2002. A β -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with A β pathology. *Neurosci. Res.* V. 43. P. 39.
[https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(02\)00015-9](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(02)00015-9)
- Ghosh S., Larson S.D., Hefzi H., Marnoy Z., Cutforth T., Dokka K., Baldwin K.K.* 2011. Sensory maps in the olfactory cortex defined by long-range viral tracing of single neurons. *Nature.* V. 472. P. 217.
<https://doi.org/10.1038/nature09945>
- Iwata N., Mizukami H., Shirotani K., Takaki Y., Muramatsu S., Lu B., Gerard N.P., Gerard C., Ozawa K., Saido T.C.* 2004. Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid- β peptide in mouse brain. *J. Neurosci.* V. 24. P. 991.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4792-03.2004>
- Liu B., Luo Z., Pinto J.M., Shiroma E.J., Tranah G.H., Wirdfeldt K., Fang F., Harris T.B., Chen H.* 2019. Relationship between poor olfaction and mortality among community-dwelling older adults: A cohort study. *Ann. Intern. Med.* V. 170. P. 673.
<https://doi.org/10.7326/M18-0775>
- Murphy C.* 2019. Olfactory and other sensory impairments in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* V. 15. P. 11.
<https://doi.org/10.1038/s41582-018-0097-5>
- Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Lewis D.I., Pickles A.R., Makova N.Z., Bagrova D.I., Dubrovskaya N.M., Plesneva S.A., Zhuravin I.A., Turner A.J.* 2012. Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats. *J. Mol. Neurosci.* V. 46. P. 569.
<https://doi.org/10.1007/s12031-011-9644-x>
- Nalivaeva N.N., Fisk L., Kochkina E.G., Plesneva S.A., Zhuravin I.A., Babusikova E., Dobrota D., Turner A.J.* 2004. Effect of hypoxia/ischemia and hypoxic preconditioning/reperfusion on expression of some amyloid-degrading enzymes. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* V. 1035. P. 21.
<https://doi.org/10.1196/annals.1332.002>
- Nalivaeva N.N., Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Turner A.J., Zhuravin I.A.* 2020. Role of neprilysin in synaptic plasticity and memory. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* Т. 106. № 10. С. 1191. (*Ross. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova.* V. 106. № 10. P. 1191.)
<https://doi.org/10.31857/S0869813920100076>
- Nalivaeva N.N., Turner A.J.* 2019. Targeting amyloid clearance in Alzheimer’s disease as a therapeutic strategy. *Br. J. Pharmacol.* V. 176. P. 3447.
<https://doi.org/10.1111/bph.14593>
- Nocera S., Simon A., Fiquet O., Chen Y., Gascuel J., Datiche F., Schneider N., Epelbaum J., Viollet C.* 2019. Somatostatin serves a modulatory role in the mouse olfactory bulb: neuroanatomical and behavioral evidence. *Front. Behav. Neurosci.* V. 13. P. 61.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00061>
- Pacheco-Quinto J., Eckman Ch.B., Eckman E.A.* 2016. Major amyloid- β degrading enzymes endothelin-converting enzyme-2 and neprilysin are expressed by distinct populations of GABAergic interneurons in hippocampus and neocortex. *Neurobiol. Aging.* V. 48. P. 83.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.011>
- Pardo G.V.E., Lucion A.B., Calcagnotto M.E.* 2018. Postnatal development of inhibitory synaptic transmission in the anterior piriform cortex. *Int. J. Dev. Neurosci.* V. 71. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.07.008>
- Paxinos G., Watson C.* 2005. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Amsterdam—Boston: Elsevier AP.
- Reilly J.F., Games D., Rydel R.E., Freedman S., Schenk D., Young W.G., Morrison J.H., Bloom F.E.* 2003. Amyloid deposition in the hippocampus and entorhinal cortex: quantitative analysis of a transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 100. P. 4837.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0330745100>
- Saiz-Sanchez D., Ubeda-Bañon I., de la Rosa-Prieto C., Argandoña-Palacios L., García-Muñozguren S., Insausti R., Martínez-Marcos A.* 2010. Somatostatin, Tau, and β -amyloid within the anterior olfactory nucleus in Alzheimer disease. *Exp. Neurol.* V. 223. P. 347.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.06.010>
- Sosulski D.L., Lissitsyna Bloom M., Cutforth T., Axel R., Datta S.R.* 2011. Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. *Nature.* V. 472. P. 213.
<https://doi.org/10.1038/nature09868>
- Sun S., Li T., Davies H., Li W., Yang J., Li S., Ling S.* 2016. Altered morphologies and functions of the olfactory bulb and hippocampus induced by miR-30c. *Front. Neurosci.* V. 10. P. 207.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00207>
- Thomann P., Dos Santos V., Toro P., Schönknecht P., Essig M., Schröder J.* 2009. Reduced olfactory bulb and tract volume in early Alzheimer’s disease — a MRI study. *Neurobiol. Aging.* V. 30. P. 838.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.001>
- Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Tumanova N.L., Zhuravin I.A.* 2016. Prenatal hypoxia in different periods of embryogenesis differentially affects cell migration, neuronal plasticity, and rat behavior in postnatal ontogenesis. *Front. Neurosci.* V. 10. P. 126.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00126>
- Wang J., Eslinger P.J., Doty R.L., Zimmerman E.K., Grunfeld R., Sun X., Meadowcroft M.D., Connor J.R., Price J.L., Smith M.B., Yang Q.X.* 2010. Olfactory deficit detected by fMRI in early Alzheimer’s disease. *Brain Res.* V. 1357. P. 184.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.018>

Effect of Prenatal Hypoxia on Cytoarchitectonics and Ultrastructural Organisation of Brain Regions Related to Olfaction in Rats

N. L. Tumanova^a, D. S. Vasilev^{a,*}, N. M. Dubrovskaya^a, N. N. Nalivaeva^a, and I. A. Zhuravin^a

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

**e-mail: dvasilyev@bk.ru*

Using light and electron microscopy it was shown that on the 20th day after birth in rats subjected to prenatal hypoxia on E14 (7% O₂, 3 h) in the central parts of the olfactory system – the hippocampus and entorhinal cortex, there were significant neurodegenerative changes and decreased number of neurones, while in the peripheral part of the olfactory system, namely olfactory bulbs, no changes were observed. Immunohistochemical analysis also revealed changes in the content and distribution of a metallopeptidase, neprilysin (NEP), in the entorhinal cortex and hippocampus of rats subjected to prenatal hypoxia. These data allow us to conclude that the impairment of the olfactory function in young rats, caused by maternal hypoxia during pregnancy and manifested itself as worsened performance in the food search task, is underlined by the pathological changes in the cells of the olfactory system as well as by the decreased content of NEP.

Keywords: entorhinal cortex, hippocampus, neurodegeneration, olfactory behavior, olfactory bulbs, ontogenesis, neprilysin, prenatal hypoxia

ОЦЕНКА УРОВНЯ RAGE В КЛЕТКАХ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2021 г. Я. В. Горина¹, *, Е. Д. Осипова¹, А. В. Моргун¹, Е. Б. Бойцова¹,
О. Л. Лопатина¹, А. Б. Салмина¹

¹НИИ молекулярной медицины и патобиохимии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ, Красноярск, 660022 Россия

*E-mail: yana_20@bk.ru

Поступила в редакцию 28.09.2020 г.

После доработки 27.10.2020 г.

Принята к публикации 28.10.2020 г.

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное расстройство, при котором накопление β -амилоида и нейрофибриллярных клубков является определяющим патологическим признаком. Активация передачи сигналов белков RAGE (рецептора поздних продуктов гликозилирования) играет решающую роль в продукции β -амилоида, образовании нейрофибриллярных клубков и дегенерации нейронов. Цель работы – оценить влияние RAGE и его лиганда β -амилоида ($A\beta$ 1-42) на клетки эндотелия церебральных микрососудов в *in vitro* модели гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) при экспериментальной БА. При моделировании экспериментальной БА *in vitro* выявлено значимое ($P \leq 0.05$) повышение уровня RAGE на клетках эндотелия и снижение величины трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС) как в статической, так и динамической моделях ГЭБ. Однако блокирование активности белка RAGE привело к стойкому и длительному повышению величины ТЭС. При этом лиганд RAGE ($A\beta$ 1-42) вызвал уменьшение величины ТЭС. БА сопровождается изменением уровня RAGE на клетках эндотелия, что приводит к нарушению структурно-функциональной целостности ГЭБ. Однако блокирование активности белка RAGE ингибирует развитие эндотелиальной дисфункции и восстанавливает целостность ГЭБ, нарушенную действием β -амилоида.

Ключевые слова: RAGE, β -амилоид, эндотелий, ГЭБ, болезнь Альцгеймера

DOI: 10.31857/S0041377121010041

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой хроническое нейродегенеративное заболевание, поражающее различные области головного мозга и характеризующееся церебральным накоплением бляшек β -амилоида, которые усиливают образование нейрофибриллярных клубков (Jeong, 2017; Chen, 2018). Это способствует гибели нейронов и нарушению синаптической пластичности, усиливая воспаление, окислительный стресс и развитие церебральных микрососудистых осложнений (Sengupta et al., 2016).

Известно, что увеличение продукции β -амилоида в ткани головного мозга, характерное для большинства случаев БА, может быть вызвано различными причинами, при этом снижение скорости клиренса приводит к его накоплению в паренхиме головного мозга и, в конечном итоге, образованию сенильных

бляшек как ключевого признака БА (Oh et al., 2018). Рецептор конечных продуктов гликирования (RAGE), являющийся мультилигандным рецептором семейства иммуноглобулинов, участвует в патогенезе неврологических нарушений при БА, например, за счет участия в развитии нейровоспаления и взаимодействия с молекулой β -амилоида, выступающей в качестве его лиганда (Fang et al., 2010; Успенская и др., 2015). Гиперэкспрессия RAGE запускает каскад патологических событий, которые способствуют развитию окислительного стресса и нейровоспаления за счет повышения уровня ядерного фактора NF- κ B и провоспалительных цитокинов, что, в конечном итоге, приводит к дисфункции нервных клеток (Tóbon-Velasco et al., 2014).

Интересно, что повышение уровня RAGE диагностируется уже на ранней стадии развития БА (Takeuchi et al., 2007). Кроме того, RAGE обладает значимой транспортной активностью, что было показано не только для β -амилоида, но и для нейропептидов, в частности, окситоцина (Yamamoto et al., 2019). Экспериментально установлено, что аномальная транслокация β -амилоида через гематоэнцефа-

Принятые сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ТЭС – трансэндотелиальное электрическое сопротивление; LRP1 – low density lipoprotein receptor-related protein 1 (белок 1, подобный рецептору липопротеинов низкой плотности); $A\beta$ 1-42 – β амилоид.

лический барьер (ГЭБ) играет роль в развитии БА (Mohamed et al., 2017). Транслокация в основном осуществляется через RAGE и белок LRP1 – белок-1, подобный рецептору липопротеинов низкой плотности. При этом RAGE действует как транспортер, регулирующий поступление в ткань головного мозга β -амилоида, тогда как выход β -амилоида в периферический кровоток происходит при непосредственном участии LRP1 (Guo et al., 2016). Примечательно, что клинические исследования продемонстрировали взаимосвязь между патологическими признаками БА и уровнями LRP1 и RAGE, а именно, у пациентов с БА наблюдали низкий уровень LRP1 и высокий уровень RAGE, что в свою очередь вызывало интенсивное отложение церебрального β -амилоида (Donahue et al., 2006).

Клетки церебральных микрососудов являются основным компонентом гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и экспрессируют большое число транспортных молекул. Развитие церебральной амилоидной ангиопатии сопровождается нарушением целостности ГЭБ (Yamada et al., 2008). β -Амилоид оказывает RAGE-опосредованное цитотоксическое действие на белки плотных контактов между эндотелиальными клетками церебральных микрососудов (Wan et al., 2015). Показано, что взаимодействие β -амилоида с RAGE индуцирует повышение проницаемости ГЭБ за счет нарушения экспрессии белков плотных контактов (ZO-1) в плазматической мембране, увеличения секреции внутриклеточного кальция и секреции матриксной металлопротеиназы в культивируемых эндотелиальных клетках, что указывает на потенциальный молекулярный путь, лежащий в основе β -амилоид-RAGE-индуцированного нарушения целостности ГЭБ. При этом блокирование активности RAGE, ингибирование матриксной металлопротеиназы предотвращало вызванное β -амилоидом патологическое изменение содержания ZO-1, тем самым снижая негативное влияние β -амилоида на эндотелий микрососудов головного мозга и нейротоксический эффект (Kook et al., 2012).

Несмотря на значительный интерес к механизмам транспорта через ГЭБ и токсического действия β -амилоида на клетки эндотелия микрососудов головного мозга, многие стороны этих процессов остаются не выясненными. В связи с этим, цель настоящего исследования заключалась в оценке роли RAGE и его лиганда β -амилоида (A β 1-42) в клетках эндотелия церебральных микрососудов в модели ГЭБ *in vitro* при экспериментальной БА.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Материалом для создания моделей ГЭБ *in vitro* служили первичные культуры клеток астроцитов, нейронов и церебральных эндотелиоцитов, выделенные из головного мозга эмбрионов мыши линии C57BL/6.

Выделение церебральных эндотелиоцитов из коры головного мозга проводили согласно протоколу (Liu et al., 2013). Для этого выделяли кору головного мозга, мелко нарезали, центрифугировали при ускорении 150 g в течение 3 мин при 20°C. Затем добавляли 25% фетальной бычьей сыворотки (FBS, HyClone, Южная Америка), тритурировали, гомогенат центрифугировали при ускорении 600 g в течение 10 мин при 20°C. Забирали нижний слой, тритурировали и центрифугировали 3 раза, затем проводили ферментативную обработку пеллета 0.1%-ным раствором коллагеназы II (ПанЭко, Россия) при 37°C в течение 35 мин с последующим центрифугированием при ускорении 150 g в течение 5 мин. Далее культивировали фрагменты и отдельные эндотелиальные клетки в культуральных флаконах, покрытых желатином (gelatin solution 0.1%; Biological Industries, США) в культуральной среде, состоящей из DMEM (ПанЭко, Россия), 20% FBS (HyClone, Южная Америка), 3 мг/мл глюкозы (Sigma-Aldrich, США), 0.58 мг/мл глутамина (Sigma-Aldrich, США), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (HyClone, Южная Америка), при 5% CO₂ и 37°C.

Для культивирования нейросфер из головного мозга выделяли гиппокамп и стенки боковых желудочков, иссекали, помещали в 2%-ный раствор глюкозы (Sigma-Aldrich, США) в фосфатно-солевом буфере (Sigma-Aldrich, США) на 1 мин, далее удаляли супернатант, а оставшуюся ткань ресуспендировали в 1 мл культуральной среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, Канада), тритурировали. К полученной суспензии добавляли 1 мл культуральной среды NeuroCult NS-A Proliferation, собирали супернатант, центрифугировали при ускорении 150 g в течение 5 мин, затем удаляли супернатант и добавляли 1 мл культуральной среды NeuroCult NS-A Proliferation с последующей тритурацией.

С помощью цитометра Scepter Cell Counter (Millipore, США) проводили подсчет числа клеток. Клетки (1.5×10^6 кл./мл) рассевали в культуральные флаконы с 25 мл культуральной среды NeuroCult NS-A Proliferation, инкубировали при 5% CO₂ и 37°C. Обращивание нейросфер наблюдали через 24–48 ч.

Получение астроцитов и нейронов осуществляли из нейросфер согласно методике, представленной ранее (Моргун и др., 2013). Для этого использовали культуральную среду NeuroCult NS-A Proliferation Kit (StemCell, Канада), содержащую гепарин, основной фактор роста фибробластов (bFGF) и эпидермальный фактор роста EGF (Goustard-Langelier et al., 2012). Клетки (1.5×10^6 кл./мл) рассевали в культуральные флаконы с 25 мл культуральной среды, затем выполняли дифференцировку нейросфер в астроциты и нейроны в культуральной среде NeuroCult NS-A Differentiation Kit (Моргун и др., 2013).

Моделирование ГЭБ *in vitro*. После получения культур клеток-компонентов моделировали статическую и динамическую модели ГЭБ. Для создания

статической трехкомпонентной модели ГЭБ *in vitro* на дно 24-луночного планшета (Corning, США) засевали астроциты и нейроны по 1.5×10^5 клеток в каждую лунку. После чего на культуральные вставки добавляли столько же (1.5×10^5) церебральных эндотелиоцитов на каждую вставку. Далее клетки-компоненты ГЭБ со-культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с 10% FBS (HyClone, Южная Америка), 0.58 мг/мл глутамина (Sigma-Aldrich, США), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (HyClone, Южная Америка) в условиях CO₂-инкубатора. Моделирование экспериментальной БА в статической модели ГЭБ *in vitro* осуществляли путем добавления к клеткам Aβ1-42 (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 10 мкМ в питательной среде.

Динамическую модель ГЭБ *in vitro* использовали в двух вариантах: коммерческая закрытая система для микроперфузии CellASIC ONIX (Merck Millipore, США) и открытая система на основе перфузируемых вставок и лунок 24-луночного культурально-го планшета.

Для создания динамической модели ГЭБ с использованием системы микроперфузии CellASIC ONIX (Merck Millipore, США) в камеру планшета для микрофлюидной установки засевали клетки-компоненты ГЭБ для формирования трехмерной модели, при этом астроциты и нейроны были отделены от церебральных эндотелиоцитов мембраной рабочей камеры. Соотношение нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов составляло 1 : 2 : 1. Клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10% FBS (HyClone, Южная Америка), 0.58 мг/мл глутамина (Sigma-Aldrich, США), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (HyClone, Южная Америка) при скорости потока культуральной среды 1.25 мкл/ч при 5% CO₂ и 37°C в течение 48 ч. Моделирование экспериментальной БА в динамической модели ГЭБ *in vitro* осуществляли путем добавления к клеткам амилоида Aβ1-42 (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 10 мкМ в питательной среде.

Динамическая модель ГЭБ на основе перфузируемых вставок и лунок 24-луночного культурального планшета была разработана с возможностью использования шприцевого насоса со стеклянными шприцами типа Hamilton (Швейцария). При присоединении шприцев с обратной стороны каретки насоса была получена система для удаления жидкости из открытой камеры синхронизированно с ее подачей. Апробация системы происходила в течение 2-х сут. Учитывая разницу рабочих объемов лунок в системе CellASIC ONIX (Merck Millipore, США) и 24-луночного планшета, скорость потока среды была увеличена до 1.5 мкл/мин. Использование открытой системы на основе перфузируемых вставок и лунок позволило провести регистрацию ТЭС, что не представляется возможным при использовании закрытых систем.

Иммуногистохимическое исследование. Как в статической, так и динамической моделях ГЭБ *in vitro*, эндотелиальные клетки фенотипировали с использованием первичных антител против: ZO-1 (разведение 1 : 1000; Santa Cruz, Biotechnology, США), маркера астроцитов GFAP (1 : 1000), маркера нейронов NSE (1 : 1000) и вторичных антител Alexa Fluor 488 (1 : 1000; все от Abcam, Великобритания) согласно протоколу иммуногистохимии (García-Cabezas et al., 2016; Yu et al., 2016).

Для оценки экспрессии RAGE были сформированы 4 экспериментальные группы: контрольная К-I — интактные эндотелиоциты, культивируемые в статической модели ГЭБ; экспериментальная Э-I — эндотелиоциты в присутствии 10 мкМ Aβ1-42, культивируемые в статической модели ГЭБ (моделирование экспериментальной БА); контрольная К-II — интактные эндотелиоциты, культивируемые в динамической модели ГЭБ (закрытая система); экспериментальная Э-II — эндотелиоциты в присутствии 10 мкМ Aβ 1-42, культивируемые в динамической модели ГЭБ (закрытая система; моделирование экспериментальной БА).

Оценку наличия на поверхности целевой молекулы RAGE (Abcam, Великобритания) проводили по стандартному протоколу иммуноокрашивания (García-Cabezas et al., 2016; Yu et al., 2016). Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1 : 300. Время инкубации составляло 18 ч при 4°C. Вторичные антитела Alexa Fluor 488 (1 : 1000; Abcam, Великобритания) использовали в разведении 1 : 500, время инкубации составляло 2 ч при 37°C. Микроскопию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE (Bio-Rad, США). Считали относительное количество клеток, несущих каждый из видов антигена в образце при анализе не менее 10 полей зрения. При обработке результатов учитывали относительное количество всех клеток, несущих интересующую метку (метки) и выражали в процентах от их общего количества.

Регистрация трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС). Для непосредственного измерения ТЭС использовали эпителиальный вольтметр EVOM2 и электрод STX2 (World Precision Instruments, США). Регистрацию проводили при формировании модели ГЭБ *in vitro* в следующих экспериментальных группах: К-I (интактные эндотелиоциты, культивируемые в статической модели ГЭБ); Э-I с моделированием экспериментальной БА (эндотелиоциты в присутствии 10 мкМ Aβ1-42, культивируемые в статической модели ГЭБ); К-III (интактные эндотелиоциты, культивируемые в динамической модели ГЭБ (открытой системе)); Э-III с моделью экспериментальной БА — эндотелиоциты в присутствии 10 мкМ Aβ1-42, культивируемые в динамической модели ГЭБ (открытой системе).

Модуляция активности RAGE и регистрация ТЭС. Для подавления активности RAGE в клетках эндоте-

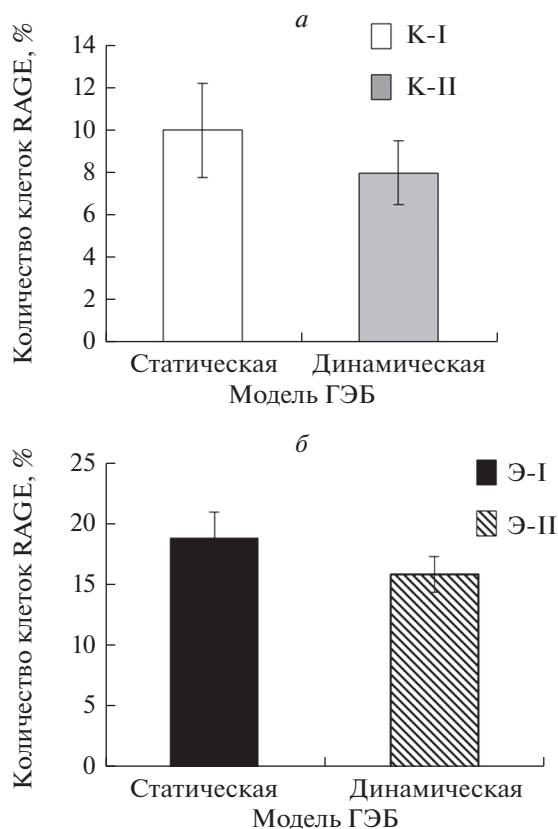


Рис. 1. Уровень RAGE на клетках эндотелия при культивировании в статической и динамической моделях ГЭБ *in vitro*. *а* – количество RAGE⁺-клеток интактных эндотелиоцитов, культивируемых в статической (контрольная группа К-I) и динамической (контрольная группа К-II) моделях ГЭБ *in vitro* (различия статистически не значимы; $P > 0.05$, U-критерий Манна–Уитни); *б* – количество RAGE⁺-клеток эндотелиоцитов в экспериментальных группах при культивировании в присутствии 10 мкМ Аβ1-42 в статической (группа Э-I) и динамической (группа Э-II) моделях ГЭБ *in vitro* (различия статистически не значимы; $P > 0.05$, U-критерий Манна–Уитни). Показано количество иммунопозитивных клеток (RAGE⁺) в % от общего количества клеток в поле зрения. На рис. 1–4 результаты представлены в виде Me (Q1; Q3).

тактная – культура эндотелиальных клеток без воздействия siRNA или химических модуляторов; группа siRNA RAGE – эндотелиальные клетки после воздействия siRNA RAGE и группа Аβ1-42 – эндотелиальные клетки после воздействия лиганда RAGE (Аβ1-42).

Статистический анализ. Анализ полученных результатов проводили с помощью программы GraphPad Prizm 8.0.1 (версия 8.0, США). Критерий Колмагорова–Смирнова использовали для оценки нормальности распределения. При отсутствии условий нормальности распределения применяли U-критерий Манна–Уитни. Различия принимали значимыми при $P \leq 0.05$. Результаты представлены в виде Me (Q1; Q3), где Me – медиана, Q1 – нижний квартиль, Q3 – верхний квартиль.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке уровня RAGE в интактных эндотелиоцитах, которые культивировали в условиях статической и динамической моделей ГЭБ *in vitro*, мы не обнаружили значимых различий ($P > 0.05$). Подобную ситуацию наблюдали и при моделировании экспериментальной БА *in vitro* (при культивировании клеток с Аβ1-42 в концентрации 10 мкМ) как в статической, так и динамической моделях ГЭБ *in vitro* (рис. 1*а, б*).

Однако необходимо отметить, что влияние β-амилоида в статических и динамических моделях ГЭБ *in vitro* вызвало однонаправленные изменения количества эндотелиальных клеток, несущих RAGE (рис. 2*а, б*) – количество клеток с RAGE возросло.

При оценке влияния условий культивирования интактных клеток, а также в экспериментальной модели БА установлено, что присутствие в модели Аβ1-42 приводит к статистически значимому ($P \leq 0.05$) снижению величины ТЭС, как в статической, так и динамической моделях ГЭБ *in vitro*, что соответствует повышению проницаемости ГЭБ, регистрируемому вследствие токсического действия β-амилоида. Также выявлено, что культивирование клеток в динамической модели приводит к статистически значимому ($P \leq 0.05$) увеличению величины ТЭС, как в контрольной группе клеток, так и при моделировании БА *in vitro* (рис. 3).

При оценке эффектов модуляции RAGE в контрольной культуре эндотелиальных клеток (группа К-III) с использованием Аβ1-42 в качестве лиганда и соответствующей siRNA для блокирования активности RAGE, выявлены изменения величины ТЭС. Блокирование активности RAGE приводит к статистически значимому ($P \leq 0.05$) увеличению показателей ТЭС в первые часы наблюдения с последующим его уменьшением к концу суток. Культивирование эндотелиальных клеток в присутствии лиганда RAGE (Аβ1-42) практически не оказало влияния на величину ТЭС (рис. 4*а*).

Для химической модуляции активности RAGE в качестве лиганда RAGE использовали Аβ1-42 (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 1 мкМ, инкубацию клеток проводили в течение 1 ч.

Для химической модуляции активности RAGE в качестве лиганда RAGE использовали Аβ1-42 (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 1 мкМ, инкубацию клеток проводили в течение 1 ч.

Регистрацию ТЭС через 1, 2, 4, 6 и 24 ч проводили в контрольной группе К-III и группе Э-III, в каждой из которой было сформировано по 3 подгруппы: ин-

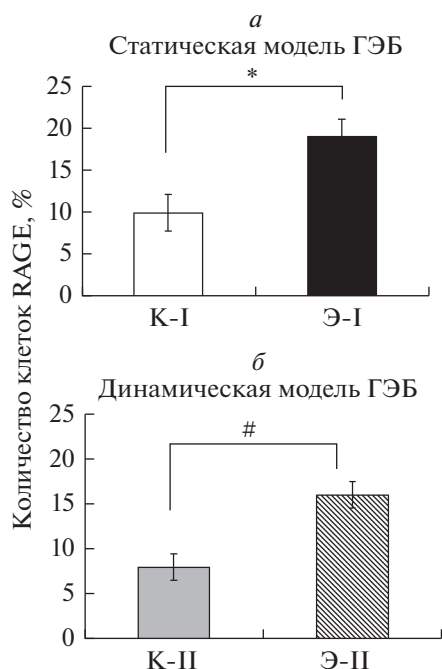


Рис. 2. Влияние β -амилоида на уровень RAGE на клетках эндотелия при культивировании в статической и динамической моделях ГЭБ *in vitro*. *a* – Количество RAGE⁺-эндотелиоцитов в контрольной (К-I) и экспериментальной (Э-I) группах при культивировании в статической модели ГЭБ *in vitro*; *б* – количество RAGE⁺-эндотелиоцитов в контрольной (К-II) и экспериментальной (Э-II) группах при культивировании в динамической модели ГЭБ *in vitro*. Количество положительных клеток представлено в процентах от общего количества клеток в поле зрения. *, #Различия статистически значимы при $P < 0.05$, U-критерий Манна–Уитни.

Однако в модели БА *in vitro* блокирование экспрессии RAGE привело к более стойкому и длительному повышению величины ТЭС. При этом лиганд RAGE вызвал уменьшение величины ТЭС через 24 ч после его добавления к культуре клеток (рис. 4б).

ОБСУЖДЕНИЕ

При развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа β -амилоид может накапливаться в ткани мозга за счет усиленной продукции, значительного транспорта из крови и нарушенной элиминации. Как известно, существует три пути элиминации β -амилоида в головном мозге: трансбарьерная доставка в периферический кровоток, деградация в ткани мозга и периваскулярный дренаж (Ueno et al., 2014), а соотношение активности RAGE и LRP1 определяет эффективность клиренса β -амилоида (Deane et al., 2004; Gool et al., 2019), которые рассматриваются в качестве терапевтических мишеней при лечении БА (Jedlitschky et al., 2014). При этом скорость клиренса через ГЭБ в 6 раз выше, чем через общий поток спинномозговой жидкости (Bell et al., 2007) и примерно в

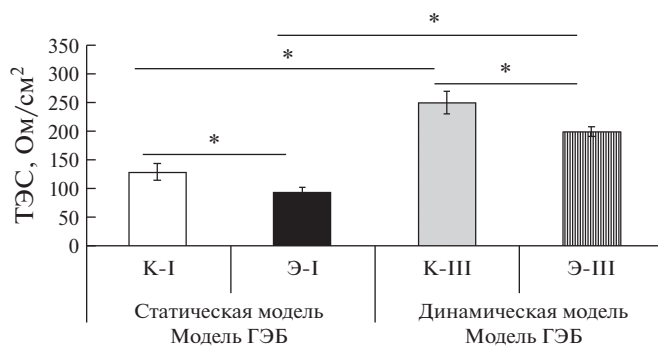


Рис. 3. Изменение трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС) в статической и динамической моделях ГЭБ *in vitro* в контрольных и экспериментальных группах. *Различия между группами статистически значимы при $P < 0.05$, U-критерий Манна–Уитни.

2 раза выше, чем скорость деградации (Qosa et al., 2014). Таким образом, нарушение притока и оттока β -амилоида через ГЭБ, по-видимому, являются основным триггером его накопления в головном мозге (Bloom, 2014; Welikovitsh et al., 2018).

Повышение уровня RAGE в головном мозге регистрируется уже на ранней стадии БА (Criscuolo et al., 2017), тем самым ускоряя процесс нейродегенерации (Origlia et al., 2009). Важно отметить и то, что, согласно данным клинических исследований, у пациентов с БА повышенная иммунореактивность RAGE наблюдается в основном в нейронах, микроглии и астроцитах гиппокампа и нижней лобной коре (Lue et al., 2001). Недавние исследования показали, что после добавления к культуре нейрональных клеток гиппокампа A β 25–35 наблюдали увеличение содержания RAGE, толл-подобного рецептора 4 (TLR4) и ядерного фактора kB на уровне мРНК, наряду с медиаторами воспаления (HMGB1, IL-1 β , IL-6 и TNF- α). Этот факт указывает на то, что нейровоспаление является ключевым фактором в прогрессировании БА посредством активации передачи сигналов RAGE/TLR4 (Nan et al., 2019).

Кроме того, гиперэкспрессия RAGE на эндотелии церебральных микрососудов у пациентов с БА наблюдается уже на ранней стадии и заметно увеличивается по мере прогрессирования заболевания (Miller et al., 2008). Поэтому помимо интенсификации процессов транспорта β -амилоида в ткань головного мозга, повреждающее действие β -амилоида может выражаться в альтерации межклеточных взаимодействий в ГЭБ и нарушении метаболизма клеток эндотелия, нарушая процессы неопангеогенеза и механизмы поддержания целостности барьера.

Мы обнаружили, что *in vitro* модели ГЭБ (статическая и динамическая конфигурации) пригодны для изучения роли RAGE в клетках церебрального эндотелия в (пато)физиологических условиях. Используя эти модели, мы обнаружили, что в эндотелии увеличивается уровень RAGE, ответственных за

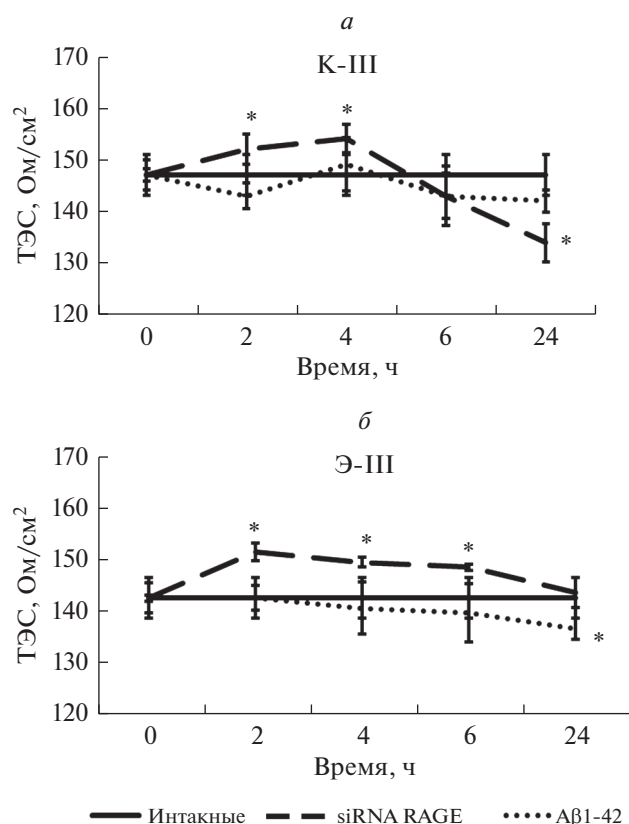


Рис. 4. Влияние RAGE-модуляторов на величину ТЭС в динамической модели ГЭБ *in vitro*. *а* – В контрольной группе (К-III); *б* – в экспериментальной группе (Э-III). *Различия между группами статистически значимы при $P < 0.05$, U-критерий Манна–Уитни.

транспорт β -амилоида, что способствует увеличению проницаемости ГЭБ, реализуемой за счет парацеллюлярного транспорта и (или) повреждения клеток эндотелия. Подавление экспрессии RAGE предупреждает развитие патологической проницаемости ГЭБ *in vitro*. Коль скоро повышение ТЭС регистрируется и в интактном эндотелии с подавленной экспрессией RAGE, логично предположить, что физиологический уровень экспрессии RAGE повышает пассивную парацеллюлярную проницаемость ГЭБ. Важно, что как статическая, так и динамическая модели ГЭБ демонстрируют схожие качественные и количественные характеристики не только в физиологических условиях, но и при моделировании эндотелиотоксического эффекта β -амилоида *in vitro*, что служит основанием для рекомендации их применения для решения задач нейробиологии и нейрофармакологии при изучении нейродегенерации альцгеймеровского типа.

Ранее было показано применительно к RAGE в нейронах, что снижение активности RAGE может иметь цитопротекторный эффект, особенно для сохранения нейрональной функции на ранних стадиях развития заболевания (Arancio et al., 2004). Полученные

нами результаты расширяют представления о роли RAGE в регуляции проницаемости ГЭБ в норме и при нейродегенерации альцгеймеровского типа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с животными проводили с соблюдением принципов гуманности, которые изложены в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС). Эксперименты проводили с разрешения биоэтической комиссии по работе с животными при локальном этическом комитете Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (Выписка из протокола № 7 от 11 февраля 2019 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Моргун А.В., Кувачева Н.В., Комлева Ю.К., Кутищева И.А., Окунева О.С., Дробушевская А.И., Хилажева Е.Д., Черепанов С.М., Салмина А.Б. 2013. Дифференцировка эмбриональных прогениторных клеток мозга крыс в астроциты и нейроны. Сибирское медицинское обозрение. № 6. С. 9. (Morgun A.V., Kuvacheva N.V., Komleva Yu.K., Kutishcheva I.A., Okuneva O.S., Drobushvskaya A.I., Khilazheva E.D., Cherepanov S.M., Salmina A. B. 2013. Differentiation of rat brain embryonic progenitor cells into astrocytes and neurons. Siberian Med. J. Revi. № 6. P. 9.)
- Успенская Ю.А., Комлева Ю.К., Пожиленкова Е.А., Салмин В.В., Лопатина О.Л., Фурсов А.А., Лаврентьев П.В., Белова О.А., Салмина А.Б. 2015. Лиганды RAGE-белков: роль в межклеточной коммуникации и патогенезе воспаления. Вестник Российской академии медицинских наук. Т. 70. № 6. С. 704. (Uspenskaya Yu.A., Komleva Yu.K., Pozhilenkova E.A., Salmin V.V., Lopatina O.L., Fursov A.A., Lavrent'ev P.V., Belova O.A., Salmina A.B. 2015. RAGE Protein ligands: Role in cellular communication and inflammation pathogenesis. Bulletin Russ. Acad. Med. Scis. V. 70. № 6. P. 704.)
- Arancio O., Zhang H.P., Chen X., Lin C., Trinchese F., Puzzo D., Liu S., Hegde A., Yan F.S., Stern A., Luddy J.S., Lue L.-F., Walker D.G., Roher A., Buttini M. et al. 2004. RAGE Potentiates abeta-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice. EMBO J. V. 23. P. 4096. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600415>
- Bell R.D., Sagare A.P., Friedman A.E., Bedi G.S., Holtzman D.M., Deane R., Zlokovic B.V. 2007. Transport pathways for clearance of human alzheimer's amyloid beta-peptide and apo-lipoproteins e and j in the mouse central nervous system. J. Cereb. Blood Flow Metab. V. 27. P. 909. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600419>

- Bloom G.S.* 2014. Amyloid- β and Tau: The Trigger and Bullet in Alzheimer Disease Pathogenesis. *JAMA Neurol.* V. 71. P. 505.
https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.5847
- Chen Y.G.* 2018. Research progress in the pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Chin. Med. J. (Engl).* V. 131. P. 624.
https://doi.org/10.4103/0366-6999.235112
- Criscuolo C., Fontebasso V., Middei S., Stazi M., Ammassari-Teule M., Yan S.S., Origlia N.* 2017. Entorhinal cortex dysfunction can be rescued by inhibition of microglial rage in an Alzheimer's disease mouse model. *Sci. Rep.* V. 7. P. 42370.
https://doi.org/10.1038/srep42370
- Deane R., Wu Z., Zlokovic B.V.* 2004. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke.* V. 35. P. 2628.
https://doi.org/10.1161/01.STR.0000143452.85382.d1
- Donahue J.E., Flaherty S.L., Johanson C.E., Duncan J.A., Silverberg G.D., Miller M.C., Tavares R., Yang W., Wu Q., Sabo E., Hovanessian V., Stopa E.G.* 2006. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* V. 112. P. 405.
https://doi.org/10.1007/s00401-006-0115-3
- Fang F., Lue L.-F., Yan S., Xu H., Luddy J.S., Chen D., Walker D.G., Stern D.M., Yan S., Schmidt A.M., Chen J.X., Yan S.S.* 2010. RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* V. 24. P. 1043.
https://doi.org/10.1096/fj.09-139634
- García-Cabezas M.Á., John Y.J., Barbas H., Zikopoulos B.* 2016. Distinction of neurons, glia and endothelial cells in the cerebral cortex: an algorithm based on cytological features. *Front. Neuroanat.* V. 10. P. 107.
https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00107
- Gool B.V., Storck S.E., Reekmans S.M., Lechat B., Gordts P.L.S.M., Pradier L., Pietrzik C.U., Roebroek A.J.M.* 2019. LRP1 Has a predominant role in production over clearance of A β in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* V. 56. P. 7234.
https://doi.org/10.1007/s12035-019-1594-2
- Goustard-Langelier B., Koch M., Lavielle M., Heberden C.* 2012. Rat neural stem cell proliferation and differentiation are durably altered by the in utero polyunsaturated fatty acid supply. *J. Nutr. Biochem.* V. 24. P. 380.
https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.08.001
- Guo Y.-X., He L.-Y., Zhang M., Wang F., Liu F., Peng W.-X.* 2016. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates expression of LRP1 and RAGE *in vitro* and *in vivo*, enhancing A β 1-40 brain-to-blood efflux and peripheral uptake transport. *Neuroscience.* V. 322. P. 28.
https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.041
- Jedlitschky G., Grube M., Mosyagin I., Kroemer H.K., Vogelgesang S.* 2014. Targeting CNS transporters for treatment of neurodegenerative diseases. *Curr. Pharm. Des.* V. 20. P. 1523.
https://doi.org/10.2174/13816128113199990460
- Jeong S.* 2017. Molecular and cellular basis of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Mol. Cells.* V. 40. P. 613.
https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0096
- Kook S.-Y., Hong H.S., Moon M., Ha C.M., Chang S., Mook-Jung I.* 2012. A β ₁₋₄₂-RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca²⁺-calcineurin signaling. *J. Neurosci.* V. 32. P. 8845.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6102-11.2012
- Liu Y., Xue Q., Tang Q., Hou M., Qi H., Chen G., Chen W., Zhang J., Chen Y., Xu X.* 2013. A simple method for isolating and culturing the rat brain microvascular endothelial cells. *Microvasc. Res.* V. 90. P. 199.
https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.08.004
- Lue L.F., Walker D.G., Brachova L., Beach T.G., Rogers J., Schmidt A.M., Stern D.M., Yan S.D.* 2001. Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: Identification of a cellular activation mechanism. *Exper. Neurol.* V. 1. P. 29.
https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7732
- Miller M.C., Tavares R., Johanson C.E., Hovanessian V., Donahue J.E., Gonzalez L., Silverberg G.D., Stopa E.G.* 2008. Hippocampal RAGE immunoreactivity in early and advanced Alzheimer's disease. *Brain Res.* V. 1230. P. 273.
https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.06.124
- Mohamed L.A., Zhu H., Mousa Y.M., Wang E., Qiu W.Q., Kaddoumi A.* 2017. Amylin enhances amyloid- β peptide brain to blood efflux across the blood-brain barrier. *J. Alzheimers Dis.* V. 56. P. 1087.
https://doi.org/10.3233/JAD-160800
- Nan K., Han Y., Fang Q., Huang C., Yu L., Ge W., Xiang F., Tao Y.-X., Cao H., Li J.* 2019. HMGB1 gene silencing inhibits neuroinflammation via down-regulation of NF- κ B signaling in primary hippocampal neurons induced by A β 25-35. *Int. Immunopharmacol.* V. 67. P. 294.
https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.12.027
- Oh S., Son M., Choi J., Lee S., Byun K.* 2018. sRAGE prolonged stem cell survival and suppressed RAGE-related inflammatory cell and T lymphocyte accumulations in an Alzheimer's disease model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 495. P. 807.
https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.035
- Origlia N., Arancio O., Domenici L., Yan S.S.* 2009. Beta-Amyloid and synaptic dysfunction: The role of RAGE affiliations expand. *Expert Rev. Neurother.* V. 9. P. 1635.
https://doi.org/10.1586/ern.09.107
- Qosa H., Abuasal B.S., Romero I.A., Weksler B., Couraud P.-O., Keller J.N., Kaddoumi A.* 2014. Differences in amyloid- β clearance across mouse and human blood-brain barrier models: Kinetic analysis and mechanistic modeling. *Neuropharmacol.* V. 79. P. 668.
https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.01.023
- Sengupta U., Nilson A.N., Kaye R.* 2016. The role of amyloid- β oligomers in toxicity, propagation, and immunotherapy. *EBioMedicine.* V. 6. P. 42.
https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.035
- Takeuchi M., Sato T., Takino J., Kobayashi Y., Furuno S., Kikuchi S., Yamagishi S.* 2007. Diagnostic utility of serum or cerebrospinal fluid levels of toxic advanced glycation endproducts (TAGE) in early detection of Alzheimer's disease. *Med. Hypotheses.* V. 69. P. 1358.
https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.12.017
- Tóbon-Velasco J.C., Cuevas E., Torres-Ramos M.A.* 2014. Receptor for ages (rage) as mediator of NF-kb pathway activation in neuroinflammation and oxidative stress. *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.* V. 13. P. 1615.
https://doi.org/10.2174/1871527313666140806144831

- Ueno M., Chiba Y., Matsumoto K., Nakagawa T., Miyanaka H. 2014. Clearance of beta-amyloid in the brain. *Curr. Med. Chem.* V. 21. P. 4085.
<https://doi.org/10.2174/0929867321666141011194256>
- Wan W., Cao L., Liu L., Zhang C., Kalionis B., Tai X., Li Y., Xia S. 2015. A β (1-42) oligomer-induced leakage in an in vitro blood-brain barrier model is associated with up-regulation of RAGE and metalloproteinases, and down-regulation of tight junction scaffold proteins. *J. Neurochem.* V. 134. P. 382.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13122>
- Welikovich L.A., Carmo S.D., Maglóczy Z., Szocsics P., Lőke J., Freund T., Cuello A.C. 2018. Evidence of intraneuronal A β accumulation preceding Tau pathology in the entorhinal cortex. *Acta Neuropathol.* V. 136. P. 901.
<https://doi.org/10.1007/s00401-018-1922-z>
- Yamada K., Hashimoto T., Yabuki C., Nagae Y., Tachikawa M., Strickland D.K., Liu Q., Bu G., Basak J.M., Holtzman D.M., Ohtsuki S., Terasaki T., Iwatsubo T. 2008. The low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates uptake of amyloid beta peptides in an in vitro model of the blood-brain barrier cells. *J. Biol. Chem.* V. 283. P. 34554.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M801487200>
- Yamamoto Y., Liang M., Munesue S., Deguchi K., Harashima A., Furuhashi K., Yuhi T., Zhong J., Akther S., Goto H., Eguchi Y., Kitao Y., Hori O., Shiraishi Y., Ozaki N. et al. 2019. Vascular RAGE transports oxytocin into the brain to elicit its maternal bonding behaviour in mice. *Commun. Biol.* V. 2. P. 76.
<https://doi.org/10.1038/s42003-019-0325-6>
- Yu Q.C., Song W., Wang D., Zeng Y.A. 2016. Identification of blood vascular endothelial stem cells by the expression of protein C receptor. *Cell Res.* V. 26. P. 1079.
<https://doi.org/10.1038/cr.2016.85>

Assessment of the Level of RAGE in Cells Blood–Brain Barrier in Experimental Alzheimer’s Disease

Ya. V. Gorina^{a, *}, E. D. Osipova^a, A. V. Morgun^a, E. B. Boytsova^a, O. L. Lopatina^a, and A. B. Salmina^a

^aResearch Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Krasnoyarsk, 660022 Russia

*e-mail: yana_20@bk.ru

Alzheimer’s disease is a progressive neurodegenerative disorder in which the accumulation of β -amyloid and neurofibrillary tangles is a determining pathological sign. Activation of RAGE plays a decisive role in the production and aggregation of β -amyloid, formation of neurofibrillary tangles and degeneration of neurons. The aim of this work is to assess the influence of RAGE and its ligands – β -amyloid (A β 1-42) on endothelial cells of cerebral microvascular in model blood-brain barrier (BBB) *in vitro* with experimental Alzheimer’s disease. Modeling of experimental Alzheimer’s disease *in vitro* caused a significant ($P \leq 0.05$) increase expression of RAGE on endothelial cells and decrease in the transendothelial electric resistance (TEER) in both the static and dynamic models BBB. However, suppressed expression of RAGE led to a persistent and long-term increase value of TEER. In this case, the ligand RAGE – A β 1-42 – caused reduced parameters of TEER. Alzheimer’s disease is accompanied by pathological changes in the expression of RAGE on endothelial cells, thereby leading to altered structural and functional integrity of the BBB. Blocking the RAGE expression in cerebral endothelial cells inhibits development of endothelial dysfunction and restores integrity of BBB impaired by the action of β -amyloid.

Keywords: RAGE, β -amyloid, endothelium, BBB, Alzheimer’s disease

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ИНКАПСУЛЯЦИИ В АЛЬГИНАТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ EGF И FGF2 НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА В УСЛОВИЯХ ПОНИЖЕННОЙ АДГЕЗИИ *IN VITRO*

© 2021 г. С. Ю. Филиппова^{1, *}, А. О. Ситковская¹, Е. С. Бондаренко¹, И. А. Новикова¹,
Д. А. Харагезов¹, В. В. Позднякова¹, О. В. Хохлова¹, О. И. Кит¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Министерства здравоохранения РФ,
Ростов-на-Дону, 344037 Россия

*E-mail: filsv@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.10.2020 г.

После доработки 30.11.2020 г.

Принята к публикации 01.12.2020 г.

Опухолевые стволовые клетки (ОСК) являются перспективными мишенями для разработки новых противораковых средств. Успехи в изучении свойств этой субпопуляции опухолевых клеток во многом зависят от подбора адекватных методов идентификации и выделения. Для оценки возможностей инкапсуляции в альгинат в контексте исследования свойств ОСК мы тестировали влияние факторов роста EGF и FGF2 на размер колоний культур колоректального рака в условиях пониженной адгезии. Исследование показало, что добавление экзогенных факторов роста приводит к замедлению роста колоний культуры HT-29 и усилению роста Сасо-2, не оказывая существенного влияния на культуру клеток НСТ116. Таким образом, инкапсуляция в альгинат с дальнейшим измерением размера образующихся колоний может быть применена для создания теста, аналогичного классическому тесту на образование колоний в полужидком агаре, с перспективой дальнейшего расширения спектра применения метода с добавлением химических модификаций альгината, сокультивирования разных типов клеток и других дополнений.

Ключевые слова: альгинат, опухолевые стволовые клетки, эпидермальный фактор роста, базовый фактор роста фибробластов, колоректальный рак

DOI: 10.31857/S0041377121020024

Теория опухолевых стволовых клеток (ОСК) утверждает, что метастазирование, рост и возобновление опухоли поддерживаются небольшой субпопуляцией клеток, обладающих свойствами, присущими нормальным стволовым клеткам – способностью к самоподдержанию, устойчивостью к действию лекарственных препаратов, мощными механизмами репарации ДНК, устойчивостью к апоптозу и др. (Пучинская, 2016; Battle, Clevers, 2017). Данная концепция вдохновила исследователей на разработку инновационных стратегий лечения рака, направленных не столько на уменьшение объема опухоли, сколько на прицельное уничтожение популяции ОСК (Du et al., 2019).

Успех исследований в области биологии ОСК связан с возможностью точной идентификации и выделения клеток опухоли, обладающих свойствами стволовых. Методы идентификации ОСК базируются на использовании присущих им характерных

свойств, которые в общем можно разделить на три группы. К первой группе относятся методы, которые эксплуатируют способность ОСК к усиленной экскреции из клетки флуоресцентных красителей за счет увеличенной экспрессии АВС-транспортёров на их поверхности (Song et al., 2010; Pattabiraman, Weinberg, 2014). Усиленное выведение красителей применяется для идентификации и измерения побочной популяции (side population) (Shimoda et al., 2018) – субпопуляции клеток, слабо светящейся в канале используемого красителя (например, Hoechst 33342 или Rhodamine 123), которая и принимается за ОСК в исследуемом материале. Ко второй группе методов относится идентификация специфических клеточных маркеров для определения выраженности свойств стволовости в культуре клеток или ткани опухоли. Молекулы CD44 и CD133, первоначально описанные для нормальных стволовых клеток, представляют собой два наиболее распространенных поверхностных маркера, используемых для идентификации ОСК (Глузман и др., 2020; Abbaszadegan et al., 2017). С развитием исследований в области биологии

Принятые сокращения: ОСК – опухолевые стволовые клетки; КРР – колоректальный рак.

стволовых клеток, список специфических маркеров, как поверхностных, так и цитоплазматических, постоянно расширяется.

Третья группа методов основывается на устойчивости ОСК к аноикису — клеточной гибели, вызванной неправильным взаимодействием с молекулами внеклеточного матрикса. Это свойство используется для получения свободно плавающих сфер (онкосфер) при культивировании исследуемого клеточного материала в условиях низкой адгезии (Lobo et al., 2007). Количество и размер онкосфер в абсолютном или относительном выражении применяются в качестве показателей выраженности свойств стволовости в исследуемой культуре клеток или ткани опухоли (Lopez-Sánchez et al., 2014; Jang et al., 2018; Katakam et al., 2020). Технически это самый простой подход к изучению ОСК, так как не требует дорогих антител и использования специального оборудования. Необходимым условием постановки тестов на образование онкосфер является низкая плотность посадки (1–10 кл./мкл) с тем, чтобы нецелевые клетки не образовали конгломераты, которые затруднили бы подсчет истинных клонов — потомков отдельных ОСК (Coles-Takabe et al., 2008). Вместе с тем, низкая плотность посадки не всегда применима из-за биологических свойств исследуемых клеток, так как для проявления свойств стволовости могут быть необходимы паракринные сигналы от других клеток (Pastrana et al., 2011).

Для преодоления этого недостатка можно использовать заключение исследуемых клеток в гидрогель, который препятствует движению и слипанию клеток. Широко применяемое для этих целей заключение в 0.3–0.35%-ный агар (Borowicz et al., 2014; Horibata et al., 2015; Rajendran, Jain, 2018) затрудняет замену среды, что ограничивает длительность культивирования и плотность посадки клеток. Инкапсуляция клеток в отдельные бусины из агара снимает проблему замены среды и может быть использована для решения широкого круга исследовательских задач. В частности, инкапсуляцию в бусины из мягкого агара (0.8%) в оболочке из плотного агара (4.5%) использовали в экспериментах с длительным культивированием для обогащения и изучения свойств ОСК мышиной почечной карциномы (Smith et al., 2011; Gazda et al., 2013). Недостаток этого метода в том, что он требует применения минерального масла и достаточно длительного воздействия на клетки не физиологических условий. В то же самое время, заключение в близкий по химическому строению к агару полисахарид растительного происхождения — альгинат — не оказывает негативного воздействия на клетки (Lee, Mooney, 2012) и открывает дополнительные возможности по созданию моделей для изучения свойств ОСК.

Из-за гидрофильных остатков альгинат, как и агар, плохо адсорбирует на своей поверхности белки (Piras, Smith, 2020), из-за чего клетки не могут нор-

мально прикрепиться к стенкам образующихся в альгинате пор даже в присутствии белков сыворотки. Поэтому альгинат может быть использован в качестве гидрогеля для тестирования способности клеток к колониеобразованию и является, таким образом, перспективным материалом для изучения клеток, проявляющих свойства стволовых. В качестве дополнительного преимущества можно указать на то, что химические свойства альгината могут быть модифицированы с получением широкого спектра биологически активных модификаций (Neves et al., 2020). Наконец, выращенные клетки без уменьшения жизнеспособности могут быть быстро выделены путем деполимеризации альгината в растворе ЭДТА или цитрата натрия для дальнейшего анализа или культивирования (Dhamecha et al., 2019).

Альгинат удобен, прежде всего, тем, что быстро полимеризуется под действием двухвалентных ионов (Lee, Mooney, 2012), поэтому бусины из этого полисахарида с небольшой вариацией по объему можно получить без применения специального оборудования, а просто прокапывая с постоянной скоростью суспензию клеток в альгинате через иглу в раствор хлорида кальция при комнатной температуре (Dhamecha et al., 2019; Кит и др., 2020). Получаемые структуры устойчивы в большинстве сред культивирования, содержащих достаточное количество ионов кальция и менее хрупкие, чем бусины из агарозы, что облегчает длительное культивирование, в том числе и в экспериментах с сокультивированием. Особенное значение разработка систем сокультивирования ОСК с другими клеточными компонентами имеет для поиска новых терапевтических стратегий для лечения таких онкологических заболеваний, течение которых зависит от локального иммунного окружения опухоли и системного иммунного статуса больного, например, опухолей желудочно-кишечного тракта (Pernot et al., 2014; Колесников и др., 2016).

Для оценки возможностей инкапсуляции в альгинат в качестве платформы для изучения ОСК в настоящей работе мы тестировали влияние факторов роста на пролиферативную способность клеток, устойчивых к аноикису, в постоянных клеточных линиях колоректального рака, заключенных в альгинатные бусины.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культуры клеток. Материалом для исследования служили постоянные культуры клеток колоректального рака (КРР) Сасо-2, НТ-29 и НСТ116. Клеточная линия Сасо-2 была получена из Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клеточная линия НТ-29 была получена из Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России (Москва, Россия). Клеточная линия НСТ116 была получена из Memorial Sloan Kettering Cancer Center (Нью-Йорк, США). Клетки всех линий культивиро-

вали в питательной среде DMEM (Gibco, США), содержащей 10% сыворотки (FBS; HyClone, США), при 37°C в атмосфере 5.5% CO₂. Для исследования был подготовлен 1%-ный раствор альгината натрия (W201502; Sigma Aldrich, США) в фосфатно-солевом растворе Дульбекко (DPBS; Биолот, Россия), простерилизованном методом холодной стерилизации путем пропускания через фильтры с диаметром пор 0.22 мкм (Corning, США).

Инкапсуляция в альгинат и условия эксперимента.

При достижении монослоем клеток 70%-ной конfluence их снимали с пластика при помощи раствора трипсин–Версена (1 : 1; Биолот, Россия). Далее часть клеток анализировали на наличие маркеров стволовости при помощи проточной цитофлуориметрии, а оставшиеся клетки ресуспендировали в растворе альгината до концентрации 10⁵ кл./мл. Раствор альгината с клетками исследуемых культур KPP медленно капали через иглу 30G в стерильный охлажденный раствор хлорида кальция (100 мМ) с высоты 10 см. При соприкосновении с раствором хлорида кальция происходило мгновенное отверждение капель альгината и образование бусин диаметром 2.5–3 мм. Полученные бусины выдерживали для дополимеризации в растворе хлорида кальция еще 5 мин. После отверждения бусины отмывали охлажденной средой DMEM и помещали в среду культивирования, приготовленную в трех вариантах: 1) DMEM/F12 (Gibco, США), содержащая по 10 нг/мл факторов роста EGF (ПанЭко, Россия) и рекомбинантного FGF2 (СайСторЛаб, Россия); 2) DMEM/F12, содержащая 10% сыворотки FBS; 3) DMEM/F12, содержащая 10% FBS и по 10 нг/мл EGF и FGF2. Бусины с заключенными в них клетками культур KPP культивировали 14 сут с заменой среды на 3-, 7- и 10-е сут культивирования. На 14-е сут культивирования фотографировали образовавшиеся колонии. При помощи средств пакета ImageJ определяли площади колоний.

Проточная цитофлуориметрия. Анализ на наличие маркеров стволовости проводили на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (BD, США) с использованием флуоресцентно меченых моноклональных антител к CD44 (BD, США) и CD133 (BD, США).

Статистический анализ. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью пакета STATISTICA. Оценку статистической достоверности различий между показателями групп определяли по *t*-критерию Стьюдента. Данные выражали средними значениями и 0.95%-ным доверительным интервалом. В каждой клеточной линии было проведено измерение площади 300 колоний.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для того чтобы оценить количество ОСК в используемых культурах клеток KPP, мы провели тестирование на наличие маркеров стволовости перед

инкапсуляцией клеток в альгинат. Согласно данным из литературы, одними из наиболее популярных маркеров ОСК клеток KPP являются CD44 и CD133 (Abbasian et al., 2019). Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что исследуемые культуры клеток KPP разделились на две группы по содержанию этих маркеров: клетки Сасо-2 и НТ-29 характеризуются меньшим количеством маркера CD133, чем клетки НСТ116. Кроме того, культура НСТ116 демонстрировала более широкий диапазон маркера CD44 по сравнению с клетками культур Сасо-2 и НТ-29 (рис. 1).

Полученные нами результаты лишь отчасти поддерживают данные других авторов. Например, количество маркера CD133 на клетках Сасо-2 было выше, чем на клетках НСТ116 в работе других авторов (Munago et al., 2012), в то время как в нашем эксперименте наблюдается обратное. Тем не менее, данные по наличию маркера CD44 в клетках Сасо-2 и НСТ116 совпадают в обоих исследованиях. Кроме того, в отличие от наших данных, в другой работе (Sahlberg et al., 2014) содержания маркеров CD133 и CD44 в культурах клеток НСТ116 и НТ-29 были схожими. Объяснением наблюдаемых расхождений количеств маркеров ОСК в одних и тех же культурах клеток KPP могут быть непостоянные биологические свойства ОСК *in vitro* и *in vivo*, так как содержание маркеров и другие характеристики ОСК могут меняться при изменении условий оксигенации, доступности факторов роста, нутриентов и других причин (Thankamony et al., 2020). Кроме того, нельзя исключить вариацию экспериментальных методик и состояния культур клеток в момент проведения эксперимента в разных лабораториях.

Для тестирования влияния условий выращивания на клетки, которые устойчивы к анокиису, мы поставили эксперименты с тремя вариантами среды с включением факторов роста EGF и FGF2 на фоне добавления сыворотки и без сыворотки, а также только с сывороткой, но без добавления факторов роста.

Наличия только факторов роста в среде культивирования оказалось недостаточно для роста колоний даже в течение 14 сут (рис. 2а). Вероятно, в среде культивирования отсутствовали ключевые компоненты, обеспечивающие пролиферацию клеток. Традиционно среда для культивирования ОСК, в том числе клеток KPP, состоит из смеси DMEM/F12, содержащей B27, и факторов роста EGF и FGF2 (известного также как основной фактор роста фибробластов bFGF) в концентрациях 10–20 нг/мл (O'Brien et al., 2007; Kreso, O'Brien, 2008; Prasetyanti et al., 2013). Добавка B27 содержит разнообразные компоненты, обеспечивающие жизнедеятельность клеток, но не поддерживающие адгезию, и является, таким образом, заменителем сыворотки, который изначально был разработан для культивирования клеток нервной системы (Brewer et al., 1993), но позже получил широ-

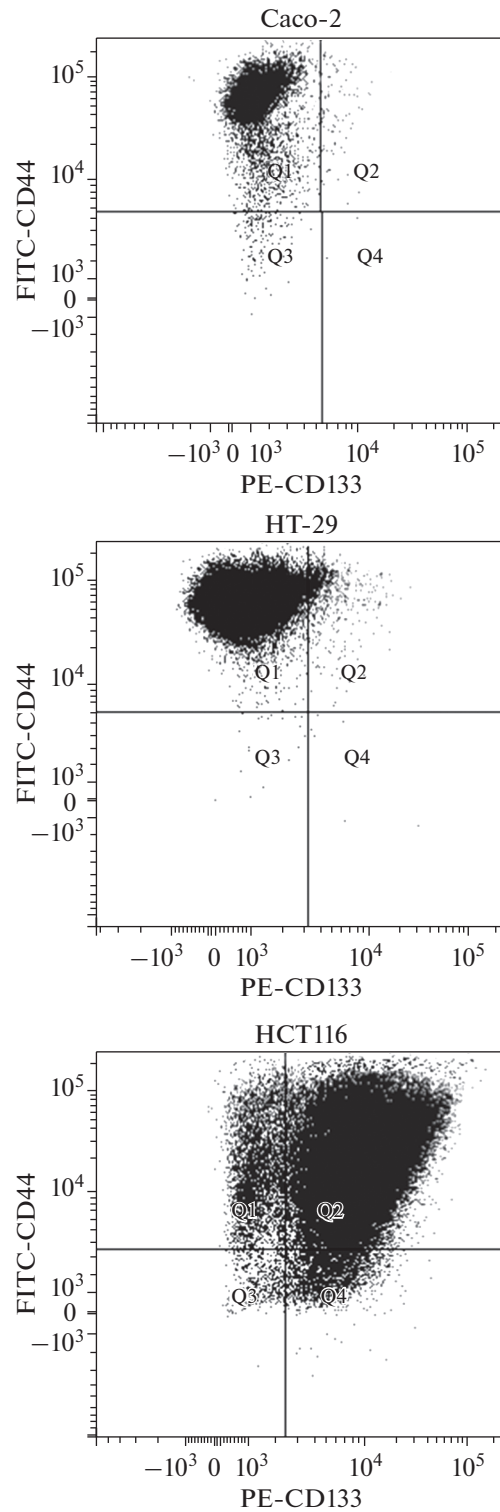


Рис. 1. Результаты проточно-цитометрического анализа культур колоректального рака Caco-2, HT-29 и HCT116. По осям – интенсивность флуоресценции антител против CD133, меченных фикоэритрином (PE-CD133, *горизонталь*) и против CD44, меченных изотиоцианатом флуоресцеина (FITC-CD44, *вертикаль*). Квадранты Q1–Q4 условно разделяют субпопуляции клеток на положительные и отрицательные по интенсивности флуоресценции в канале выбранного флюорофора.

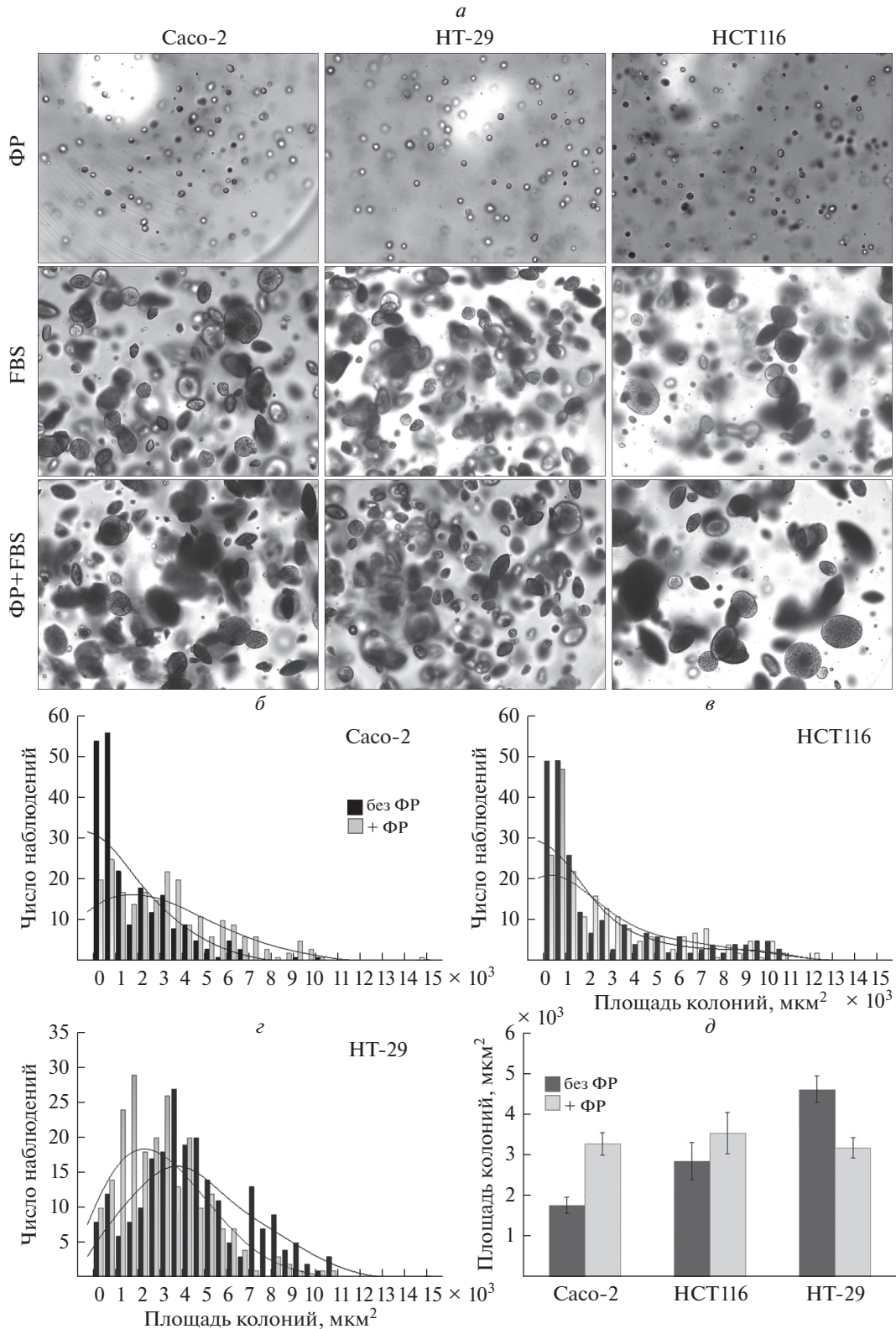


Рис. 2. Влияние факторов роста на размер колоний, образуемых инкапсулированными в альгинат клетками культур колоректального рака Саго-2, НТ-29 и НСТ116. Клетки культивировали 14 сут в среде DMEM/F12, содержащей 3 варианта добавок: только факторы роста (ФР) EGF и FGF2 по 10 нг/мл; только 10% сыворотки FBS; 10% FBS и ФР. *а* – Внешний вид образующихся колоний клеток культур КРР в трех вариантах эксперимента; увел. об.: 5 \times . *б–г* – Распределение значений площади колоний клеток культур КРР при культивировании в среде, содержащей ФР и в среде без ФР в присутствии сыворотки. *д* – Среднее значение площади колоний клеток при культивировании в среде в присутствии ФР и без ФР в присутствии сыворотки; *вертикальные отрезки* соответствуют 0.95%-ному доверительному интервалу.

кое распространение и в работе с ОСК (Ledur et al., 2017). Использование альгината обеспечивает культивирование клеток в условиях пониженной адгезии даже при добавлении сыворотки, так как на поверхности альгинатных пор не происходит адсорбции белков, способствующих прикреплению клеток к субстрату. При этом сыворотка является источником необходимых нутриентов и гормонов, поддерживающих рост клеток, устойчивых к анокиису. Поэтому добавление сыворотки привело к росту многочисленных колоний во всех культурах, как с наличием факторов роста EGF и FGF2, так и без них (рис. 2а). Наряду с колониями в альгинате также наблюдали и отдельные клетки.

Таким образом, исследуемые культуры клеток КРР продемонстрировали рост колоний в условиях низкой адгезии. Предположительно, эти колонии являются клонами ОСК в исследуемых клеточных линиях и могут выступать в качестве объектов для изучения биологических особенностей этой клеточной популяции.

В качестве параметра интенсивности роста ОСК был использован размер колоний. Измерения показали, что добавление факторов роста в среду культивирования, содержащую сыворотку, вызвало разнонаправленную реакцию со стороны исследуемых культур клеток КРР (рис. 2б–г). Клетки Сасо-2 отреагировали на добавление факторов усилением пролиферации, а именно увеличилась частота появления колоний большего размера (3500–7500 мкм²) и сократилось число маленьких колоний (0–1500 мкм²). Характер распределения размеров колоний клеточной линии НСТ116 мало изменился при добавлении факторов роста в среду культивирования. В культуре клеток НТ-29 наблюдали замедление роста колоний, о чем можно судить по смещению модального класса размеров колоний с 3500–4000 к 2000–2500 мкм² при добавлении факторов роста.

Сравнение среднего значения площади колоний культуры клеток Сасо-2 при наличии и отсутствии факторов роста показало его значительное увеличение при добавлении факторов роста: 1755.16 ± 195.87 мкм² в отсутствие и 3270.57 ± 274.91 мкм² в присутствии факторов ($P < 0.05$). Измерение площади колоний НСТ116 показало незначительную тенденцию к увеличению размеров колоний: 2844.89 ± 461.57 и 3530.31 ± 503.85 мкм² без факторов роста и в их присутствии соответственно. Площадь колоний НТ-29 уменьшилась в среде с добавлением факторов роста: 4605.10 ± 324.02 мкм² в среде без факторов и 3167.85 ± 249.07 мкм² в присутствии факторов ($P < 0.05$) (рис. 2д). Таким образом, несмотря на то, что культуры клеток Сасо-2 и НТ-29 имели одинаковую характеристику по наличию маркеров стволовости, их реакция на введение факторов роста оказалась противоположной.

Факторы роста, такие как EGF и FGF2 являются наиболее часто применяемыми компонентами сре-

ды культивирования ОСК (Ledur et al., 2017). Эти факторы участвуют в ряде сигнальных каскадов, усиливающих клеточную пролиферацию и выживаемость и играющих важную роль в канцерогенезе (Sigismund et al., 2018). Ожидается, что добавление факторов роста в среду культивирования должно простимулировать рост клеток и, в первую очередь, клеток со свойствами ОСК, так как в условиях низкой адгезии они получают пролиферативное преимущество, что и было продемонстрировано для Сасо-2. При этом для НСТ116 эффект добавления оказался слабо выраженным, а для НТ-29 – противоположным.

Наблюдаемые эффекты можно объяснить рядом причин. С одной стороны, Сасо-2 демонстрируют увеличенную экспрессию гена рецептора EGF (EGFR) по сравнению с двумя другими культурами клеток, используемыми в нашей работе (Berg et al., 2017), что может способствовать усиленному ответу на стимуляцию фактора EGF. С другой стороны, торможение роста клеточных колоний культуры клеток НТ-29 может быть связано с сигнальным каскадом EGFR–PTEN, обладающим антимитогенной активностью, которая была описана на культуре клеток рака легкого (Ryu et al., 2017). Авторы этой работы обнаружили, что торможение роста культуры клеток рака легкого связано с усилением продукции активных форм кислорода под длительным действием EGF. Увеличение продукции активных форм кислорода, в свою очередь, через ряд сигнальных событий вызывает рост экспрессии онкосупрессора *PTEN*, мишенью которого является путь PI3K–Akt, отвечающий за пролиферацию опухолевых клеток (Hoxhaj, Manning, 2020).

Известно, что экспрессия генов, участвующих в сигнальном каскаде PI3K–Akt, повышена, в том числе в клетках НТ-29 и НСТ116 (Berg et al., 2017), которые негативно или слабо отреагировали на воздействие факторов роста в нашем исследовании. Кроме того, в этой же работе сказано, что уровень малой ГТФазы Ras1, участвующей в образовании активных форм кислорода под действием EGF (Dröge, 2002; Hordijk, 2006), в НТ-29 почти в два раза выше, чем в Сасо-2, а в НСТ116 наблюдается его промежуточное значение (Berg et al., 2017). Возможно, повышение содержания Ras1 способствует увеличению продукции активных форм кислорода в ответ на продолжительную стимуляцию EGF в культуре клеток НТ-29 и, в меньшей степени, в культуре клеток НСТ116, что также может быть объяснением наблюдаемого в нашей работе антимитогенного влияния факторов роста на эти две клеточные линии.

Для установления точных причин наблюдаемого парадоксального влияния факторов EGF и FGF2 на рост клеток КРР, заключенных в альгинат, требуются дальнейшие исследования. Однако полученные нами данные уже позволяют сделать вывод о том,

что широкое применение традиционных сред для выделения ОСК с добавлением высоких концентраций факторов роста может быть под вопросом.

Таким образом, заключение в альгинат клеточных линий с определением размера образуемых колоний является адекватным методом изучения свойств ОСК, так как при этом сохраняются условия низкой адгезии и обеспечивается независимость роста отдельных клонов. При этом инкапсуляция в альгинат позволяет расширить возможности теста на колониюобразование и, например, создать на его основе экспериментальные модели с включением сокультивирования с суспензионными и адгезионными культурами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность С.С. Ларину (НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава РФ, г. Москва) за любезно предоставленный фактор роста rhFGF2.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не включала эксперименты с участием животных или людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Глузман Д.Ф., Фильченков А.А., Ивановская Т.С. 2020. Молекулярные маркеры поверхностных мембран для идентификации популяций стволовых клеток опухолей (Систематический обзор). Вопросы онкологии. Т. 66. № 4. С. 336. (*Gluzman D.F., Philchenkov A.A., Ivanovskaya T.S.* 2020. Cell surface molecular markers for identification of cancer stem cell populations (Systematic review). *Voprosy Onkologii*. V. 66. № 4. P. 336.)
- Кит О.И., Филиппова С.Ю., Ситковская А.О., Позднякова В.В., Хохлова О.В. 2020. Влияние способа стерилизации на пролиферацию и жизнеспособность инкапсулированных в альгинатный гель клеток культуры MOLT-4. Российский биотерапевтический журн. Т. 19. № 3. С. 46. (*Kit O.I., Filippova S.Yu., Sitkovskaya A.O., Pozdnyakova V.V., Khokhlova O.V.* 2020. Influence of the sterilization method on the proliferation and viability of molt-4 cells encapsulated in alginate gel. *Russ. J. Biotherapy*. V. 19. № 3. P. 46.)
- Колесников В.Е., Кит О.И., Златник Е.Ю., Новикова И.А., Гранкина А.О., Геворкян Ю.А., Максимов А.Ю. 2016. Анализ иммунного статуса больных колоректальным раком после различных вариантов оперативного вмешательства. Современные проблемы науки и образования. 6. <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25733> (*Kolesnikov V.E., Kit O.I., Zlatnik E.Yu., Novikova I.A., Grankina A.O., Gevorkyan Yu.A., Maksimov A.Yu.* 2016. Analysis of immune status of patients with colorectal cancer after different options of surgical intervention. *Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniya*. 6. <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25733>)
- Пучинская М.В. 2016. Раковые стволовые клетки как возможный источник возникновения и прогрессирования опухолей. Вопросы онкологии. Т. 62. № 1. С. 14. (*Puchinskaya M.V.* 2016. Cancer stem cells as a possible source of tumor initiation and progression. *Voprosy Onkologii*. V. 62. № 1. P. 14.)
- Abbasian M., Mousavi E., Arab-Bafrani Z., Sahebkar A. 2019. The most reliable surface marker for the identification of colorectal cancer stem-like cells: A systematic review and meta-analysis. *J. Cell. Physiol*. V. 234. P. 8192.
- Abbaszadegan M.R., Bagheri V., Razavi M.S., Momtazi A.A., Sahebkar A., Gholamin M. 2017. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *J. Cell. Physiol*. V. 232. P. 2008. <https://doi.org/10.1002/jcp.25759>
- Battle E., Clevers H. 2017. Cancer stem cells revisited. *Nat. Med*. V. 23. P. 1124. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>
- Berg K.C.G., Eide P.W., Eilertsen I.A., Johannessen B., Bruun J., Danielsen S.A., Bjørnslett M., Meza-Zepeda L.A., Eknæs M., Lind G.E., Myklebost O., Skotheim R.I., Sveen A., Lothe R.A. 2017. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines – a resource for biomedical studies. *Mol. Cancer*. V. 16. P. 116. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0691-y>
- Borowicz S., Van Scoyk M., Avasarala S., Karuppusamy Rathinam M.K., Tauler J., Bikkavilli R.K., Winn R.A. 2014. The soft agar colony formation assay. *J. Vis. Exp*. V. 92. P. e51998. <https://doi.org/10.3791/51998>
- Brewer G.J., Torricelli J.R., Evege E.K., Price P.J. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res*. V. 35 P. 567. <https://doi.org/10.1002/jnr.490350513>
- Coles-Takabe B.L., Brain I., Purpura K.A., Karpowicz P., Zandstra P.W., Morshead C.M., van der Kooy D. 2008. Don't look: growing clonal versus nonclonal neural stem cell colonies. *Stem Cells*. V. 26. P. 2938. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0558>
- Dhamecha D., Movsas R., Sano U., Menon J.U. 2019. Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: Past, present and future. *Int. J. Pharm*. V. 569. P. 118627. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118627>
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev*. V. 82. P.47. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Du F.Y., Zhou Q.F., Sun W.J., Chen G.L. 2019. Targeting cancer stem cells in drug discovery: Current state and future perspectives. *World J. Stem Cells*. V. 11. P. 398. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i7.398>
- Gazda L.S., Martis P.C., Laramore M.A., Bautista M.A., Dudley A., Vinerean H.V., Smith B.H. 2013. Treatment of agarose-agarose RENCA macrobeads with docetaxel selects for OCT4(+) cells with tumor-initiating capability. *Cancer Biol. Ther*. V. 14. P. 1147. <https://doi.org/10.4161/cbt.26455>
- Hordijk P.L. 2006. Regulation of NADPH oxidases: The role of Rac proteins. *Circ. Res*. V. 98. P. 453. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000204727.46710.5e>

- Horibata S., Vo T.V., Subramanian V., Thompson P.R., Coonrod S.A.* 2015. Utilization of the soft agar colony formation assay to identify inhibitors of tumorigenicity in breast cancer cells. *J. Vis. Exp.* (99) : e52727. <https://doi.org/10.3791/52727>
- Hoxhaj G., Manning B.D.* 2020. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer.* V. 20. P. 74. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7>
- Jang H.J., Bak Y., Pham T.H., Kwon S.B., Kim B.Y., Hong J., Yoon D.Y.* 2018. STK899704 inhibits stemness of cancer stem cells and migration via the FAK-MEK-ERK pathway in HT29 cells. *BMB Rep.* V. 51. P. 596. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.11.180>
- Katakam S.K., Pelucchi P., Cocola C., Reinbold R., Vlodavsky I., Greve B., Götte M.* 2020. Syndecan-1-dependent regulation of heparanase affects invasiveness, stem cell properties, and therapeutic resistance of Caco2 colon cancer cells. *Front. Oncol.* 10 : 774. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00774>
- Kreso A., O'Brien C.A.* 2008. Colon cancer stem cells. *Curr. Protoc. Stem. Cell Biol.* V. 7. P. 3.1.1. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc0301s7>
- Lee K.Y., Mooney D.J.* 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* V. 37. P. 106. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- Ledur P.F., Onzi G.R., Zong H., Lenz G.* 2017. Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: What is the impact for novel discoveries? *Oncotarget.* V. 8. P. 69185. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20193>
- Lobo N.A., Shimono Y., Qian D., Clarke M. F.* 2007. The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* № 23. P. 675. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154>
- Lopez-Sánchez L.M., Jimenez C., Valverde A., Hernandez V., Peñarando J., Martinez A., Lopez-Pedraza C., Muñoz-Castañeda J.R., De la Haba-Rodríguez J.R., Aranda E., Rodríguez-Ariza A.* 2014. CoCl₂, a mimic of hypoxia, induces formation of polyploid giant cells with stem characteristics in colon cancer. *PLoS One.* V. 9. P. e99143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099143>
- Muraro M.G., Mele V., Däster S., Han J., Heberer M., Cesare Spagnoli G., Iezzi G.* 2012. CD133⁺, CD166⁺CD44⁺, and CD24⁺CD44⁺ phenotypes fail to reliably identify cell populations with cancer stem cell functional features in established human colorectal cancer cell lines. *Stem Cells Transl. Med.* V. 1. P. 592. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0003>
- Neves M.I., Moroni L., Barrias C.C.* 2020. Modulating alginate hydrogels for improved biological performance as cellular 3D microenvironments. *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. P. 665. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00665>
- O'Brien C.A., Pollett A., Gallinger S., Dick J.E.* 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* V. 445. P. 106. <https://doi.org/10.1038/nature05372>
- Pastrana E., Silva-Vargas V., Doetsch F.* 2011. Eyes wide open: A critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell.* V. 8. P. 486. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.04.007>
- Pattabiraman D. R., Weinberg R. A.* 2014. Tackling the cancer stem cells – what challenges do they pose? *Nat. Rev. Drug Discov.* V. 13. P. 497. <https://doi.org/10.1038/nrd4253>
- Pernot S., Terme M., Voron T., Colussi O., Marcheteau E., Tartour E., Taieb J.* 2014. Colorectal cancer and immunity: What we know and perspectives. *World J. Gastroenterol.* V. 20. P. 3738. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i14.3738>
- Piras C.C., Smith D.K.* 2020. Multicomponent polysaccharide alginate-based bioinks. *J. Mater. Chem. B.* V. 8. P. 8171. <https://doi.org/10.1039/d0tb01005g>
- Prasetyanti P.R., Zimmerlin C., De Sousa E., Melo F., Medema J.P.* 2013. Isolation and propagation of colon cancer stem cells. *Methods Mol. Biol.* № 1035. P. 247. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-508-8_21
- Rajendran V., Jain M.V.* 2018. In Vitro tumorigenic assay: Colony forming assay for cancer stem cells. *Methods Mol. Biol.* № 1692. P. 89. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7401-6_8
- Ryu J.W., Choe S.S., Ryu S.H., Park E.Y., Lee B.W., Kim T.K., Ha C.H., Lee S.W.* 2017. Paradoxical induction of growth arrest and apoptosis by EGF via the up-regulation of PTEN by activating Redox factor-1/Egr-1 in human lung cancer cells. *Oncotarget.* V. 8. P. 4181.
- Sahlberg S.H., Spiegelberg D., Glimelius B., Stenerlöw B., Nestor M.* 2014. Evaluation of cancer stem cell markers CD133, CD44, CD24: Association with AKT isoforms and radiation resistance in colon cancer cells. *PLoS One.* V. 9. P. e94621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094621>
- Shimoda M., Ota M., Okada Y.* 2018. Isolation of cancer stem cells by side population method. *Methods Mol. Biol.* № 1692. P. 49. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7401-6_5
- Sigismund S., Avanzato D., Lanzetti L.* 2018. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol. Oncol.* V. 12. P. 3. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12155>
- Smith B.H., Gazda L.S., Conn B.L., Jain K., Asina S., Levine D.M., Parker T.S., Laramore M.A., Martis P.C., Vinerean H.V., David E.M., Qiu S., Cordon-Cardo C., Hall R.D., Gordon B.R. et al.* 2011. Three-dimensional culture of mouse renal carcinoma cells in agarose macrobeads selects for a subpopulation of cells with cancer stem cell or cancer progenitor properties. *Cancer Res.* V. 71. P. 716. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2254>
- Song J., Chang I., Chen Z., Kang M., Wang C.-Y.* 2010. Characterization of side populations in HNSCC: Highly invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. *PLoS One.* V. 5. P. e11456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011456>
- Thankamony A.P., Saxena K., Murali R., Jolly M.K., Nair R.* 2020. Cancer stem cell plasticity – a deadly deal. *Front. Mol. Biosci.* V. 7. P. 79. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00079>

The Use of Alginate Encapsulation to Study EGF and FGF2 Effect on Colorectal Cancer Cells Proliferation in Low Adhesion Conditions *in Vitro*

S. Yu. Filippova^{a,*}, A. O. Sitkovskaya^a, E. S. Bondarenko^a, I. A. Novikova^a, D. A. Kharagezov^a,
V. V. Pozdnyakova^a, O. V. Khokhlova^a, and O. I. Kit^a

^aNational Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, 344037 Russia

*e-mail: filsv@yandex.ru

Cancer stem cells (CSCs) are promising targets for the development of new anti-cancer agents. Success in studying these tumor cells subpopulation properties largely depends on the selection of adequate methods for its identification and isolation. To assess the possibilities of encapsulation in alginate in the context of studying the properties of CSCs, we tested the effect of EGF and FGF2 on the colony size of colorectal cancer cell cultures under conditions of low adhesion. The study showed that the addition of exogenous growth factors leads to a slowdown in the growth of colonies of the HT-29 culture and an increase in the growth of Caco-2, without significantly affecting the HCT116 culture. Thus, encapsulation in alginate with further measurement of the size of the formed colonies can be used to create a test similar to the classical test for the formation of colonies in semi-liquid agar with the prospect of further expanding the functionality of the method with the addition of chemical modifications of alginate, co-cultivation of different cell types and other additions.

Keywords: alginate, cancer stem cells, epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, colorectal cancer

УДК 57.088.2

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ

© 2021 г. А. Н. Горшков^{1, *}, Л. В. Пурвиньш^{1, 2}, А. В. Протасов^{1, 2}, П. А. Некрасов¹,
А. А. Шалджян¹, А. В. Васин^{1, 2}

¹Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Санкт-Петербург, 197376 Россия

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Институт биомедицинских систем
и биотехнологий, Санкт-Петербург, 195251 Россия

*E-mail: angorsh@yahoo.com

Поступила в редакцию 15.11.2020 г.

После доработки 10.12.2020 г.

Принята к публикации 10.12.2020 г.

Экзосомы представляют собой внеклеточные мембранные везикулы диаметром 40–100 нм и являются ключевым средством межклеточной коммуникации. С их помощью происходит перенос широкого спектра биологически активных молекул, включая липиды, белки, мРНК и микроРНК. Передача этих молекул клеткам-реципиентам регулирует их функции в норме и вносит вклад в патогенез множества заболеваний. Уникальные особенности молекулярного состава экзосом делают их потенциально важнейшим диагностическим и прогностическим маркером в медицине. К настоящему времени предложен ряд методов выделения и очистки экзосом. Тем не менее, стандартный подход, позволяющий получать чистые препараты, полностью пригодные для последующего применения высокочувствительных методов анализа, в настоящее время отсутствует. В настоящей работе мы провели сравнение эффективности выделения экзосом из культуральной клеточной среды с помощью трех методов: 1) ультрацентрифугирования, 2) концентрирования тангенциальной потоковой фильтрацией с последующей гель-фильтрацией, 3) осаждения с помощью коммерческого реагента Total exosome isolation reagent (Thermo Fisher, США). Оценка качества проб экзосом включала просвечивающую электронную микроскопию, динамическое светорассеяние и детекцию маркерного экзосомального белка аннексина А2 Вестерн-блоттингом. Результаты показали, что наибольшая чистота препарата экзосом достигается при их концентрировании тангенциальной потоковой фильтрацией с последующей гель-фильтрацией.

Ключевые слова: экзосомы, ультрацентрифугирование, гель-фильтрация

DOI: 10.31857/S0041377121020048

Экзосомы – везикулы диаметром 40–100 нм, секретируемые клетками во внеклеточное пространство (Purushothaman et al., 2016). Биогенез экзосом в клетке связан с эндосомальным компартментом. Наблюдается вторичное впячивание мембраны поздней эндосомы и образование мультивезикулярного тела с интралюминальными везикулами внутри него (Stoorvogel et al., 2002). При слиянии мультивезикулярного тела с плазматической мембраной происходит выход содержащихся в нем везикул во внеклеточное пространство – секреция экзосом из клетки (Colombo et al., 2014). Экзосомы секретируются клетками всех типов и обнаруживаются во множестве различных биологических жидкостей: моче (Conde-Vancells et al., 2010), крови (Caby et al., 2005), слюне (Michael et al., 2010), грудном молоке (Admyre et al.,

2007), бронхоальвеолярной (Prado et al., 2008), амниотической (Keller et al., 2007) и других жидкостях, доставляя свое содержимое клеткам-реципиентам.

По современным представлениям, экзосомы являются компонентом внеклеточного микроокружения, обеспечивающим межклеточную коммуникацию. Благодаря специфической доставке функциональных белков и нуклеиновых кислот к клеткам-реципиентам, экзосомы выступают посредниками регуляторных сигналов между клетками (Vlassov et al., 2012). Секретируемые экзосомы могут локально влиять на функции соседних клеток, а также переноситься на значительные расстояния биологическими жидкостями. С накоплением данных о составе экзосом и способах их взаимодействия с клетками-мишенями открывается все больше физиологических процессов, регулируемых этими везикулами.

Так как экзосомы широко представлены в биологических жидкостях и содержат специфические бел-

Принятые сокращения: ПААГ – полиакриламидный гель; FBS – эмбриональная бычья сыворотка (fetal bovine serum).

ки, липиды и нуклеиновые кислоты, состав которых зависит от функционального состояния секретирующей клетки, они являются перспективным объектом для ранней диагностики заболевания, определения его прогрессии и эффективности лечения, в частности для диагностики онкологических заболеваний (Whiteside 2015; Palmirotta et al., 2018).

Кроме того, природная функция экзосом как средства межклеточной коммуникации, их стабильность, небольшие размеры и нетоксичность для организма делает их перспективным объектом для разработки систем направленной доставки лекарственных препаратов *in vivo* (Bunggulawa et al., 2018; Samanta et al., 2018). Однако реализация всего потенциала клинического использования экзосом невозможна без эффективных и воспроизводимых подходов получения чистых препаратов экзосом. Несмотря на большое разнообразие разработанных и применяемых методов, в том числе имеющихся на рынке нескольких коммерческих наборов для выделения, до сих пор не существует “золотого стандарта”, позволяющего получать однородные препараты экзосом из различных биологических жидкостей (Abramowicz et al., 2016).

Цель настоящей работы заключалась в сравнении эффективности получения чистых препаратов экзосом из культуральной среды тремя методами, которые включали ультрацентрифугирование, гель-фильтрацию и осаждение коммерческим реагентом Total exosome isolation reagent (Thermo Fisher, США). Были поставлены следующие задачи: анализ выхода экзосом и чистоты полученных препаратов с помощью просвечивающей электронной микроскопии, динамического светорассеивания и Вестерн-блот-анализа с использованием моноклональных антител к аннексину A2 — известному маркерному белку экзосом.

Полученные результаты важны для выбора оптимального протокола выделения экзосом с целью дальнейшего анализа их молекулярного состава и исследований по доставке биологически активных веществ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Очистка сыворотки от экзосом. Рутинные протоколы культивирования клеток традиционно предполагают использование 5% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), как источника гормонов и ростовых факторов. Однако FBS сама по себе является биологической жидкостью, содержащей большое количество функционально активных экзосом (Shelke et al., 2014). Поэтому при исследовании экзосом, секретируемых культивируемыми клетками в присутствии FBS в культуральной среде, абсолютно необходима ее предварительная очистка от FBS сывороточных экзосом.

С этой целью мы ультрацентрифугировали культуральную среду DMEM, содержащую 20% FBS, в течение 15 ч при 100 тыс. *g* и 4°C (центрифуга Beckman Coulter Avanti J-30I, США, ротор JA-30.50). Далее отбирали верхнюю часть среды из центрифужных пробирок, переносили в другие пробирки и повторно ультрацентрифугировали аналогичным образом. После второго раунда ультрацентрифугирования верхнюю фракцию отбирали, разбавляли средой DMEM до концентрации FBS 5% и использовали для последующего культивирования клеток.

Культивирование клеток. Для получения культуральной среды, содержащей клеточные экзосомы, использовали клетки линии A549 (карцинома легкого человека; коллекция ATCC CCL-185). Клетки рутинно культивировали в среде DMEM, содержащей GlutaMax, антибиотик-антимикотик и 5% FBS (Gibco, Life technologies, США) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для культивирования использовали флаконы NUNC 225 см² EasyFlask (Thermo Fisher, США). Для одного раунда выделения экзосом культивировали 5 флаконов с клетками A549. После достижения монослоем 80% конfluence, клетки 3 раза промывали фосфатно-солевым раствором (PBS; Биолот, Россия) и меняли среду на аналогичную, предварительно очищенную от сывороточных экзосом по вышеописанному протоколу. Параллельно клетки после 3-кратной промывки в PBS помещали в бессысывороточную среду DMEM. Для секреции экзосом клетки культивировали 48 ч. После этого культуральную среду собирали и центрифугировали 30 мин при 3000 *g* и 4°C для удаления клеточного детрита (центрифуга Eppendorf Centrifuge 5810R, Германия). Далее супернатант собирали и проводили дальнейшие этапы выделения экзосом.

Выделение экзосом. Для сравнительного анализа мы использовали 3 метода выделения экзосом, принципиально различающихся по своим физическим принципам.

Ультрацентрифугирование. Среду, содержащую экзосомы и полученную по вышеуказанным протоколам культивирования клеток, центрифугировали 30 мин при 10000 *g* и 4°C для удаления фрагментов клеток, крупных везикул и белковых комплексов. Далее очищенный супернатант переносили в ультрацентрифужные пробирки и центрифугировали 2 ч при 100 тыс. *g* и 4°C (центрифуга Beckman Coulter Avanti J-30I, США, ротор JA-30.50). После ультрацентрифугирования супернатанты удаляли, осадки ресуспендировали в PBS и объединяли в одну ультрацентрифужную пробирку. Пробу повторно центрифугировали 2 ч при тех же условиях. Далее супернатант удаляли, а обогащенный экзосомами осадок ресуспендировали в 500 мкл PBS.

Гель-фильтрация. Использованный нами протокол включал в себя два препаративных этапа: концентрирование образца методом тангенциальной потоковой фильтрации и последующую гель-филь-

трацию. Для тангенциальной фильтрации использовали систему Akta flux (GE Healthcare Life Sciences, США). Культуральную среду, содержащую экзосомы, пропускали через фильтр MWCO (molecular weight cut-off) с размером пор для молекул 750 кДа, благодаря чему происходило отделение везикул и белковых комплексов от низкомолекулярных компонентов, с уменьшением объема жидкости в образце. В процессе фильтрации образец несколько раз разбавляли PBS и повторно концентрировали, что способствовало более полному удалению солей и низкомолекулярных компонентов среды. Конечный объем образца уменьшался в 10 раз.

Сконцентрированный образец наносили на колонку объемом 120 мл, содержащую Sephacryl S-500HR (Sigma-Aldrich, США), и проводили гель-фильтрацию (хроматограф Akta pure, GE Healthcare Life Sciences, США). Элюцию проводили PBS (скорость элюции 1 мл/мин, фракции по 5 мл). Фракции первого пика объединяли и концентрировали с помощью центрифугирования при 3000 g через Amicon Ultra-15 30 кДа (Merck, Германия) до 500 мкл.

Осаждение с помощью коммерческого реагента. Для выделения экзосом использовали Total exosome isolation reagent (Thermo Fisher, США) согласно протоколу производителя. Культуральную среду, содержащую экзосомы, смешивали с реагентом в соотношении 1 : 0.5. Пробу инкубировали с реагентом в течение ночи при 4°C, после чего центрифугировали 1 ч при 10 тыс. g и 4°C. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 500 мкл PBS.

Обогащенные экзосомами пробы, полученные тремя перечисленными выше методами, анализировали на чистоту образца и выход экзосом непосредственно после получения, либо хранили до исследования не более 1 нед. при -20°C в присутствии ингибиторов протеаз (Sigma-Aldrich, США).

Просвечивающая электронная микроскопия. Для электронно-микроскопического исследования образцов, содержащих экзосомы, был использован метод негативного контрастирования. Исследуемые суспензии наносили на медные сетки для электронной микроскопии (300 mesh; Sigma-Aldrich, США), покрытые коллодиевой поддерживающей пленкой. После адсорбции на пленку в течение 1–2 мин частиц, содержащихся в пробе, сетки дважды промывали дистиллированной водой в течение 10 с. Контрастирование проводили в 2%-ном растворе фосфорновольфрамовой кислоты (Sigma-Aldrich, США) в течение 1 мин. Далее сетки исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM 1011 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ в диапазоне инструментальных увеличений 50–250 тыс. Электронные микрофотографии получали с помощью цифровой камеры Morada (Olympus, Япония).

Динамическое светорассеяние. Метод динамического рассеяния позволяет оценить однородность и фракционный состав микрочастиц в образце путем

статистической обработки значений светорассеивания, происходящего за счет случайного теплового перемещения микрочастиц в растворе.

Наличие и количество фракций микрочастиц в изучаемых препаратах оценивали с помощью прибора Zetasizer Nano-ZSP (Malvern Instruments, Великобритания). В качестве эталона для оценки гидродинамического радиуса частиц в отдельных фракциях использовали стандартные частицы латекса диаметром 100 нм. Образцы объемом 60 мкл вносили в микрокюветы Starstedt при стандартном значении угла детектирования. Измерения проводили с учетом показателей преломления воды и комнатной температуры. Для каждого образца проводили по три измерения, каждое включало 20 прогонов (продолжительностью 10 с), с автоматическим подбором аттенуатора. Полученные в каждом измерении данные обрабатывали, после чего с помощью программного обеспечения Malvern Zetasizer Software 7.12 определяли наличие, стабильность и количество фракций частиц и строились кривые, характеризующие среднее распределение гидродинамического радиуса частиц в пробах. Для обьема использовали базовую статистическую модель прибора (профиль General purpose). В процессе эксперимента оценивали светорассеяние как неразведенной пробы, так и проб, разведенных в 10 и 100 раз.

Вестерн-блот-анализ. К препаратам экзосом добавляли буфер Лэмли и инкубировали 5 мин при 95°C. Последующее электрофоретическое разделение белков выполняли в градиентном полиакриламидном геле (градиент 8–16%). Для электрофореза использовали источник PowerPac universal (Bio-Rad, США), ток 25 мА и время разделения 1 ч. В качестве стандарта молекулярной массы был добавлен Precision plus protein WesternC standarts (Bio-Rad, США).

Полусухой перенос белков на PVDV- мембрану был выполнен в течение 30 мин с помощью источника Trans-blot turbo (Bio-Rad, США). Далее мембрану инкубировали в течение ночи в растворе первичных антител (раствор антитела на PBST в разведении 1 : 2500) против хорошо известного маркерного белка экзосом аннексина A2 (MAВ3928; R&D Systems, США).

После инкубации с первичными антителами мембрану отмывали в PBST и инкубировали в растворе козьих вторичных антител (в разведении 1 : 1000 на PBST) против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Bio-Rad, США) в течение 1 ч. После отмывки добавляли субстрат Clarity Western ECL (Bio-Rad, США). Детектировали хемилюминисценцию с помощью системы Chemi-Doc MP imaging system (Bio-Rad, США).

Трипсинолиз и масс-спектрометрия. С помощью масс-спектрометрии анализировали ультрацентрифугированный препарат клеточных экзосом после культивирования клеток в среде, содержащей 5% FBS, очищенной от экзосом. Для этого белки в пробе были разделены с помощью электрофореза в гра-

диентном полиакриламидном геле (градиент 8–16%) в денатурирующих условиях, аналогично приведенному выше протоколу Вестерн-блоттинга. Гель был окрашен красителем Coomassie Blue R250.

Фрагменты геля объемом около 2 мкл, содержащие наиболее выраженные белковые бэнды, вырезали и переносили в пробирки с отмывочным буферным раствором (150 мкл, 2 смены по 10 мин). Состав отмывочного буфера: 30 мМ NH_4HCO_3 и 40% ацетонитрила. После отмывки проводили инкубацию проб с ацетонитрилом (100 мкл) в течение 10 мин. После полного удаления ацетонитрила к фрагментам геля добавляли раствор трипсина (Promega, США) в 50 мМ NH_4HCO_3 , разведенном до концентрации 20 мкг/мл. Трипсинолиз проводили в течение 4 ч при 37°C.

Для дальнейшего масс-спектрометрического анализа образцов использовали масс-спектрометрию с ионизацией лазерной десорбции в присутствии матрицы (MALDI – Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry) с время-пролетным анализатором TOF (time of flight), реализованную в приборе ultrafleXtreme™ (Bruker, Германия). Этот прибор оснащен твердотельным лазером 337 нм.

Для получения масс-спектров образцы наносили на мишень (MTP 384 target plate ground steel TF; Bruker, Германия). Для нанесения образцов использовали матрицу HCCA (α -циано-4-гидроксикоричная кислота). Масс-спектры получали в режиме регистрации положительных ионов при помощи программы Bruker daltonics flex control (Bruker, Германия).

Для накопления масс-спектров мощность лазерного излучения устанавливали на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции (ионизации) образца. Спектры получали в результате суммирования трех серий спектров по 1000 импульсов лазера для каждой серии. Спектры фрагментации пептидов регистрировали с помощью метода LIFT. Обработку полученных результатов проводили с помощью программы Bruker daltonics flex analysis (Bruker, Германия). Идентификацию соединений осуществляли посредством программы Bruker daltonics BioTools (Bruker, Германия), взаимодействующей с базами данных MASCOT. Для внутренней калибровки масс в спектрах использовали ионы, соответствующие продуктам автопротеолиза трипсина (842.51 и 2211.01 Да). Погрешность измерения масс составляла не более 20 ppm.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Очистка FBS от экзосом. Классические протоколы культивирования клеток, в частности линии A549, требуют использования эмбриональных сывороток как источника ряда гормонов, ростовых факторов и других биологически активных молекул (Marcos-Vadillo, García-Sánchez, 2016). Эти соединения необходимы для нормального функционально-

го состояния клеток, в том числе для их эффективного деления в фазе экспоненциального роста клеточной культуры. Однако при этом FBS является биологической жидкостью, содержащей огромное количество экзосом. По-видимому, именно присутствующие в FBS экзосомы и их содержимое опосредуют значительную часть физиологических эффектов FBS на клеточные культуры (Beninson, Fleshner, 2015; Zhou et al., 2020). При этом клеточные и сывороточные экзосомы имеют более 95% гомологии белкового состава, что делает невозможным их разделение и сильно затрудняет дальнейший протеомный и транскриптомный анализ клеточных экзосом (Keerthikumar et al., 2016). В этой связи был предложен протокол удаления экзосом из FBS путем ее длительного ультрацентрифугирования при 100 тыс. g, что приводит к 50%-ному уменьшению сигнала маркерного экзосомального белка CD63 при иммуноблоттинге (Abramowicz et al., 2018).

В начале нашей работы мы оценили применимость ультрацентрифугирования для удаления экзосом из FBS с учетом задач последующего использования высокопроизводительных аналитических методов. Для увеличения эффективности осаждения сывороточных экзосом мы использовали два последовательных раунда 15-часового ультрацентрифугирования среды, содержащей 20% сыворотки, после чего верхнюю фракцию отбирали и использовали для культивирования клеток.

Ультрацентрифугированный препарат клеточных экзосом, полученный после культивирования клеток в среде с 5% FBS, освобожденной от ее собственных экзосом, мы проанализировали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (рис. 1).

Очевидно, что количество неспецифических хлопьевидных агрегатов сывороточных белков в данной пробе в десятки раз превышает количество целевых экзосом, тем самым крайне затрудняя морфологический и молекулярный анализ данных везикул. Кроме того, по недавно опубликованным данным (Lehrich et al., 2018), ультрацентрифугирование FBS в принципе не приводит к полному удалению экзосом из сыворотки. Следовательно, мы не можем быть полностью уверены в происхождении экзосом (из клеток A549 или из FBS), представленных на рис. 1.

Для уточнения данных электронной микроскопии и идентификации наиболее обильных белков в пробе, мы провели ее электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле (рис. 2), трипсинолиз и масс-спектрометрический анализ наиболее выраженных полос в геле.

По данным масс-спектрометрии, основными идентифицированными в образце белками являлись внеклеточные сывороточные белки: альфа-2-макроглобулин (рис. 2, *полоса 2*), сывороточный альбумин (рис. 2, *полоса 7*), аполипопротеин А (рис. 2, *полоса 9*). Экзосомальные белки не были выявлены масс-спектрометрически, то есть они не образуют выраженных

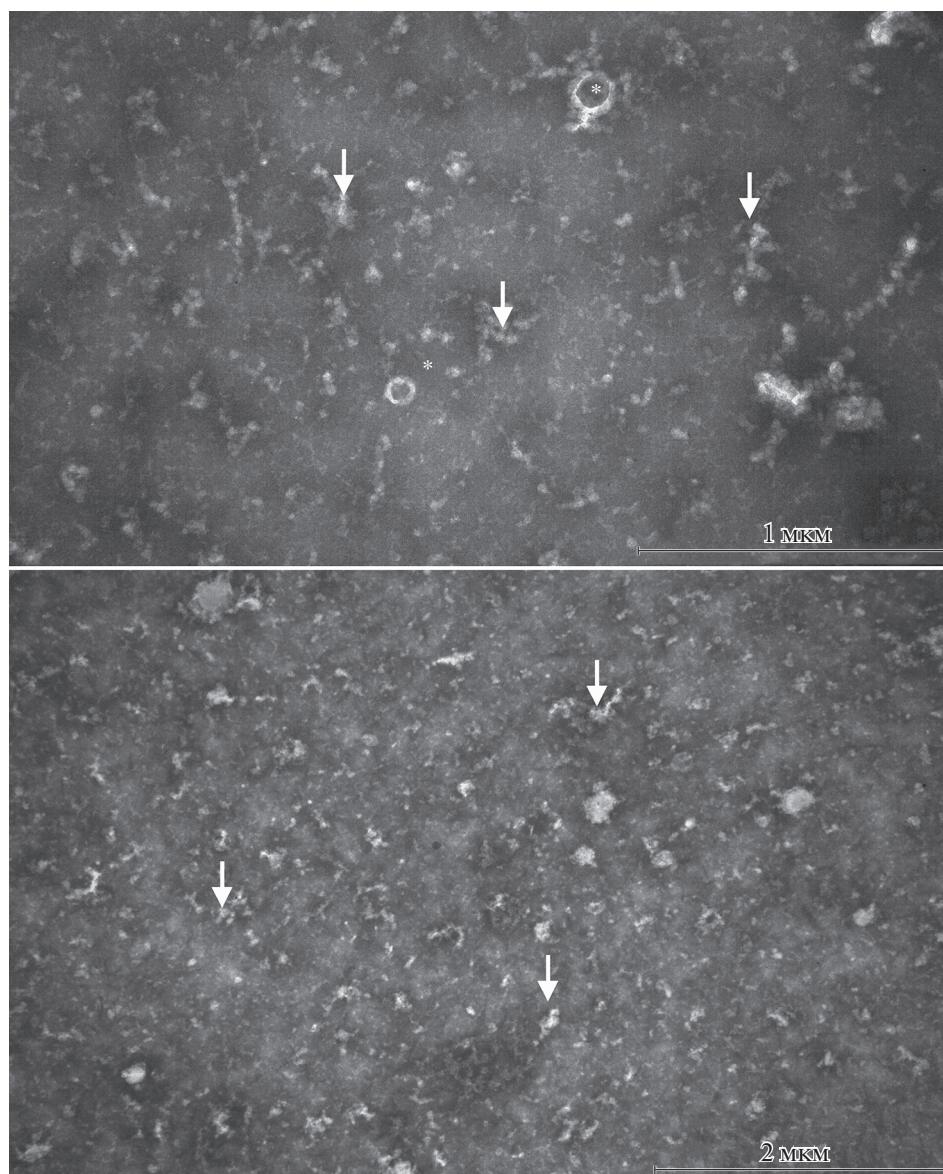


Рис. 1. Электронные микрофотографии ультрацентрифугированного препарата клеточных экзосом после культивирования клеток в среде, содержащей 5% сыворотки (FBS), очищенной от экзосом. Наряду с отдельными экзосомами (*звездочки*), видны многочисленные хлопьевидные агрегаты сывороточных белков, покрывающие пленку-подложку (*стрелки*).

ных полос при электрофоретическом разделении и присутствуют в значительно меньших концентрациях по сравнению с вышеперечисленными сывороточными белками. Маскирующий эффект преобладающих в образце сывороточных белков делает практически невозможным детальный протеомный анализ экзосом.

Таким образом, существующий протокол очистки FBS от экзосом не приводит к удовлетворительным результатам в рамках стоящих задач протеомного анализа. Учитывая это, дальнейшие эксперименты мы выполняли, культивируя клетки в течение 48 ч в бессывороточной среде DMEM. Хотя хорошо известно, что длительное сывороточное голодание в

целом может ухудшать состояние клеток, останавливать их деление и, в конечном итоге, запускать апоптотическую гибель, мы не наблюдали заметных изменений морфологии клеточного монослоя клеток A549 в течение 48 ч в условиях голодания (данные не приводятся), что позволило нам использовать эту методику.

Анализ методов выделения клеточных экзосом. Мы использовали три принципиально разных подхода к выделению экзосом из культуральной среды — ультрацентрифугирование, гель-фильтрацию и осаждение коммерческим реагентом Total exosome isolation reagent. Конечный объем полученных препаратов экзосом во всех случаях составлял 500 мкл для удоб-

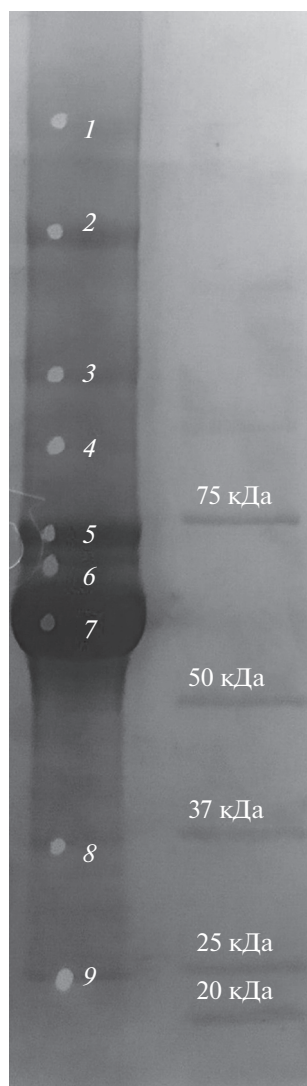


Рис. 2. ПААГ-электрофорез ультрацентрифугированного препарата клеточных экзосом после культивирования клеток A549 в среде, содержащей 5% FBS, очищенную от собственных экзосом (*левая дорожка*). 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – наиболее выраженные полосы геля, для которых была выполнена масс-спектрометрическая идентификация. *Справа* показаны маркеры мол. массы.

Хроматографические методы также широко применяются для выделения экзосом, одним из наиболее эффективных является гель-фильтрация, позволяющая отделить высокомолекулярные везикулярные структуры от низкомолекулярных примесных белков. При этом экзосомы элюируются с колонки в первую очередь, тогда как более мелкие компоненты задерживаются в порах сорбента.

Менее трудоемким способом получения экзосомальных препаратов является использование коммерческих наборов и реактивов. Согласно описанию производителей, такие наборы позволяют быстро и качественно получить чистые препараты экзосом без использования сложного оборудования. Однако закрытость информации о составе веществ в наборах, осаждающих экзосомы, затрудняет понимание их истинных возможностей и ограничений. Кроме того, большинство из них рассчитаны на небольшие объемы исходных образцов, что усложняет масштабирование данного подхода.

Основные стадии используемых в настоящей работе методов выделения и анализа экзосом отражены на схеме на рис. 3.

Динамическое светорассеяние. Результаты определения фракционного состава частиц в полученных препаратах экзосом с применением метода динамического светорассеивания представлены ниже (рис. 4).

При исследовании препарата экзосом, полученного методом ультрацентрифугирования (рис. 4а), ни автоматический подбор аттенуатора, ни разведение препарата не позволило получить достоверного разделения фракций микрочастиц. С некоторой вероятностью можно предположить в препарате наличие двух перекрывающихся фракций микрочастиц с преобладанием частиц диаметром около 300 нм, однако результат также может свидетельствовать о наличии в препарате смеси частиц разнородной как по размеру, так и по форме и оптическим свойствам. Вероятнее всего, в препарате содержится значительное количество примесных частиц (белков, белковых комплексов и агрегатов).

Выделение экзосом методом гель-фильтрации способствует получению гораздо более гомогенной фракции частиц (рис. 4б). Устойчивый пик этой фракции определяется при различных разведениях, лучше всего при десятикратном. Средний размер этой фракции несколько превышает 100 нм, что, однако, не исключает соответствие пика экзосомальной фракции. Определение размера частиц в смешанных (богатых белком) препаратах является ориентировочным и определяется многими факторами. Сопоставление данных динамического светорассеяния с обнаружением экзосомальных частиц электронной микроскопией позволяет заключить, что в препарате содержится преобладающая фракция экзосом в количестве, достаточном для определения при разведениях до 1000-кратного.

ства и достоверности сравнительного анализа полученных образцов.

Серия последовательных центрифугирований с конечным этапом ультрацентрифугирования считается классическим методом выделения экзосом из разных биологических жидкостей. Показано, что с помощью высокоскоростного ультрацентрифугирования можно получить препараты с хорошим выходом экзосом. Основными недостатками такого подхода являются трудо- и времязатратность, а также со-осаждение вместе с экзосомами различных высокомолекулярных белков и белковых комплексов, загрязняющих конечный препарат.

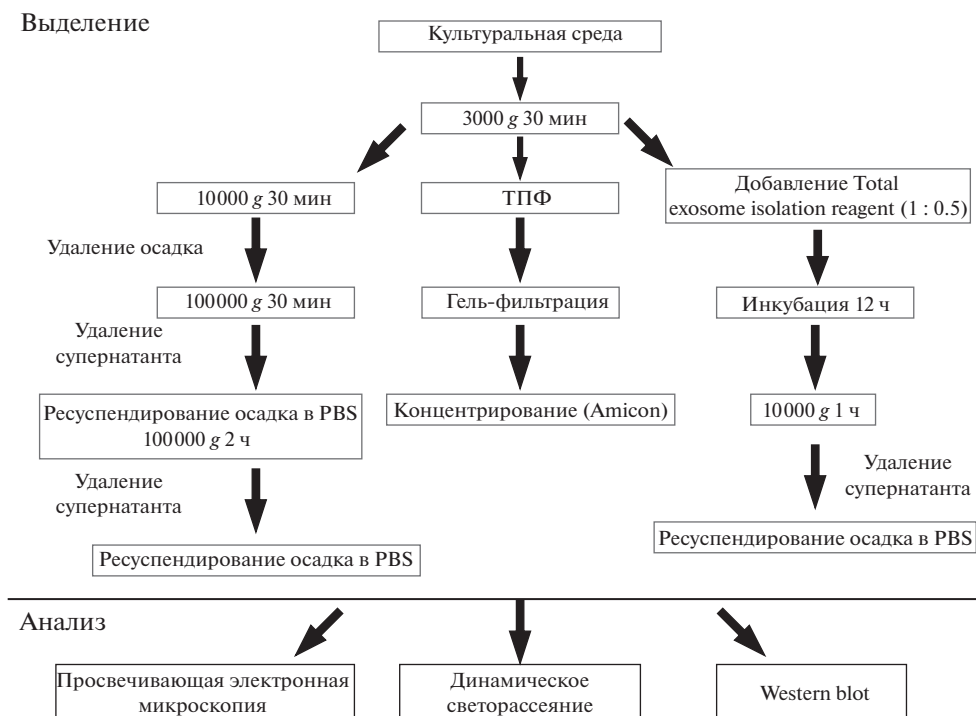


Рис. 3. Схема основных стадий методов выделения и анализа экзосом, используемых в работе.

Наконец, в препарате, полученном с помощью коммерческого реагента Total exosome isolation reagent, методом динамического светорассеивания стабильно определялись две фракции микрочастиц, однако ни одна из них не соответствовала предполагаемому размеру экзосом. Наблюдали два пика, соответствующих совсем маленьким частицам (до 10 нм) и крупным частицам (более 1 мкм) (рис. 4в). Можно предположить, что в третьем образце присутствует два типа частиц, не соответствующих известным размерам экзосомальной фракции (около 100 нм).

Электронно-микроскопический анализ. Морфологическую оценку чистоты, размеров и формы частиц в составе полученных препаратов проводили с помощью просвечивающей электронной микроскопии. В препаратах после ультрацентрифугирования присутствуют внеклеточные везикулы, соответствующие по размерам (50–120 нм) и форме (чашеобразной) экзосомам. Помимо экзосом, в препаратах также наблюдали заметное количество хлопьевидных белковых агрегатов, которые со-осаждаются с экзосомами при центрифугировании на высоких оборотах (рис. 5).

В препаратах после гель-фильтрации (рис. 6) наблюдаемое под электронным микроскопом количество экзосом несколько уступает таковому в пробах после ультрацентрифугирования, хотя вполне достаточно для электронно-микроскопической визуализации. При этом неспецифические агрегаты примесных белков в данных образцах не выявляются, т.е. степень очистки препарата в случае гель-филь-

трации существенно выше, по сравнению с ультрацентрифугированием.

В случае препарата, полученного с помощью коммерческого реагента Total exosome isolation reagent (рис. 7) экзосом в пробе не наблюдали. Образец состоит из массы округлых электронно-плотных частиц различного диаметра, по-видимому, представляющих собой осажденный материал в составе реагента.

Вестерн-блот-анализ. Метод был использован для иммунодетекции маркерного белка экзосом в полученных нами препаратах. При его проведении мы использовали моноклональные антитела к маркерному поверхностному белку экзосом аннексину A2. Результаты Вестерн-блоттинга представлены на рис. 8.

Специфические бэнды аннексина A2 (молекулярная масса около 37 кДа) обнаружены в пробах клеточных экзосом, выделенных ультрацентрифугированием и гель-фильтрацией, при этом при ультрацентрифугировании выявлен более интенсивный бэнд. Этот результат соответствует данным электронной микроскопии, согласно которым ультрацентрифугирование обеспечивает несколько более высокий выход экзосом по сравнению с гель-фильтрацией. В пробе, полученной с помощью Total exosome isolation reagent, специфический бэнд аннексина A2 не обнаружен.

Таким образом, в настоящей работе мы проанализировали метод очистки эмбриональной сыворотки от экзосом (два раунда длительного ультрацентри-

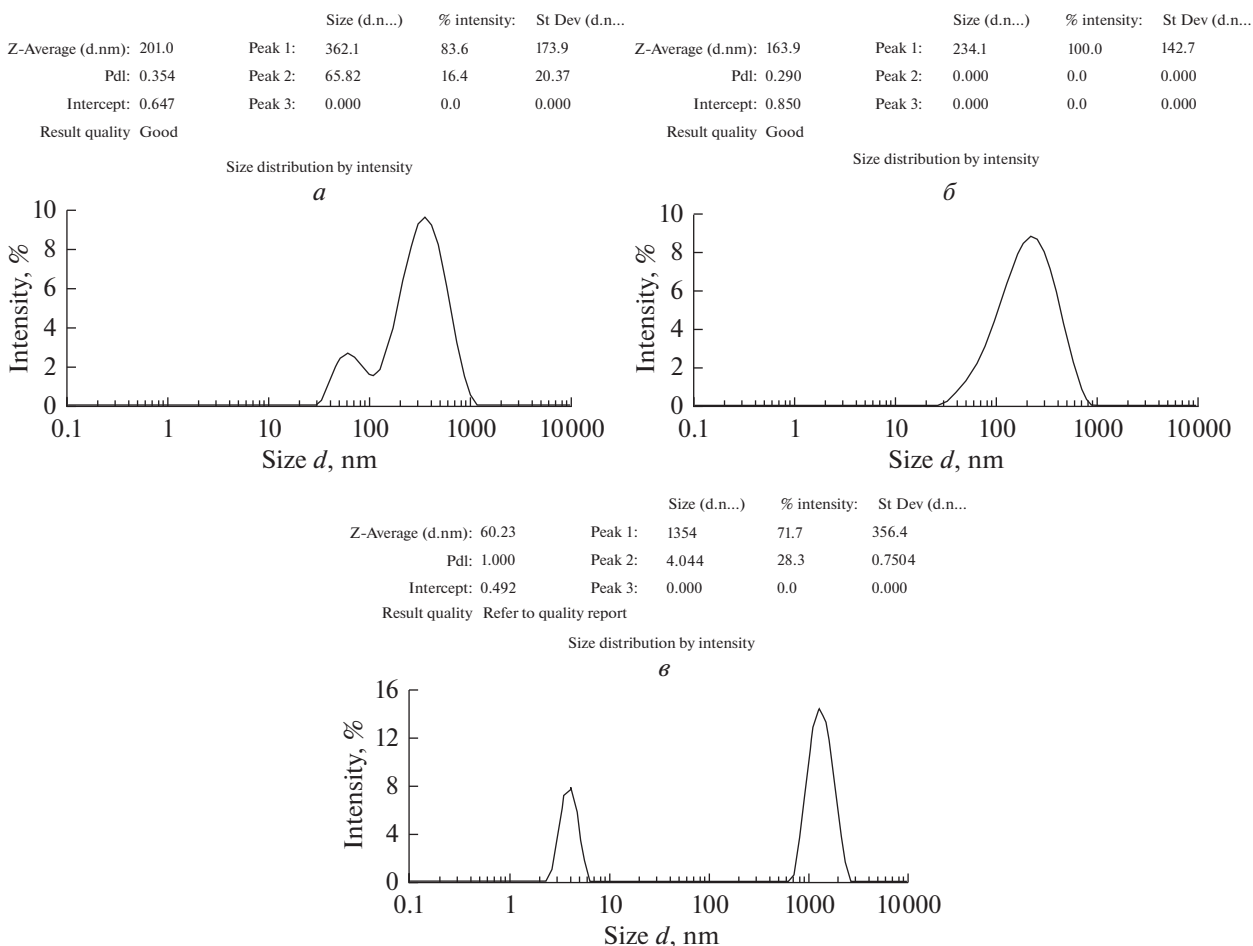


Рис. 4. Распределение размеров частиц в препаратах экзосом, выделенных тремя разными методами: *a* – ультрацентрифугированием, *б* – гель-фильтрацией, *в* – с использованием коммерческого Total exosome isolation reagent. Приведены графики, полученные с прибора Zetasizer Nano-ZSP (Malvern Instruments, Великобритания) с программным обеспечением Malvern Zetasizer Software 7.12. По горизонтали – размер частиц, нм; по вертикали – интенсивность сигнала, %.

фугирования) для ее последующего использования в культивировании клеток, секретирующих экзосомы. Оказалось, что культуральная среда с такой сывороткой содержит огромное количество сывороточных белков (по результатам электронной микроскопии и масс-спектрометрической идентификации), что исключительно усложняет задачу анализа минорных экзосомальных белков клеточного происхождения. Поэтому оптимальным решением в данном случае является 48-часовое культивирование клеток, секретирующих экзосомы, в полностью бессывороточной среде.

Далее мы сравнили 3 метода выделения клеточных экзосом (ультрацентрифугирование, гель-фильтрация и использование коммерческого реагента Total exosome isolation reagent). Для анализа полученных препаратов использовали 3 подхода – электронную микроскопию, динамическое светорассеяние и Вестерн-блот-анализ с антителами к аннексину A2.

По совокупности полученных результатов, наиболее высокий выход экзосом достигается путем ультрацентрифугирования. Однако данный протокол неизбежно приводит к со-осаждению вместе с экзосомами заметного количества неспецифических белков и белковых комплексов. Гель-фильтрация с предварительным концентрированием культуральной среды тангенциальной потоковой фильтрацией несколько уменьшает выход экзосом, однако обеспечивает несоизмеримо более высокую чистоту препарата (по данным электронной микроскопии и динамического светорассеяния). Применение реагента Total exosome isolation reagent не позволило детектировать экзосомы в пробе ни одним из использованных методов. Таким образом, по нашему мнению, гель-фильтрация с предварительным концентрированием культуральной среды тангенциальной потоковой фильтрацией является оптимальным методом выделения экзосом для задач последующего протеомного и транскриптомного анализа.

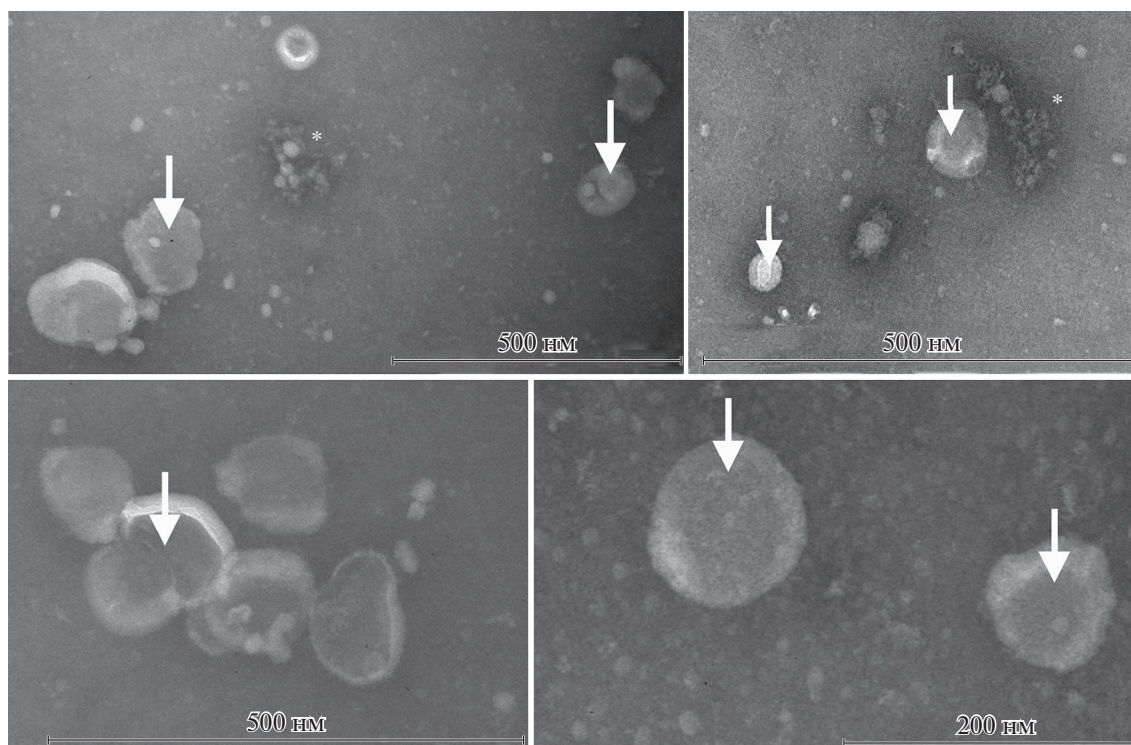


Рис. 5. Электронные микрофотографии экзосом в образце, полученном методом ультрацентрифугирования (стрелки). Помимо экзосом, в пробе присутствуют также хлопьевидные белковые агрегаты (звездочки).

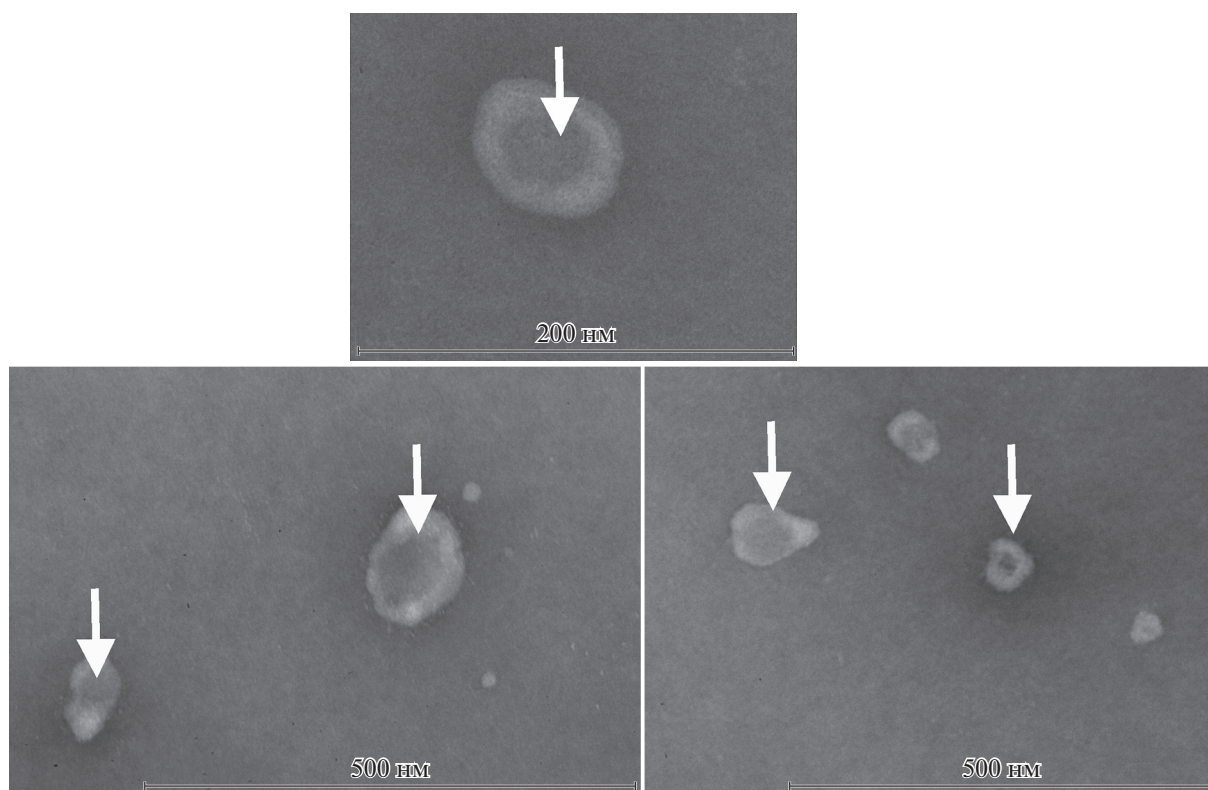


Рис. 6. Электронные микрофотографии вариантов экзосом в образце, полученном методом гель-фильтрации (стрелки). Неспецифические хлопьевидные агрегаты примесных белков в образце не выявляются.

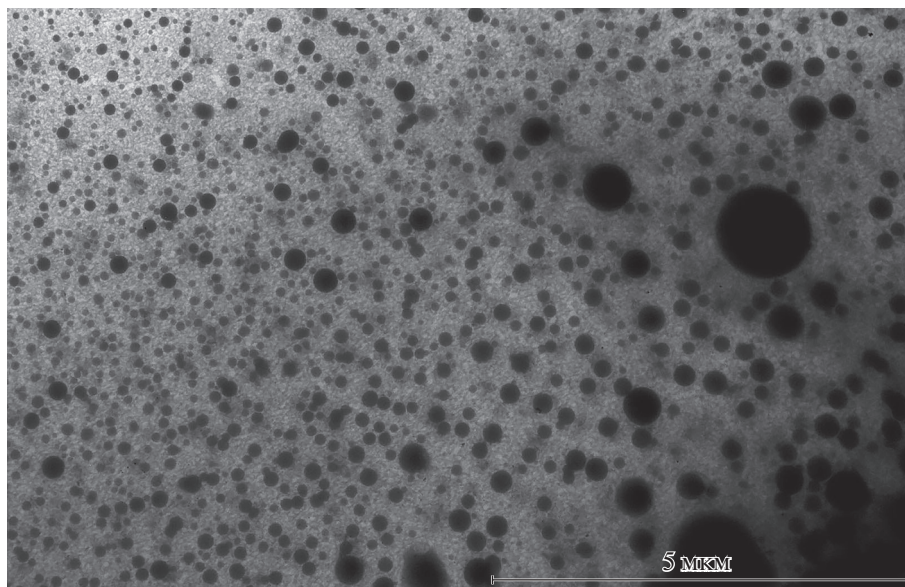


Рис. 7. Электронная микрофотография препарата, полученного в результате выделения экзосом с использованием коммерческого реагента Total exosome isolation reagent. Экзосомы не наблюдаются. Видны многочисленные округлые электронноплотные частицы различного диаметра.

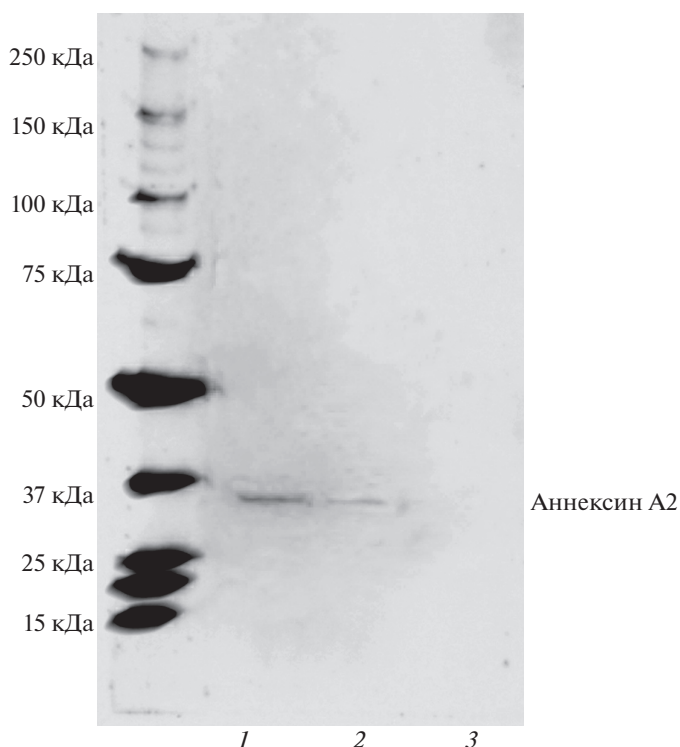


Рис. 8. Вестерн-блоттинг препаратов экзосом, полученных тремя различными способами. Дорожки: 1 – ультрацентрифугирование, 2 – гель-фильтрация, 3 – использование коммерческого реагента Total exosome isolation reagent. Иммунодетекция моноклональными антителами к аннексину 2.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 20-15-00228).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах данной работы животные и люди в качестве объектов не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abramowicz A., Marczak L., Wojakowska A., Zapotoczny S., Whiteside T.L., Widlak P., Pietrowska M.* 2018. Harmonization of exosome isolation from culture supernatants for optimized proteomics analysis. *PLoS One* V. 13. P. e0205496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205496>
- Abramowicz A., Widlak P., Pietrowska M.* 2016. Proteomic analysis of exosomal cargo: The challenge of high purity vesicle isolation. *Mol. Biosyst.* V. 12. P. 1407. <https://doi.org/10.1039/c6mb00082g>
- Admyre C., Johansson S.M., Rahman Qazi K., Filén J., Lahesmaa R., Norman M., Neve E.P.A., Scheynius A., Gabrielsson S.* 2007. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J. Immunol.* V. 179. P. 1969. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1969>
- Beninson L.A., Fleshner M.* 2015. Exosomes in fetal bovine serum dampen primary macrophage IL-1 β response to lipopolysac-

- charide (LPS) challenge. *Immunol. Lett.* V. 163. P. 187.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.10.019>
- Bunggulawa E.J., Wang W., Yin T., Wang N., Durkan C., Wang Y., Wang G. 2018. Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *J. Nanobiotech.* V. 16. P. 81.
<https://doi.org/10.1186/s12951-018-0403-9>
- Caby M.P., Lankar D., Vincendeau-Scherrer C., Raposo G., Bonnerot C. 2005. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int. Immunol.* V. 17. P. 879.
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxh267>
- Colombo M., Raposo G., Théry C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* V. 30. P. 255.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Conde-Vancells J., Rodriguez-Suarez E., Gonzalez E., Berisa A., Embade N., Gil D., Matthiesen R., Valle M., Elortza F., Wagner C., Lu S.C., Mato J.M., Falcon-Perez J.M. 2010. Candidate biomarkers in exosome-like vesicles purified from rat and mouse urine samples. *Proteomics Clin. Appl.* V. 4. P. 416.
<https://doi.org/10.1002/prca.200900103>
- Keerthikumar S., Chisanga D., Ariyaratne D., Al Saffar H., Anand S., Zhao K., Samuel M., Pathan M., Jois M., Chilkurki N., Gangoda L., Mathivanan S. 2016. ExoCarta: A web-based compendium of exosomal cargo. *J. Mol. Biol.* V. 428. P. 688.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.019>
- Keller S., Rupp C., Stoeck A., Runz S., Fogel M., Lugert S., Hager H.D., Abdel-Bakky M.S., Gutwein P., Altevogt P. 2007. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int.* V. 72. P. 1095.
<https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002486>
- Lehrich B.M., Liang Y., Khosrav P., Federoff H.J., Fiandac M.S. 2018. Fetal bovine serum-derived extracellular vesicles persist within vesicle-depleted culture media. *Int. J. Mol. Sci.* V. 19. P. 3538.
<https://doi.org/10.3390/ijms19113538>
- Marcos-Vadillo E., García-Sánchez A. 2016. Cell culture techniques: corticosteroid treatment in A549 human lung epithelial cell. *Methods Mol. Biol.* V. 1434. P. 169.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3652-6_12
- Michael A., Bajracharya S.D., Yuen P.S.T., Zhou H., Star R.A., Illei G.G., Alevizos I. 2010. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis.* V. 16. P. 34.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01604.x>
- Palmirotta R., Lovero D., Cafforio P., Felici C., Mannavola F., Pellè E., Quaresmini D., Tucci M., Silvestris F. 2018. Liquid biopsy of cancer: A multimodal diagnostic tool in clinical oncology. *Ther. Adv. Med. Oncol.* V. 10. P. 758835918794630.
<https://doi.org/10.1177/1758835918794630>
- Prado N., Marazuela E.G., Segura E., Fernández-García H., Villalba M., Théry C., Rodríguez R., Batanero E. 2008. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. *J. Immunol.* V. 181. P. 1519.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.1519>
- Purushothaman A., Bandari S.K., Liu J., Mobley J. A., Brown E.E., Sanderson R.D. 2016. Fibronectin on the surface of myeloma cell-derived exosomes mediates exosome-cell interactions. *J. Biol. Chem.* V. 291. P. 1652.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.686295>
- Samanta S., Rajasingh S., Drosos N., Zhou Z., Dawn B., Rajasingh J. 2018. Exosomes: New molecular targets of diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* V. 39. P. 501.
<https://doi.org/10.1038/aps.2017.162>
- Shelke G.V., Lässer C., Gho Y.S., Lötvall J. 2014. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J. Extracell. Ves.* V. 3. P. 24783.
<https://doi.org/10.3402/jev.v3.24783>
- Stoorvogel W., Kleijmeer M.J., Geuze H.J., Raposo G. 2002. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic.* V. 3. P. 321.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30502.x>
- Vlassov A.V., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R. 2012. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1820. P. 940.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.03.017>
- Whiteside T.L. 2015. The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring. *Expert Rev. Mol. Diagn.* V. 15. P. 1293.
<https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1071666>
- Zhou Q., Xie F., Zhou B., Li C., Kang Y., Wu B., Li L., Dai R. 2020. Fetal bovine serum-derived exosomes regulate the adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells in a cross-species manner. *Differentiation.* V. 115. P. 11.
<https://doi.org/10.1016/j.diff.2020.06.004>

Comparative Analysis of Methods for Isolating Exosomes from the Culture Medium

A. N. Gorshkov^{a,*}, L. V. Purvinsh^{a,b}, A. V. Protasov^{a,b}, P. A. Nekrasov^a, B. A. Shaldzhyan^a, and A. V. Vasin^{a,b}

^aSmorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 197376 Russia

^bPeter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251 Russia

*e-mail: angorsh@yahoo.com

Exosomes are extracellular membrane vesicles with a diameter of 40–100 nm. They are formed as invaginations of the membrane of the late endosome, with the release of the vesicles into the lumen of the multivesicular body. The fusion of the multivesicular body with the plasma membrane leads to the secretion of exosomes into the extracellular environment. Exosomes are a key vehicle for intercellular communication. They are used to transfer a wide range of biologically active molecules, including lipids, proteins, mRNA and microRNA. The transfer of these molecules to recipient cells regulates their functions normally and contributes to the pathogenesis of many diseases. The unique features of the molecular composition of exosomes make them a potentially important diagnostic and prognostic marker in medicine. The communicative function of exosomes allows them to be considered as a promising delivery system for therapeutic drugs, including the latest gene therapy tools. For the practical implementation of these pos-

sibilities, fully reproducible, standardized protocols for obtaining highly purified exosome preparations from various biological fluids and culture media, known for their complex heterogeneous composition, are required. To date, a number of methods have been proposed for the isolation and purification of exosomes. Nevertheless, there is currently no standard approach that allows one to obtain pure preparations fully suitable for the subsequent application of highly sensitive methods for the analysis of exosomal proteins and RNA. In this work, we compared the efficiency of exosome isolation from the cell culture medium by three methods: 1) ultracentrifugation, 2) concentration by tangential flow filtration followed by gel filtration, 3) precipitation using the commercial Total Exosome Isolation Reagent. Evaluation of the quality of exosome samples obtained by the above methods included transmission electron microscopy, dynamic light scattering and detection of the marker exosomal protein annexin A2 by Western blotting. According to our data, the highest purity of exosome preparations is achieved when they are concentrated by tangential flow filtration followed by gel filtration.

Keywords: exosomes, ultracentrifugation, gel filtration