

СОДЕРЖАНИЕ

Том 64, номер 6, 2022

Гомотипическая регуляция функциональной активности мультипотентных мезенхимных стромальных клеток: роль щелевых контактов <i>М. И. Ездакова, Д. К. Матвеева, Е. Р. Андреева</i>	523
Анализ механизмов подавления миграции эндометриальных стволовых клеток при селективной химической активации механочувствительных каналов Piezo1 <i>В. Ю. Васильева, Е. А. Морачевская, Ю. А. Негуляев, В. И. Чубинский-Надеждин</i>	534
Тубацин, ингибитор гистондеацетилазы 6, вызывает ацетилирование α -тубулина, блок клеточного цикла, старение и подавление миграции фибробластов мышцы, трансформированных онкогенами <i>E1A</i> и <i>cHa-ras</i> <i>А. Н. Кукушкин, С. Б. Светликова, Н. Д. Аксенов, В. А. Поспелов</i>	544
Влияние препаратов с альфа-глутамил-триптофаном <i>in vitro</i> на секрецию цитокинов и уровень поверхностной молекулы ICAM-1 <i>Е. Г. Головачева, Э. А. Старикова, Т. А. Кудрявцева, В. А. Апрятина</i>	557
Распределение ГАМКергических интернейронов и транспортера ГАМК GAT ₁ в слоях неокортекса в неонатальный период у крыс <i>Л. И. Хожай</i>	565
Распределение клеток меланомы В16 по фазам клеточного цикла под воздействием дакарбазина <i>Е. З. Лапкина, А. Р. Есимбекова, В. Д. Беленюк, А. А. Савченко, Т. Г. Рукша</i>	573
Участие транслокаторного белка в индукции и регуляции открытия поры неспецифической проницаемости в митохондриях клеток глиомы С6 <i>Ю. Л. Бабурина, Л. Д. Сотникова, О. В. Крестинина</i>	581
Оценка тканеинженерного сосудистого имплантата на основе биodeградируемой матрицы и мезенхимных стромальных клеток в хроническом эксперименте <i>in vivo</i> <i>Г. И. Попов, В. Н. Вавилов, П. В. Попрядухин, Г. Ю. Юкина, Е. Г. Сухорукова, А. А. Давыдов, Е. М. Иванькова, А. Е. Крюков, Н. В. Смирнова, В. Е. Юдин</i>	591
Действие проназы на нервные ганглии моллюска, пиявки и лягушки вызывает образование нейронно-нейрональных щелевых контактов <i>О. С. Сотников, С. С. Сергеева, Н. М. Парамонова</i>	600
100 лет профессору Андрею Павловичу Дыбану (18.04.1922–24.02.2013)	607

Contents

Vol. 64, No. 6, 2022

Homotypic regulation of functional activity of multipotent mesenchymal stromal cells: The role of gap junctions <i>M. I. Ezdakova, D. K. Matveeva, E. R. Andreeva</i>	523
Analysis of possible mechanisms of endometrial stem cell migration suppression by selective chemical activation of Piezo1 mechanosensitive channels <i>V. Y. Vasileva, E. A. Morachevskaya, Y. A. Negulyaev, V. I. Chubinskiy-Nadezhdin</i>	534
Tubacin, a histone deacetylase 6 inhibitor, causes α -tubulin acetylation, cell cycle arrest, senescence and suppression of migration of mouse fibroblasts transformed by <i>E1A</i> and <i>cHa-ras</i> oncogenes <i>A. N. Kukushkin, S. B. Svetlikova, N. D. Aksenov, V. A. Pospelov</i>	544
The effect of drugs with alpha-glutamyl-tryptophan <i>in vitro</i> on cytokine secretion and level of surface molecule ICAM-1 <i>E. G. Golovacheva, E. A. Starikova, T. A. Kudryavtseva, V. A. Apryatina</i>	557
Distribution of GABAergic interneurons and GAT1 GABA transporter in neocortical layers in the neonatal period in rats <i>L. I. Khozhai</i>	565
Cell cycle phase distribution in B16 melanoma cells under dacarbazine treatment <i>E. Z. Lapkina, A. R. Esimbekova, V. D. Beleniuk, A. A. Savchenko, T. G. Ruksha</i>	573
The participation of a translocator protein in the induction and regulation of permeability transition pore opening in mitochondria from C6 glioma cells <i>Yu. L. Baburina, L. D. Sotnikova, O. V. Krestinina</i>	581
Evaluation of tissue-engineered vascular grafts based on the biodegradable scaffold and mesenchymal stem cells in the long-term <i>in vivo</i> experiment <i>G. I. Popov, V. N. Vavilov, P. V. Popryadukhin, G. Yu. Yukina, E. G. Sukhorukova, A. A. Davydov, E. M. Ivankova, A. E. Kryukov, N. V. Smirnov, V. E. Yudin</i>	591
Action of pronase on the nerve ganglia causes formation of neural-neuronal gap contacts <i>O. S. Sotnikov, S. S. Sergeeva, N. M. Paramonova</i>	600
100 years of Professor Andrey Pavlovich Dyban (18.04.1922–24.02.2013)	607

ГОМОТИПИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК: РОЛЬ ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ

© 2022 г. М. И. Ездакова¹, Д. К. Матвеева¹, Е. Р. Андреева¹, *

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, 123007 Россия

*E-mail: andreeva1564@gmail.com

Поступила в редакцию 15.07.2022 г.

После доработки 15.07.2022 г.

Принята к публикации 17.08.2022 г.

Периэндотелиально расположенные мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) рассматриваются как одно из наиболее вероятных депо, из которого МСК могут быть мобилизованы в случае повреждения тканей. В настоящей работе проанализировано, как нарушение прямой межклеточной коммуникации при ингибировании гомотипических щелевых контактов (ЩК) может влиять на свойства МСК, востребованные в процессах заживления и восстановления тканей: состояние внутриклеточных компартментов, паракринную, в частности ангиогенную активность, способность к миграции и фагоцитозу. В культивируемых митотически неактивных МСК коммуникацию через ЩК подавляли с помощью специфического ингибитора карбеноксолона. С помощью проточной цитофлуориметрии в МСК с заблокированными ЩК было показано двукратное увеличение массы митохондрий (зонд MitoTracker Green). Трансмембранный потенциал митохондрий (зонд JC-1) и уровень активных форм кислорода (измеренный с помощью зонда CM-H2DCFDA), а также активность лизосомального компартмента (зонд LysoTracker Green) при этом не изменялись. МСК с заблокированными ЩК менее активно мигрировали в модели раны. Способность к фагоцитозу частиц латекса была снижена. В кондиционированной среде (КС) от МСК с заблокированными ЩК по данным мультиплексного анализа уровень плеiotропных цитокинов IL-6, IL-8, MСP-3 был значимо ниже. Эта КС не стимулировала ненаправленную миграцию эндотелиальных клеток и рост основных сосудов в хориоаллантоисной оболочке эмбриона перепела. Сделано предположение, что снижение эффективности прямой межклеточной коммуникации МСК–МСК *in vivo* может негативно отразиться как на функционировании стромальных предшественников в местах их расположения, так и на возможности их мобилизации из тканевых депо.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, гомотипические щелевые контакты, ингибитор, внутриклеточные компартменты, фагоцитоз, миграция, растворимые медиаторы, ангиогенез *in ovo*

DOI: 10.31857/S0041377122060037

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) вызывают значительный интерес в связи с их фундаментальной ролью в обеспечении физиологии и регенерации тканей, которая делает их важным структурным и регуляторным компонентом различных тканевых ниш (Буравкова и др., 2012; Андреева, Буравкова, 2013; Murphy et al., 2013; Murphy, Réault, 2015; Caplan, 2017; Tan et al., 2020). Многие аспекты их вовлечения в поддержание гомеостаза и ремоделирование тканей остаются неисследованными, что связано с недостаточностью знаний о

функционировании МСК в локальных тканевых депо, а также о модуляции их функциональной активности при действии соответствующих стимулов. Хорошо известно, что, по крайней мере, часть МСК *in vivo* располагается периваскулярно, где они формируют сеть контактирующих между собой клеток (Andreeva et al., 1998). В этой сети гомотипические контакты между МСК осуществляются с участием высокоспециализированных соединений – щелевых контактов (ЩК) (Orekhov et al., 2016).

ЩК играют существенную роль в регулировании тканевого гомеостаза. Через ЩК цитозоли соседних клеток связаны напрямую, что обеспечивает перемещение вторичных мессенджеров, аминокислот, ионов кальция, глюкозы и ее метаболитов, микроРНК, малых интерферирующих РНК (siRNA) и др. непосредственно из клетки в клетку, минуя внекле-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; МСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; ХАО – хориоаллантоисная оболочка; ЩК – щелевые контакты; ЭК – эндотелиальные клетки; СВХ – карбеноксолон (carbenoxolone).

точное пространство (Harris et al., 2007; Brink et al., 2012; Gresco et al., 2013). Это позволяет клеткам взаимодействовать, формируя клеточные системы с высокой степенью функциональной интеграции. Наличие интегрированной через ЩК сети обеспечивает, по-видимому, поддержание “покоящегося” (steady-state) фенотипа МСК в периваскулярных депо. Мы предположили, что снижение эффективности коммуникации через ЩК может привести к изменению функциональной активности МСК – фенотипической поляризации.

В настоящей работе мы определили, как степень гомотипической коммуникации через ЩК влияет на свойства МСК, востребованные с точки зрения реализации их регенеративного потенциала. Для этого оценивали влияние подавления коммуникации через ЩК на состояние внутриклеточных компартментов МСК, а также их паракринную, в частности ангиогенную активность, способность к миграции и фагоцитозу.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. В работе использовали линейные МСК (ASC52telo SCRC-4000™; ATCC, США) и эндотелиальные клетки (ЭК) (EA.hy926 CRL-2922™; ATCC, США) человека, которые культивировали в среде α -MEM и DMEM/F12 (Gibco, США) соответственно, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (Hyclone, США), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия) (далее – среды культивирования). Для остановки клеточных делений МСК предварительно обрабатывали митомицином С (1.5 мкг/мл, 18 ч; Sigma-Aldrich, США). МСК и ЭК постоянно культивировали при стандартных лабораторных условиях в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония).

Дизайн эксперимента. Эксперименты проводили следующим образом: после обработки митомицином МСК промывали, пассировали и рассеивали в чашки Петри в полной ростовой среде из расчета 7000 кл./см². Через 48 ч к МСК добавляли (или нет) ингибитор ЩК карбенексон (CBX) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 100 мкг/мл на 18 ч.

Оценка эффективности коммуникации через ЩК. Использовали следующие методические подходы.

1) Нагрузка флуоресцентным зондом клеток в модели “раны” клеточного монослоя (Zachar et al., 2016). Для этого монослой МСК повреждали с помощью наконечника микропипетки. Затем добавляли краситель 6-карбоксиволлюксин (1 мкМ, Sigma-Aldrich, США). Этот краситель не может проходить через клеточные мембраны неповрежденных клеток. При нанесении раны краситель попадает в поврежденные клетки и из них проникает в соседние только через ЩК. Окрашенные карбоксиволлюксином МСК фотографировали через 1 и 6 ч после нанесения раны. Появление окрашенных карбоксиволлюксином МСК,

связанных с поврежденными клетками, свидетельствовало о наличии работающих ЩК.

2) Парашют-анализ (Parashute assay) (Talbot et al., 2018). Для подтверждения взаимодействия клеток через ЩК использовали цитоплазматический зонд кальцеин-АМ (Invitrogen, США). Этот витальный краситель проникает в клетки и подвергается гидролизу под действием эстераз. Образующийся кальцеин не может выйти из клетки, но способен к перетеканию в соседние клетки через ЩК. Часть МСК окрашивали кальцеином-АМ (0.1 мкг/мл). Далее МСК, содержащие кальцеин, и неокрашенные МСК (1 : 2) сокультивировали в течение 24 ч. Увеличение количества окрашенных МСК свидетельствовало о переносе кальцеина через ЩК. Для блокирования ЩК использовали специфический ингибитор карбенексон (CBX, 100 мкг/мл; Sigma-Aldrich, США) в течение 3 ч.

Объем митохондриального компартмента и трансмембранный потенциал митохондрий. Объем оценивали при помощи независимого от трансмембранного потенциала митохондриального зонда MitoTracker Green (15 нг/мл; Invitrogen, США); трансмембранный потенциал митохондрий определяли с помощью зонда JC-1 (1.5 нг/мл; Invitrogen, США). Длина волны возбуждения и испускания для обоих зондов составляла соответственно 581 и 644 нм.

Состояние лизосомального компартмента и уровень АФК. Лизосомальный компартмент оценивали при помощи pH-чувствительного флуоресцентного зонда LysoTracker Green DND26 (0.5 мкл/мл; Invitrogen, США) (при длине волны возбуждения и испускания соответственно 504 и 511 нм). Активные формы кислорода (АФК) в клетках выявляли, используя зонд CM-H2DCFDA (1 мкг/мл, Invitrogen, США) (длина волны возбуждения и испускания соответственно 492–495 и 517–527 нм).

Для всех флуоресцентных зондов, использованных в работе, указаны конечные концентрации в среде с клетками.

Фагоцитарная активность МСК. Оценивали способность клеток поглощать флуоресцентные частицы латекса FluoSpheres Yellow-green диаметром 0.5 мкм (Molecular Probes, США). Частицы добавляли к среде культивирования в концентрации 1 млн частиц/мл. Непосредственно перед добавлением к клеткам суспензию частиц латекса обрабатывали в течение 15 мин в ультразвуковой ванне (Сапфир, Россия) для получения гомогенной суспензии, состоящей из отдельных частиц без агрегатов. МСК (7000 кл./см²) инкубировали с частицами в течение 3 ч, после чего клетки тщательно промывали фосфатным буфером для удаления частиц с поверхности. Эффективность отмычки клеток от латексных частиц контролировали с помощью фазово-контрастного микроскопа (Leica DMIL, Германия). После промывки клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 20 мин, после чего тщательно промывали фосфатным буфером и заключали в мон-

тирующую среду Fluoroshield с DAPI (Invitrogene, США). Для характеристики фагоцитарной активности вычисляли фагоцитарный индекс – долю МСК, фагоцитировавших латексные частицы. Подсчет производили с помощью флуоресцентного инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-U (Япония). В каждом эксперименте анализировали 200 клеток в трех технических повторах.

Иммуноцитохимия. Для выявления на МСК основного белка ЩК коннексина 43 (Cx43) использовали непрямо иммунофлуоресцентное мечение. Клетки фиксировали в 4%-ном параформальдегиде и окрашивали первичными мышинными моноклональными антителами к Cx43 (Abcam, Великобритания) и затем вторичными антителами козы против иммуноглобулинов мыши, мечеными AlexaFluor 488 (Имтек, Россия). После окрашивания покровные стекла с МСК монтировали на предметное стекло при помощи среды для заключения препаратов с добавлением красителя DAPI (Fluoroshield с DAPI; Sigma-Aldrich, США).

МСК анализировали на флуоресцентном инвертированном микроскопе Nikon Eclipse Ti-U, лазерном сканирующем микроскопе Zeiss LSM 900, (Zeiss, Германия) и проточном цитофлуориметре Cytotflex S (BeckmanCoulter, США), оснащенном лазерами с длиной волны 488 и 640 нм.

Ненаправленную (в отсутствие хемоаттрактантного стимула) миграцию в монослойных культурах МСК и ЭК (после добавления кондиционированной среды (КС) от МСК) оценивали *in vitro* через 6 ч после нанесения экспериментальной раны по уменьшению площади, свободной от клеток. Площадь закрытия (мм²) представляла собой разность между начальным (сразу после нанесения повреждения) и конечным размером раны. Измерение площадей проводили с использованием программного обеспечения NIS-elements AR версии 3.21 (Nikon, Япония).

Оценка транскрипционной активности генов. Использовали полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ). МСК лизировали с помощью реагента QIAzol (Qiagen, США). Концентрацию и чистоту полученной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США) по уровню поглощения при длине волн 260/280 нм. Далее на матрице РНК синтезировали кДНК с использованием Quantitech Reverse Transcription Kit (Qiagen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для определения уровня экспрессии генов использовали набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green 1. Для определения относительного изменения уровня экспрессии целевых генов в качестве гена домашнего хозяйства использовали ген гипоксантин фосфорибозилтрансферазы (*HPRT1*). Специфичность проводимой реакции определялась с помощью анализа кривой плавления продуктов амплификации в диапазоне от 55 до 95°C с шагом в 1 градус. Методом ПЦР-РВ

определяли транскрипционную активность генов *GJA1*, *GLUT1*, *TUBB*, *RhoA*, *RocK1*, *IL-6*, *IL-8*, *MCP-1* и *VEGF* с помощью соответствующих праймеров (Qiagen, США), на приборе MX300P (Stratagen, США).

Содержание паракринных медиаторов. Медиаторы в образцах КС определяли с помощью MILLIPLEX MAP (Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel-Premixed 41 Plex-Immunology Multiplex Assay) (Merck, Германия).

Оценку ангиогенной активности проводили с использованием *in ovo* модели (формирование сосудистой сети в хориоаллантоисной оболочке (ХАО) эмбриона японского перепела *Coturnix coturnix japonica*). КС от МСК наносили на хориоаллантоисную оболочку на 24 ч, контролем служила полная ростовая среда. Объем вводимого образца составлял 0.025 см³ на 1 г веса эмбриона вместе с зародышевыми оболочками. Затем образцы фиксировали и фотографировали на стереомикроскопе ZeissStemi 2000-C (Zeiss, Германия) с камерой для захвата изображения Canon G9 (Canon, Япония). На изображениях определяли число ветвей и число основных сосудов, с использованием программного обеспечения AngioQuant (www.cs.tut.fi) (Udartseva et al., 2019). Яйца японского перепела предоставлены вивариум ИМБП РАН (Москва).

Статистическая обработка. В качестве характеристики полученных выборок использовали среднее значение и стандартное отклонение. Использовали пакет программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 7.0 и непараметрический критерий Манна-Уитни (для малых и средних выборок, $n \leq 30$) при выбранном уровне значимости $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1а представлены результаты иммуноцитохимического выявления основного белка ЩК – Cx43 на поверхности МСК. Как на интактных МСК, так и на МСК с заблокированными с помощью специфического ингибитора карбенексолона (СВХ) ЩК, обнаружено присутствие Cx43 в виде специфических структур – коннексиновых бляшек. Ингибирование работы ЩК не влияло на представленность и расположение коннексиновых бляшек на поверхности МСК и на транскрипционную активность гена *GJA1*, кодирующего Cx43 (рис. 1б).

В монослое МСК связаны друг с другом работающими ЩК, что демонстрируется в экспериментах с нагрузкой ЩК-специфичным красителем 6-карбок-сифлуоресцеином в модели экспериментальной раны (рис. 2а). Данные флуоресцентной микроскопии подтверждаются с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием парашют-анализа (см. раздел “Материал и методика”). Для этого неокрашенные МСК (70% популяции) (рис. 2б: –СВХ, кривая 1) и МСК, содержащие кальцеин (30% популя-

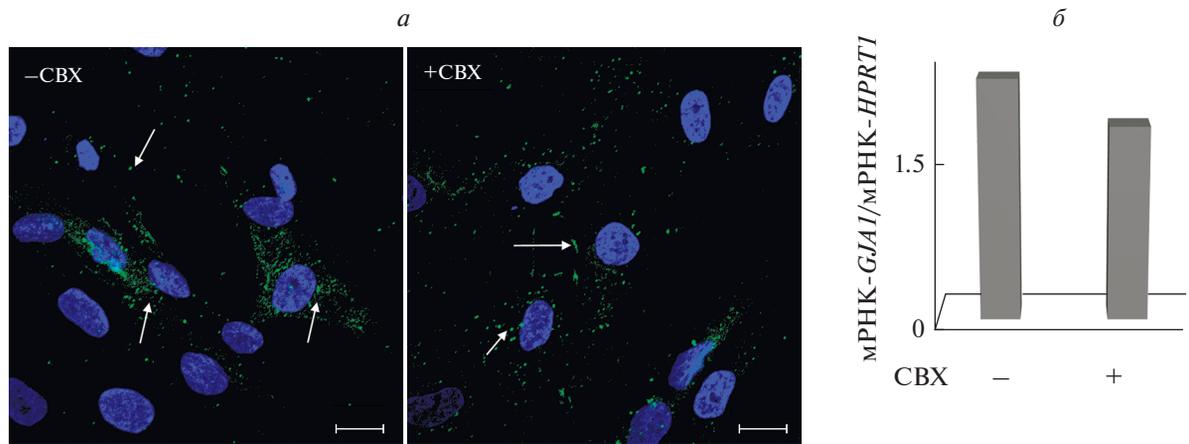


Рис. 1. Экспрессия основного белка щелевых контактов (ЩК) коннексина 43 (Cx43) на МСК и транскрипционная активность соответствующего гена. *а* – Иммуноцитохимическое выявление Cx43 на МСК; репрезентативные микрофотографии, флуоресцентная микроскопия; Cx43 в составе коннексиновых бляшек локализован на поверхности МСК и в местах контактов МСК–МСК (белые стрелки), ядра МСК докрашены DAPI; масштабный отрезок: 20мкм, увел. об.: 20×. *б* – Транскрипционная активность гена *GJA1*, кодирующего Cx43; уровень транскрипции нормализован на значение экспрессии гена домашнего хозяйства *HPRT1*. CBX – карбенексолон, специфический ингибитор ЩК. Представлены результаты, полученные в интактных МСК (–CBX) и в МСК с блокированными ЩК (+CBX).

ции) (рис. 2б: +CBX: кривая 2), сокультивировали 3 ч и затем анализировали на проточном цитофлуориметре. Для полуколичественной оценки уровня кальцеина в МСК использовали среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ). В неокрашенных МСК СИФ составила $(2.0 \pm 0.0) \times 10^3$ отн. ед. СИФ в МСК, содержащих краситель, была равна $(5400.0 \pm 500.0) \times 10^3$ отн. ед. После взаимодействия кальцеин-содержащих и неокрашенных МСК можно было видеть, что сформировалась популяция, в которой все клетки содержали кальцеин. Распределение клеток по интенсивности флуоресценции было близким к нормальному (рис. 2б: –CBX, кривая 3), СИФ составила $(1900.0 \pm 300.0) \times 10^3$ отн. ед. Значения СИФ были ниже, чем в исходных окрашенных клетках, но существенно выше, чем в неокрашенных МСК, что подтвердило перетекание кальцеина через ЩК из окрашенных клеток в неокрашенные.

После блокирования с помощью СВХ функциональная активность ЩК в МСК снижалась существенно. Практически полностью ингибировался перенос карбоксифлуоресцеина в модели раны (рис. 2а: +CBX). Парашют-анализ выявил уменьшение эффективности переноса кальцеина. Гистограмма распределения интенсивности флуоресценции в популяции после взаимодействия кальцеин-содержащих и неокрашенных МСК с заблокированными ЩК была представлена кривой с двумя пиками (рис. 2б: +CBX, кривая 3). Часть окрашенных МСК, составлявшая примерно треть популяции, имела исходно высокий уровень флуоресценции (СИФ: $(6070.0 \pm 200.0) \times 10^3$ отн. ед.) (рис. 2б: +CBX, кривая 3, пик справа). Другие две трети популяции были окра-

шены гораздо слабее (СИФ: $(8.0 \pm 0.2) \times 10^3$ отн. ед.) (рис. 2б: +CBX, кривая 3, пик слева).

После блокирования ЩК в МСК через 96 ч увеличилась (по сравнению с интактными МСК) в 2 раза масса митохондрий (объем митохондриального компартмента), выявленная с помощью красителя MitoTracker Green (рис. 3а). Трансмембранный потенциал митохондрий (определенный с помощью зонда JC-1) (рис. 3б) и содержание внутриклеточных АФК в МСК не зависели от эффективности работы ЩК (рис. 3в), но ингибирование ЩК привело к увеличению транскрипции переносчика глюкозы *GLUT1* (рис. 3г). Блокирование ЩК не повлияло на активность лизосомального компартмента, выявляемого с помощью зонда LysoTracker Green (рис. 3д).

Таким образом, ингибирование коммуникации через ЩК привело к изменению состояния внутриклеточных компартментов, что отразилось на функциональной активности МСК.

В случае МСК с ингибированными ЩК площадь открытой раны через 6 ч после нанесения была больше, чем в МСК с работающими ЩК ($P < 0.05$) (рис. 4а, б), что свидетельствовало о снижении скорости миграции МСК. При этом не выявлено изменения активности генов, кодирующих белок цитоскелета (*TUBB*) и белки сигнального пути Rho/ROCK (*RhoA*, *Rock1*), контролирующего перестройки цитоскелета (рис. 4в).

Для оценки фагоцитарной активности к МСК добавляли флуоресцентные частицы латекса. Способность к захвату частиц латекса после ингибирования контактов снижалась практически в два раза: доля фагоцитирующих МСК составила 35% в контроле и 18% в МСК с ингибированными контактами (рис. 4г).

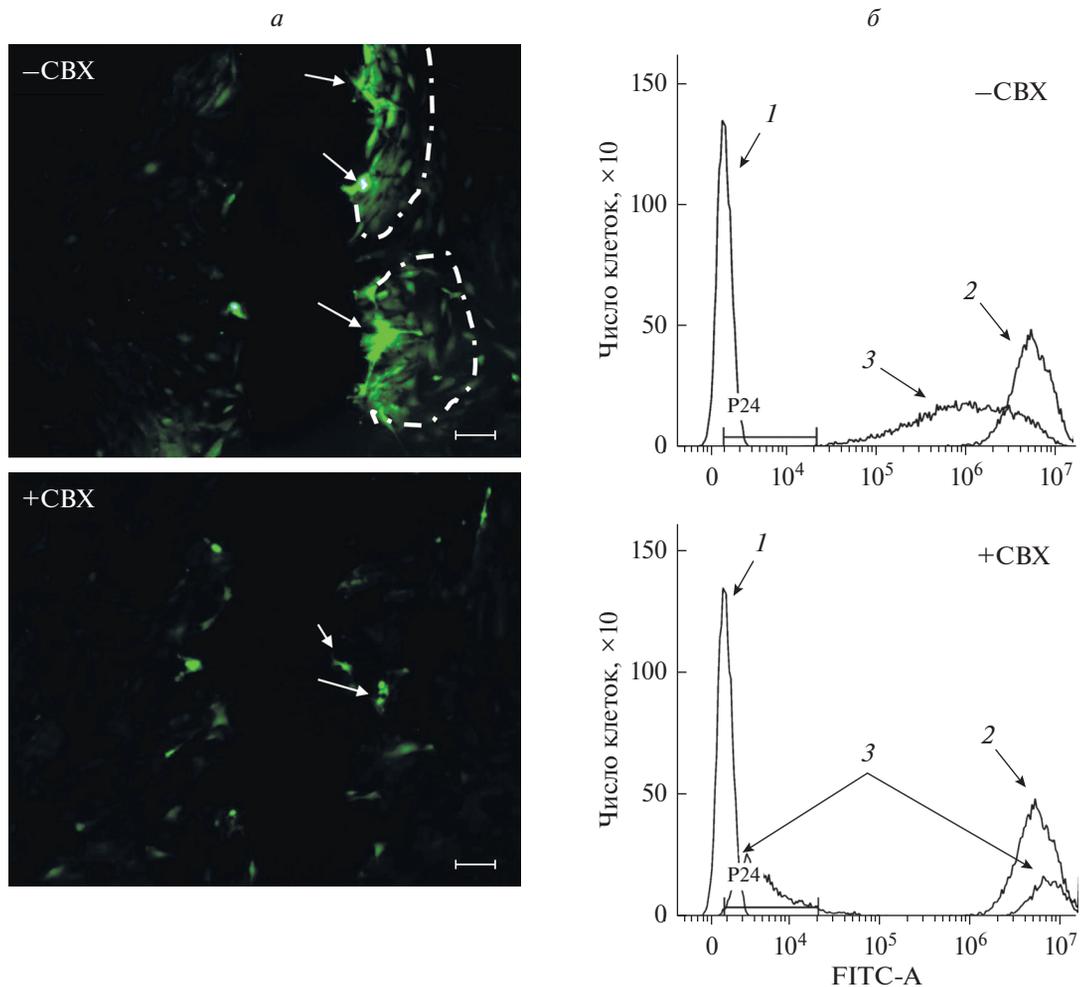


Рис. 2. Функционально-активные ШК в МСК. *а* – Флуоресцентный ШК-специфичный карбоксифлуоресцеин, введенный в МСК при повреждении монослоя, распространяется через работающие ШК; белыми стрелками отмечены поврежденные МСК, ярко окрашенные карбоксифлуоресцеином; прерывистая линия показывает область клеток, в которые краситель проник через ШК; флуоресцентная микроскопия, репрезентативные микрофотографии: масштабный отрезок: 50 мкм; увел. об.: 10×. *б* – Функционально-активные ШК в МСК, проточная цитофлуориметрия, парашют-анализ, репрезентативные гистограммы распределения МСК неокрашенных (1), окрашенных кальцеином-АМ (2) и смешанная популяция 1 и 2 (3). Кальцеин перетек из окрашенных МСК в неокрашенные через работающие ШК. СВХ – карбенексолон, специфический ингибитор ШК; –СВХ – интактные МСК; +СВХ – МСК с заблокированными ШК.

Ангиогенные эффекты КС от МСК с работающими и заблокированными ШК оценивали по влиянию на ненаправленную миграцию в экспериментальной ране в монокультурах ЭК (рис. 5а, б) и в модели формирования сосудистой сети в ХАО эмбриона перепела (рис. 5в–д).

Эффективность закрытия раны ЭК была одинаковой при культивировании в КС от МСК с работающими или заблокированными ШК (рис. 5б).

Через 24 ч после добавления среды культивирования (контроль) или КС от интактных МСК в сосудистой сети ХАО стало больше как основных сосудов, так и ветвей. Эффект при добавлении КС был более выраженным. Превышение над значениями в контроле составило 20% ($P = 0.0476$ и $P = 0.0286$ для основных сосудов и ветвей соответственно) (рис. 5з, д).

При использовании КС от МСК с ингибированными ШК не выявлено прироста основных сосудов в ХАО ($P = 0.699$) (рис. 5з), тогда как прирост ветвей был таким же, как при действии КС от интактных МСК (20%, $P = 0.0222$).

Транскрипционная активность генов МСК, кодирующих плейотропные ангиогенные цитокины IL-6, IL-8 и MCP-1, а также основной ангиогенный медиатор – фактор роста сосудистого эндотелия VEGF, не изменялась в МСК с заблокированными ШК (рис. 5е). При этом содержание ангиогенных медиаторов IL-6, IL-8, GRO, MCP-3 в КС от МСК понижалось, что могло быть причиной выявленных эффектов (рис. 5е). Снижение уровня VEGF носило характер тенденции, но было отмечено увеличение уровня другого медиатора – фактора роста фиброб-

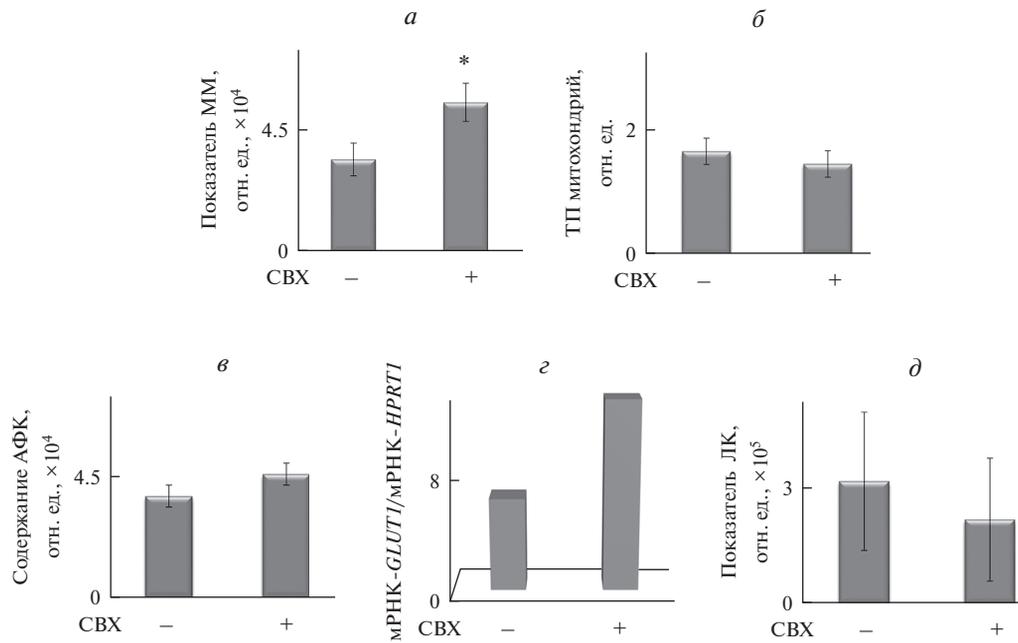


Рис. 3. Влияние блокирования щелевых контактов с помощью ингибитора карбенексолона (CBX) на состояние внутриклеточных компартментов МСК: массы митохондрий (ММ, *a*), трансмембранного потенциала (ТП) митохондрий (*б*), содержания АФК (*в*), уровня транскрипции гена переносчика глюкозы *GLUT1* (*г*); данные нормализованы на значение экспрессии гена домашнего хозяйства *HPRT1*) и лизосомального компартмента (ЛК, *д*). По вертикали — средняя интенсивность флуоресценции митохондриально-селективного красителя MitoTracker Green (*a*) или JC-1 (*б*), АФК-чувствительного зонда CM-H2DCFDA (*в*) и pH-чувствительного лизосомного красителя LysoTracker Green (*д*). Представлены средние значения и стандартные отклонения, $n = 4$. Результаты получены в интактных МСК (–CBX) и в МСК с заблокированными ЩК (+CBX).

ластов (FGF-2). Такое изменение секреторного профиля, по-видимому, и определило уменьшение ангиогенной активности КС от МСК с ингибированными ЩК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, МСК образуют различные типы соединений, таких как адгезионные и щелевые контакты, туннельные микротрубочки (Batra et al., 2012; Plotnikov et al., 2015; Успенская и др., 2021). Мы сосредоточили внимание на ЩК, т.к. именно этот способ коммуникации позволяет клеткам обмениваться метаболитами и сигнальными молекулами, минуя внеклеточное пространство, и таким образом может осуществляться модификация активности клеток в пределах популяции. Ранее мы показали, что физическое уменьшение степени гомотипических контактов МСК приводит к поляризации их фенотипа (Ездакова и др., 2020). МСК при низкой плотности и, соответственно, малом количестве физических контактов, имели более высокие уровни трансмембранного потенциала митохондрий и эндогенных АФК, менее закисленный лизосомальный компартмент, а также продуцировали существенно больше растворимых медиаторов, обладающих иммунорегуляторной и ангиогенной активностью. Возник вопрос, как снижение функциональной коммуника-

ции через высокоспециализированные структуры, такие как ЩК, при сохранении уровня физических контактов повлияет на фенотипическую поляризацию МСК?

После ингибирования ЩК в МСК нами выявлено увеличение объема митохондриального компартмента, при этом не изменялись трансмембранный потенциал митохондрий и уровень внутриклеточных АФК. Изменение массы митохондрий рассматривается как индикатор происходящих внутри клетки изменений. С одной стороны, увеличение массы митохондрий может быть свидетельством преобладания анаболических процессов над катаболическими, что сопровождается усилением биогенеза митохондрий (Lamb et al., 2015). С другой стороны, есть данные, позволяющие интерпретировать увеличение массы митохондрий как защитный ответ клеток на имевший место стресс, в частности повреждение митохондрий. Так, показано увеличение этого показателя после действия ионизирующего излучения (Limoli et al., 2003), пероксида водорода (Lee et al., 2005), антибиотиков (Manchini et al., 2005), цитостатиков (Cupler et al., 1995) и статинов (Lee et al., 2000). Логично предположить, что в наших экспериментах снижение эффективности прямых межклеточных коммуникаций оказалось стрессом для МСК. Усиление биогенеза митохондрий в этом случае можно интерпретировать как адаптивную реакцию. Еще

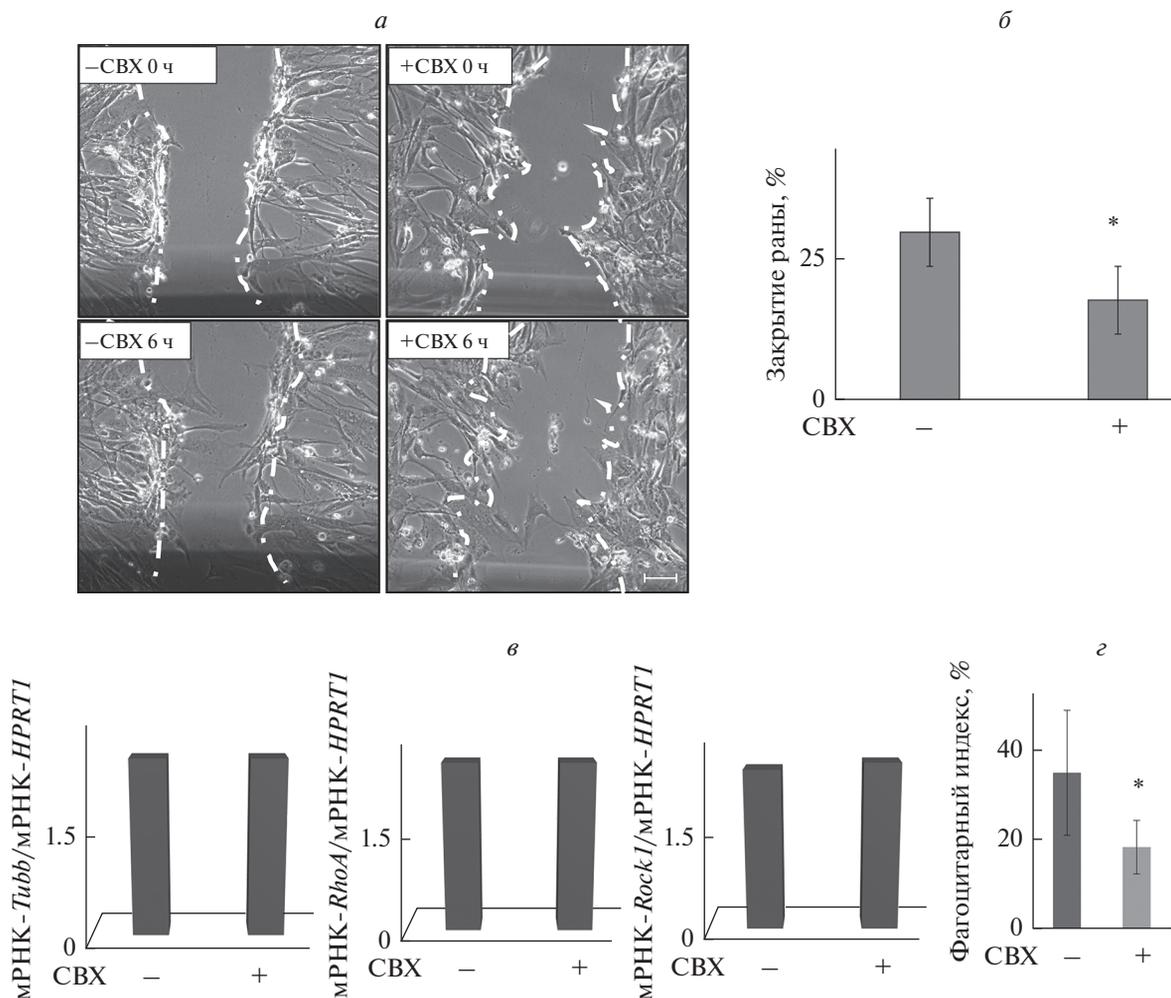


Рис. 4. Влияние блокирования ЩК с помощью ингибитора карбенноксолон (CBX) на функциональную активность МСК. *а* – Ненаправленная миграция МСК в модели раны монослоя; фазово-контрастная микроскопия, репрезентативные микрофотографии; прерывистая линия показывает границы раны (поврежденного монослоя) в точке “0”; масштабный отрезок: 50 мкм, увел. об.: 10×. *б* – Эффективность закрытия раны; представлены средние значения и стандартные отклонения, $n = 4$, (*) – различия достоверны при $P < 0.05$. *в* – Транскрипционная активность генов, кодирующих тубулин (*TUBB*) и белки-регуляторы миграции (*RhoA*, *Rock1*), данные нормализованы на значение экспрессии гена домашнего хозяйства *HPRT1*, $n = 3$. *г* – Фагоцитарный индекс, показаны средние значения и стандартные отклонения для доли МСК, захвативших частицы латекса, $n = 4$, (*) – различия достоверны при $P < 0.05$. Результаты получены в интактных МСК (–CBX) и в МСК с заблокированными ЩК (+CBX).

одним проявлением ответа на стресс на уровне клеточного метаболизма можно считать повышение транскрипции переносчика глюкозы, что может указывать на увеличение гликолитической составляющей в метаболизме АТФ.

Блокирование ЩК привело к изменению функциональной активности МСК. Выявленное замедление ненаправленной миграции МСК после ингибирования ЩК оказалось неожиданным. Ранее было показано, что снижение коммуникации через ЩК за счет подавления транскрипции *Sx43* приводит к стимуляции миграции. При этом было выявлено увеличение транскрипции генов, кодирующих белки, ассоциированные с репарацией тканей: нескольких матриксных металлопротеиназ, факторов

TGF- β 1 и проангиогенного VEGF-A, тогда как гены, молекулы которых ассоциированы с фиброзом (про-коллаген I типа, сократительные белки), были ингибированы. В эти изменения вовлечены сигнальные пути ERK1/2, GSK3 α/β , TGF- β и транскрипционные факторы AP1, SP1 (Tazemany et al., 2015). В нашей работе ингибирование работы ЩК не сопровождалось снижением транскрипции белка *Sx43* и уменьшением количества коннексиновых бляшек на поверхности МСК, с чем, по-видимому, и было связано отсутствие стимуляции миграции МСК с заблокированными ЩК. Это наблюдение может представлять интерес с точки зрения возможности направленного воздействия на функционирование ЩК-интегрированных клеточных систем.

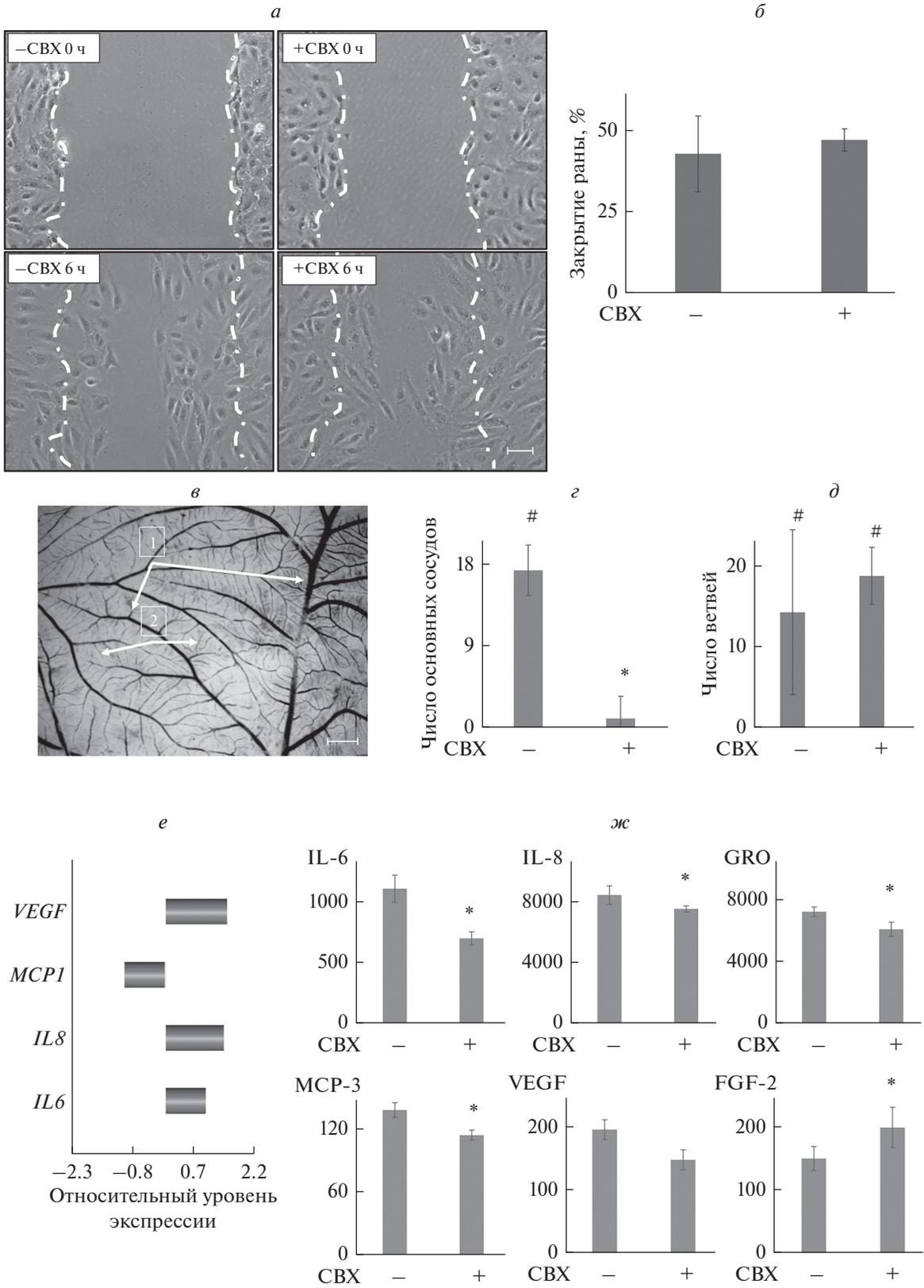


Рис. 5. Ангиогенные эффекты кондиционированной среды от МСК с работающими и заблокированными ЩК в моделях *in vitro* и *in ovo*. *а* – Ненаправленная миграция эндотелиальных клеток (ЭК) в модели раны монослоя; фазово-контрастная микроскопия, репрезентативные микрофотографии; прерывистой линией показаны границы поврежденного монослоя в точке “0”; масштабный отрезок: 50 мкм, об.: 10×. *б* – Эффективность закрытия раны ЭК; представлены средние значения и стандартные отклонения, $n = 4$; отличие от значений в контроле (среда культивирования, *) и от значений для интактных МСК (–СВХ, #) достоверно при $P < 0.05$. *в* – Сосудистая сеть в хориоаллантаической оболочке (ХАО) эмбриона перепела, стрелками указаны основные сосуды (1) и ветви (2); микроскопия в светлом поле, репрезентативная микрофотография; масштабный отрезок: 1 мм, об.: 6×. *г*, *д* – Число основных сосудов и ветвей соответственно: показан прирост по сравнению с контролем (средой культивирования); отличие от значений в контроле (*) и от значений для интактных МСК (–СВХ, #) достоверно при $P < 0.05$. *е* – дифференциальная экспрессия генов, кодирующих ангиогенные медиаторы; показана кратность отличий в МСК с заблокированными ЩК по сравнению с интактными МСК, $n = 3$. *ж* – Содержание ангиогенных медиаторов (IL-6, IL-8, GRO, MCP-3, VEGF, FGF-2) в кондиционированной среде МСК. Представлены средние значения и стандартные отклонения, $n = 4$; отличия между МСК с заблокированными контактами (+СВХ) и интактными МСК (–СВХ) достоверны при $P < 0.05$ (*).

Помимо снижения миграции мы обнаружили уменьшение фагоцитарного индекса после ингибирования ЩК в МСК. Подобный эффект был ранее описан в результате нокдауна *Sx43* и последующего подавления работы ЩК в клетках внутриглазной трабекулярной сети (Li et al., 2020). Кроме того, ингибирование *Sx43* с помощью малых интерферирующих мНПК вызывало снижение фагоцитоза в макрофагах. Этот эффект авторы объяснили тем, что *Sx43* связан с цитоскелетными белками и необходим для реорганизации F-актинового цитоскелета и RhoA-зависимого захвата фагоцитируемых частиц (Anand et al., 2008).

Фенотипическая поляризация МСК при снижении коммуникации через ЩК, помимо замедления миграции и подавления фагоцитоза, сопровождалась снижением продукции паракринных медиаторов, что привело к ослаблению ангиогенных эффектов КС от МСК. Ранее после ингибирования ЩК в культивируемых стромальных клетках эндометрия человека было показано снижение продукции VEGF-A, что рассматривалось как одна из причин снижения ангиогенеза в эндометрии (Yu et al., 2011). В нашей работе при анализе паракринного профиля КС выявлена тенденция к снижению уровня основного ангиогенного медиатора VEGF, играющего центральную роль в стимуляции пролиферации и миграции ЭК, а также наблюдалось снижение содержания нескольких хемокинов: IL-8, IL-6, GRO, MCP-3.

Хемокины играют важную роль в регуляции процессов ангиогенеза. IL-8 – первый из хемокинов, для которых показана прямая проангиогенная активность за счет стимуляции миграции ЭК, а также опосредованная – путем усиления продукции VEGF и фактора роста фибробластов FGF-2 (Li et al., 2003). Похожими эффектами обладает и плеотропный IL-6: за счет стимулирования синтеза и секреции VEGF он активирует процессы миграции и пролиферации ЭК, что обеспечивает формирование сосудистой сети (Papetti, Herman, 2002; Wei et al., 2003). Кроме того, IL-6 повышает экспрессию Ang-2. Этот медиатор

вызывает антиангиогенные эффекты, способствует гибели клеток эндотелия и регрессии сосудов. Но действуя синергично с VEGF, он содействует образованию новых кровеносных сосудов, опосредуя взаимодействия между эндотелиальными и периваскулярными клетками, усиливая эффект проангиогенных белков (Wei et al., 2003; Kayakabe et al., 2012).

Кроме того, еще ряд факторов роста и цитокинов, таких как GRO- α , вызывают опосредованные проангиогенные эффекты через усиление продукции основных регуляторов сосудобразования (Caunt et al., 2006). Семейство моноцитарных хемотактических протеинов также вовлечено в регуляцию роста сосудов. В частности, продемонстрировано, что MCP-3 стимулирует миграцию МСК, тем самым индуцируя ангиогенез (Bousquenaud et al., 2012). Поскольку в наших экспериментах содержание перечисленных выше медиаторов значимо снижалось, это может объяснять отсутствие действия на продукцию VEGF, стимуляцию миграции ЭК в модели раны, а также снижение эффективности формирования сосудистой сети *in ovo* при использовании КС от МСК с заблокированными ЩК.

Таким образом, снижение эффективности прямой межклеточной коммуникации МСК–МСК может рассматриваться как стрессовая ситуация, приводящая к ухудшению интеграционной целостности клеточной системы МСК в локальных тканевых депо и поляризации фенотипа МСК. В связи с этим представляется актуальным анализ того, как факторы микроокружения МСК могут повлиять на эффективность коммуникации. В частности, есть данные о подавлении ЩК при гипергликемии (Muto et al., 2014) и повышенном уровне воспалительных медиаторов (Dorshkind et al., 1993; Duffy et al., 2000; Chanson et al., 2005). Возможно, что подобные эффекты могут вызваться также острым гипоксическим стрессом или депривацией факторов роста, возникающими при повреждении тканей. Подобного рода нарушения могут негативно отразиться как на функционировании МСК в местах их расположения, так и на возможности их мобилизации из тканевых депо.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00075).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В настоящей работе не проводили какие-либо исследования с использованием животных или людей в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.* 2013. Паракринная активность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и ее особенности в условиях гипоксии. Физиол. человека. Т. 39. № 3. С. 104. (*Andreeva E.R., Buravkova L.B.* 2013. Paracrine activity of multipotent mesenchymal stromal cells and its modulation in hypoxia. Human Physiol. 2013. V. 39. № 3. P. 315. <https://doi.org/10.7868/S0131164613030041>)
- Буравкова Л.Б., Андреева Е.Р., Григорьев А.И.* 2012. Роль кислорода как физиологического фактора в проявлении функциональных свойств мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека. Физиол. человека. Т. 38. № 4. С. 1. (*Buravkova L.B., Andreeva E.R., Grigoriev A.I.* 2012. The impact of oxygen in physiological regulation of human multipotent mesenchymal cell functions. Hum. Physiol. V. 38. № 4. P. 444.)
- Ездакова М.И., Зорникова К.В., Буравков С.В., Андреева Е.Р.* 2020. Функциональная активность непролиферирующих мезенхимных стромальных клеток, культивируемых в различной плотности. Клет. тех. биол. мед. № 4. С. 247. (*Ezidakova M.I., Zornikova K.V., Buravkov S.V., Andreeva E.R.* 2021. Functional activity of non-proliferating mesenchymal stromal cells cultured at different densities. Bull. Exper. Biol. Med. V. 170. P. 537. <https://doi.org/10.47056/1814-3490-2020-4-247-254>)
- Успенская Ю.А., Малиновская Н.А., Салмина А.Б.* 2021. Межклеточный транспорт митохондрий: молекулярные механизмы и роль в поддержании энергетического гомеостаза в тканях. Цитология. Т. 63. № 6. С. 513. (*Uspenskaya Yu.A., Malinovskaya N.A., Salmina A.B.* 2021. Intercellular mitochondrial transfer: molecular mechanisms and role in maintaining the energy homeostasis in tissues. Tsitologiya. V. 63. № 6. P. 513. <https://doi.org/10.31857/S0041377121060110>)
- Anand R.J., Dai S., Gribar S.C., Richardson W., Kohler J.W., Hoffman R.A., Branca M.F., Li J., Shi X.H., Sodhi C.P., Hackam D.J.* 2008. A role for connexin43 in macrophage phagocytosis and host survival after bacterial peritoneal infection. J. Immunol. V. 181. P. 8534. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8534>
- Andreeva E.R., Pugach I.M., Gordon D., Orekhov A.N.* 1998. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. Tiss. Cell. V. 30. P. 127. [https://doi.org/10.1016/s0040-8166\(98\)80014-1](https://doi.org/10.1016/s0040-8166(98)80014-1)
- Batra N., Kar R., Jiang J.X.* 2012. Gap junctions and hemichannels in signal transmission, function and development of bone. Biochim. Biophys. Acta. V. 1818. P. 1909. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.09.018>
- Bousquenaud M., Schwartz C., Léonard F., Rolland-Turner M., Wagner D., Devaux Y.* 2012. Monocyte chemotactic protein 3 is a homing factor for circulating angiogenic cells. Cardiovasc. Res. V. 94. P. 519. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs140>
- Brink P.R., Valiunas V., Gordon C., Rosen M.R., Cohen I.S.* 2012. Can gap junctions deliver? Biochim. Biophys. Acta. V. 1818 P. 2076. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.09.025>
- Caplan A.I.* 2017. Mesenchymal stem cells: time to change the name! Stem Cells Transl. Med. V. 6. P. 1445. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
- Castellano P., Eugenin E.A.* 2014. Regulation of gap junction channels by infectious agents and inflammation in the CNS. Front. Cell Neurosci. V. 8. P. 122. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00122>
- Caunt M., Hu L., Tang T., Brooks P.C., Ibrahim S., Karparkin S.* 2006. Growth-regulated oncogene is pivotal in thrombin-induced angiogenesis. Cancer Res. V. 66. P. 4125. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2570>
- Chanson M., Derouette J.P., Roth I., Foglia B., Scerri I., Dudez T., Kwak B.R.* 2005. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. Biochim. Biophys. Acta. V. 1711. P. 197. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.10.005>
- Cupler E.J., Danon M.J., Jay C., Hench K., Rapka M., Dalakos M.C.* 1995. Early features of zidobudine-associated myopathy: histopathological findings and clinical correlations. Acta Neuropathol. V. 90. P. 1. <https://doi.org/10.1007/BF00294452>
- Dorshkind K., Green L., Godwin A., Fletcher W.H.* 1993. Connexin-43-type gap junctions mediate communication between bone marrow stromal cells. Blood. V. 82. P. 38.
- Duffy H.S., John G.R., Lee S.C., Brosnan C.F., Spray D.C.* 2000. Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1beta in primary human fetal astrocytes. J. Neurosci. V. 20. P. RC114. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-23-j0004.2000>
- Greco S.J., Rameshwar P.* 2013. Analysis of the transfer of circulating microRNA between cells mediated by gap junction. Methods Mol. Biol. V. 1024. P. 87. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-453-1_7
- Harris A.L.* 2007. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. Prog. Biophys. Mol. Biol. V. 94. P. 120. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.011>
- Kayakabe K., Kuroiwa T., Sakurai N., Ikeuchi H., Kadiombo A.T., Sakairi T., Nojima Y.* 2012. Interleukin-6 promotes destabilized angiogenesis by modulating angiopoietin expression in rheumatoid arthritis. Rheumatol. V. 51. P. 1571. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes093>
- Lamb R., Bonuccelli G., Ozsvári B., Peiris-Pagès M., Fiorillo M., Smith D.L., Bevilacqua G., Mazzanti C.M., McDonnell L.A., Naccarato A.G., Chiu M., Wynne L., Martinez-Outschoorn U.E., Sotgia F., Lisanti M.P.* 2015. Mitochondrial mass, a new metabolic biomarker for stem-like cancer cells: understanding WNT/FGF-driven anabolic signaling. Oncotarget. V. 6. P. 30453. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5852>
- Lee C.F., Liu C.Y., Hsieh R.H., Wei Y.H.* 2005. Oxidative stress-induced depolymerization of microtubules and alteration of mitochondrial mass in human cells. Ann. NY Acad. Sci. V. 1042. P. 246. <https://doi.org/10.1196/annals.1338.027>

- Lee C., Yin P.H., Lu C.Y., Chi C.W., Wei Y.H. 2000. Increase of mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem. J.* V. 348. P. 425.
- Li A., Dubey S., Varney M.L., Dave B.J., Singh R.K. 2003. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J. Immunol.* V. 170. P. 3369. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3369>
- Li X., Nagy J.I., Li D., Acott T.S., Kelley M.J. 2020. Gap junction connexin43 is a key element in mediating phagocytosis activity in human trabecular meshwork cells. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* V. 12. P. 25
- Limoli C.L., Giedzinski E., Morgan W.F., Swarts S.G., Jones G.D.D., Hyun W. 2003. Persistent oxidative stress in chromosomally unstable cells. *Cancer Res.* V. 63. P. 3107.
- Mancini M., Anderson B.O., Caldwell E., Sedghinasab M., Paty P.B., Hockenbery D.M. 2005. Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line. *J. Cell Biol.* V. 138. P. 449. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.2.449>
- Murphy M.B., Moncivais K., Caplan A.I. 2013. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exper. Mol. Med.* V. 45. P. 54. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.94>
- Murray I.R., Péault B. 2015. Mesenchymal stem cells – where do they come from and is it important? *BMC Biol.* V. 13. P. 99. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0212-7>
- Orekhov A.N., Andreeva E.R., Bobryshev Y.V. 2016. Cellular mechanisms of human atherosclerosis: role of cell-to-cell communications in subendothelial cell functions. *Tissue Cell.* V. 48. P. 25. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2015.11.002>
- Papetti M., Herman I.M. 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* V. 282. P. C947. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00389.2001>
- Plotnikov E.Y., Babenko V.A., Silachev D.N., Zorova L.D., Khryapenkova T.G., Savchenko E.S., Pevzner I.B., Zorov D.B. 2015. Intercellular transfer of mitochondria. *Biochemistry (Mosc).* V. 80. P. 542. <https://doi.org/10.1134/S0006297915050041>
- Talbot J., Brion R., Lamora A., Mullard M., Morice S., Heymann D., Verrecchia F. 2018. Connexin43 intercellular communication drives the early differentiation of human bone marrow stromal cells into osteoblasts. *J. Cell. Physiol.* V. 233. P. 946. <https://doi.org/10.1002/jcp.25938>
- Tan L., Liu X., Dou H., Hou Y. 2020. Characteristics and regulation of mesenchymal stem cell plasticity by the microenvironment-specific factors involved in the regulation of MSC plasticity. *Genes Dis.* V. 9. P. 296. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.10.006>
- Tarzemany R., Jiang G., Larjava H., Häkkinen L. 2015. Expression and function of connexin 43 in human gingival wound healing and fibroblasts. *PLoS One.* V. 10. P. e0115524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115524>
- Udartseva O.O., Zhidkova O.V., Ezdakova M.I., Ogneva I.V., Andreeva E.R., Buravkova L.B., Gollnick S.O. 2019. Low-dose photodynamic therapy promotes angiogenic potential and increases immunogenicity of human mesenchymal stromal cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* V. 199. P. 111596. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111596>
- Wei L.H., Kuo M.L., Chen C.A., Chou C.H., Lai K.B., Lee C.N., Hsieh C.Y. 2003. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene.* V. 22. P. 1517. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206226>
- Yu J., Wu J., Bagchi I.C., Bagchi M.K., Sidell N., Taylor R.N. 2011. Disruption of gap junctions reduces biomarkers of decidualization and angiogenesis and increases inflammatory mediators in human endometrial stromal cell cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.* V. 344. P. 25. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.04.011>
- Zachar L., Bačenková D., Rosocha J. 2016. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *J. Inflamm. Res.* V. 9. P. 231. <https://doi.org/10.2147/JIR.S121994>

Homotypic Regulation of Functional Activity of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: The Role of Gap Junctions

M. I. Ezdakova^a, D. K. Matveeva^a, and E. R. Andreeva^{a, *}

^a*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123007 Russia*

**e-mail: andreeva1564@gmail.com*

Perivascular multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are considered as most likely putative depot for MSCs' mobilization in case of tissue damage. Here, we analyzed the involvement of direct homotypic gap junctional intercellular communication (GJIC) in realization of MSC functions requested in tissue healing and repair: the state of intracellular compartments, paracrine, in particular angiogenic activity, the migration and phagocytosis. GJIC in growth arrested MSCs was suppressed with specific inhibitor, carbenoxolone. Using flow cytometry, a two-fold increase in mitochondrial mass (MitoTracker Green) was shown in MSCs with blocked GJ. The transmembrane mitochondrial potential (JC-1) and the ROS levels (CM-H2DCFDA probe), as well as the activity of the lysosomes (LysoTracker Green) did not change. MSCs with blocked GJs migrated less actively in the "scratch wounding" model. The phagocytosis of latex beads was reduced. According to multiplex immunofluorescence assay, the levels of pleiotropic cytokines IL-6, IL-8, and MCP-3 were significantly lower in the conditioned medium from MSCs with blocked GJs. This medium did not stimulate the non-targeted migration of endothelial cells and the growth of the tubule complexes in the chorioallantoic membrane of the quail embryo. It is supposed, that a decrease in the efficacy of direct MSC-MSC intercellular communication *in vivo* may negatively affect stromal cells' functions on site as well as their mobilization from tissue depots.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, homotypic gap junctions, inhibitor, intracellular compartments, phagocytosis, migration, soluble mediators, angiogenesis *in ovo*

УДК 576.32/.52/577.353

АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ПОДАВЛЕНИЯ МИГРАЦИИ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ СЕЛЕКТИВНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАНАЛОВ Piezo1

© 2022 г. В. Ю. Васильева¹, Е. А. Морачевская¹, Ю. А. Негуляев¹, В. И. Чубинский-Надеждин¹, *¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: vchubinskiy@gmail.com

Поступила в редакцию 10.06.2022 г.

После доработки 20.06.2022 г.

Принята к публикации 20.06.2022 г.

В работе исследовали возможные молекулярные механизмы, которые могли бы опосредовать подавление клеточной подвижности эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека (эмСК) при селективной химической активации механочувствительных каналов Piezo1 низкомолекулярным гетероциклическим соединением Yoda1. Согласно данным литературы, стимуляция активности Piezo1 в плазматической мембране может приводить к активации различных сигнальных путей, в частности связанных с активностью каналов TRPV4 или с высвобождением внутриклеточной АТФ во внеклеточную среду и последующим запуском пуринаргических каскадов. Мы предположили, что Piezo1-зависимая активация этих сигнальных путей может вносить вклад в торможение миграции эмСК при действии агониста Yoda1. С помощью полимеразной цепной реакции и иммунофлюоресцентного окрашивания выявлена экспрессия TRPV4 в эмСК на уровне мРНК и белка. В то же время, миграционные тесты показали, что ингибирование каналов TRPV4 (реагентом HC067047) не отменяло эффекта снижения клеточной подвижности эмСК в присутствии Yoda1. Кроме того, добавление в среду апиразы – дифосфогидролазы, катализирующей быстрое расщепление АТФ, не приводило к восстановлению миграционного потенциала эмСК, снижающегося при действии агониста Yoda1. Результаты работы позволяют исключить из рассмотрения гипотезы о TRPV4- или АТФ-зависимом подавлении миграции эмСК при селективной химической активации механочувствительных каналов Piezo1; обсуждаются предпосылки для поиска ионных механизмов, лежащих в основе наблюдаемых изменений подвижности эндометриальных стволовых клеток.

Ключевые слова: механочувствительные каналы Piezo1, Yoda1, клеточная подвижность, эндометриальные стволовые клетки, АТФ, TRPV4

DOI: 10.31857/S0041377122060116

Механоправляемые ионные каналы плазматической мембраны играют ведущую роль в передаче механических сигналов и формировании интегрального клеточного ответа на изменения свойств микроокружения. Ранее в наших электрофизиологических исследованиях была изучена механозависимая активация каналов в эндометриальных мезенхимных стволовых клетках человека (эмСК) (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2017, 2019a), представляющих интерес с точки зрения регенеративной медицины ввиду нескольких преимуществ, таких как доступность, неинвазивные протоколы их получения и отсутствие существенных этических проблем (Vanu et al., 2008; Zemel'ko et al., 2012; Chen et al., 2019). Недавно в эмСК были идентифицированы механочувствительные каналы Piezo1, способные в физиоло-

гических условиях проводить ионы Ca^{2+} из внеклеточной среды в цитоплазму (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2022). Полученные нами результаты, в том числе данные о функциональной кластеризации каналов, позволяют полагать, что Ca^{2+} -проницаемые каналы Piezo1 могут вносить существенный вклад в локальные механизмы кальциевой сигнализации и сопряженные процессы клеточной механотрансдукции эмСК.

Перспективным инструментом исследования физиологической роли каналов Piezo1 в нативных клетках оказались их селективные химические агонисты, способные специфически присоединяться к канальным молекулам, приводя к изменению их конформационной структуры и активации ионных токов в отсутствие механического стимула (Syeda et al., 2015; Wang et al., 2018). Недавно обнаружено, что селективный активатор каналов Piezo1 низкомолекулярное гетероциклическое соединение Yoda1 ингибирует подвижность эмСК в тестах по заживлению экс-

Принятые сокращения: МСК – мезенхимные стволовые клетки; эмСК – МСК эндометрия человека; ПЦР – полимеразная цепная реакция; hDP-MSCs – МСК из пульпы зуба.

периментальной раны (wound healing assay) (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2022).

Этот достаточно неожиданный результат согласуется с ранее полученными данными на клетках 3T3B-SV40 (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2019b) и мотивирует нас обратиться к выяснению механизмов обнаруженного эффекта подавления миграционного потенциала ЭМСК при повышении активности механочувствительных каналов Piezo1. Согласно данным литературы, стимуляция активности Piezo1 может приводить к активации различных сигнальных путей, связанных, в частности, с активностью ионных каналов TRPV4 (Swain et al., 2020; Swain, Liddle, 2021) или с высвобождением внутриклеточной АТФ во внеклеточную среду и последующим запуском пуринергических каскадов (Mousawi et al., 2020). Мы предположили, что Piezo1-зависимая активация этих сигнальных систем может вносить вклад в Yoda1-индуцированное ингибирование миграции ЭМСК.

Специального внимания заслуживают предположения о возможном участии ионных каналов TRPV4 в Piezo-зависимом сигналинге в стволовых клетках. Взаимодействие между Piezo1 и TRPV4 было показано ранее в хондроцитах (Servin-Vences et al., 2017), остеобластах (Yoneda et al., 2019) и эндотелиальных клетках (Swain, Liddle, 2021). Сообщалось, что в клетках эндотелия сосудов (HUVeC) механочувствительные каналы Piezo1 стимулируют активность каналов TRPV4, результирующий вход кальция через которые приводит к ремоделированию актина и нарушению адгезивных контактов (Swain et al., 2020; Swain, Liddle, 2021). Наши результаты по миграции стволовых клеток (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2022) вкпе с приведенными данными из литературы позволяют считать вероятным вовлечение TRPV4 в обнаруженное нами ингибирование клеточной подвижности при селективной химической активации каналов Piezo1 в ЭМСК. С использованием апробированных подходов может быть проверена гипотеза о функционировании аналогичного механизма взаимодействия между каналами Piezo1 и TRPV4 в стволовых клетках и возможного вклада в подавление их миграционного потенциала.

Вторая гипотеза базируется на данных, полученных на мезенхимных стволовых клетках, о выбросе АТФ во внеклеточную среду вследствие активации Piezo1 (Mousawi et al., 2020). Ранее показано также снижение скорости застывания раны на монослое ЭМСК при внесении АТФ в среду культивирования (Semenova et al., 2020). Подтверждение предположения о Piezo-зависимом выбросе АТФ в ЭМСК может дать непротиворечивое объяснение ранее обнаруженным эффектам ингибирования миграции при действии внеклеточного АТФ (Semenova et al., 2020) или агониста Yoda1 (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2019b, 2022).

Задачей настоящей работы являлась последовательная проверка предположений о возможных молекулярных участниках регуляции клеточной подвижности при селективной химической активации механочувствительных каналов Piezo1. В независимых экспериментах на модели застывания раны были проверены две предложенные гипотезы о возможных механизмах, которые могли бы опосредовать подавление миграции ЭМСК, наблюдаемое при действии соединения Yoda1, селективного агониста каналов Piezo1.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Клеточная линия эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека (ЭМСК, линия 2804), выделенная из десквамированного эндометрия, была получена и охарактеризована (Zemel'ko et al., 2012) в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки обладают свойствами, типичными для мезенхимных стволовых клеток, включая фибробластоподобную морфологию, мультипотентность и экспрессию соответствующих поверхностных маркеров (Dominici et al., 2006; Zemel'ko et al., 2012). Клетки культивировали согласно стандартному протоколу в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США, или BioSera, Франция), 1% антибиотика гентамицина и 1% GlutaMAX (Gibco, США). В экспериментах использовали ЭМСК на 9–13 пассажах. Клеточную линию культивировали в стандартных условиях в инкубаторе (37°C и 5% CO₂). Подсчет клеток при пересеве и перед экспериментами проводили с помощью автоматического счетчика клеток Thermo Fisher Countess 2 (Thermo Fisher Scientific, США).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для выделения общей (тотальной) РНК брали 3 чашки (диаметр 60 мм) с монослоем ЭМСК. РНК выделяли с использованием коммерческого набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Синтезирование первой цепи кДНК производили с помощью коммерческого набора ОТ-1 (Синтол, Россия). Реакцию обратной транскрипции проводили при смешении 1 мкг РНК с 0.5 мкг случайных гексапраймеров, 100 ед. обратной транскриптазы (ревертазы) MMLV и 2.5-кратной реакционной смеси в общем объеме 25 мкл и инкубировании при 37°C в течение 1 ч. Для отрицательного контроля (ОТ–) использовали ПЦР-смесь без MMLV ревертазы. Полученную концентрированную кДНК разводили до рабочей концентрации 100 нг/мкл. Праймеры для ПЦР были разработаны с использованием программного обеспечения GeneRunner v5.0.59 (www.generunner.net). Последовательности праймеров для *hTRPV4*: 5' AAG-CAC-CCA-TGG-ACT-CAC-T 3' (прямой), 5' CCA-CGA-GAA-GTT-CCA-CGT-A 3' (обратный). Согласно расчету в программе BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/>

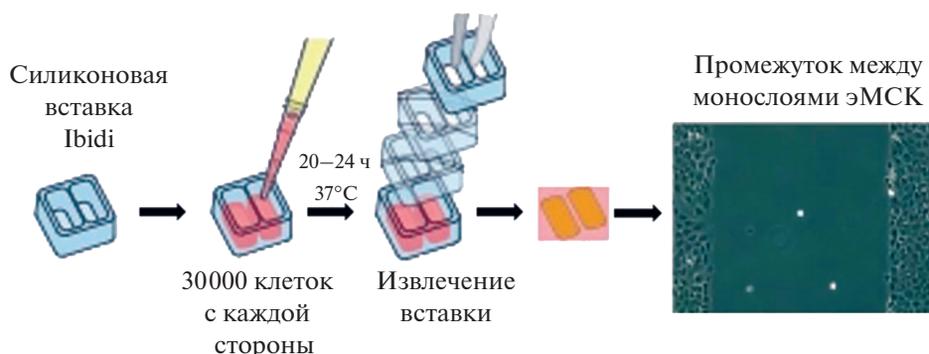


Рис. 1. Схема процедуры формирования промежутка между монослоями ЭМСК (экспериментальной раны) с использованием двухлуночных вставок Ibidi (см. Материалы и Методику). Адаптировано с сайта производителя (Ibidi, Германия, www.ibidi.com).

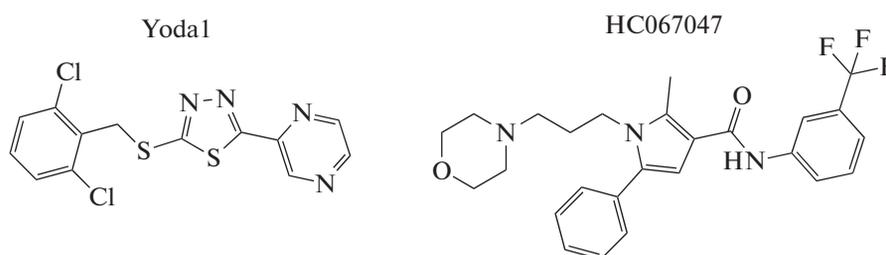


Рис. 2. Структурные формулы селективного активатора каналов Piezo1 низкомолекулярного соединения Yoda1 (2-(5-((2,6-Дихлорофенил)метил)сульфанил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)пиразин) и ингибитора каналов TRPV4 реagenta HC067047 (2-метил-1-(3-морфолин-4-илпропил)-5-фенил-N-[3-(трифлуорометил)фенил]пиррол-3-карбоксамид).

primer-blast/), ожидаемый размер продукта реакции составляет 474 пар нуклеотидов (п.н.). ПЦР проводили в объеме 15 мкл с использованием 1.5 мкл разбавленной кДНК, 0.3 мкМ каждого праймера, 200 мкМ dNTP, 2 мМ MgCl₂, 1 ед. Hot-Taq полимеразы и 1 × Hot-Taq полимеразного буфера (Силекс, Россия). ПЦР проводили по следующей схеме: 9 мин и 30 с при 94°C, 35 циклов по 40 с при 94°C, 30 с при 60°C и 30 с при 72°C, 5 мин при 72°C. Для определения присутствия продукта, полученного в ходе ПЦР, 10 мкл ПЦР-реакции подвергали электрофорезу в 6%-ном полиакриламидном геле. Затем гель окрашивали ДНК-связывающим красителем GelRed (1 : 10000, Biotium, США). Результаты реакции визуализировали в ультрафиолетовом свете с помощью системы гель-документирования E-Gel Imager System (Thermo Fisher Scientific, США).

Миграция. Для оценки миграционного потенциала ЭМСК использовали силиконовые 2-х луночные культуральные вставки Ibidi Culture inserts (Ibidi, Германия), позволяющие сформировать межклеточный промежуток стабильных размеров (500 ± 50 мкм) между двумя клеточными монослоями и, тем самым, моделировать экспериментальную рану. Перед экспериментом вставки устанавливали в 4-луночные планшеты (Jet Biofil, Китай) в стерильных условиях. Клетки трипсинизировали (0.25% трипсином с

ЭДТА; Thermo Fisher Scientific, США), переводили в суспензию в полной культуральной среде, далее производили их подсчет и высевали во вставки по 30 тыс. с каждой стороны от силиконового разделителя (рис. 1). Далее клетки культивировали в течение 20–24 ч до их расплывания и образования монослоя, затем вставки убирали и промывали клетки фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). После промывки к клеткам добавляли полную культуральную среду, содержащую 10 мкМ Yoda1 (Tocris, США), 10 мкМ Yoda1 и 5 ед. апиразы (Sigma-Aldrich, Германия) или 10 мкМ Yoda1 и 300 нМ HC067047 (Sigma-Aldrich, Германия). Структурные формулы реагентов представлены на рис. 2. В качестве контролей использовали культуральную среду с добавлением DMSO (растворитель для Yoda1 и HC067047), сверхчистой воды (растворитель для апиразы, Agium Ultrapure water, Sartorius, Германия) или их комбинации (вода + DMSO) в количествах, соответствующих разведениям используемых реагентов.

Далее клетки помещали в стандартные условия культивирования на 48 ч. Фотосъемку экспериментальных ран производили сразу после добавления реагентов (0 ч) и через 24 и 48 ч после начала экспериментов. Изображения получали на инвертированном микроскопе Биомед (Биомед, Россия) в фазовом контрасте (объектив 10×) с помощью цифровой

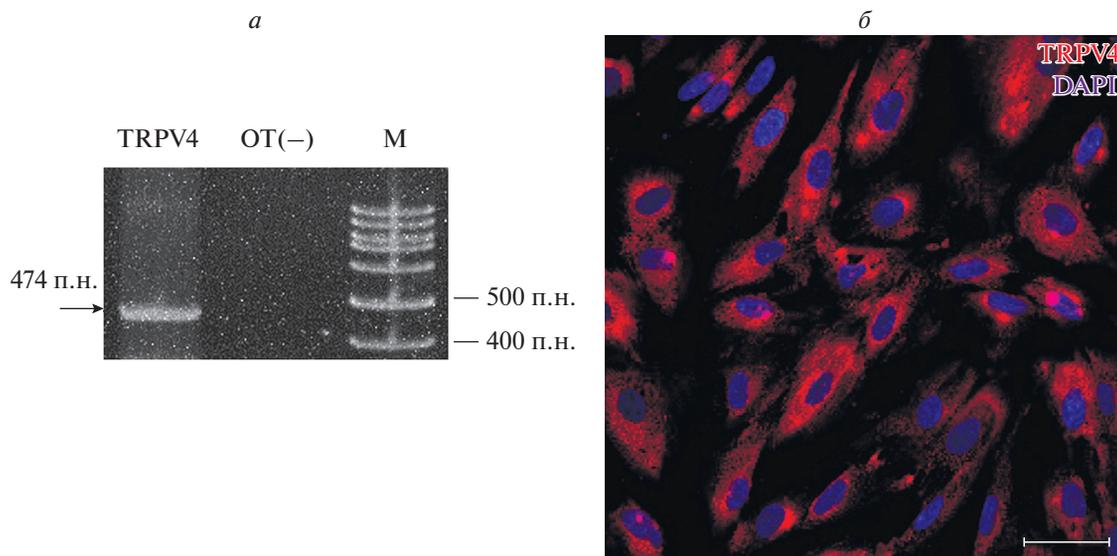


Рис. 3. Результаты ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ), демонстрирующие присутствие мРНК белков TRPV4 в ЭМСК (а) и иммунофлуоресцентное окрашивание ЭМСК специфическими антителами против белков TRPV4 (б). а – Расчетный продукт амплификации – 474 п.н. (показан стрелкой); ОТ(–) – отрицательный контроль (ПЦР-реакция без обратной MMLV транскриптазы; М – маркер длин фрагментов). б – Красный цвет – белки TRPV4, синий – окраска ядер DAPI; масштабная линейка – 50 мкм.

камеры ToupCam 5.1 MP (ToupTek Photonics, Китай) под управлением специализированной программы ToupView (ToupTek Photonics, Китай). Площадь экспериментальных ран измеряли в программе ImageJ (National Institute of Health, США), пользуясь функцией обведения ран вручную (freehand selection). Площади ран через 24 и 48 ч после начала эксперимента нормализованы на соответствующие значения площади исходных ран (0 ч). Обработку числовых значений, их статистический анализ и построение графиков проводили в программе GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Динамика заращения ран представлена на столбчатых диаграммах как средняя площадь раны (в %) и среднеквадратичное отклонение; все экспериментальные значения показаны на графиках (рис. 4–6). Перед статистическими сравнениями данные проверяли на соответствие нормальному распределению (критерий Шапиро–Уилка), отсутствие выбросов (критерий ROUT) и равенство дисперсий (F-тест). После этого данные сравнивали с применением двустороннего (two-tailed) *t*-критерия Стьюдента (*t*-тест), уровень различий $P < 0.05$ считали достоверным.

Иммунофлуоресцентная микроскопия. Для проведения иммунофлуоресцентного окрашивания ЭМСК, предварительно высеянные на покровные стекла (за 2–3 сут до экспериментов, итоговая конfluence-ность 70–80%), фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 10 мин. Затем клетки обрабатывали 0.25%-ным Tween-20 (10 мин) и инкубировали с 10% козьей сыворотки 1 ч для блокирования неспецифического присоединения антител к клеткам. Окраску первичными антителами к белкам TRPV4

(№ ACC-034; Alomone Labs, Израиль, разведение 1 : 100) проводили согласно стандартному протоколу (20–24 ч, 4°C). Далее клетки инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем Cy3 (Goat-Anti-Rabbit-Cy3; Santa Cruz, США, 1 : 200, 1 ч в темноте), ядра окрашивали DAPI (0.05 мкг/мл, 15 мин в темноте). Между всеми этапами окраски препараты промывали PBS. Все процедуры проводили при комнатной температуре, если не указано иное. После окрашивания препараты монтировали на предметных стеклах с использованием реагента, препятствующего выгоранию флуоресцентных красителей (Vectashield; Vector Labs, США). Для получения изображений использовали конфокальный микроскоп Olympus FV3000 с объективом 40×/NA1.3 (Olympus, Япония), доступный через Центр коллективного пользования Института цитологии РАН. Возбуждение флуоресценции производили лазерами с длинами волн 405 (для DAPI) и 568 нм (для Cy3). В качестве контроля использовали клетки, инкубированные только со вторичными антителами (Goat-Anti-Rabbit-Cy3, Santa Cruz, США, 1 : 200, 1 ч в темноте); в этих условиях флуоресценцию не наблюдали. Обработку изображений проводили с помощью плагина Olympus Viewer для программы ImageJ (НИН, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В качестве первого шага мы решили проверить, экспрессируется ли мРНК гена *hTRPV4* в ЭМСК. Мы провели реакцию ОТ-ПЦР и выявили продукт амплификации, соответствующий расчетному размеру

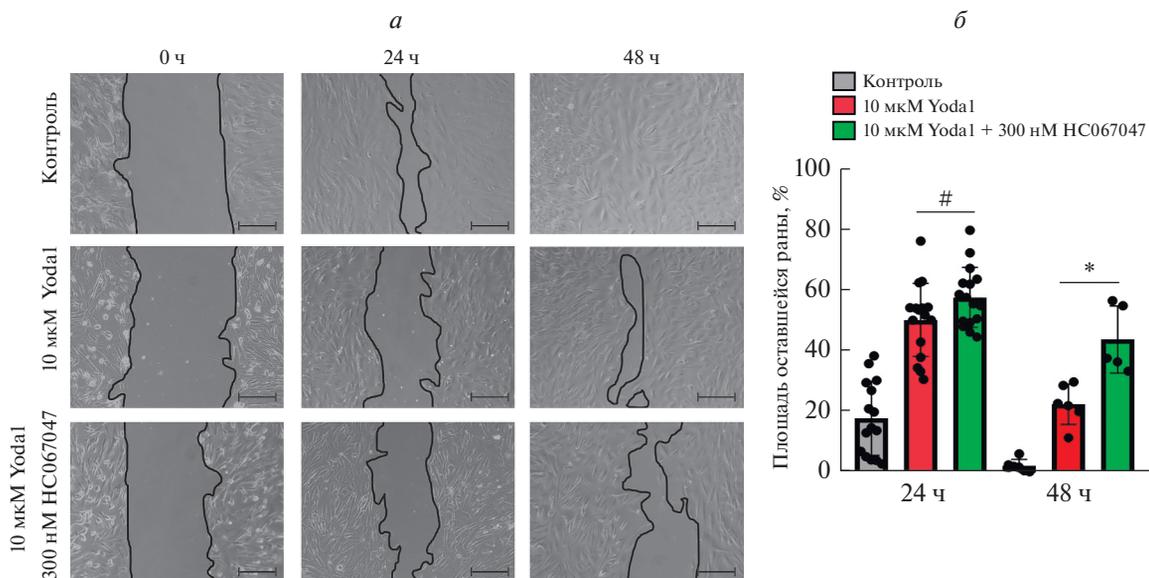


Рис. 4. Влияние селективного активатора каналов Piezo1 (Yoda1, 10 мкМ) и его комбинации с ингибитором каналов TRPV4 соединением HC067047 (300 нМ) на миграционный потенциал эМСК с помощью метода зарастания экспериментальной раны. *a* – Репрезентативные изображения исходных ран (0 ч) и ран через 24 и 48 ч после культивирования клеток с реагентами; масштабная линейка – 100 мкм. *б* – Здесь и на рис. 5–6 представлены средние значения площадей оставшихся ран (в % от исходной площади) и их среднеквадратические отклонения через 24 и 48 ч после начала эксперимента; точки на диаграмме – все экспериментальные значения в каждом из наборов данных. (*) – различие достоверно при $P < 0.05$, # – нет статистически значимых различий (двусторонний *t*-критерий Стьюдента).

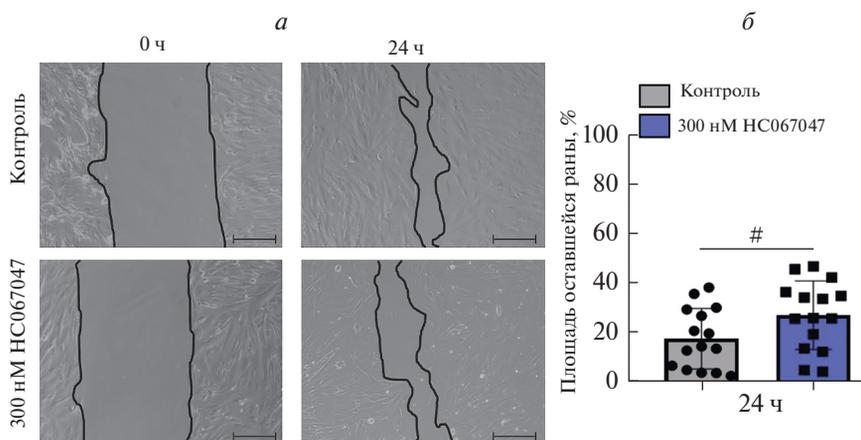


Рис. 5. Селективный ингибитор каналов TRPV4 вещество HC067047 не влияет на зарастание экспериментальной раны эМСК. *a* – Репрезентативные изображения исходных ран (0 ч) и ран через 24 ч в контроле и после культивирования клеток с 300 нМ HC067047. *б* – Средние значения размеров оставшихся ран через 24 ч. Масштабная линейка – 100 мкм. # – нет статистически значимых различий (двусторонний *t*-критерий Стьюдента).

для подобранных праймеров (рис. 3а, 474 п.н.), в клеточных лизатах, полученных из эМСК. Далее мы провели иммунофлуоресцентное окрашивание специфическими антителами, что позволило подтвердить присутствие белков TRPV4 в эМСК (рис. 3б). Таким образом, мы получили предварительные аргументы для дальнейшей проверки нашей первой рабочей гипотезы, основанной на данных о взаимодей-

ствии каналов Piezo1 и TRPV4 (Servin-Vences et al., 2017; Yoneda et al., 2019; Swain, Liddle, 2021).

Для проверки предположения о роли Piezo1-зависимой активации TRPV4 в подавлении миграционного потенциала стволовых клеток мы провели эксперименты по оценке клеточной подвижности эМСК с помощью метода зарастания экспериментальной раны (см. раздел “Материал и Методика”).

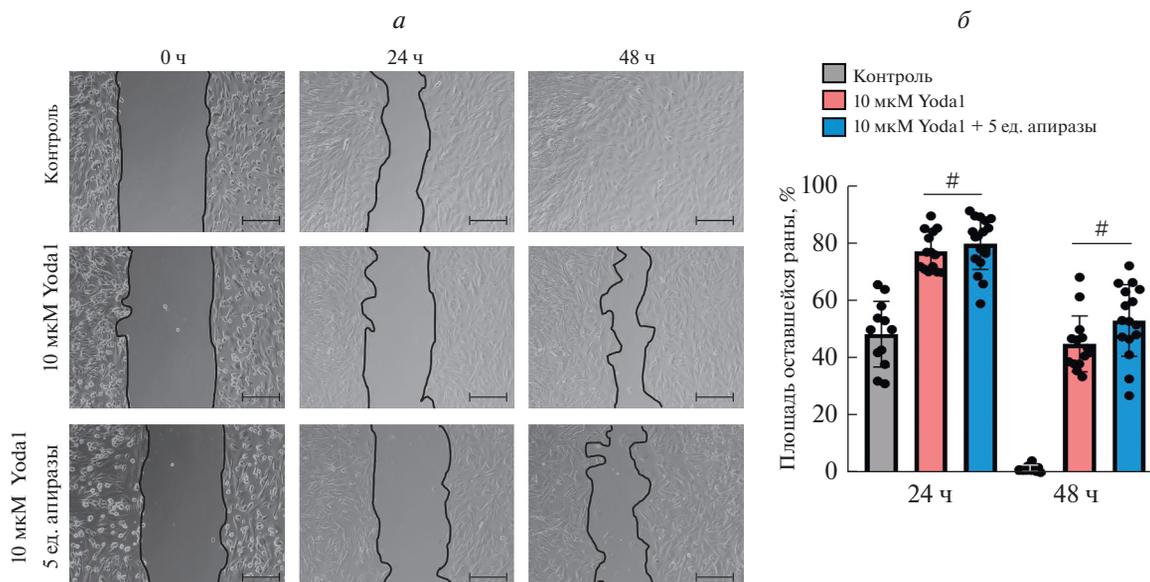


Рис. 6. Присутствие в культуральной среде апиразы не влияет на ингибирующее действие Yoda1 при зарастании экспериментальных ран ЭМСК. *а* – Репрезентативные изображения исходных ран (0 ч) и ран через 24 и 48 ч культивирования клеток с реагентами. Масштабная линейка – 100 мкм. *б* – Средние значения размеров оставшихся ран через 24 и 48 ч. # – нет статистически значимых различий (двусторонний *t*-критерий Стьюдента, $P < 0.05$).

В этих экспериментах мы исследовали действие селективного химического активатора механочувствительных каналов Piezo1 вещества Yoda1 (Syeda et al., 2015), селективного ингибитора каналов TRPV4 вещества HC067047 (Everaerts et al., 2010), а также их комбинации на миграцию ЭМСК.

В наших экспериментах присутствие в среде 10 мкМ Yoda1 приводило к ингибированию зарастания раны (рис. 4), как и было описано нами ранее (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2022). В то же время, добавление к клеткам 300 нМ HC067047 в присутствии Yoda1 не отменяло торможения миграции ЭМСК через 24 ч и при этом еще и замедляло зарастание раны через 48 ч (рис. 4*а, б*). Вещество HC067047 в используемой концентрации (300 нМ), согласно данным литературы, должно ингибировать >90% активности каналов TRPV4 (Everaerts et al., 2010). При этом добавление в культуральную среду только блокатора каналов TRPV4 само по себе не влияло на процесс зарастания раны (рис. 5) по сравнению с контролем (нет статистически значимых различий через 24 ч, и раны полностью зарастали в течение 48 ч). Таким образом, полученные экспериментальные данные (рис. 3–5) указывают на то, что, несмотря на присутствие в ЭМСК каналов TRPV4, их селективное ингибирование не отменяет эффекта Yoda1 на клеточную подвижность. Результаты позволяют нам, вероятно, исключить рабочую гипотезу, согласно которой подавление миграционного потенциала ЭМСК при химической стимуляции Piezo1 обусловлено последующей активацией каналов TRPV4. При этом полученные нами данные не ис-

ключают возможного взаимодействия каналов Piezo1 и TRPV4 в ЭМСК.

Наша вторая рабочая гипотеза базировалась на концепции, предлагаемой в работе из литературы (Mousawi et al., 2020), согласно которой селективная активация Piezo1 приводит к выбросу АТФ из клеток во внеклеточную среду, что, в свою очередь, запускает каскады пуринергического сигналинга, которые и опосредуют влияние Yoda1 на клеточную подвижность МСК. Следует еще раз подчеркнуть, что в этой работе (Mousawi et al., 2020), проведенной на МСК, выделенных из пульпы зуба (hDP-MSCs), селективная химическая активация Piezo1 его агонистом Yoda1 *ускоряла* процессы заживления экспериментальной раны клеток hDP-MSC, в то же время, в аналогичных экспериментах мы наблюдали *торможение* миграции ЭМСК (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2022) и трансформированных фибробластов линии 3Т3В-SV40 (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2019b) в присутствии Yoda1. Тем не менее, разнонаправленность эффектов Yoda1 может быть теоретически объяснена некоторой разницей в Piezo1-зависимых сигнальных путях в различных типах клеток, при общности механизмов Piezo1-зависимого выброса АТФ. Кроме того, обнаруженное подавление миграции ЭМСК при добавлении в среду АТФ (Semenova et al., 2020) свидетельствует в пользу предположений о роли внеклеточного АТФ в Yoda1-индуцированном ингибировании клеточной подвижности.

В уже упомянутой работе (Mousawi et al., 2020) присутствие в культуральной среде фермента апиразы, катализирующей гидролиз АТФ, отменяло действие Yoda1 на клеточную подвижность клеток hDP-

MSC. Мы решили повторить экспериментальные протоколы, представленные в этой работе, и исследовать процессы клеточной подвижности эМСК при добавлении к клеткам апиразы совместно с Yoda1. Проведенные эксперименты показали, что эффект ингибирования клеточной подвижности эМСК при культивировании клеток с Yoda1 (10 мкМ) не отменяется в присутствии апиразы (5 ед.) (рис. 6а, б). В текущей работе и более ранней (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2022) мы использовали концентрацию Yoda1 на порядок выше (10 мкМ), чем цитируемые авторы (1 мкМ; Mousawi et al., 2020), что могло бы приводить к тому, что апираза не успевала катализировать расщепление большего количества АТФ, которое, теоретически, высвобождается при большей концентрации Yoda1. Учитывая такую возможность, мы использовали на порядок более высокую концентрацию (5 ед.) апиразы (по сравнению с 0.3 ед. в работе Mousawi et al., 2020) и, при этом, мы не наблюдали достоверного влияния апиразы на Yoda1-зависимое ингибирование подвижности эМСК.

Следует отметить, что концентрация апиразы, выбранная для экспериментов (Mousawi et al., 2020), была основана на измерениях уровня внеклеточного АТФ при Yoda1-зависимом выбросе из hDP-MCK (происходит высвобождение порядка 300 наномоль АТФ при действии 1 мкМ Yoda1: Mousawi et al., 2020). Относительно эффективности действия апиразы на АТФ принято, что 1 ед. апиразы катализирует расщепление 1 мкМ АТФ за 1 мин при 30°C (Molnar, Lorand, 1961). Использование нами высокой концентрации апиразы (5 ед., которая теоретически способна расщепить 5 мкМ АТФ за 1 мин) должно было хотя бы частично “отменить” действие Yoda1 (в случае действительной зависимости Yoda1-ингибирующего действия на подвижность эМСК от выброса АТФ во внеклеточную среду), чего мы не наблюдали ни через 24, ни через 48 ч.

Таким образом, совокупность проведенных независимых миграционных тестов с селективным ингибитором каналов TRPV4 (веществом HC067047) и АТФ-расщепляющим ферментом (апиразой) позволяет исключить существенный вклад механизмов, связанных с активацией TRPV4 или выбросом АТФ, в Piezo1-зависимое подавление миграционного потенциала эМСК.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время существуют единичные экспериментальные работы, в которых было исследовано влияние селективной химической активации механочувствительных каналов Piezo1 на клеточную подвижность и миграционный потенциал МСК (Mousawi et al., 2020), при этом одна из работ – работа нашего научного коллектива (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2022). В упомянутых статьях задокументированы разнонаправленные эффекты Yoda1 – как

повышение скорости миграции МСК из пульпы зуба (hDP-MCK, Mousawi et al., 2020), так и снижение миграционного потенциала МСК эндометрия человека (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2022). Разница в эффектах может быть объяснена, в частности, различием источников происхождения МСК, из-за чего функциональная активность Piezo1 может быть сопряжена с различными сигнальными каскадами, в зависимости от типа клеток. Стоит отметить, что повышение подвижности эМСК, вероятно, сопряжено с развитием таких патологий, как эндометриоз, в частности аденомиоз (Sudarikova et al., 2020).

Mousawi с соавторами (Mousawi et al., 2020) была предложена и проверена цепочка сигнальных событий, в ходе которых химическая активация Piezo1 приводит к выбросу АТФ с последующей активацией пуринергической системы, а расщепление АТФ апиразой отменяет стимулирующий эффект Yoda1 на миграцию hDP-MCK. Ранее было показано, что внеклеточный АТФ, напротив, дозозависимо тормозит миграцию эМСК, и этот эффект не опосредован участием рецепторов P2X7 (несмотря на их присутствие в эМСК), так как селективный ингибитор P2X7 не отменял действие АТФ на клеточную подвижность (Semenova et al., 2020). Вероятно, следует рассмотреть и возможное вовлечение других P2-рецепторов в наблюдаемое АТФ-зависимое подавление клеточной миграции эМСК, однако уровень их экспрессии и степень участия в физиологических реакциях эМСК в данное время остаются неизученными. В дополнение, АТФ существенно снижал пролиферацию эМСК через 48 ч действия (Semenova et al., 2020), сходный эффект наблюдали и в присутствии Yoda1 в культуральной среде (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2022). При этом не было отмечено гибели клеток, что свидетельствует о том, что наблюдаемое влияние АТФ и Yoda1 на пролиферацию эМСК, скорее всего, не связано со снижением их жизнеспособности.

Таким образом, результаты двух наших работ, вкуче с механизмом, предложенным Mousawi et al., (2020) позволяли рассматривать гипотезы о вероятном участии АТФ в Yoda1-зависимом подавлении миграции эМСК. Однако присутствие апиразы (катализирующей быстрое расщепление АТФ) в культуральной среде не отменяло ингибирующего действия агониста Yoda1 на подвижность эМСК (рис. 6). Подводя итоги, можно заключить, что непротиворечивая гипотеза об участии внеклеточного АТФ в замедлении клеточной подвижности эМСК при селективной активации каналов Piezo1, по-видимому, не находит своего подтверждения. Возникает важный вопрос о том, вызывает ли Yoda1 выброс АТФ из эМСК, что может быть выявлено при прямых измерениях ее концентраций во внеклеточной среде, и который является адекватной и релевантной задачей для будущих исследований.

В то же время, не исключается и участие внутриклеточных и (или) мембранно-ассоциированных путей, которые могут модулироваться активностью механочувствительных каналов Piezo1 как в эМСК, так и в других экспериментальных объектах. В частности, интересно отметить, что селективная химическая активация Piezo1 при помощи Yoda1 привела к дифференцировке МСК из костного мозга в остеогенном направлении и при этом ингибировала адипогенное направление дифференцировки. В качестве механизма было показано повышение экспрессии гена *BMP2* (bone morphogenetic protein), то есть участие внутриклеточных механизмов регуляции экспрессии генов (Sugimoto et al., 2017). Учитывая возможность эМСК дифференцироваться в указанных направлениях (Zemel'ko et al., 2012), вполне вероятно, что Yoda1 мог бы схожим образом влиять и на дифференцировку эМСК, что формирует еще одно направление для дальнейших исследований.

Ранее нами было показано дозозависимое снижение миграционного потенциала трансформированных фибробластов мыши 3T3B-SV40 в присутствии различных концентраций агониста Yoda1. Более того, было выявлено, что селективная химическая активация Piezo1 приводит к поляризации клеток и частичной реверсии трансформированного фенотипа, включая интенсивное формирование стресс-фибрилл и сборку F-актина, что и может лежать в основе ингибирования миграции клеток 3T3B-SV40 (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2019b). В наших предварительных экспериментах не было обнаружено сборки F-актина в эМСК, несмотря на сходный эффект подавления их подвижности, как и в трансформированных фибробластах. Таким образом, имеющиеся данные не подтверждают предположения о роли перестройки цитоскелета в опосредовании эффекта подавления миграции клеток при гиперактивации Piezo1.

В наших экспериментах впервые показана экспрессия TRPV4 на уровне мРНК и белка в стволовых клетках эндометрия. В настоящее время данные литературы о роли и участии TRPV4 в физиологических процессах стволовых клеток крайне ограничены. В недавней работе было показано, что TRPV4 является ключевым участником механотрансдукции МСК, опосредуя быстрое увеличение концентрации внутриклеточных ионов кальция и индукцию экспрессии генов остеогенной дифференцировки при действии ламинарного потока жидкости (shear stress; Corrigan et al., 2018). Показано также участие каналов TRPV4 в процессах метастазирования раковых клеток, в том числе их инвазии и миграции. При этом селективное ингибирование каналов TRPV4 фармакологическим агентом HC067047, снижало скорость миграции и инвазии нескольких клеточных линий колоректального рака (Zhang et al., 2021). В наших экспериментах добавление ингибитора HC067047, само по себе, не влияло на скорость миграции эМСК (рис. 5). В то же время, одновремен-

ное присутствие HC067047 и Yoda1 в культуральной среде не только не приводило к отмене Yoda1-зависимого ингибирования клеточной подвижности, но и еще более замедляло ее через 48 ч (рис. 4). Полученные нами результаты свидетельствуют в пользу гипотез о функциональной активности TRPV4 в плазматической мембране эМСК, не исключая и возможное взаимодействие каналов Piezo1 и TRPV4, ранее показанное в нескольких типах клеток (Servin-Vences et al., 2017; Yoneda et al., 2019; Swain et al., 2020). Можно предположить Piezo1-опосредованный механизм, согласно которому TRPV4 может реагировать на механические раздражители, при этом не нуждаясь в собственной механочувствительности (Swain et al., 2020), которая постулируется в ряде работ (Scheraga et al., 2016; Lu et al., 2021). В еще одной работе (Yoneda et al., 2019) также было продемонстрировано, что селективный агонист каналов Piezo1 (Yoda1) индуцирует кальциевый ответ, который включает компоненту, опосредованную активацией TRPV4. Полученные нами данные не позволяют сказать, сопряжена ли активность Piezo1 и TRPV4 в плазматической мембране эМСК; ответ могли бы дать, в частности, измерения динамики изменений концентрации внутриклеточного кальция при добавлении ингибитора каналов TRPV4. Проведенные нами миграционные тесты однозначно свидетельствуют, что наблюдаемое подавление миграционного потенциала эМСК при химической стимуляции Piezo1 не обусловлено возможной активацией каналов TRPV4 (рис. 4).

Важно отметить, что ранее нами был обнаружен феномен сопряженной активации двух типов катионных каналов — Ca^{2+} -проницаемых механочувствительных (вероятный коррелят Piezo1) и Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов большой проводимости (BK; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2017, Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2019a). Возможно, что активация калиевых каналов может лежать в основе Yoda1-индуцированного подавления миграции эМСК, и это предположение должно быть проверено в ходе решения наших будущих экспериментальных задач. Кроме того, можно допустить, что подавление пролиферации и миграции клеток, наблюдаемое при продолжительном действии агониста Yoda1 может быть обусловлено массивным поступлением кальция из внеклеточной среды в цитозоль вследствие гиперактивности каналов Piezo1 (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2022). В пользу такого предположения свидетельствуют недавние данные об индукции апоптоза, обусловленного повышением концентрации внутриклеточных ионов кальция, триггером которого служит активация механочувствительных каналов Piezo1 (Hope et al., 2019).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-15-00106).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не проводили экспериментов на животных или людях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н.* 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. № 12. С. 919–929. (*Zemel'ko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artsybasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Bichevaia N.K., Korsak V.S., Nikol'skii N.N.* 2012. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: Isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. *Cell Tiss. Biol.* V. 6. P. 1–11.)
- Сударикова А.В., Шилина М.А., Чубинский-Надеждин В.И., Гринчук Т.М., Морачевская Е.А., Негуляев Ю.А.* 2019. Повышенная миграционная способность эндометриальных мезенхимных стволовых клеток при аденомиозе. Цитология. Т. 61. № 12. С. 964–970. (*Sударикова А.В., Шилина М.А., Чубинский-Надеждин В.И., Гринчук Т.М., Морачевская Е.А., Негуляев Ю.А.* 2020. Increased migration ability of adenomyosis-derived endometrial mesenchymal stem cells. *Cell Tiss. Biol.* V. 14. P. 190.)
- Banu S.K., Lee J., Speights V.O. Jr., Starzinski-Powitz A., Arosh J.A.* 2008. Cyclooxygenase-2 regulates survival, migration, and invasion of human endometriotic cells through multiple mechanisms. *Endocrinol.* V. 149. P. 1180.
- Chen L., Qu J., Cheng T., Chen X., Xiang C.* 2019. Menstrual blood-derived stem cells: Toward therapeutic mechanisms, novel strategies, and future perspectives in the treatment of diseases. *Stem Cell Res. Ther.* V. 10. P. 406.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Sudarikova A.V., Shilina M.A., Vasileva V.Y., Grinchuk T.M., Lyublinskaya O.G., Nikolsky N.N., Negulyaev Y.A.* 2019a. Cell cycle-dependent expression of BK channels in human mesenchymal endometrial stem cells. *Sci. Rep.* V. 9. P. 4595.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Vasileva V.Y., Pugovkina N.A., Vassilieva I.O., Morachevskaya E.A., Nikolsky N.N., Negulyaev Y.A.* 2017. Local calcium signalling is mediated by mechanosensitive ion channels in mesenchymal stem cells. *Biochem. biophys. Res. Commun.* V. 482. P. 563.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Vasileva V.Y., Vassilieva I.O., Sudarikova A.V., Morachevskaya E.A., Negulyaev Y.A.* 2019b. Agonist-induced Piezo1 activation suppresses migration of transformed fibroblasts. *Biochem. biophys. Res. Commun.* V. 514. P. 173.
- Chubinskiy-Nadezhdin V., Semenova S., Vasileva V., Shatrova A., Pugovkina N., Negulyaev Y.* 2022. Store-Operated Ca^{2+} Entry Contributes to Piezo1-Induced Ca^{2+} Increase in Human Endometrial Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. P. 3763.
- Corrigan M.A., Johnson G.P., Stavenschi E., Riffault M., Labour M.N., Hoey D.A.* 2018. TRPV4-mediates oscillatory fluid shear mechanotransduction in mesenchymal stem cells in part via the primary cilium. *Sci. Rep.* Vol. 8. P. 3824.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.* 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytother.* V. 8. P. 3157.
- Everaerts W., Zhen X., Ghosh D., Vriens J., Gevaert T., Gilbert J.P., Hayward N.J., McNamara C.R., Xue F., Moran M.M., Strassmaier T., Uykai E., Owsianik G., Vennekens R., De Ridder D. et al.* 2010. Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 107. P.19084.
- Hope J.M., Lopez-Cavestany M., Wang W., Reinhart-King C.A., King M.R.* 2019. Activation of Piezo1 sensitizes cells to TRAIL-mediated apoptosis through mitochondrial outer membrane permeability. *Cell Death Dis.* V. 10. P. 837.
- Lu Q., Zemskov E.A., Sun X., Wang H., Yegambaram M., Wu X., Garcia-Flores A., Song S., Tang H., Kangath A., Cabanillas G.Z., Yuan J.X., Wang T., Fineman J.R., Black S.M.* 2021. Activation of the mechanosensitive Ca^{2+} channel TRPV4 induces endothelial barrier permeability via the disruption of mitochondrial bioenergetics. *Redox Biol.* V. 38. P.101785.
- Molnar J., Lorand L.* 1961. Studies on apyrases. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 93. P. 353.
- Mousawi F., Peng H., Li J., Ponnambalam S., Roger S., Zhao H., Yang X., Jiang L.H.* 2020. Chemical activation of the Piezo1 channel drives mesenchymal stem cell migration via inducing ATP release and activation of P2 receptor purinergic signaling. *Stem Cells.* V. 38. P. 410.
- Scheraga R.G., Abraham S., Niese K.A., Southern B.D., Grove L.M., Hite R.D., McDonald C., Hamilton T.A., Olman M.A.* 2016. TRPV4 Mechanosensitive ion channel regulates lipopolysaccharide-stimulated macrophage phagocytosis. *J. Immunol.* V. 196. P. 428.
- Semenova S., Shatrova A., Vassilieva I., Shamatova M., Pugovkina N., Negulyaev Y.* 2020. Adenosine-5'-triphosphate suppresses proliferation and migration capacity of human endometrial stem cells. *J. Cell Mol. Med.* V. 24. P. 4580.
- Servin-Vences M.R., Moroni M., Lewin G.R., Poole K.* 2017. Direct measurement of TRPV4 and PIEZO1 activity reveals multiple mechanotransduction pathways in chondrocytes. *Elife.* V. 6. P. e21074. <https://doi.org/10.7554/eLife.21074>
- Sugimoto A., Miyazaki A., Kawarabayashi K., Shono M., Akazawa Y., Hasegawa T., Ueda-Yamaguchi K., Kitamura T., Yoshizaki K., Fukumoto S., Iwamoto T.* 2017. Piezo type mechanosensitive ion channel component 1 functions as a regulator of the cell fate determination of mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* V. 7. P. 17696.
- Swain S.M., Liddle R.A.* 2021. Piezo1 acts upstream of TRPV4 to induce pathological changes in endothelial cells due to shear stress. *J. Biol. Chem.* Vol. 296. P. 100171. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015059>
- Swain S.M., Romac J.M., Shahid R.A., Pandol S.J., Liedtke W., Vigna S.R., Liddle R.A.* 2020. TRPV4 channel opening me-

- diates pressure-induced pancreatitis initiated by Piezo1 activation. *J. Clin. Invest.* V. 130. P. 2527.
- Syeda R., Xu J., Dubin A.E., Coste B., Mathur J., Huynh T., Matzen J., Lao J., Tully D.C., Engels I.H., Petrassi H.M., Schumacher A.M., Montal M., Bandell M., Patapoutian A. 2015. Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. *Elife.* V. 22. P. 4. e07369. <https://doi.org/10.7554/eLife.07369>
- Wang Y., Chi S., Guo H., Wang Y., Chi S., Guo H., Li G., Wang L., Zhao Q., Rao Y., Zu L., He W., Xiao B. 2018. A lever-like transduction pathway for long-distance chemical- and mechano-gating of the mechanosensitive Piezo1 channel. *Nature communications.* V. 9. P. 1300.
- Yoneda M., Suzuki H., Hatano N., Nakano S., Muraki Y., Miyazawa K., Goto S., Muraki K. 2019. PIEZO1 and TRPV4, which are distinct mechano-sensors in the osteoblastic MC3T3-E1 cells, modify cell-proliferation. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 4960. <https://doi.org/10.3390/ijms20194960>
- Zhang P., Xu J., Zhang H., Liu X.Y. 2021. Identification of TRPV4 as a novel target in invasiveness of colorectal cancer. *BMC Cancer.* V. 21. P. 1264.

Analysis of Possible Mechanisms of Endometrial Stem Cell Migration Suppression by Selective Chemical Activation of Piezo1 Mechanosensitive Channels

V. Y. Vasileva^a, E. A. Morachevskaya^a, Y. A. Negulyaev^a, and V. I. Chubinskiy-Nadezhdin^a, *

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

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

We investigated the possible molecular mechanisms that could mediate the suppression of cell motility of human endometrial mesenchymal stem cells (eMSCs) by selective chemical activation of mechanosensitive Piezo1 channels with small heterocyclic molecule Yoda1. According to the literature data, stimulation of Piezo1 activity in the plasma membrane can lead to the activation of various signaling pathways, in particular, associated with the activity of TRPV4 channels or with the release of intracellular ATP into the extracellular environment and subsequent triggering of purinergic cascades. We hypothesized that Piezo1-dependent activation of these signaling pathways may contribute to the inhibition of eMSC migration by selective Piezo1 agonist Yoda1. Using polymerase chain reaction and immunofluorescent staining, TRPV4 expression was revealed in eMSCs at the mRNA and protein levels. At the same time, migration tests showed that inhibition of TRPV4 channels (with reagent HC067047) did not abolish the effect of decreased eMSC cell motility in the presence of Yoda1. Also, the addition of apyrase that catalyzes the rapid hydrolysis of ATP did not restore the migration potential of eMSCs decreased by Yoda1. The results obtained allow us to exclude the hypothesis of TRPV4- or ATP-dependent suppression of eMSC migration upon selective chemical activation of mechanosensitive Piezo1 channels; the prerequisites for the search for ionic mechanisms underlying the observed changes in the motility of endometrial stem cells are discussed.

Keywords: mechanosensitive Piezo1 channels, Yoda1, cell motility, endometrial stem cells, ATP, TRPV4

ТУБАЦИН, ИНГИБИТОР ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗЫ 6, ВЫЗЫВАЕТ АЦЕТИЛИРОВАНИЕ α -ТУБУЛИНА, БЛОК КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА, СТАРЕНИЕ И ПОДАВЛЕНИЕ МИГРАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ОНКОГЕНАМИ *E1A* И *cHa-ras*

© 2022 г. А. Н. Кукушкин¹, *, С. Б. Светликова¹, Н. Д. Аксенов¹, В. А. Поспелов¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: kan@incras.ru

Поступила в редакцию 28.05.2022 г.

После доработки 08.07.2022 г.

Принята к публикации 20.07.2022 г.

Ингибиторы гистондеацетилазной активности широко используются для остановки пролиферации раковых клеток в клинических испытаниях *in vivo* и в исследованиях на линиях опухолевых клеток *in vitro*. Кроме подавления пролиферации опухолевых клеток эти ингибиторы способны индуцировать либо клеточное старение, либо апоптотическую гибель клеток и аутофагию. Гистондеацетилаза 6 (HDAC6, класс II) отличается от других HDAC (класса I) преимущественно цитоплазматической локализацией и низкой деацетилазной активностью в отношении гистонов. Более того, HDAC6 деацетилирует ряд негистоновых белков, включая α -тубулин – компонент микротрубочек, тем самым влияя на их стабильность. Оверэкспрессия HDAC6 была обнаружена в различных линиях опухолевых клеток и индуцированных опухолях мышей. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что HDAC6 участвует в контроле процесса аутофагии, поскольку ацетилирование α -тубулина необходимо для слияния аутофагосом с лизосомами. В настоящей работе мы сравнивали эффекты, производимые ингибитором HDAC6 бутиратом натрия и тубацином, который является специфическим ингибитором HDAC6, на *E1A* + *Ras*-трансформированные фибробласты мыши (линия mERas). Бутират натрия ингибирует активность HDAC6 класса I (но не HDAC6). Оказалось, что тубацин вызывает те же эффекты, что и бутират натрия, в отношении подавления роста клеток, индукции блока клеточного цикла на границе фаз G_1/S и клеточного старения. Поскольку тубацин индуцирует ацетилирование α -тубулина, можно предположить, что определенный уровень ацетилирования α -тубулина необходим для пролиферации, старения и миграции клеток mERas.

Ключевые слова: эмбриональные фибробласты мыши, HDAC6, тубацин, старение, клеточный цикл, миграция клеток, апоптоз

DOI: 10.31857/S0041377122060062

Ингибиторы HDAC широко используются для подавления пролиферации опухолевых клеток, так как вызывают блок клеточного цикла, клеточное старение или апоптотическую гибель клеток (Shao et al., 2004; Newbold et al., 2016). Предполагается, что эти эффекты, по крайней мере частично, опосредованы ацетилированием нуклеосомных гистонов, что в свою очередь приводит к активации генов-супрессоров опухолей и ингибированию экспрессии генов, специфичных для пролиферации. Важно отметить, что большинство из этих процессов может быть реализовано в опухолевых клетках с мутантным белком p53, часто стабилизированным в опухолях человека. Кроме того, ингибиторы HDAC вызывают необратимую остановку клеточного цикла в опухолевых

клетках, экспрессирующих дикий тип p53, за которой следует либо клеточное старение, либо апоптотическая гибель клеток. Стареющие клетки не делятся, но все еще сохраняют жизнеспособность и секретируют различные факторы роста и цитокины, поддерживающие так называемый секреторный фенотип (SASP) (Rodier, Campisi, 2011; Laberge et al., 2015). Тем не менее, такое покоящееся состояние *in vivo* потенциально опасно как для этих, так и для окружающих клеток. Стареющие клетки могут перезапустить пролиферацию при определенных условиях, в то время как секретируемые ими факторы могут индуцировать трансформацию окружающих нормальных клеток. Следовательно, в практических клинических целях представляется перспективным индуцировать апоптотическую гибель стареющих опухолевых клеток, но это не всегда возможно из-за

Принятые сокращения: ДМСО – диметилсульфоксид; ПААГ – полиакриламидный гель; HDAC6 – гистондеацетилаза 6; MEF – эмбриональные фибробласты мыши.

активации антиапоптотических факторов семейства Bcl-2 (Adams, Cory, 2007; Delbridge, Strasser, 2015).

Ингибиторы HDAC также могут препятствовать процессу аутофагии, которая играет важную защитную функцию в опухолевых клетках. Это особенно важно в тех случаях, когда эти ингибиторы вызывают старение и гипертрофию клеток. Необходимо своевременно элиминировать стареющие клетки, которые продуцируют избыточное количество белков и других компонентов (Rodier, Campisi, 2011). Переход клетки от цитопротекторной аутофагии к ее цитотоксической форме требует тщательного изучения механизмов аутофагии в опухолевых клетках (Mathew et al., 2007). Следовательно, использование ингибиторов HDAC, которые нацелены на цитоплазматические деацетилазы (Verdel et al., 2000), может обеспечить новый подход для подавления пролиферации опухолевых клеток и их сопутствующей элиминации.

В представленной работе мы использовали фибробласты мышцы, трансформированные онкогенами *E1A* и *cHa-Ras* (линия mERas), для сравнения эффектов, продуцируемых ингибитором HDAC бутиратом натрия, который ингибирует активность HDAC класса I (но не активность цитоплазматической HDAC6) и тубацином, который является специфическим ингибитором HDAC6 и способствует ацетилированию α -тубулина. Наши данные показывают, что тубацин способен запускать большинство клеточных событий, вызываемых ингибиторами HDAC класса I, а именно бутиратом натрия: G₁/S-блок клеточного цикла, клеточное старение и подавление миграции клеток. Поскольку тубацин преимущественно индуцирует ацетилирование α -тубулина, можно предположить, что высокий уровень ацетилирования α -тубулина в микротрубочках необходим для пролиферации, старения и клеточной миграции фибробластов мышцы, трансформированных онкогенами *E1A* и *Ras*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки и реактивы. Эмбриональные фибробласты мышцы (MEF) выделяли из эмбрионов через 14–15 сут после начала беременности. Стабильные трансформированные клетки MEF (линия mERas) получали с помощью кальций-фосфатной трансфекции онкогенов *E1A* аденовируса Ad5 и активированного *cHa-Ras* (Поспелова и др., 1990). Клетки mERas выращивали на среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FCS; HyClone GE, США). Растворенный в ДМСО тубацин (Sigma, США) и водный раствор бутирата натрия (Sigma) использовали в концентрациях 2.5–15 мкМ и 4 мМ соответственно. Растворенный в ДМСО рапамицин (Calbiochem, США) использовали в конечной концентрации 500 нМ.

Для оценки пролиферативной активности клетки mERas высевали в чашки диаметром 60 мм. Число клеток считали на стеклах KOVA (Nunc Biomed, Великобритания). Когда число клеток достигало 35×10^4 , их обрабатывали 10 мкМ тубацина в течение 24, 48 или 72 ч. Необработанные клетки служили контролем. Кривые роста строили, исходя из четырех независимых экспериментов.

Жизнеспособность клеток mERas оценивали с помощью набора Count and Viability (Millipore, США) на цитометре Muse Cell Analyzer (Millipore) по методике, рекомендованной производителем.

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла. Использовали проточную цитометрию, как описано ранее (Nelyudova et al., 2007). Клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и пермеабелизовали 30 мин 0.01%-ным сапонином. Затем клетки инкубировали в PBS, содержащем 40 мкг/мл йодистого пропидия, 0.1 мг/мл РНКазы А (все от Sigma) 15 мин при 37°C и анализировали на цитометре CytoFLEX (Beckman, США). Популяции контрольных и обработанных клеток в разных фазах цикла сравнивали с помощью цитометрического светорассеяния и анализировали в программе WinMDI, v.2.8. Количество апоптотических клеток оценивали по относительной площади субдиплоидного пика на гистограммах проточной цитометрии. Для подсчета апоптотических клеток в двумерном распределении использовали набор Аннексин V-FITC (Abcam, США) в сочетании с йодистым пропидием.

МТТ-тест на жизнеспособность клеток. Жизнеспособность клеток оценивали посредством колориметрического анализа с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромидом (МТТ, Sigma). Количество образовавшегося формазанового продукта коррелирует с числом живых клеток. Приблизительно по 10 тыс. клеток сеяли в 96-луночные планшеты и обрабатывали в течение 1 сут 2.5 мкМ тубацина и (или) 4 мМ бутиратом натрия в среде DMEM. Далее в лунки добавляли МТТ (0.5 мг/мл), растворенный в PBS, и клетки культивировали в течение 1.5 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. Полученные осадки формазана растворяли в ДМСО (Sigma). Поглощение измеряли при длине волны 570 нм на планшетном спектрофотометре MultiskanEX (Thermo Sci., США). Каждый эксперимент повторяли шесть раз с последующим вычислением средних значений и их стандартных ошибок.

Иммуноблотинг. Клеточные экстракты получали, лизируя клетки в буфере RIPA, содержащем раствор PBS, 1% Igepal CA-630, 0.5% дезоксихолата натрия, 0.1% SDS, 1 мМ DTT, набор ингибиторов протеаз (пепстатин А, леупептин, апротинин (все в концентрации 1 мкг/мл), 1 мМ PMSF) и фосфатаз (1 мМ ортованадат натрия, 2.5 мМ EGTA, 20 мМ β -глицерофосфат натрия, 10 мМ фторид натрия) (все упомянутые здесь вещества получены от Sigma). Концентрацию белка в клеточных экстрактах определяли методом

Брэдфорд (Bradford, 1976). Пробы по 50 мкг белковых экстрактов разделяли с помощью электрофореза в 10–15%-ном ПААГ, переносили на мембрану PVDF Immobilon-P (Millipore, США) с размером пор 0.45 мкм. Эти мембраны инкубировали с первичными антителами в буфере TBS с 5%-ным BSA в соответствии с рекомендациями производителя. Маркерами молекулярной массы служил набор окрашенных стандартных белков SeeBluePlus2 (Invitrogen, США). В качестве вторых антител использовали козы антитела против иммуноглобулинов кролика или кроличьи антитела против иммуноглобулинов мыши (все от Sigma), конъюгированные с пероксидазой хрена. Белки на мембранах визуализировали с помощью наборов ECL Optiblot (Abcam) или Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Sci.), используя систему гель-документации PXi6 Access (Syngene, Великобритания). Нужные белковые полосы денситометрировали и нормализовали относительно контрольных полос и стандартного белка, обычно α -тубулина. Иммуноблоттинг определенных белков повторяли не менее 3 раз. На рисунках приведены иммуноблоты, в которых интенсивности интересующих белковых полос близки средним значениям полос, полученных в нескольких электрофорезах. Погрешности определения интенсивности белковых полос обычно составляли ± 0.1 отн. ед.

Использовали первичные антитела к следующим белкам: α -тубулину (T5168; Sigma), LC3 (PM036; MBL, США), ацетилованному по лизину-40 α -тубулину (cs-5335), ацетилованному по лизинам-9/14 гистону H3 (cs-9677), фосфо-S6 (cs-2211), S6 (cs-2317), фосфо-4E-BP1 (cs-9459), SQSTM1/p62 (cs-5114), фосфо-ULK1 по Ser555 (cs-5869) и Ser757 (cs-14202), фосфо-AMPK α по Thr172 (cs-2535) (все от Cell Signaling, США).

Миграция клеток в монослое. Этот анализ проводили, как описано ранее (Romanov et al., 2010). Клетки mERas росли на чашках 35 мм 1 сут, затем в монослое делали рану путем удаления клеток с помощью наконечника 200 мкл. Оставшиеся прикрепленные клетки дополнительно промывали средой DMEM. Для оценки влияния тубацина или бутирата натрия на миграцию клеток в рану, их культивировали в среде DMEM дополнительно в течение 48 ч в присутствии тубацина и (или) бутирата, или без этих ингибиторов (контроль). Затем раны фотографировали под микроскопом Axiovert с 5-кратной линзой. Интегральную плотность клеток считали на 5 равных участках для каждой раны с использованием программы ImageJ. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Протеасомная активность. Химотрипсин-, трипсин- и каспаза-подобные пептидазные активности протеасом определяли, используя флуорогенные субстраты Succ-LLVY-AMC, Ac-RLR-AMC и Z-LLE-AMC соответственно в концентрации 50 мкМ, которые растворяли в буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl,

pH 7.5, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 1 мМ ДТТ, 5 мМ АТФ (Sigma). Клеточные экстракты инкубировали с субстратами 45 мин при 37°C, как было описано ранее (Kulichkova et al., 2010). Количество высвобожденного вещества AMC определяли по интенсивности флуоресценции с помощью флуориметра GloMax Multi (Promega, США), используя длину волны возбуждения и эмиссии соответственно 365 и 440 нм. Для контроля специфичности перед добавлением субстратов клеточные экстракты обрабатывали протеасомным ингибитором MG132 (100 мкМ; Millipore) или его растворителем для контроля (DMCO) в течение 20 мин при 4°C.

Анализ клеточного старения. Старение клеток контролировали путем анализа активности β -галактозидазы (SA- β -gal), связанной со старением, как описано ранее (Dimri et al., 1995). Клетки mERas выращивали на покровных стеклах 72 ч. Окрашивание SA- β -gal после обработки фиксированных клеток раствором X-gal (Sigma) наблюдали в проходящем свете и фотографировали под микроскопом Pascal LSM5 (Zeiss, Германия) при увеличении объектива 40 \times .

Анализ аутофагии. Уровень аутофагии в клетках оценивали, используя набор CYTO-ID (Enzo Life Sci., США), который содержал флуоресцентный краситель, специфически и количественно связывающийся с аутофагическими вакуолями. Живые суспендированные клетки mERas инкубировали с красителем CYTO-ID в течение 30 мин при 37°C в темноте в соответствии с протоколом производителя и анализировали с помощью проточной цитометрии при длине волны 488 нм. Эти эксперименты повторяли не менее 4 раз.

Статистический анализ. Представленные здесь средние значения количественных данных и их средние квадратичные отклонения являются результатами по крайней мере 3-х независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Тубацин индуцирует блок клеточного цикла на границе G₁ и S фаз. Ранее мы показали (Abramova et al., 2006; Romanov et al., 2010), что бутират натрия (ингибитор HDAC класса I) способен индуцировать как необратимый блок клеточного цикла, так и клеточное старение в клетках mERas. В данной работе мы хотели проверить, может ли специфический ингибитор тубацин цитоплазматической HDAC6 класса II оказывать такое же действие на клетки mERas, как и бутират натрия. Известно, что бутират не ингибирует активность HDAC6 (Guardiola, Yao, 2002; Davie, 2003) и способен индуцировать ацетилование α -тубулина, хотя и в меньшей степени по сравнению с тубацином (Zhang et al., 2003). Данные, представленные на рис. 1а, показывают, что тубацин значительно увеличивает ацетилование α -тубулина по срав-

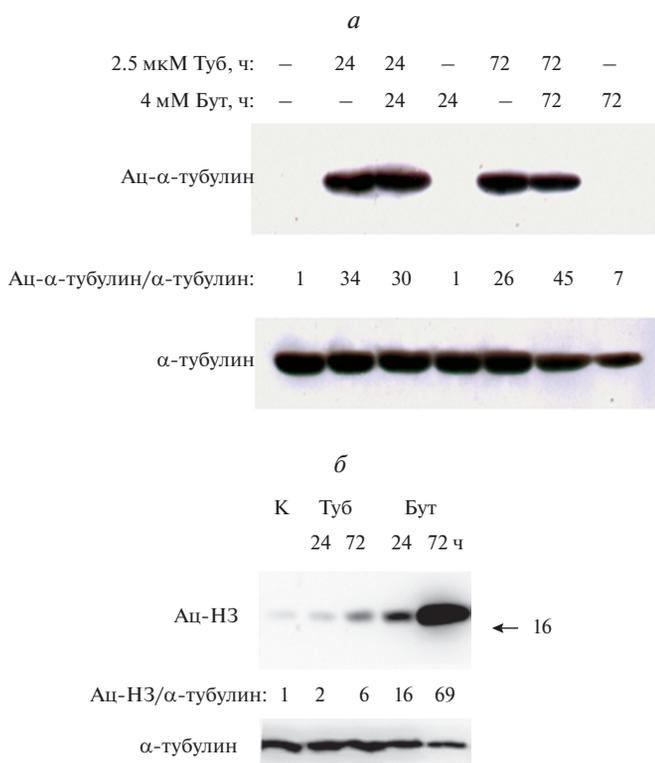


Рис. 1. Тубацин (Туб) способствует накоплению ацетилированного α -тубулина в цитоплазме клеток mERas. *а* – Иммуноблот с антителами к ацетилированной (Ац) и неацетилированной формам α -тубулина после электрофореза клеточных экстрактов (50 мкг) в 10%-ном ПААГ; клетки обрабатывали 2.5 мкМ Туб и (или) 4 мМ бутирата натрия (Бут) в течение 24 или 72 ч; нормализованные значения (отношения интенсивности полос ацетилированной и неацетилированной форм α -тубулина) показаны между панелями. *б* – Иммуноблот с антителами к гистону Н3, ацетилированному по лизинам 9/14, и к α -тубулину после электрофореза в 12.5%-ном ПААГ белков (50 мкг) из клеток mERas, обработанных 5 мкМ Туб или 4 мМ Бут в течение 24 или 72 ч; К – контрольные необработанные клетки. Положение маркерного белка 16 кД указано стрелкой справа; нормализованные значения (отношения интенсивности полос ацетилированного Н3 к α -тубулину) показаны между панелями.

нению с бутиратом натрия, что хорошо видно при использовании оптимальной экспозиции ECL. Это различие в активностях двух ингибиторов HDAC для субстрата α -тубулина оценивается в десятки раз, причем оно проявляется при минимальной используемой концентрации тубацина – 2.5 мкМ (рис. 1а). Такая концентрация была предложена ранее (Haggarty et al., 2003) как действенная в клетках A549. Влияние бутирата натрия на ацетилирование α -тубулина очень низкое по сравнению с тубацином и может наблюдаться только после длительной экспозиции мембраны в процессе ECL (данные не показаны). Поэтому при их совместном действии вклад 4 мМ бутирата натрия мал и практически теряется на фоне действия 2.5 мкМ тубацина (рис. 1а). С другой сто-

роны, тубацин на порядок меньше влияет на ацетилирование таких неспецифических для него субстратов, как гистоны, в частности гистон Н3 по сравнению с бутиратом натрия (рис. 1б), что согласуется с другими исследованиями (Haggarty et al., 2003; Depetter et al., 2019).

Кроме того, тубацин оказывает сильное антипролиферативное действие, о чем свидетельствуют данные проточной цитометрии и анализа жизнеспособности клеток (МТТ) (рис. 2а, б; рис. 3а). Согласно данным проточной цитометрии (рис. 2а), тубацин способен индуцировать остановку клеточного цикла перед фазой S и уменьшать долю вовлеченных в S-фазу клеток. Следует отметить, что тубацин несколько менее эффективен в индукции G₁/S-блока клеточного цикла, чем бутират натрия в определенных экспериментальных условиях. Как показано другими авторами (Namdar et al., 2010), в трансформированных клетках LNCaP тубацин также может индуцировать остановку в фазе G₁, и, судя по анализу транскриптов, он уменьшает экспрессию 72 генов, из которых 40% относятся к клеточному циклу, включая специфические гены для перехода G₁/S. Кроме того, тубацин способен ингибировать пролиферацию других опухолевых клеток (линий PC3 клеток простаты и TNBC молочной железы) и повышать экспрессию гена *p21^{Waf1}* (Sobue et al., 2016; Yu et al., 2017).

Тем не менее, сам по себе тубацин не вызывал апоптотической гибели клеток mERas в пределах используемых концентраций (2.5–10 мкМ), что следует из малой величины субдиплоидного пика ДНК на рис. 2б. Однако в отличие от клеток mERas, в других типах опухолевых клеток, например, в клетках острого лимфобластного лейкоза, тубацин может индуцировать апоптоз наряду с подавлением пролиферации (Aldana-Masangkay et al., 2011). Параллельно с индукцией G₁/S-блока клеточного цикла тубацин снижает их жизнеспособность, которую оценивали по МТТ-тесту (рис. 3а) и также уменьшает количество растущих клеток, судя по анализу кривых роста (рис. 3б). Таким образом, тубацин снижает жизнеспособность клеток mERas в большей степени, чем бутират натрия.

Тубацин способствует гипертрофии и старению трансформированных клеток mERas. Измерение прямого светорассеяния методом проточной цитометрии клеток mERas, обработанных тубацином, показало, что тубацин увеличивает размер клеток (вызывает их гипертрофию) (рис. 2в), что считается необходимым шагом для развития клеточного старения. Хотя гипертрофия клеток выражена не в такой степени, как в случае бутирата натрия, тем не менее, длительная обработка тубацином в течение 72 ч вызывает экспрессию маркера стареющих клеток SA- β -Gal (окрашивание показано на рис. 4а). В совокупности данные свидетельствуют о том, что ацетилирование α -тубулина в трансформированных клетках mERas после действия тубацина способствует

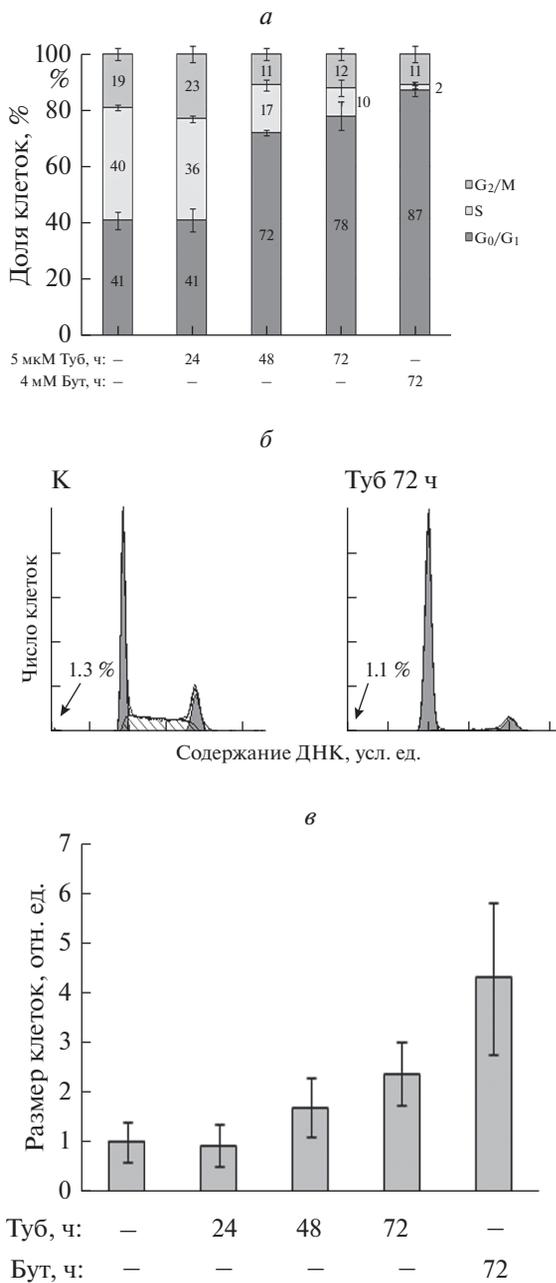


Рис. 2. Длительное воздействие тубацина (Туб) вызывает G₁/S-блок клеточного цикла и гипертрофию клеток mERas, но не их апоптотическую гибель. *а* – Распределение клеток по фазам клеточного цикла в контроле и после действия 5 мкМ Туб или 4 мМ бутирата натрия (Бут) в течение 24, 48 и 72 ч по данным проточной цитометрии. На столбцах указаны средние значения (%) доли клеток в каждой фазе и их погрешности (вертикальные отрезки) из 5 экспериментов. *б* – Распределение клеток по фазам клеточного цикла по данным проточной цитометрии контрольных клеток mERas (К) и клеток после действия 5 мкМ тубацина (Туб) в течение 72 ч; процентное содержание апоптотических клеток оценивали по площади субдиплоидных пиков ДНК, которые обозначены стрелками. *в* – Размеры клеток относительно контрольных клеток (первый столбец), определенные по светорассеиванию при проточной цитометрии; указаны средние размеры и их ошибки из 5 экспериментов.

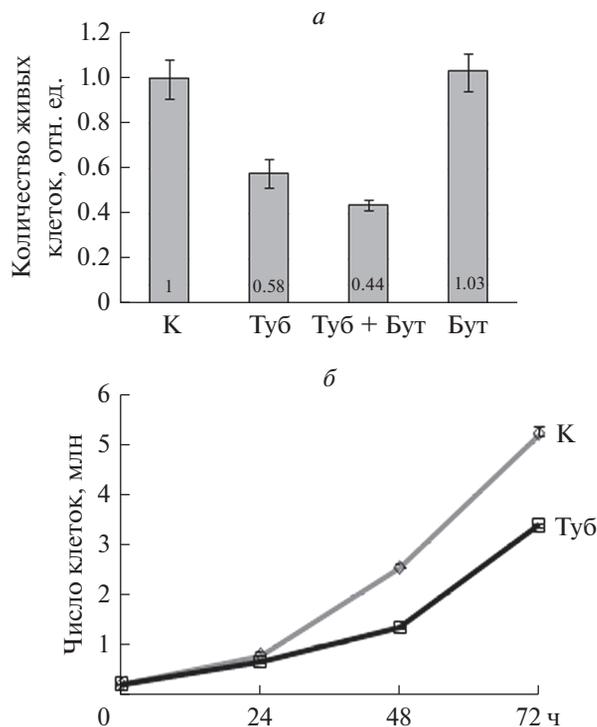


Рис. 3. Тубацин снижает жизнеспособность клеток mERas и замедляет их пролиферацию. *а* – МТТ-анализ клеток mERas, культивируемых с 2.5 мкМ тубацина (Туб), или с 4 мМ бутирата натрия (Бут), или с двумя реагентами вместе (Туб + Бут) в течение 24 ч; К – контрольные клетки; показаны средние количества живых клеток относительно контроля (К) и их ошибки из 4 экспериментов. *б* – Кривые роста контрольных клеток mERas (К) и клеток, обработанных 10 мкМ тубацина (Туб) в течение 24, 48 и 72 ч.

остановке клеточного цикла в фазе G₁ с последующей индукцией гипертрофии и старения клеток. Таким образом, ацетилирование гистонов, индуцированное обработкой клеток бутиратом натрия и сопровождающееся индукцией бутират-опосредованного клеточного старения (Romanov et al., 2010), не является единственным условием для осуществления старения.

Тубацин ингибирует миграцию клеток в монослое. Ранее мы показали, что после обработки бутиратом натрия клеток mERas значительно снижается миграция, и эта особенность сильно зависит от экспрессии гена *p21^{Waf1}* (Romanov et al., 2010). Для оценки подвижности клеток широко используется процедура миграции клеток в рану *in vitro* (заращение раны в монослое). Результаты, представленные в рис. 4б, показывают, что тубацин также ингибировал миграцию клеток mERas в рану после обработки в течение 48 ч, хотя и в меньшей степени, чем бутират натрия. Для сравнения эффектов, производимых бутиратом и тубацином, с помощью программы ImageJ считали интегральные плотности клеток, мигрировавших в рану, на 5 равных полях соответствующих ран монослоя.

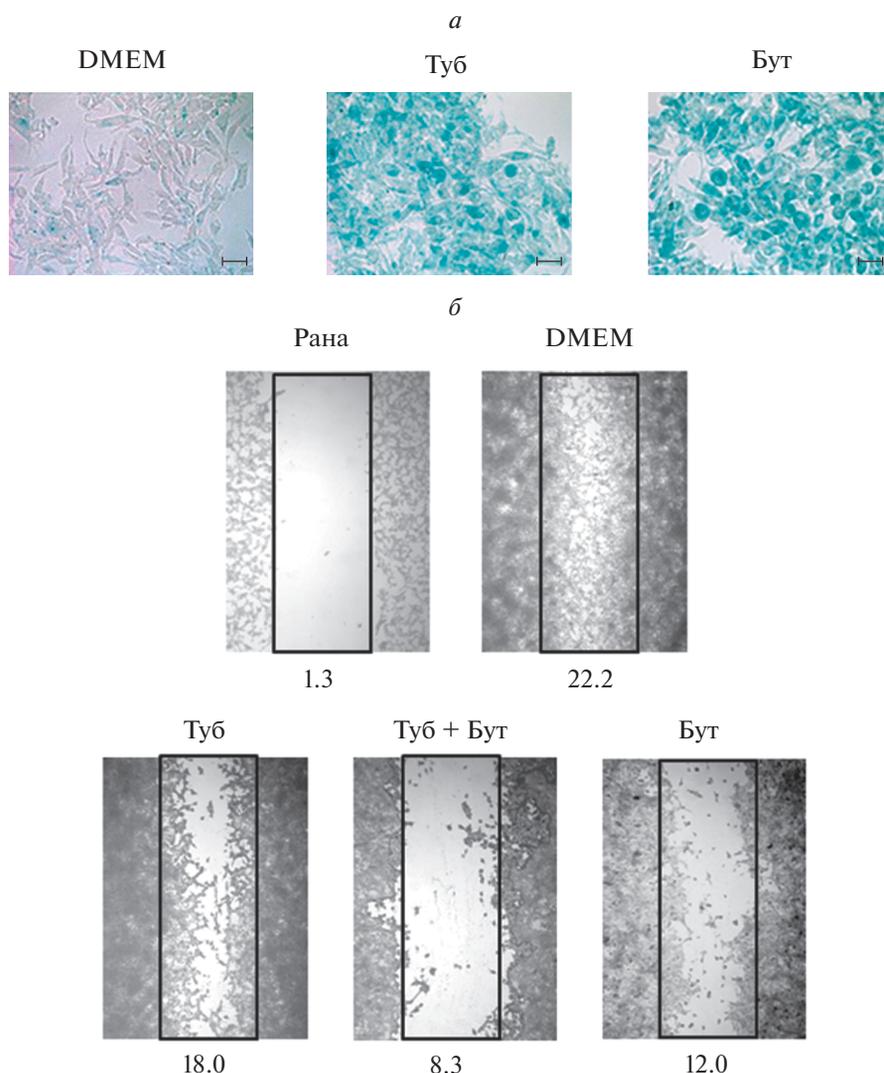


Рис. 4. Длительная обработка клеток mERas тубацином вызывает клеточное старение в той же степени, что и бутират натрия, а также препятствует миграции клеток в рану. *а* – Клетки mERas выращивали в течение 72 ч на покровных стеклах в среде DMEM (контроль) или в присутствии 5 мкМ тубацина (Туб) или 4 мМ бутирата натрия (Бут), затем их окрашивали на SA-β-gal; масштабный отрезок под фотографиями справа – 25 мкм. *б* – Зарастание раны на монослое клеток, нанесенной через 24 ч культивирования, в среде DMEM (контроль зарастания), в присутствии 2.5 мкМ тубацина (Туб), или (и) 4 мМ бутирата натрия (Бут) в течение еще 48 ч культивирования; средние значения интегрированных плотностей клеток в ране показаны под фотографиями. За 1 ед. отн. плотности принимали плотность в местах раны, где отсутствуют клетки.

Различия между заросшей раной контрольных клеток (в среде DMEM) и ранами, культивируемыми в присутствии тубацина и (или) бутирата натрия (рис. 4б) являются значимыми при $P = 0.005$ в соответствии с *t*-критерием Стьюдента. Можно предположить, что индуцированное тубацином ацетилирование α -тубулина служит важным фактором уменьшения стремлений клеток к миграции и метастазированию. В другой работе (Ding et al., 2014) также показано, что тубацин значительно подавлял миграцию и инвазию клеток лимфомы Беркитта. Таким образом, ингибирование HDAC6 тубацином и сопутствующее гиперацетилирование α -тубулина способствуют таким изменениям структуры цитоскелета, которые сни-

жают миграционный потенциал трансформированных клеток.

Активность mTOR и аутофагия. Выше было показано, что ингибирование активности HDAC6 подавляет рост и миграцию клеток mERas, а также индуцирует старение клеток. HDAC6 имеет цитоплазматическую локализацию и не участвует в деацетилировании гистонов, тогда как она деацетилирует α -тубулин – компонент микротрубочек, тем самым влияя на их стабильность (Verdel et al., 2000; Matsuyama et al., 2002; Asthana et al., 2013). Следовательно, ингибирование HDAC6, способствующее ацетилированию α -тубулина, может мешать другому сигнальному пути и кооперировать с противораковыми препаратами,

вызывающими деполимеризацию микротрубочек. Например, в клетках немелкоклеточного рака легкого активность HDAC6 поддерживает высокий уровень экспрессии рецептора Notch1 и соответствующий сигнальный путь, важный для выживания и пролиферации этих опухолевых клеток, поэтому тубацин и соединения, подобные ингибиторам HDAC, могут быть потенциальными терапевтическими агентами для пациентов с таким раком (Deskin et al., 2020). Тубацин в низких концентрациях способствует пролиферации стволовых стромальных клеток костного мозга и усиливает их механические свойства при увеличении содержания ацетилированного α -тубулина, причем его действие опосредуется через MEK/ERK-сигнальный каскад (Liang et al., 2019).

Поскольку клеточное старение, индуцированное ингибиторами HDAC класса I, сопровождается остановкой деления клеток, но не прекращением их роста и синтеза белков, мы проверили уровень активности mTOR-сигнального пути в клетках mERas, обработанных тубацином, анализируя фосфорилирование мишеней mTOR: содержание фосфорилированного рибосомного белка S6 (p-S6) и фосфорилированного эукариотического фактора инициации транскрипции 4E-BP1 (p-4E-BP1). Представленные на рис. 5а данные показывают, что тубацин увеличивает фосфорилирование 4E-BP1 через 24 ч, затем уровень p-4E-BP1 сохраняется в течение 72 ч, но содержание его изоформ меняется. Что касается S6, то тубацин слабо способствует его фосфорилированию через 24 ч, которое резко снижается к 72 ч (рис. 5а). Таким образом, длительное воздействие тубацина снижает активность mTOR и в то же время вызывает клеточное старение, что отличается от результатов, полученных с бутиратом натрия (Romanov et al., 2010), который и индуцирует старение, и активирует mTOR-путь.

Поскольку мы показали модуляцию уровней mTOR в клетках mERas, обработанных тубацином, важно выяснить, как изменяется уровень аутофагии в клетках. Хорошо известно, что высокая активность mTOR негативно регулирует аутофагию посредством ингибиторного фосфорилирования белка ULK-1 (Atg-1) с сопутствующими изменениями двух маркерных белков аутофагии: LC3-II, связанного с мембранами аутофагосом (Kuma et al., 2007), и накоплением p62/SQSTM1, белка секвестомы 1, (Bjørkøy et al., 2006; Sahani et al., 2014), который может взаимодействовать с HDAC6 и регулировать ее деацетилазную активность (Yan et al., 2013).

Действительно, белок p62 значительно накапливается при обработке тубацином (рис. 6в). Подобное накопление белка p62 в цитоплазме было подтверждено с помощью иммунофлуоресценции с использованием антител к p62 (данные не показаны). Здесь мы показали, что тубацин индуцировал старение клеток mERas (рис. 4а), а ранее были получены данные о том, что в стареющих фибробластах могут на-

капливаться агрегаты белка p62 (Gamerding et al., 2009). Хотя обычно уровень p62 обратно коррелирует с уровнем аутофагии, но это относится к полному циклу аутофагии. Так, в нормальных MEF и трансформированных клетках HepG2 белок p62 накапливается во время развития аутофагии (Sahani et al., 2014). В клеточных линиях PC3 и LNCaP рака простаты тубацин вызывал накопление p62 благодаря непосредственной регуляции его стабильности независимо от стадии аутофагии (Watson et al., 2016). Поскольку белок p62 физически связан с HDAC6 в цитоплазме, он может модулировать ее деацетилазную активность, так что накопление p62 возможно снижает активность HDAC6 (Yan et al., 2013). В целом, содержание p62 модулируется различными стимулами: окислительным стрессом, активностью киназных каскадов Ras/MAPK и JNK, индуктором аутофагии ресвератролом (Liu et al., 2016). Например, ресвератрол активирует экспрессию p62 через JNK-путь и инициирует аутофагию в клетках K562 (Puissant et al., 2012).

Мы также проверили уровень фосфорилирования белка ULK1 – мишени для киназы AMPK. Тубацин вызывает, главным образом, AMPK-зависимое фосфорилирование по серину-555 (S555), тогда как фосфорилирование по S757 (мишени mTOR) лишь слегка повышено (рис. 5б). Это означает, что AMPK-зависимое фосфорилирование ULK1 (по S555) способствует активации аутофагии (Egan et al., 2011), тогда как mTOR-зависимое фосфорилирование по S757 слабо ингибирует аутофагию (Kim et al., 2011). Кроме того, тубацин способен непосредственно активировать киназу AMPK α (Hawley et al., 1996), усиливая ее фосфорилирование по Thr172 с максимумом через 48 ч (рис. 5в).

Так как ацетилирование α -тубулина необходимо для слияния аутофагосом с лизосомами, HDAC6, вероятно, участвует в контроле процесса аутофагии (Lee et al., 2010). Обработка клеток тубацином в течение 24 ч несильно увеличивает превращение цитоплазматического белка LC3-I в форму LC3-II, связанную с мембранами аутофагосом (рис. 6б), в то время как это превращение хорошо заметно через 72 ч, что свидетельствует об увеличении уровня аутофагии в обработанных тубацином клетках через 3 сут.

Эти результаты согласуются с данными, полученными с помощью набора для аутофагии CytoID (рис. 6а). Можно видеть, что в клетках mERas индуктор аутофагии рапамицин действительно увеличивает количество обнаруженных аутофагосомных вакуолей в среднем в 1.4 раза, в то время как после суточного воздействия тубацина это значение достигает 1.6 раза (рис. 6а). Таким образом, все эти результаты показывают, что тубацин действительно усиливает по крайней мере начальную стадию аутофагии. Подобное действие тубацина на уровень аутофагии также наблюдали в подоцитах (Liang et al., 2020). Эта его роль в сочетании с другими противо-

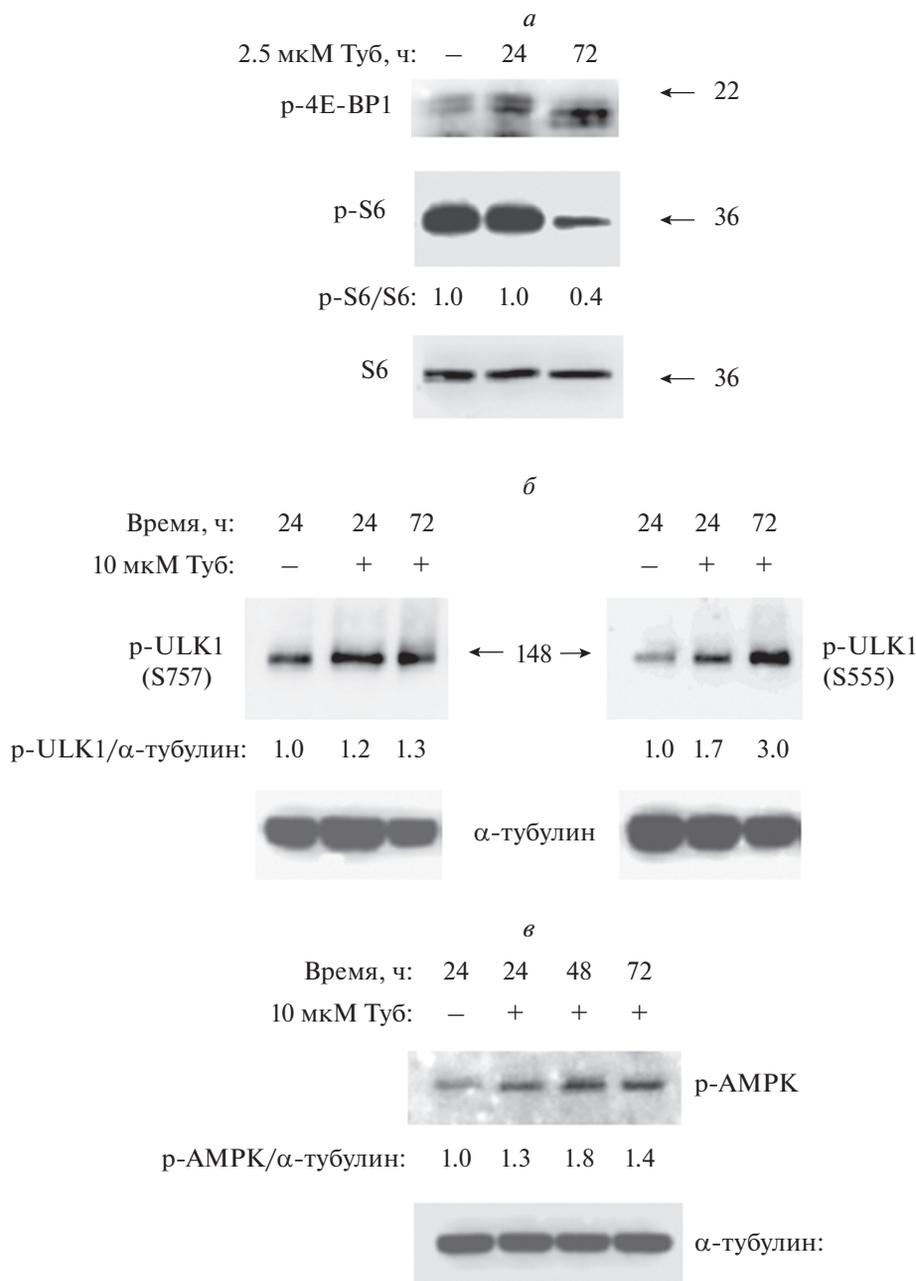


Рис. 5. Тубацин (Туб) индуцирует фосфорилирование белков AMPKα, ULK1 (зависимое от AMPK) и 4E-BP1 – мишени mTOR. *а* – Иммуноблот с антителами к фосфорилированным формам белков 4E-BP1 (p-4E-BP1) и S6 (p-S6), а также к нефосфорилированному белку S6 после электрофореза клеточных экстрактов (50 мкг) в 10%-ном ПААГ. Клетки обрабатывали или не обрабатывали (–, контроль) 5 мкМ Туб в течение 24 или 72 ч; позиции маркерных белков указаны справа; отн. значения денситометрии полос p-S6/S6 показаны между панелями. *б* – Иммуноблот с использованием антител к α-тубулину и белку ULK1, фосфорилированному по серину757 (S757) или 555 (S555), после электрофореза экстрактов клеток mERas в 10%-ном ПААГ. Клетки обрабатывали или не обрабатывали (–, контроль) 10 мкМ Туб в течение 24 или 72 ч; указано положение маркерного белка 148 кД; отн. значения денситометрии полос p-ULK1/α-тубулин показаны между панелями. *в* – Иммуноблот с антителами к AMPKα, фосфорилированному по треонину-172 (p-AMPK), и к α-тубулину после электрофореза экстрактов клеток mERas в 10% ПААГ; клетки обрабатывали или не обрабатывали (–) 10 мкМ Туб в течение 24, 48 и 72 ч; отн. значения денситометрии полос p-AMPK/α-тубулин показаны между панелями.

пухولةвыми препаратами может быть перспективной для противораковой терапии (Janku et al., 2011). Так, недавно показали, что комбинация тубацина с эрастином – блокатором транспорта цистеина – ин-

дуцирует гибель немезенхимных клеток TNBC рака молочной железы (Alothaim et al., 2021).

Тубацин в сочетании с бортезомибом индуцирует апоптоз. Контрольные клетки mERas показывают

высокий уровень протеосомной активности, в частности химотрипсин-подобной активности, которая дополнительно возрастает при действии тубацина (рис. 7а). Поскольку химотрипсин-подобная активность очень чувствительна к бортезомибу, ингибитору протеосомной активности, мы проверили, может ли тубацин в сочетании с бортезомибом вызывать синергический антипролиферативный эффект в клетках mERas. Действительно, данные проточной цитометрии (рис. 7б1) показывают, что тубацин и бортезомиб вместе уменьшают S-фазу клеточного цикла до 18%. Интересно, что отдельно бортезомиб способен индуцировать G₁/S-блок в клеточном цикле mERas, причем доля G₁-фазы возрастает при увеличении концентрации бортезомиба (рис. 7в1). Индуцированный бортезомибом G₁/S-блок также наблюдали в некоторых линиях опухолевых клеток (хондросаркомы, В-лимфомы Раджи) (Бао et al., 2017; Gu et al., 2017), тогда как G₂/M-блок цикла был обнаружен в других опухолевых клетках (саркомы Ивинга, рефрактерной В-лимфомы мантии, колоректального рака) (Lu et al., 2008; Hutter et al., 2012; Rastogi, Mishra, 2012).

Супрессорное действие бортезомиба на клеточный цикл можно объяснить индукцией экспрессии ингибиторов клеточного цикла (p21, p27, p15) (Lu et al., 2008; Hutter et al., 2012; Rastogi, Mishra, 2012), а также его способностью препятствовать деградации этих регуляторных белков (Lu et al., 2008; Gu et al., 2017).

При низкой концентрации (10 нМ) бортезомиб не вызывает заметной апоптотической гибели клеток mERas (рис. 7б2, в2). После совместной обработки тубацином и бортезомибом наблюдали дополнительный (синергический) эффект по снижению доли клеток в S-фазе (рис. 7б1). В то же время, по данным проточной цитометрии в клетках, обработанных тубацином и бортезомибом, наблюдали увеличение субдиплоидного пика как характеристики продолжающейся апоптотической гибели клеток (рис. 7б2). Этот факт можно объяснить значительным снижением жизнеспособности клеток mERas при совместном действии тубацина и бортезомиба, которое выявлялось с помощью набора Count and Viability (рис. 8а). Повышенная апоптотическая гибель клеток mERas в присутствии тубацина и бортезомиба подтверждается проточной цитометрией с использованием набора Annexin-V-FITC и последующим анализом двупараметрического распределения клеток (рис. 8б, в).

Ранее аналогичный комбинированный эффект был обнаружен для клеток множественной миеломы человека (Hideshima et al., 2005). При использовании другой модели было показано, что комбинация бортезомиба и индуцирующего аутофагию рапамицина может подавлять гепатоцеллюлярную карциному мыши (Wang et al., 2012). В совокупности эти результаты показывают, что ингибитор HDAC6 тубацин усиливает протеосомную активность в клетках mERas, а сов-

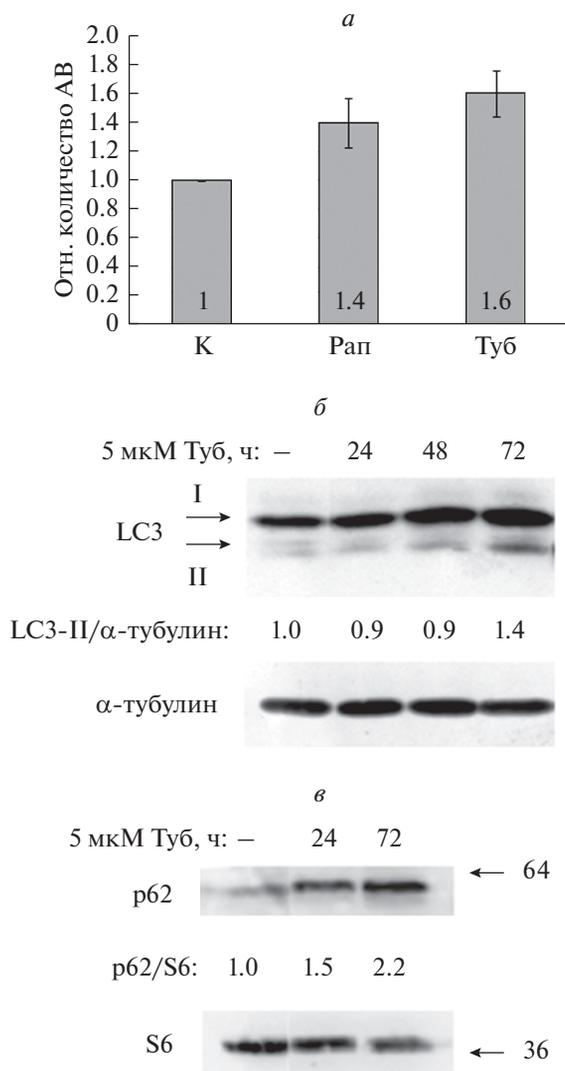


Рис. 6. Тубацин (Туб) увеличивает количество аутофагосомных вакуолей (АВ) в клетках mERas. *а* – Количество АВ в контроле (К) и при действии рапамицина (индуктора аутофагии; Рап, 0.5 мкМ) и Туб (5 мкМ) в течение 24 ч; значения относительно контроля (К), принятого за 1 ед., показаны внутри столбцов; контрольные клетки культивировали с растворителем реагентов ДМСО; суспендированные клетки ($5-7 \times 10^5$) добавляли к компонентам флуоресцентного набора для обнаружения аутофагии CYTO-ID® и анализировали в проточном цитометре (см. раздел “Материал методика”). *б* – Иммуноблот с антителами к белкам LC3 (формы I и II) и α-тубулину после электрофореза 50 мкг экстрактов клеток в 15%-ном ПААГ; показаны клетки контрольные (–) и обработанные 5 мкМ Туб 24, 48 и 72 ч; относительные значения денситометрии полос LC3-II/α-тубулина указаны между панелями. *в* – Иммуноблот с антителами к убиквитин-связывающему белку SQSTM1/p62 (p62) и белку S6 после электрофореза экстрактов клеток в 10%-ном ПААГ; клетки обрабатывали 5 мкМ Туб 24 и 72 ч; (–) – контрольные клетки; значения относительной денситометрии полос p62/S6 указаны между панелями.

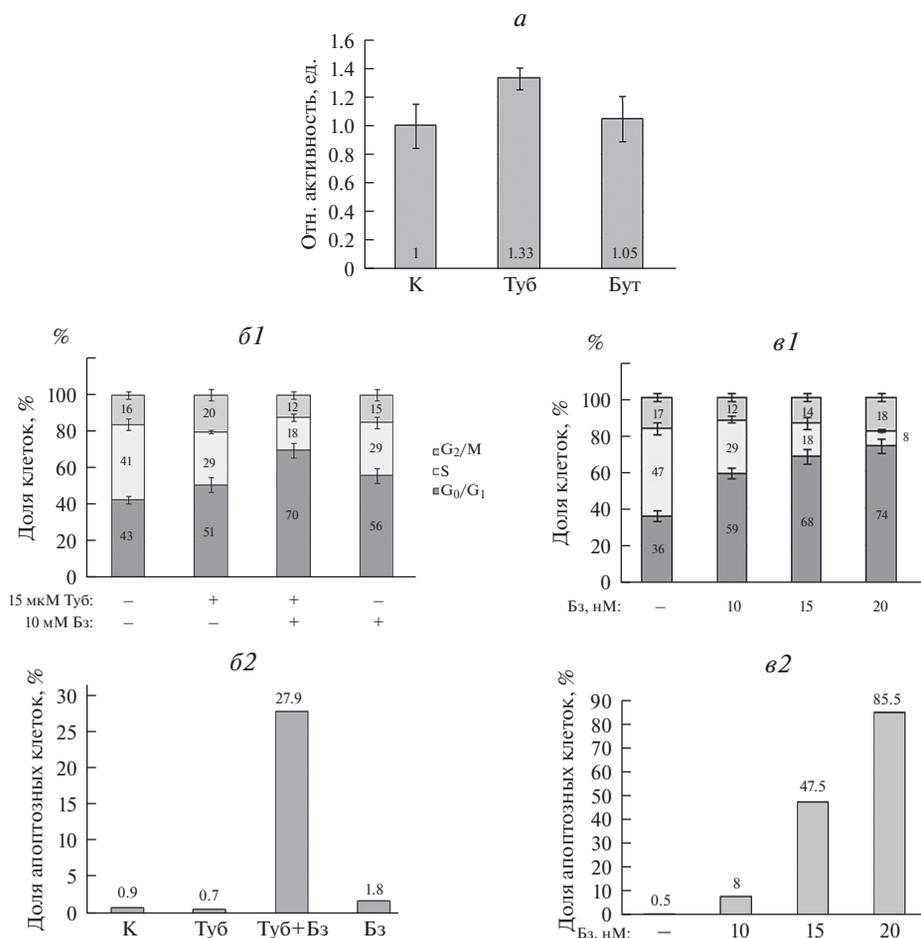


Рис. 7. Протеосомный ингибитор бортезомиб (Бз) усиливает индуцированный тубацином G₁/S-блок клеточного цикла и в сочетании с тубацином (Туб, 5 мкМ) способствует апоптотической гибели клеток mERas. *а* – активность химотрипсин-подобной пептидазы с флуорогенным субстратом (50 мкМ, Enzo) в экстрактах клеток (5 мкг белка) после обработки ингибитором HDAC в течение 72 ч; К – контрольные клетки, Бут – 4 мМ бутират натрия; значения активности пептидазы относительно контроля (К), принято за 1 ед., показаны внутри столбцов. *б1* – Распределение клеток по фазам клеточного цикла после суточной обработки 15 мкМ Туб и (или) 10 нМ Бз по данным проточной цитометрии, (–) – контрольные клетки; указаны средние значения и их ошибки по 3 экспериментам. *б2* – доля (в %) апоптотирующих клеток, измеренная по площади пиков субдиплоидной ДНК для одного из экспериментов, представленного на диаграмме *б1*. *в1* – Распределение клеток по фазам клеточного цикла после обработки (24 ч) Бз в концентрации 10, 15 и 20 нМ; (–) – контрольные клетки; указаны средние значения и их ошибки по 3 экспериментам. *в2* – Доля (в %) апоптотирующих клеток, измеренная по площади пиков субдиплоидной ДНК для одного из экспериментов, представленного на диаграмме *в1*.

местное воздействие тубацина и бортезомиба оказывает дополнительное антипролиферативное действие и вызывает апоптотическую гибель клеток.

Суммируя, можно сказать, что ингибитор HDAC6 тубацин действует через ацетилирование α-тубулина, который является основным компонентом микротрубочек, участвующих в процессе аутофагии. Подобно ингибитору HDAC бутирату натрия, тубацин вызывает остановку клеточного цикла на стадии G₁/S, подавляет пролиферацию клеток mERas, а также вызывает их гипертрофию и клеточное старение, что приводит к подавлению миграции клеток в рану. Следует отметить, что тубацин осуществляет все эти эффекты при гораздо более низ-

ких концентрациях (микромольных) по сравнению с бутиратом натрия (4 мМ).

Полученные результаты показывают, что тубацин способен индуцировать по меньшей мере первые стадии аутофагии путем активации как AMPK-зависимого фосфорилирования ULK1, так и самого фосфорилирования AMPKα. Хотя белок LC3-II накапливается в течение 72 ч после обработки клеток тубацином, слияние аутофагосом и лизосом, по-видимому, не происходит. Комбинация протеосомно ингибитора бортезомиба в наномольных концентрациях и тубацина очень эффективна для индукции апоптотической гибели клеток mERas, что предполагает перспективное использование ее для элиминации Ras-экспрессирующих опухолевых клеток.

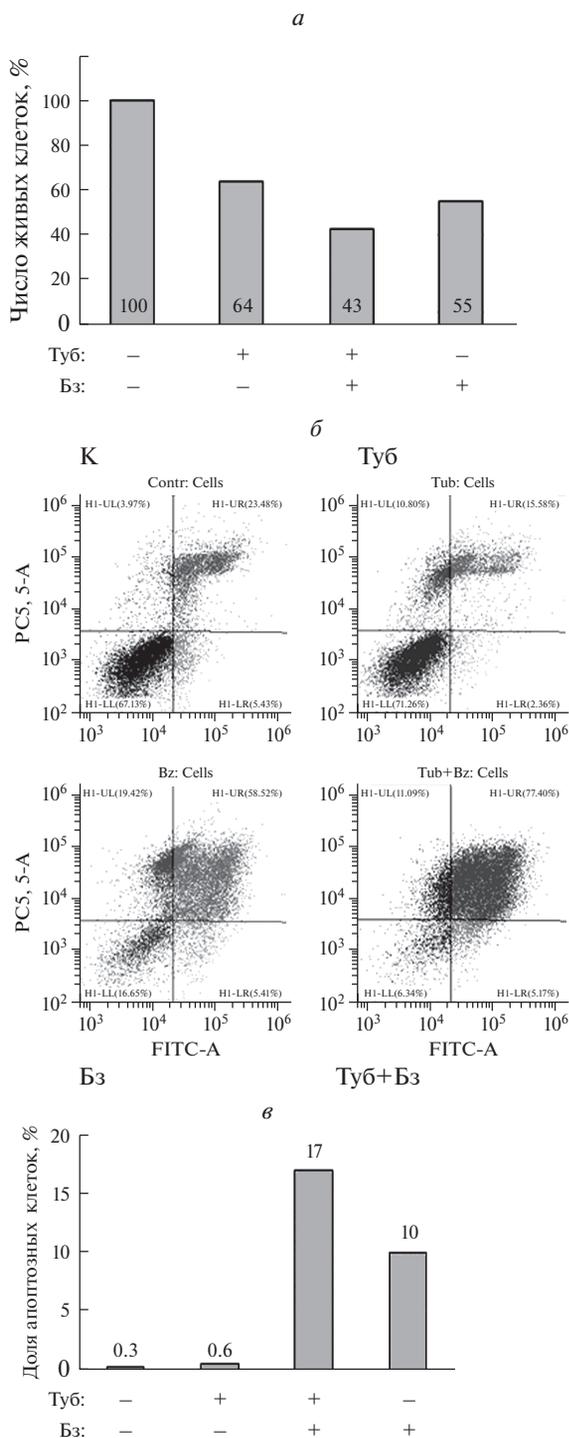


Рис. 8. Совместное действие тубацина (Туб, 15 мкМ) и бортезомиба (Бз, 15 нМ) значительно снижает жизнеспособность клеток mERas вследствие активации апоптоза. *a* – Жизнеспособность клеток, оцененная с помощью набора Count and Viability для цитометра Muse Cell Analyzer, (–) – контроль; процентное количество живых клеток указано внутри столбцов. *б* – Двупараметрическое распределение клеток (содержание ДНК против Аннексин V-FITC) по данным проточной цитометрии; показаны контрольные клетки (К), действие Туб, Бз, раздельно и совместно. *в* – Диаграмма по результатам одного из экспериментов, представленного в части *б* этого рисунка; показано процентное содержание апоптотических клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Е.Б. Бурову (ИНЦ РАН) за предоставление антител к фосфо-АМРК α .

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00068).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы не проводили экспериментов с участием животных или людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Поспелова Т.В., Кислякова Т.В., Медведев А.В., Светликова С.Б., Поспелов В.А. 1990. Характеристика трансформированного фенотипа и экспрессии САТ-плазмид в клетках эмбриональных фибробластов крысы, трансформированных онкогенами *E1A* + *cHa-ras*. Цитология. Т. 32. С. 148. (Pospelova T.V., Kislyakova T.V., Medvedev A.V., Svetlikova S.B., Pospelov V.A. 1990. The characteristics of the transformed phenotype and the expression of indicator plasmids in the cells of rat embryonic fibroblasts immortalized by oncogene *E1Aad5* and transformed by oncogenes *E1Aad5+c-Ha-ras*. Tsitologiya. V. 32. P. 148.)
- Abramova M.V., Pospelova T.V., Nulenkov F.P., Hollander C.V., Fornace A.J. Jr., Pospelov V.A. 2006. G₁/S arrest induced by histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in E1A + Ras-transformed cells is mediated through downregulation of E2F activity and stabilization of beta-catenin. J. Biol. Chem. V. 281. P. 21040.
- Adams J.M., Cory S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. Oncogene. V. 26. P. 1324.
- Aldana-Masangkay G.I., Rodrigues-Gonzales A., Lin T., Ikeda A.K., Hsieh Y.-T., Kim Y.-M., Lomenick B., Okemoto K., Landaw E.M., Wang D., Mazitschek R., Bradner J.E., Sakamoto K.M. 2011. Tubacin suppresses proliferation and induces apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells. Leuk. Lymphoma. V. 52. P. 1544.
- Allothaim T., Charbonneau M., Tang X. 2021. HDAC6 inhibitors sensitize non-mesenchymal triple-negative breast cancer cells to cysteine deprivation. Sci. Rep. V. 11. P. 10956.
- Asthana J., Kapoor S., Mohan R., Panda D. 2013. Inhibition of HDAC6 deacetylase activity increases its binding with microtubules and suppresses microtubule dynamic instability in MCF-7 cells. J. Biol. Chem. V.288. P. 22516.
- Bao X., Ren T., Huang Y., Ren C., Yang K., Zhang H., Guo W. 2017. Bortezomib induces apoptosis and suppresses cell growth and metastasis by inactivation of Stat3 signaling in chondrosarcoma. Int. J. Oncol. V. 50. P. 477.
- Bjorkoy G., Lamark T., Johansen T. 2006. p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. Autophagy. V. 2. P. 138.

- Bradford M.M.* 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* V. 72. P. 248.
- Davie J.R.* 2003. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J. Nutr.* V. 133. P. 2485.
- Delbridge A.R., Strasser A.* 2015. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* V. 22. P. 1071.
- Depetter Y., Geurs S., De Vreese R., Goethals S., Vandoom E., Steenbrugge J., Meyer E., de Tullio P., Brake M., D'hooghe M., de Weyer O.* 2019. Selective pharmacological inhibitors of HDAC6 reveal biochemical activity but functional tolerance in cancer models. *Int. J. Cancer.* V. 145. P. 735.
- Deskin B., Yin Q., Saito S., Shan B., Lasky J.A.* 2020. Inhibition of HDAC6 attenuates tumor growth of non-small cell lung cancer. *Transl Oncol.* V. 13. P. 135.
- Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubel, I., Pereira-Smith O.* 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 92. P. 9363.
- Ding N., Ping L., Feng L., Zheng X., Song Y., Zhu J.* 2014. Histone deacetylase 6 activity is critical for the metastasis of Burkitt's lymphoma cells. *Cancer Cell Int.* V. 14. P. 139.
- Egan D.F., Shackelford D.B., Mihaylova M.M., Gelino S., Kohnz R.A., Mair W., Vasquez D.S., Joshi A., Gwinn D.M., Taylor R., Asara J.M., Fitzpatrick J., Dillin A., Violle, B., Kundu M., Hansen M., Shaw R.J.* 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science.* V. 331. P. 456.
- Gamerding M., Hajieva P., Kaya A.M., Wolfrum U., Hart F.U., Behl C.* 2009. Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J.* V. 28. P. 889.
- Gu J.J., Kaufman G.P., Mavis C., Czuczman M.S., Hernandez-Ilizaliturri F.J.* 2017. Mitotic catastrophe and cell cycle arrest are alternative cell death pathways executed by bortezomib in rituximab resistant B-cell lymphoma cells. *Oncotarget.* V. 8. P. 12741.
- Guardiola A.R., Yao T.-P.* 2002. Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J. Biol. Chem.* V. 277. P. 3350.
- Haggarty S.J., Koeller K.M., Wong J.C., Grozinger C.M., Schreiber S.L.* 2003. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 100. P. 4389.
- Hawley S.A., Davison M., Woods A., Davies S.P., Beri R.K., Carling D., Hardie D.G.* 1996. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* V. 271. P. 27879.
- Hideshima T., Bradner J.E., Wong J., Chauhan D., Richardson P., Schreiber S.L., Anderson K.C.* 2005. Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 102. P. 8567.
- Hutter G., Rieken M., Pastore A.* 2012. The proteasome inhibitor bortezomib targets cell cycle and apoptosis, and acts synergistically in a sequence-dependent way with chemotherapeutic agents in mantle cell lymphoma. *Ann. Hematol.* V. 91. P. 847.
- Janku F., McConkey D.J., Hong D.S., Kurzrock R.* 2011. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* V. 8. P. 528.
- Kim J., Kundu M., Violle, B., Guan K.L.* 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* V. 13. P. 132.
- Kulichkova V.A., Tsimokha A.S., Fedorova O.A., Moiseeva T.N., Botril A., Lezina L., Gauze L.N., Konstantinova I.M., Mitytenberg A.G., Barlev N.A.* 2010. 26S proteasome exhibits endoribonuclease activity controlled by extra-cellular stimuli. *Cell Cycle.* V. 9. P. 840.
- Kuma A., Matsui M., Mizushima N.* 2007. LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy. *Autophagy.* V. 3. P. 323.
- Laberge R.M., Sun Y., Orjalo A.V., Patil C.K., Freund A., Zhou L., Curran S.C., Davalos A.R., Wilson-Edell K.A., Liu S., Limbad C., Demaria M., Li P., Hubbard G.B., Ikeno Y. et al.* 2015. mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translocation. *Nat. Cell Biol.* V. 17. P. 1049.
- Lee J.Y., Koga H., Kawaguchi Y., Tang W., Wong E., Gao Y.-S., Pandey U.B., Kayshik S., Tresse E., Lu J., Taylor J.P., Cuervo A.M., Yao T.-P.* 2010. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J.* V. 29. P. 969.
- Liang J.-Q., Lu F., Gan B., Wen Y.-Y., Chen J., Wang H.-G., Yang Y., Peng X.-S., Zhou Y.-F.* 2019. Low-dose tubacin promotes BMSCs proliferation and morphological changes through the ERK pathway. *Am. J. Transl. Res.* V. 11. P. 1446.
- Liang T., Qi C., Lay Y., Xie J., Wang H., Zhang L., Lin T., Jv M., Li J., Wang Y., Zhang Y., Chen Z., Qiu X., Li R., Li Z. et al.* 2020. HDAC6-mediated α -tubulin deacetylation suppresses autophagy and enhances motility of podocytes in diabetic nephropathy. *J. Cell Mol. Med.* V. 24. P. 11558.
- Liu W.J., Ye L., Huang W.F., Guo L.J., Xu Z.G., Wu H.L., Yang C., Liu H.F.* 2016. P62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell. Mol. Biol. Lett.* V. 21. P. 1.
- Lu G., Vasu P.V., Chaudhary P.M.* 2008. Proteasome inhibitor bortezomib induces cell cycle arrest and apoptosis in cell lines derived from Ewing's sarcoma family of tumors and synergizes with TRAIL. *Cancer Biol. Therapy.* V. 7. P. 603.
- Mathew R., Karantza-Wadsworth V., White E.* 2007. Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* V. 7. P. 961.
- Matsuyama A., Shimazu T., Sumida Y., Saito A., Yoshimatsu Y., Seigneurin-Berny D., Osada H., Komatsu Y., Nishino N., Khochbin S., Horinouchi S., Yoshida M.* 2002. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* V. 21. P. 6820.
- Namdar M., Perez G., Ngo L., Marks P.A.* 2010. Selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) induces DNA damage and sensitizes transformed cells to anticancer agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 107. P. 20003.
- Nelyudova A.M., Aksenov N.D., Pospelov V.A., Pospelova T.V.* 2007. By blocking apoptosis, Bcl-2 in p38-dependent manner promotes cell cycle arrest and accelerated senescence after DNA damage and serum withdrawal. *Cell Cycle.* V. 6. P. 2171.

- Newbold A., Falkenberg K.J., Prince H.M., Johnstone R.W. 2016. How do tumor cells respond to HDAC inhibition? FEBS J. V. 283. P. 4032.
- Puissan, A., Fenouille N., Auberger P. 2012. When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. Am. J. Cancer Res. V. 2. P. 397.
- Rastogi N., Mishra D.P. 2012. Therapeutic targeting of cancer cell cycle using proteasome inhibitors. Cell Division. V. 7. P. 1.
- Rodier F., Campisi J. 2011. Four faces of cellular senescence. J. Cell Biol. V. 192. P. 547.
- Romanov V.S., Abramova M.V., Svetlikova S.B., Bykova T.V., Zubova S.G., Aksenov N.D., Fornace A.J.Jr., Pospelova T.V., Pospelov V.A. 2010. p21^{Waf1} is required for cellular senescence but not for cell cycle arrest induced by the HDAC inhibitor sodium butyrate. Cell Cycle. V. 9. P. 3945.
- Sahani M.H., Itakura E., Mizushima N. 2014. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. Autophagy. V. 10. P. 431.
- Shao Y., Gao Z., Marks P.A., Jiang X. 2004. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 101. P. 18030.
- Sobue S., Mizutani N., Aoyama Y., Kawamoto Y., Suzuki M., Nozawa Y., Ichihara M., Murate T. 2016. Mechanism of paclitaxel resistance in a human prostate cancer cell line, PC3-PR, and its sensitization by cabazitaxel. Biochem. Biophys. Res. Comm. V. 479. P. 808.
- Verdel A., Curtet S., Brocard M., Rousseaux S., Lemerrier C., Yoshida M., Khochbin S. 2000. Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. Curr. Biol. V. 10. P. 747.
- Wang C., Gao D., Guo K., Kang X., Jiang K., Sun C., Li Y., Sun L., Shu H., Jin G., Sun H., Wu W., Liu Y. 2012. Novel synergistic antitumor effects of rapamycin with bortezomib on hepatocellular carcinoma cells and orthotopic tumor model. BMC Cancer. V. 12. P. 1.
- Watson G.W., Wickramasekara S., Fang Y., Maier C.S., Williams D.E., Dashwood R.H., Perez V.I., Ho E. 2016. HDAC6 activity is not required for basal autophagic flux in metastatic prostate cancer cells. Exp. Biol. Med. V. 241. P. 1177.
- Yan J., Seibenhener M.L., Calderilla-Barbosa L., Diaz-Meco M.-T., Moscat J., Jiang J., Wooten M.W., Wooten M.C. 2013. SQSTM1/p62 interacts with HDAC6 and regulates deacetylase activity. PLoS one. V. 8. P. 1.
- Yu S., Cai X., Wu C., Liu Y., Zhang J., Gong X., Wang X., Wu X., Zhu T., Mo L., Gu J., Yu Z., Chen J., Thiery J.P., Chai R., Chen L. 2017. Targeting HSP90-HDAC6 regulating network implicates precision treatment of breast cancer. Int. J. Biol. Sci. V. 13. P. 505.
- Zhang Y., Li N., Caron C., Matthias G., Hess D., Khochbin S., Matthias P. 2003. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. EMBO J. V. 22. P. 1168.

Tubacin, a Histone Deacetylase 6 Inhibitor, Causes α -Tubulin Acetylation, Cell Cycle Arrest, Senescence and Suppression of Migration of Mouse Fibroblasts Transformed by *E1A* and *cHa-ras* Oncogenes

A. N. Kukushkin^a, S. B. Svetlikova^a, N. D. Aksenov^a, and V. A. Pospelov^a

^aInstitute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St-Petersburg, 194064 Russia

*e-mail: kan@incras.ru

Inhibitors of histone deacetylase activity (HDACs) are widely used to block proliferation of cancer cells in clinical trials *in vivo* and in studies on tumor cell lines *in vitro*. Some inhibitors reached to the clinical stage (SAHA, Class I). In addition to the suppression of cancer cell proliferation, they are capable of inducing either cellular senescence or apoptotic cell death and autophagy. HDAC6 (Class II) is different from other HDACs in its cytoplasmic localization and the lack of a noticeable histone deacetylase activity. In turn, HDAC6 deacetylates a number of non-histone proteins, including α -tubulin, a component of microtubules, thereby influencing microtubule stability. Overexpression of HDAC6 has been identified in a variety of cancer cell lines and mouse tumor models. Available data suggest that HDAC6 is involved in quality control in the process of autophagy as α -tubulin acetylation is essential for fusion of autophagosomes to lysosomes. We compared the effects produced by HDAC inhibitor sodium butyrate, which inhibits the activity of HDACs Class I, but not HDAC6, and by Tubacin, which is a specific inhibitor of HDAC6. It turned out that Tubacin causes the same effects as the sodium butyrate does regarding suppression of cell growth, induction of G₁/S cell cycle arrest and cellular senescence. As long as Tubacin treatment induces acetylation of α -tubulin, one may suggest that the level of α -tubulin acetylation is indispensable for proliferation, senescence and cell migration of E1A + Ras transformed cells.

Keywords: mouse embryonic fibroblasts, HDAC6, tubacin, senescence, cell cycle, cell migration, apoptosis

УДК 57.085.23

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ С АЛЬФА-ГЛУТАМИЛ-ТРИПТОФАНОМ *IN VITRO* НА СЕКРЕЦИЮ ЦИТОКИНОВ И УРОВЕНЬ ПОВЕРХНОСТНОЙ МОЛЕКУЛЫ ICAM-1

© 2022 г. Е. Г. Головачева¹ *, Э. А. Старикова^{2, 3}, Т. А. Кудрявцева², В. А. Апрятина⁴¹Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, 197376 Россия²Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук, Санкт-Петербург, 197376 Россия³Кафедра иммунологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022 Россия⁴Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, 197110 Россия

*E-mail: okdixi@mail.ru

Поступила в редакцию 13.07.2022 г.

После доработки 20.08.2022 г.

Принята к публикации 30.08.2022 г.

Изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе действия иммуномодулирующих препаратов, актуально для обоснования их терапевтического эффекта. В настоящей работе проведен сравнительный анализ спонтанной и индуцированной TNF α секреции провоспалительных цитокинов IL-1 α и IL-8, а также уровень адгезионной молекулы ICAM-1 в культуре эндотелиальных клеток EA.hy 926 и на мононуклеарных клетках периферической крови здоровых доноров в моделях воспаления *in vitro* в присутствии альфа-глутамил-триптофана (α -Glu-Trp) и препарата Цитовир-3. Цель – изучить клеточные механизмы, опосредующие иммуномодулирующий эффект препаратов α -Glu-Trp и Цитовир-3. Показано, что α -Glu-Trp снижал индуцированную TNF α продукцию IL-1 α и усиливал стимулированный действием TNF α уровень поверхностной молекулы ICAM-1 эндотелиальных клеток. При этом препарат снижал секрецию цитокина IL-8, индуцированную TNF α , и повышал спонтанный уровень ICAM-1 мононуклеарных клеток. Препарат Цитовир-3 оказывал активирующее действие на эндотелиальные клетки EA.hy 926 и мононуклеарные лейкоциты периферической крови человека. В его присутствии происходило усиление спонтанной секреции IL-8 эндотелиальными и мононуклеарными клетками. Кроме того, Цитовир-3 повышал уровень ICAM-1, индуцированный TNF α , на эндотелиальных клетках и увеличивал спонтанный уровень этой поверхностной молекулы на мононуклеарах. Подавление стимулированной продукции провоспалительных цитокинов под действием α -Glu-Trp как монопрепарата, так и в составе Цитовира-3, может обуславливать его противовоспалительные свойства. Однако повышение уровня поверхностной молекулы ICAM-1 свидетельствует о механизмах, повышающих функциональную активность изученных клеток, что одинаково важно для реализации эффективного иммунного ответа на инфекцию и репарации поврежденных тканей при воспалительных реакциях.

Ключевые слова: альфа-глутамил-триптофан, Цитовир-3, эндотелиальные клетки EA.hy 926, мононуклеарные лейкоциты периферической крови человека, ICAM-1, секреция цитокинов, ОРВИ

DOI: 10.31857/S0041377122060049

Ввиду высокой изменчивости антигенного состава вируса гриппа, а также значительного количества возбудителей ОРВИ большую трудность представляет задача создания эффективных препаратов терапии этих инфекций (Смирнов и др., 2020; Malainou, Herold, 2019; Зинина и др., 2021). В связи с этим профилактика и лечение ОРВИ по-прежнему остается важной проблемой, требующей своего разрешения.

Принятые сокращения: ИФА – иммуноферментный анализ; СИФ – средняя интенсивность флуоресценции; α -Glu-Trp – альфа-глутамил-триптофан.

Альфа-глутамил-триптофан (α -Glu-Trp) является синтетическим пептидным иммуномодулятором, широко используется как препарат для лечения иммунодефицитных состояний. Известно, что препарат оказывает модулирующее влияние на метаболические процессы в клетках, стимулирует функциональную активность клеток иммунной системы, обладает антиоксидантным действием, стимулирует процессы регенерации тканей, ускоряет заживление ран, активизирует функции клеток соединительной ткани, эндотелиоцитов, макрофагов и лейкоцитов в очаге повреждения, ингибирует продукцию гиста-

мина и серотонина при воспалении (Смирнов и др., 2021; Хавинсон и др., 2021). На его основе фармацевтической компанией АО МБНПК Цитомед (Санкт-Петербург, Россия) создан препарат Цитовир-3 для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ у взрослых и детей. Препарат представляет собой комбинацию трех лекарственных веществ: бендазола гидрохлорид (Дибазол), α -Glu-Trp-натрия (Тимоген® натрий) и аскорбиновой кислоты.

Цитовир-3 является средством этиотропной и иммуностимулирующей терапии, обладает противовирусным действием в отношении вирусов гриппа А и В и других вирусов, вызывающих острые респираторные вирусные заболевания. Препарат может применяться и как средство экстренной профилактики, и как средство лечения, в том числе и коронавирусной инфекции COVID-19 (Шипицын и др., 2010; Хавинсон и др., 2020; Головачева и др., 2021; Смирнов и др., 2021). Терапевтический эффект препарата обусловлен сочетанным действием входящих в него веществ. В настоящее время доказано, что бендазол и его производные могут являться агонистами рецепторов TLR-3, TLR-8 и RLR, распознающих паттерны, ассоциированные с патогенными микроорганизмами (Beesu et al., 2014, 2016). Взаимодействие аналогов бензимидазола с этими молекулами приводит к ингибированию продукции провоспалительных цитокинов (Ullah et al., 2022; Eskandari et al., 2022). Аскорбиновая кислота является веществом с доказанным антиоксидантным и противовоспалительным действием (Смирнов и др., 2020; Oudemans-van Straaten et al., 2014).

Исследуемое вещество α -Glu-Trp предположительно оказывает иммуномодулирующее действие *in vivo* за счет модуляции экспрессии генов провоспалительных факторов, которые находятся под контролем транскрипционного фактора NF- κ B.

Цель настоящей работы заключалась в изучении клеточных механизмов, опосредующих иммуномодулирующий эффект α -Glu-Trp. В работе *in vitro* изучали возможные механизмы реализации фармакологического эффекта α -Glu-Trp и препарата Цитовир-3, содержащего в составе α -Glu-Trp, эндотелиальными клетками линии EA.hy 926 и мононуклеарными лейкоцитами периферической крови. Для моделирования активации клеток использовали провоспалительный цитокин TNF α с широким спектром активностей. Для оценки иммуномодулирующего влияния препаратов мы проводили изучение секреции провоспалительных цитокинов IL-1 α и IL-8, которые регулируют развитие воспаления в ходе инфекции. Дополнительно проводили анализ уровня поверхностной экспрессии индуцибельной молекулы ICAM-1.

Подбор клеточной модели исследований был связан с тем, что лейкоциты являются основными регуляторными и эффекторными элементами развития воспаления и иммунного ответа. Одна из главных функций эндотелиальных клеток состоит в ре-

гуляции эмиграции лейкоцитов из кровеносного русла в ткани, за счет секреции цитокинов и экспрессии адгезионных молекул, что способствует репаративным процессам. Лейкоциты, и эндотелиальные клетки являются мишенью действия провоспалительных факторов разной природы (цитокинов, компонентов микроорганизмов и пр.) и экспрессируют на своей поверхности рецепторы для этих факторов (Москалец, 2018; Chong et al., 2021).

Рецепторы TNFR1 присутствуют на клетках почти всех типов, а рецепторы TNFR2 — преимущественно на клетках иммунной системы. Связывание TNF α с рецепторами приводит, в частности, к активации транскрипционного фактора NF- κ B, т.е. к классическому пути индукции провоспалительных цитокинов. Экспрессия всех исследуемых факторов находится под контролем транскрипционного фактора NF- κ B, в связи с чем, полученные данные позволяют косвенно судить о возможности модуляции активации NF- κ B под действием исследуемых субстанций (Markey et al., 2015; Zhang et al., 2020).

IL-1 α и IL-1 β традиционно называют IL-1, поскольку эти цитокины взаимодействуют на клетках с одним рецептором и их эффекты неразличимы. IL-1 α продуцируют макрофаги, дендритные клетки, эндотелиальные и стромальные клетки, В-лимфоциты. Макрофаги важны для контроля протекания иммунной реакции, переключения стадий иммунного ответа, осуществления эффективного фагоцитоза. Рецепторы семейства TLR вызывают активацию классических провоспалительных сигнальных каскадов, что приводит к экспрессии основных цитокинов воспаления: интерлейкинов IL-1 β и IL-12, фактора некроза опухолей альфа (TNF α) и ряда основных хемокинов, в том числе IL-8. Активная иммунная реакция макрофагов поддерживается Т-хелперами 1-го типа (Th1) (Guo et al., 2012; Beesu et al., 2014; Kaneko et al., 2019).

Секретируемый IL-1 α подвергается процессингу внеклеточными протеазами с образованием активного цитокина. Процессинг IL-1 β происходит внутри клетки с участием каспазы-1. Активация каспазы-1 происходит в составе инфламмосомы, и для этого необходимо связывание внутриклеточных рецепторов NLR с PAMP. Рецепторы IL-1 экспрессируются спонтанно на многих типах клеток. В наибольшей степени действие этого цитокина затрагивает эндотелиальные клетки и лейкоциты, при этом происходит индукция экспрессии более 100 генов. Основные эффекты IL-1 вызывают активацию и эмиграцию лейкоцитов (Chong et al., 2021; Markey et al., 2015).

IL-8 относится к провоспалительным хемокинам, которые продуцируются клетками миелоидного ряда и эндотелиальными клетками после их активации. Стимулом к синтезу IL-8 является связывание TLR с агонистами (микробными и вирусными продуктами) или действие провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF α и др.). IL-8 относится к семей-

ству хемокинов и играет решающую роль в активации и привлечении нейтрофилов в очаг воспаления верхних дыхательных путей. Важный эффект IL-8 – его ангиогенное действие, как при развитии воспаления, так и при заживлении ран (Guo et al., 2012; Khalil et al., 2021; Matsushima et al., 2022).

ICAM-1 – адгезионная молекула, которая имеет низкий спонтанный уровень экспрессии на клетках. Уровень поверхностной молекулы увеличивается под влиянием провоспалительных цитокинов, компонентов микроорганизмов, а также под влиянием разного рода стрессорных воздействий на клетки (Москалец, 2018; Vui et al., 2020). Молекула обеспечивает межклеточные взаимодействия в условиях воспаления. На эндотелиальных клетках ICAM-1 является контрлигандом интегриновых рецепторов лейкоцитов и обеспечивает их миграцию в ткани в условиях воспаления, что является защитным фактором в борьбе с инфекционным агентом. ICAM-1, экспрессируемая на мононуклеарных фагоцитах, участвует в формировании иммунологического синапса и презентации антигенов, что может быть использовано в конструировании новых вакцин или иммуномодулирующих препаратов (Guo, 2012; Soema et al., 2015; Хавинсон и др., 2021).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Использовали клетки эндотелиального происхождения линии EA.hy 926 (Университет Северная Каролина, США) и мононуклеарные лейкоциты периферической крови здоровых доноров, полученной из банка Отделения переливания крови Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

Культивирование. Перевиваемые эндотелиальные клетки человека EA.hy 926 культивировали в полной культуральной среде DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ICN, США), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ глутамин (Flow Laboratories, Англия). Для дезинтеграции монослоя использовали 0.25%-ный раствор Версена (Биолот, Россия). Клетки пересеивали каждые 3–4 сут в разведении 1 : 3.

Разделение фракции гранулоцитов и фракции мононуклеарных лейкоцитов проводили на гепаринизированной крови с помощью осаждения клеток в градиенте плотности фиколл-верографина 1.077 г/см³ (Биолот, Россия). Цельную кровь разводили в 2 раза забуференным физиологическим раствором (рН 7.2); 8 мл разведенной крови наслаивали на 4 мл раствора фиколл-верографина и центрифугировали в горизонтальном роторе при 400 g в течение 30 мин. Мононуклеарные лейкоциты отбирали из интерфазного кольца, образовавшегося на границе смеси фиколл-верографин и разведенной крови, и отмывали 3 раза тем же ФР, рН 7.2. Жизнеспособность клеток определяли с помощью окраски 0.2%-ным раство-

ром трипанового синего, клетки считали в камере Горяева. Мононуклеары ресуспендировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ICN, США), 50 мкг/мл сульфата гентамицина (Самсон, Россия) и 2 мМ L-глутамин (ICN, США).

Препараты. Испытывали действие следующих препаратов: α -Glu-Trp-натрия и Цитовира-3 – смеси трех активных компонентов: α -Glu-Trp-натрия, гидрохлорида бендазола (МБНПК Цитомед, Россия) и аскорбиновой кислоты. Препараты разводили в полной культуральной среде DMEM/F12 (для эндотелиальных клеток) или RPMI-1640 (для мононуклеарных лейкоцитов) (Биолот, Россия).

С целью наиболее адекватной оценки действующих дозировок препаратов предварительно определяли их минимальную токсическую дозу при разведении в полной культуральной среде. Для подбора диапазона концентраций препаратов, не токсичных для клеток, использовали стандартные цитотоксические тесты. Токсичность Цитовира-3 для клеток суспензионной природы изучали с помощью точной цитометрии, используя окрашивание ДНК-связывающим красителем йодидистым пропидием (Sigma-Aldrich, США), свободно проникающим в мертвые клетки. Токсичность препарата Цитовир-3 для эндотелиальных клеток изучали колориметрическим методом, окрашивая монослой клеток кристаллическим фиолетовым. Токсичность препарата α -Glu-Trp для мононуклеарных лейкоцитов изучали с помощью МТТ-теста по активности митохондриальных дегидрогеназ (Van Meerloo et al., 2011). По результатам проведенных исследований для дальнейших экспериментов были выбраны концентрации препарата Цитовира-3 100.0, 10.0 и 1.0 мкг/мл для мононуклеарных лейкоцитов крови и концентрации 10.1 и 0.1 нг/мл – для клеток EA.hy 926.

Воздействие препаратов. Для изучения влияния исследуемых препаратов на спонтанную и индуцированную секрецию цитокинов IL-1 α , IL-8 и IFN α эндотелиальные клетки EA.hy 926 вносили в лунки 24-луночного планшета, в концентрации 1 млн кл./мл культуральной среды, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и культивировали 4 ч в присутствии или отсутствие провоспалительного цитокина TNF α (рефнолина, рекомбинантного TNF α ; Sanitas, Литва; специфическая активность препарата: 1 ЕД соответствует 0.06 нг) в концентрации 50 ЕД/мл в CO₂-инкубаторе. После этого в лунки планшета вносили культуральную среду, содержащую испытуемые препараты в трех концентрациях, нетоксичных для клеток, подобранных в предварительном эксперименте, и культивировали в течение 24 ч. Затем надосадочные жидкости собирали и хранили при –20°C для последующего ИФА.

Мононуклеарные клетки периферической крови здоровых доноров ресуспендировали в полной культуральной среде RPMI-1640 и вносили в лунки 24-

луночного планшета в концентрации 1 млн кл./мл. Далее исследование проводили, как описано выше для эндотелиальных клеток EA.hy 926.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Секретию клетками цитокинов оценивали с помощью ИФА, используя коммерческие тест-системы (Цитокин, Россия) согласно рекомендациям производителей. Оптическую плотность в лунках измеряли на спектрофотометре Bio-Rad Model 680 (Bio-Rad, США).

Проточная цитометрия. Для оценки спонтанного и индуцированного уровня поверхностной молекулы ICAM-1 суспензии эндотелиальных клеток EA.hy 926 и мононуклеаров периферической крови после проведенной стимуляции, аналогичной для исследования цитокинов, переносили в пробирки для проточного цитометрического анализа и окрашивали клетки с использованием моноклональных антител против ICAM-1, меченных FITC (Beckman Coulter, США), согласно рекомендациям производителя. Пробы анализировали на проточном цитометре NAVIOS (Beckman Coulter, США). Уровень поверхностной молекулы ICAM-1 оценивали по количественному определению средней интенсивности флуоресценции (СИФ).

Статистическая обработка результатов. Среднее арифметическое и стандартное отклонение из трех независимых экспериментов определяли с помощью программы Microsoft Office Excel, 2010. Для оценки достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента. За уровень статистической значимости было принято значение $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Продукция IL-8 эндотелиальными клетками EA.hy 926. Эндотелиальные клетки линии EA.hy 926 имели высокий спонтанный уровень секреции IL-8, который усиливался более чем в 5 раз в присутствии TNF α (рис. 1а). Препарат α -Glu-Trp не изменял статистически значимо спонтанную и усиленную действием TNF α секрецию IL-8 клетками EA.hy 926. Однако наблюдали тенденцию к дозозависимому снижению индуцированной продукции этого цитокина (при концентрации α -Glu-Trp 1 мкг/мл снижение составляло 26.37%, $p > 0.05$) (рис. 1а).

Продукция IL-8 мононуклеарными клетками. Мононуклеарные лейкоциты имели высокий спонтанный уровень синтеза IL-8, который под влиянием TNF α усиливался более чем в 3 раза (рис. 1б). При культивировании в присутствии Цитовира-3 в концентрации 1 нг/мл отмечали значимое увеличение спонтанной секреции IL-8 на 49.46% ($p < 0.05$), однако отмечали тенденцию к снижению содержания IL-8, индуцированного TNF α . Препарат α -Glu-Trp не оказывал самостоятельного влияния на спонтанную секрецию IL-8, однако в концентрации 1 мкг/мл статистически значимо подавлял на 36.28% ($p < 0.05$)

секрецию цитокина, индуцированную в присутствии TNF α (рис. 1б).

Продукция IL-1 α эндотелиальными клетками EA.hy 926. Спонтанный уровень секреции IL-1 α в культуре эндотелиальных клеток был низким, однако значительно усиливался под влиянием TNF α (рис. 1в). Цитовир-3 не оказывал влияния на спонтанную и индуцированную TNF α продукцию IL-1 α этими клетками. α -Glu-Trp также не оказывал действия на спонтанную секрецию этого цитокина, однако в концентрации 10 мкг/мл достоверно снижал на 22.79% ($p < 0.05$) секрецию, усиленную действием TNF α , а в концентрации 1 мкг/мл — повышал на 31.64% ($p > 0.05$), что было статистически не значимо при большом разбросе значений (рис. 1в).

Продукция IL-1 α мононуклеарными клетками. В культуре мононуклеарных лейкоцитов был зарегистрирован исходно низкий спонтанный уровень секреции IL-1 α , который изменялся незначительно в присутствии TNF α . Культивирование с препаратами Цитовир-3 и α -Glu-Trp не оказывало значимого влияния на спонтанный уровень секреции IL-1 α мононуклеарными лейкоцитами, однако отмечалась тенденция к уменьшению уровня IL-1 α , индуцированного TNF α (рис. 1г).

Определение уровня ICAM-1 на эндотелиальных клетках EA.hy 926. Эндотелиальные клетки EA.hy 926 имели низкий спонтанный уровень адгезионной молекулы ICAM-1, который повышался при культивировании клеток в присутствии TNF α (рис. 2а). Цитовир-3 не влиял на спонтанный уровень ICAM-1 эндотелиальных клеток, но в концентрации 10 нг/мл статистически значимо на 12.14% ($p < 0.05$) повышал уровень молекулы, индуцированный TNF α . Культивирование с α -Glu-Trp также не оказывало самостоятельного влияния на спонтанный уровень ICAM-1, но в концентрации 100 мкг/мл усиливал на 8.27% ($p < 0.05$) среднюю интенсивность флуоресценции этой молекулы, индуцированную TNF α (рис. 2а).

Определение уровня ICAM-1 на мононуклеарных клетках. Мононуклеарные лейкоциты также имели низкий спонтанный уровень ICAM-1. Однако индуцированный TNF α уровень этой молекулы был значительно ниже, чем у эндотелиальных клеток (рис. 2б). Цитовир-3 в концентрациях 10 и 1 нг/мл повышал спонтанный уровень ICAM-1 на клетках соответственно на 66.67% ($p < 0.05$) и 33.33% ($p < 0.01$). Препарат α -Glu-Trp во всех исследуемых концентрациях (100, 10 и 1 мкг/мл) усиливал спонтанную среднюю интенсивность флуоресценции мононуклеарных клеток на 36.67, 66.67 и 20.00% соответственно ($p < 0.05$). Ни Цитовир-3, ни α -Glu-Trp существенно не влияли на уровень поверхностной молекулы ICAM-1 после стимуляции TNF α (рис. 2б).

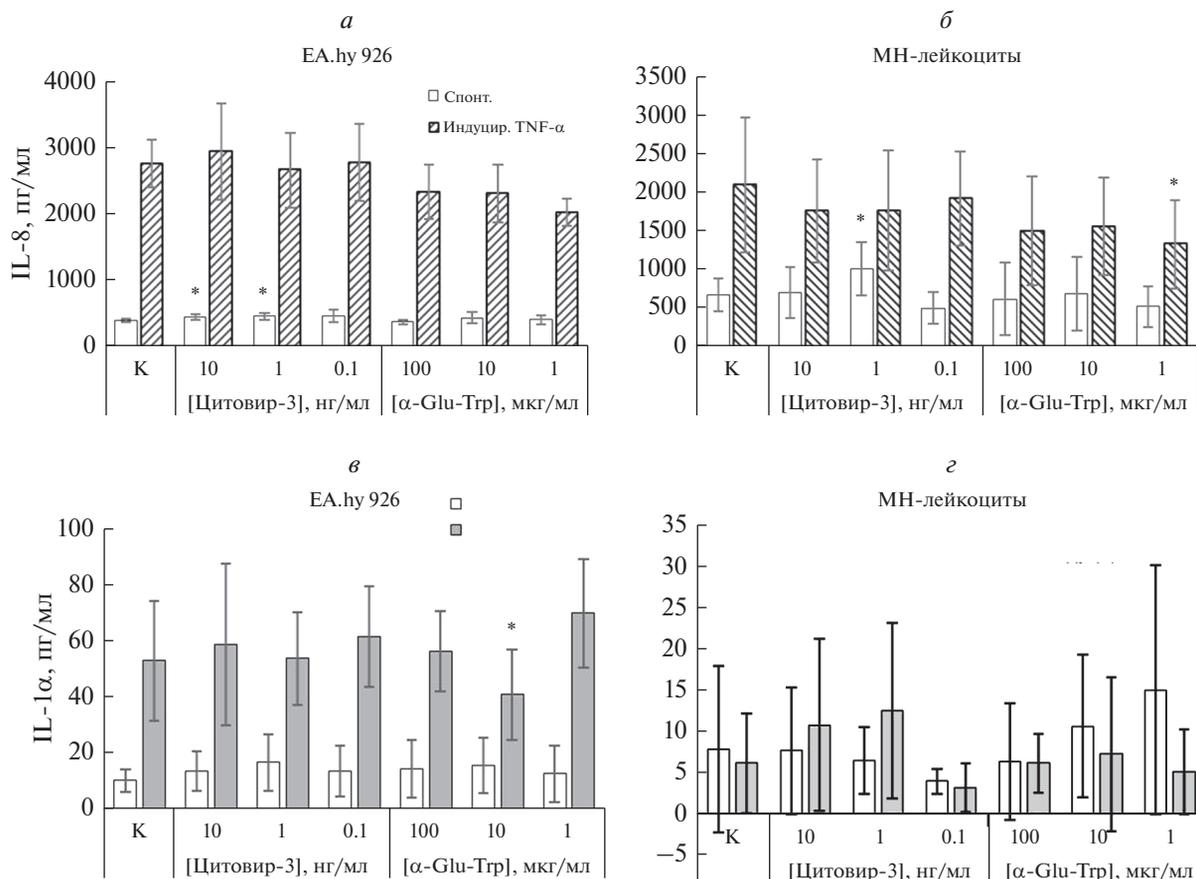


Рис. 1. Влияние препаратов Цитовир-3 и α-Glu-Trp на секрецию IL-8 (а, б) и IL-1α (в, г) эндотелиальными клетками EA.hy 926 (а, в) и мононуклеарными (МН) лейкоцитами периферической крови доноров (б, г). Клетки культивировали 4 ч в присутствии или отсутствии провоспалительного цитокина TNFα, затем – с препаратами Цитовир-3 и α-Glu-Trp в различных концентрациях или без препарата (К – контроль) в полной культуральной среде RPMI-1640 в течение 24 ч. Оценивали концентрацию IL-8 и IL-1α методом ИФА в спонтанных (спонт.) и индуцированных TNFα (индуцир. TNFα) супернатантах образцов клеток. Данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. * – различия достоверны по сравнению с группой контроля при $p < 0.05$.

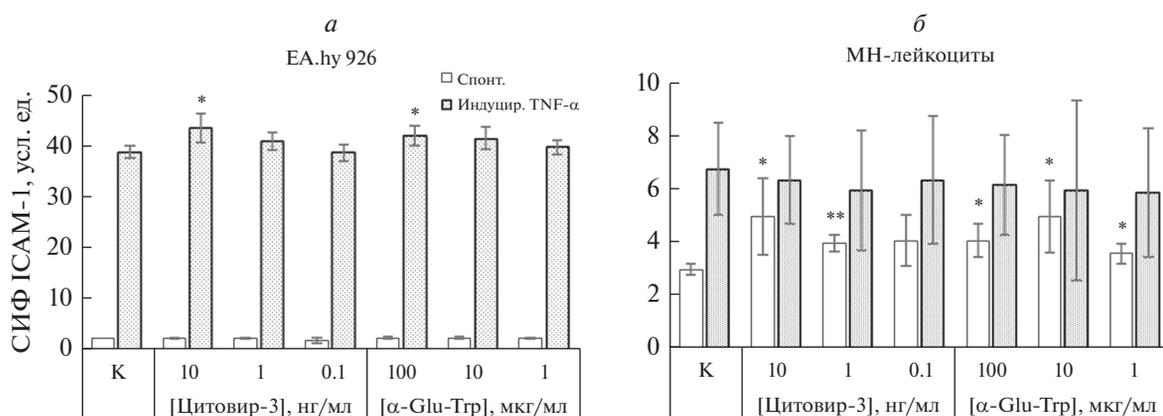


Рис. 2. Влияние препаратов Цитовир-3 и α-Glu-Trp на уровень поверхностной молекулы ICAM-1 эндотелиальных клеток EA.hy 926 (а) и мононуклеарных (МН) лейкоцитов периферической крови доноров (б). Клетки культивировали 4 ч в присутствии или отсутствие провоспалительного цитокина TNFα, затем – с препаратами Цитовир-3 и α-Glu-Trp в различных концентрациях или без препарата (К – контроль) в полной культуральной среде RPMI-1640 в течение 24 ч. Оценивали среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) FITC-меченных ICAM-1 методом проточной цитометрии в спонтанных (спонт.) и индуцированных TNFα (индуцир. TNFα) образцах клеток; показаны средние значения и их стандартные отклонения. * – различия достоверны по сравнению с группой контроля при $p < 0.05$, ** – различия достоверны по сравнению с группой контроля при $p < 0.01$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, полученные данные на модели эндотелиальных клеток линии EA.hy 926 и мононуклеарных лейкоцитах свидетельствуют о схожих разнонаправленных эффектах изученных препаратов в отношении клеток различного происхождения.

При культивировании эндотелиальных клеток в присутствии α -Glu-T γ r в концентрации 10 мкг/мл происходило снижение продукции IL-1 α , индуцированной TNF α , тогда как в концентрации 100 мкг/мл отмечали усиление уровня поверхностной молекулы ICAM-1, стимулированного действием этого провоспалительного цитокина.

Действие α -Glu-T γ r на мононуклеарные лейкоциты также было разнонаправленным. В его присутствии в концентрации 1 мкг/мл было зарегистрировано значимое снижение продукции IL-8, индуцированной TNF α . Во всех трех исследуемых концентрациях (100, 10 и 1 мкг/мл) препарат усиливал спонтанный уровень поверхностной молекулы ICAM-1, повышая среднюю интенсивность флуоресценции на 1–2 усл. ед. Подавление продукции провоспалительных цитокинов под действием α -Glu-T γ r может обуславливать его противовоспалительные свойства, однако его способность повышать уровень молекулы ICAM-1 свидетельствует о способности α -Glu-T γ r активировать клетки (Bui et al., 2020; Moser et al., 2021). Учитывая, что действие препарата α -Glu-T γ r на изученные функции клеток носило разнонаправленный характер, представляется маловероятным возможность прямого влияния препарата на уровень фосфорилирования фактора NF- κ B (Chong et al., 2021).

Исследования показали, что Цитовир-3 оказывал сходное активирующее действие на эндотелиальные клетки EA.hy 926 и мононуклеарные лейкоциты периферической крови человека в различных концентрациях. Обнаруженное стимулирующее действие препарата Цитовир-3 может быть связано и с эффектом бендазола в составе препарата. Показано, что само вещество и его производные могут являться агонистами рецепторов, распознающих консервативные структуры микроорганизмов TLR и RLR. Обусловленная такими взаимодействиями активация внутриклеточных MAP-киназ (митоген-активируемых протеинкиназ) и сигнальных путей NF- κ B приводит к усилению экспрессии клетками активационных маркеров, таких как ICAM-1, но при этом уменьшается продукция провоспалительных цитокинов, индуцированной различными факторами (Chong et al., 2021; Eskandari et al., 2022).

Таким образом, выявленные эффекты препарата α -Glu-T γ r и Цитовира-3 свидетельствуют об их противовоспалительном действии за счет подавления стимулированной продукции провоспалительных цитокинов, а способность активировать клетки за счет повышения уровня поверхностной молекулы ICAM-1 позволяет реализовать защитные механизмы в борьбе с инфекцией разной этиологии, а также

способствует улучшению репарации тканей, поврежденных воспалительным процессом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках научно-исследовательской работы в Научно-исследовательском институте экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН по заказу и финансовой поддержке АО МБНПК “Цитомед”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах животные и люди не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Э.А. Старикова, Т.А. Кудрявцева: постановка цели и задач, планирование экспериментов; Э.А. Старикова: постановка экспериментов; Т.А. Кудрявцева, Э.А. Старикова, Е.Г. Головачева, В.А. Апрытина: анализ результатов; Е.Г. Головачева, В.А. Апрытина: написание статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Головачева Е.Г., Афанасьева О.И., Гончарова Е.С., Быковская А.Г., Давлетгареева Д.В., Апрытина В.А. 2021. Возможности терапевтической коррекции патологии носоглотки, ассоциированной с COVID-19, у детей в амбулаторных условиях. Вестник оториноларингологии. Т. 86. № 6. С. 69. (Golovacheva E.G., Afanasyeva O.I., Goncharova E.S., Bykovskaya A.G., Davletgareeva D.V., Apryatina V.A. 2021. Possibilities of therapeutic correction of ENT pathology associated with COVID-19 in children on an outpatient basis. Vestn. Otorinolaringol. V. 86. № 6. P. 69.) <https://doi.org/10.17116/otorino20218606169>
- Зинина Е.П., Царенко С.В., Логунов Д.Ю., Тухватуллин А.И., Бабаянц А.В., Аврамов А.А. 2021. Роль провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при бактериальной пневмонии. Обзор литературы. Вестник интенсивной терапии им. А.И. Салтанова. Т. 1. С. 77. (Zinina E.P., Tsarenko S.V., Logunov D.Yu., Tukhvatullin A.I., Babayants A.V., Abramov A.A. 2021. The role of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in bacterial pneumonia. Literature review. Bulletin of Intensive Therapy named after A.I. Saltanov. V. 1. P. 77.) <https://doi.org/10.21320/1818-474X-2021-1-77-89>
- Москалец О.В. 2018. Молекулы клеточной адгезии ICAM-1 и VCAM-1 при инфекционной патологии. Тихоокеанский мед. журн. Т. 2. С.21. (Moskalets O.V. 2018. Molecules of cellular adhesion ICAM-1 and VCAM-1 in infectious pathology. Pacific Med. J. T. 2. P. 21.) <https://doi.org/10.17238/PmJ1609-1175.2018.2.21-25>
- Смирнов В.С., Зарубаев В.В., Петленко В.С. 2020. Биология возбудителей и контроль гриппа и ОРВИ. Санкт-Петербург: Гиппократ. 336 с. (Smirnov V.S., Zarubaev V.V., Petlenko S.V. 2020. Biology of pathogens and control of influenza and ARV. St. Petersburg: Hippocrates. 336 p.)

- Смирнов В.С., Ленева И.А., Кудрявцева Т.А., Файзуллоев Е.Б., Заплутанов В.А., Петленко С.В., Карташова Н.П., Грачева А.В., Корчевая Е.Р. 2021. Возможности подавления цитопатогенного действия коронавируса SARS-CoV-2 по результатам изучения противовирусной активности препарата Цитовир®-3 *in vitro*. Антибиотики и химиотерапия. Т. 66. № 5–6. С. 4. (Smirnov V.S., Leneva I.A., Kudryavtseva T.A., Fayzulloev E.B., Zaplutanov V.A., Petlenko S.V., Kartashova N.P., Gracheva A.V., Korchevaya E.R. 2021. Possibilities of suppressing the cytopathogenic effect of SARS-CoV-2 coronavirus according to the results of the antiviral activity of Cytovir®-3 *in vitro* study. Antibiotics and Chemother. V. 66. № 5–6. P. 4.) <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-5-6-4-10>
- Хавинсон В.Х., Корнеев А.А., Попович И.Г., Дудков А.В., Кузник Б.И. 2020. Мета-анализ иммуномодулирующей активности лекарственного пептидного препарата тималина. Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. № 4. С.108. (Khavinson V.H., Korneenkov A.A., Popovich I.G., Gudkov A.V., Kuznik B.I. 2020. Meta-analysis of the immunomodulatory activity of the medicinal peptide drug timalin. Current problems of healthcare and medical statistics. № 4. P.108.) <https://doi.org/10.24411/2312-2935-2020-00100>
- Хавинсон В.Х., Линькова Н., Чалисова Н.И., Ивко О.М. 2021. Тималин: применение для иммунокоррекции и молекулярные аспекты биологической активности. Успехи совр. биол. Т. 141. № 1. С. 25. (Khavinson V.H., Linkova N., Chalisova N.I., Ivko O.M. 2021. Timalin: application for immunocorrection and molecular aspects of biological activity. Successes Modern Biol. T. 141. № 1. P. 25.) <https://doi.org/10.31857/S0042132420060046>
- Шипицын К.С., Огарков П.И., Смирнов В.С., Жоголев С.Д., Жоголев К.Д. 2010. Профилактика острых респираторных вирусных инфекций и пневмоний в организованном коллективе. Эпидемиология и инфекционные болезни. № 1. С. 57. (Shipitsyn K.S., Ogarkov P.I., Smirnov V.S., Zhogolev S.D., Zhogolev K.D. 2010. Prevention of acute respiratory viral infections and pneumonia in an organized team. Epidemiol. Infect. Diseases. № 1. P. 57.) <https://doi.org/10.17816/EID40479>
- Beesu M., Caruso G., Salyer A.C., Shukla N.M., Khetani K.K., Smith L.J., Fox L.M., Tanji H., Ohto U., Shimizu T., David S.A. 2016. Identification of a human toll-like receptor (TLR) 8-specific agonist and a functional pan-tlr inhibitor in 2-aminoimidazoles. J. Med. Chem. V. 59. P. 3311. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00023>
- Beesu M., Malladi S.S., Fox L.M., Jones C.D., Dixit A., David S.A. 2014. Human toll-like receptor 8-selective agonistic activities in 1-alkyl-1H-benzimidazol-2-amines. J. Med. Chem. V. 57. P. 7325. <https://doi.org/10.1021/jm500701q>
- Bui T.M., Wiesolek H.L., Sumagin R. 2020. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. J. Leukoc. Biol. V. 108. № 3. P. 787–799. <https://doi.org/10.1002/JLB.2MR0220-549R>
- Chong D.L.W., Rebeyrol C., José R.J., Williams A.E., Brown J.S., Scotton C.J., Porter J.C. 2021. ICAM-1 and ICAM-2 are differentially expressed and up-regulated on inflamed pulmonary epithelium, but neither ICAM-2 nor LFA-1: ICAM-1 are required for neutrophil migration into the airways in vivo. Front. Immunol. V. 12. P. 691. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.691957>
- Eskandari M., Asgharzadeh F., Askarnia-Faal M.M., Naimi H., Avan A., Ahadi M., Vossoughinia H., Gharib M., Soleimani A., Naghibzadeh N., Ferns G., Ryzhikov M., Khazaei M., Hasanian S.M. 2022. Mebendazole, an anti-helminth drug, suppresses inflammation, oxidative stress and injury in a mouse model of ulcerative colitis. Sci. Rep. V. 12. P. 10249. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14420-6>
- Fiore-Gartland A., Panoskaltis-Mortari A., Agan A.A., Mistry A.J., Thomas P.G., Matthay M.A., PALISI PICFlu Investigators: Hertz T., Randolph A.G. 2017. Cytokine profiles of severe influenza virus-related complications in children. Front. Immunol. V. 8. P. 1423. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01423>
- Guo F., Mead J., Aliya N., Wang L., Cuconati A., Wei L., Li K., M. Block T., Guo J.-T., Chang J. 2012. RO 90-7501 enhances TLR3 and RLR agonist induced antiviral response. PLoS One. V. 7. P. e42583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042583>
- Matsushima K., Yang D., Oppenheim J.J. 2022. Interleukin-8: an evolving chemokine. Cytokine. V. 153. P. 155828. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155828>
- Moser T., Hoepner L., Schwenker K., Seiberl M., Feige J., Akgün K., Haschke-Becher E., Ziemssen T., Sellner J. 2021. Cladribine alters immune cell surface molecules for adhesion and costimulation: further insights to the mode of action in multiple sclerosis. Cells. V. 10. № 11. P. 3116. <https://doi.org/10.3390/cells10113116>
- Kaneko N., Kurata M., Yamamoto T., Morikawa S., Masumoto J. 2019. The role of interleukin-1 in general pathology. Inflamm. Regen. V.3 9. P. 12. <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0101-5>
- Khalil B.A., Elemam N.M., Maghazachi A.A. 2021. Chemokines and chemokine receptors during COVID-19 infection. Computational and Structural Biotechnol. J. V. 19. P. 976. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.034>
- Malainou C., Herold S. 2019. [Influenza]. Internist (Berl.). V. 60. P. 1127. <https://doi.org/10.1007/s00108-019-00670-6>
- Markey K.A., Gartlan K.H., Kuns R.D., MacDonald K.P., Hill G.R. 2015. Imaging the immunological synapse between dendritic cells and T cells. J. Immunol. Methods. V. 423. P. 40. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.029>
- Oudemans-van Straaten H.M., Spoelstra-de Man A. ME and de Waard M.C. 2014. Vitamin C revisited. Critical Care. V. 18. P. 460. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0460-x>
- Soema P.C., Kompier R., Amorij J.P., Kersten G.F. 2015. Current and next generation influenza vaccines: formulation and production strategies. Eur. J. Pharm. Biopharm. V. 94. P. 251. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.023>
- Ullah A., Al Kury L.T., Althobaiti Y.S., Ali T., Shah F.A. 2022. Benzimidazole derivatives as new potential NLRP3 inflammasome inhibitors that provide neuroprotection in a rodent model of neurodegeneration and memory impairment. J. Inflamm. Res. V. 15. P. 3873. <https://doi.org/10.2147/JIR.S351913>
- Van Meerloo J., Kaspers G.J.L., Cloos J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol. Biol. V. 731. P. 237. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- Zhang Y., Liu H., Tang W., Qiu Q., Peng J. 2020. Resveratrol prevents TNF- α -induced VCAM-1 and ICAM-1 upregulation in endothelial progenitor cells via reduction of NF- κ B activation. J. Int. Med. Res. V.48. P. 300060520945131. <https://doi.org/10.1177/0300060520945131>

The Effect of Drugs with Alpha-Glutamyl-Tryptophan *in vitro* on Cytokine Secretion and Level of Surface Molecule ICAM-1

E. G. Golovacheva^{a, *}, E. A. Starikova^{b, c}, T. A. Kudryavtseva^b, and V. A. Apryatina^d

^a*Smorodintsev Influenza Research Institute of the Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, 197376 Russia*

^b*Research Institute of Experimental Medicine of the North-Western Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, 197376 Russia*

^c*Department of Immunology of Pavlov First State St. Petersburg Medical University, Saint Petersburg, 197022 Russia*

^d*Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, St. Petersburg, 197110 Russia*

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

The study of the molecular mechanisms underlying the action of immunomodulatory drugs is relevant to substantiate their therapeutic effect. In this work, a comparative analysis of spontaneous and TNF α -induced secretion of proinflammatory cytokines IL-1 α and IL-8, as well as the level of the adhesion molecule ICAM-1 in the culture of endothelial cells EA.hy 926 and on peripheral blood mononuclear cells of healthy donors *in vitro* in the model of inflammation when cultivated in the presence of alpha-glutamyl-tryptophan (α -Glu-Trp) and the drug Cytovir-3 is shown. The aim was to study the cellular mechanisms mediating the immunomodulatory effect of the drugs α -Glu-Trp and Cytovir-3. It was shown that α -Glu-Trp reduced TNF α -induced IL-1 α production and enhanced the TNF α -stimulated level of the ICAM-1 surface molecule of endothelial cells. At the same time, the drug reduced the secretion of TNF α -induced cytokine IL-8 and increased the spontaneous level of ICAM-1 on mononuclear cells. The drug Cytovir-3 had an activating effect on endothelial cells EA.hy 926 and mononuclear leukocytes of human peripheral blood. In his presence, there was an increase in spontaneous secretion of IL-8 by endothelial and mononuclear cells. The drug also increased the level of TNF α -induced ICAM-1 on endothelial cells and increased the spontaneous level of this surface molecule on mononuclears. Suppression of stimulated production of proinflammatory cytokines under the action of α -Glu-Trp independently and as part of Cytovir-3 may cause its anti-inflammatory properties. However, an increase in the level of the ICAM-1 surface molecule indicates mechanisms that increase the functional activity of the studied cells, which is equally important for the implementation of an effective immune response to infection and repair of damaged tissues during inflammatory reactions.

Keywords: alpha-glutamyl-tryptophan, Cytovir-3, EA.hy 926 endothelial cells, human peripheral blood mononuclear leukocytes, ICAM-1, cytokine secretion, ARVI

УДК 611.018.8:612.72

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГАМКергических ИНТЕРНЕЙРОНОВ И ТРАНСПОРТЕРА ГАМК GAT₁ В СЛОЯХ НЕОКОРТЕКСА В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД У КРЫС

© 2022 г. Л. И. Хожай*

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

*E-mail: astarta0505@mail.ru

Поступила в редакцию 14.04.2022 г.

После доработки 15.06.2022 г.

Принята к публикации 06.07.2022 г.

Изучено распределение нейронов, содержащих ГАМК, и интенсивность иммуногистохимического мечения транспортера ГАМК GAT₁ в разных слоях неокортекса в течение неонатального периода у крыс. На начальных этапах неонатального периода в слоях II–III и VI имеет место высокая численность нейронов, содержащих ГАМК, которая к концу неонатального периода значительно снижается и тормозные интернейроны распределяются во всех слоях примерно равномерно. К концу неонатального периода значительно повышается уровень иммуногистохимического мечения GAT₁, что, вероятно, может свидетельствовать о возрастании роли синаптической тормозной нейротрансмиссии.

Ключевые слова: ГАМК, GAT₁, ГАМКергические нейроны, неокортекс, неонатальный период

DOI: 10.31857/S0041377122060050

В состав коры головного мозга входят нейроны разных типов, обладающие специфическими морфологическими, молекулярными и функциональными характеристиками и локализующиеся в определенных слоях. Тормозные ГАМКергические интернейроны имеют особый статус, так как при синаптическом торможении обеспечивают стабильность корковых нейронных сетей. Эти нейроны образуют гетерогенную группу клеток, которые не только осуществляют регуляцию активности отдельных популяций пирамидных нейронов неокортекса, но и модулируют пространственно-временную динамику различных форм синхронизированных сетевых колебаний (Klausberger, Somogyi, 2008).

Полагают, что нейронные сети в неокортексе организованы по определенным правилам, которые гарантируют критически важный баланс между количеством возбуждающих и тормозных нейронов, и это соотношение во взрослом неокортексе относительно постоянно (Fishell, Rudy, 2011; Sahara et al., 2012).

Во время эмбриогенеза молодые ГАМКергические нейроны мигрируют из определенных пролиферативных зон вентральной части продолговатого мозга к развивающемуся неокортексу, где первое появление ГАМК в клетках зарегистрировано на 14.5 эмбриональные сутки. На начальных этапах миграция имеет тангенциальное направление, которое затем, в промежуточной зоне неокортекса, меняется на радиальное и нейроны распределяются по слоям,

занимая свое дефинитивное положение (Marín, Rubenstein, 2001).

Развитие неокортекса происходит на протяжении длительного периода времени, который включает как пренатальный, так и неонатальный период, во время которого завершается его формирование и становление нейронных связей, при этом упорядоченное расположение нейронов в слоях неокортекса имеет решающее значение для нормального функционирования ЦНС (Fishell, Rudy, 2011; Sahara et al., 2012). Несмотря на то, что в последние годы были выявлены некоторые механизмы, регулирующие миграцию ГАМК-содержащих нейронов в период развития неокортекса, сведений о динамике распределения ГАМКергических интернейронов в слоях неокортекса в неонатальный период в настоящее время крайне мало.

Для ГАМК выявлено четыре класса транспортных белков: GAT₁, GAT₂, GAT₃ и GAT₄ (или BGT-1 betaine), среди которых GAT₁ считается одним из основных транспортеров при синаптической нейротрансмиссии (Gadea, Lopez-Colome, 2001). Во взрослом мозге этот белок обнаружен как в нейронах, так и в глиальных клетках. Электронно-микроскопические исследования показали, что GAT₁ может присутствовать в цитоплазме и проксимальных отделах отростков нейронов, в терминалях аксонов, образующих симметричные синапсы, в отростках астроцитов (Fattorini et al., 2020). GAT₁ относится к Na⁺-зависимым

транспортным белкам обратного захвата, локализуемым на плазматической мембране нейронов (Augood et al., 1995, Bernstein, Quick, 1999). Функция транспортеров ГАМК заключается в переносе через мембрану аниона этой аминокислоты на основе градиента катиона натрия (Lu et al., 1999; Loo et al., 2000). При тормозной нейротрансдукции скорость обратного захвата ГАМК из синаптической щели или межклеточного пространства, осуществляемого транспортером GAT_1 , определяет эффективность нейротрансдукции. Вопрос о динамике экспрессии GAT_1 в разных слоях неокортекса в неонатальный период развития до настоящего времени остается мало освещенным.

В связи с этим целью работы было изучение распределения нейронов, содержащих ГАМК, и интенсивности иммуногистохимического мечения GAT_1 в слоях неокортекса в течение неонатального периода у крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа проведена на лабораторных крысах линии Wistar из питомника Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург).

Гистологические и иммуногистохимические методы исследования. Головной мозг извлекали, фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (рН 7.4), заливали в парафин по общепринятой методике и готовили серийные фронтальные срезы мозга толщиной 6–7 мкм на уровне брегмы -0.60 mm ... 0.40 mm (Khazipov et al., 2015). Затем срезы помещали на предметные стекла Super-Frost Plus Gold (Menzel-Glaser, Германия). У интактных животных исследовали соматосенсорную область неокортекса на 5-е ($n = 5$) и 10-е ($n = 5$) сутки постнатального развития (П5, П10). Общий морфологический анализ проводили на цифровых изображениях серийных гистологических срезов, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия) при увеличении объектива $100\times$.

Иммуногистохимическую реакцию на ГАМК проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA antibody, ab8891, Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 1000. После процедуры теплового демаскирования белков в цитратном буфере (рН 6.1) (Dako, Дания) в течение 25 мин, срезы инкубировали в первичных антителах при 4°C в течение 16 ч. В качестве вторичных антител использовали Goat anti-rabbit IgG H&L(HRP) (Abcam, Великобритания). Срезы помещали во вторичные антитела на 40 мин при комнатной температуре. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). Специфичность иммунной реакции проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител).

Иммуногистохимическую реакцию на GAT_1 проводили с использованием первичных кроличьих по-

ликлональных антител (anti-GABA transporter 1; GAT_1 ; ab426, Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 100. После процедуры теплового демаскирования белков в цитратном буфере (рН 6.1) (Dako, Дания) в течение 20 мин, срезы инкубировали в первичных антителах при 4°C в течение 18 ч. В качестве вторичных реагентов для выявления GAT_1 использовали реактивы из набора EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США). Срезы помещали во вторичные антитела на 30 мин при комнатной температуре. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). Срезы заключали в синтетическую среду Permount (Termo, США). Специфичность иммунной реакции проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител).

Оценка оптической плотности продукта иммуногистохимической реакции. Оценку иммунореактивности производили с использованием системы анализа изображения, включающей световой микроскоп Olympus CX31 (Япония), цветную цифровую камеру VideoZavr Standard VZ-C31Sr и программное обеспечение Видеозавр Мультиметр 2.3 (разработка ООО "АТМ-практика", Санкт-Петербург). Оценивали оптическую плотность (D) продукта реакции в нейрорпиле – сети иммуно-позитивных отростков, терминалей, а также в скоплениях мелких и крупных гранул. Последние, предположительно, считаются терминальными синаптическими структурами и их скоплениями (Guthmann et al., 1998). Для этого контуром выделяли участки сети иммунопозитивных отростков и скоплений гранул. Уровень содержания GAT_1 выражали в относительных единицах оптической плотности продукта иммунной реакции. Определяли среднее значение D (отн. ед.) интенсивности окраски в иммунопозитивных отростках и гранулах при увеличении объектива $100\times$.

Статистическая обработка результатов исследования. При проведении иммуногистохимических реакций все процедуры были стандартизированы и осуществлялись одновременно для гистологических срезов мозга, полученных от животных разного возраста.

Количество иммуноположительных клеток оценивали на стандартной площади 0.1 мм² (условной единице площади) при увеличении объектива $100\times$. Количественный анализ данных осуществляли на изображениях, полученных с 12–15 гистологических срезов мозга, взятого от 5 животных каждой исследуемой возрастной группы, при помощи пакетов компьютерных программ ImageJ (НИН, США), Origin 5.0. Статистически обработанные данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($m \pm SEM$). Для анализа и сравнения полученных результатов между разными группами животных использовали *t*-критерий Стьюдента и *oneway* ANOVA (Statistica 8.0, Statsoft Inc., USA), различия считали достоверными при $P < 0.05$.

Использованные реактивы: первичные кроличьи поликлональные антитела к ГАМК (ab8891) и GAT₁ (ab426), вторичные антитела Goat anti-rabbit IgG H&L (HRP) (Abcam, Великобритания); набор реактивов EnVision + System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США); хромоген DAB+ (Dako, Дания); гематоксилин Майера (Bio-Optica, Италия); синтетическая среда для заключения гистологических срезов Permaunt (Термо, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение нейронов, содержащих ГАМК, в разных слоях соматосенсорной области неокортекса на 5 постнатальные сутки

На П5 в слое I присутствует небольшое число интернейронов (6.2 ± 0.9 на условной единице площади (здесь и далее)) (табл. 1), сеть иммуноокрашенных отростков, многочисленных синаптические структуры, а также клетки Кахаля–Ретциуса, которые определялись визуально по морфологическим критериям (локализация в слое I, горизонтальная ориентация, овальная форма тела клетки, основные отростки вытянуты параллельно пиальной оболочке).

В слоях II–III иммунопозитивные нейроны, имеющие преимущественно веретеновидную форму тела, располагаются близко друг к другу, их число составляет 18.6 ± 2.1 клеток (табл. 1). Нейропиле развит слабо, хотя иммуноокрашенные отростки образуют рыхлую сеть. Отдельные иммуноокрашенные отростки, отходящие от тел клеток, имеют варикозные расширения и редкие синаптические структуры.

В слоях IV и V присутствуют иммунопозитивные нейроны как веретеновидной, так и мультиполярной формы, при этом их число в 1.5 и 2.3 раза меньше (12.5 ± 1.8 и 8.0 ± 1.4 соответственно), чем в верхних слоях (табл. 1). Нейропиле более развит, сеть иммуноокрашенных отростков плотнее, также присутствуют варикозные расширения и синаптические структуры.

В слое VI присутствуют иммунопозитивные нейроны разной формы и размеров, их количество соответствует числу таких нейронов в верхних слоях (19.3 ± 1.2) (табл. 1). В нейропиле плотность сети иммуноокрашенных отростков аналогична таковой в слое V, отростки имеют варикозные расширения и синаптические структуры.

Распределение нейронов, содержащих ГАМК, в разных слоях соматосенсорной области неокортекса на 10 постнатальные сутки

На П10 в слое I (так же, как и на предыдущем исследованном сроке) присутствует небольшое число интернейронов (табл. 1), плотная сеть иммуноокрашенных отростков, большое количество синаптических структур.

Таблица 1. Распределение нейронов, содержащих ГАМК, в слоях соматосенсорной области неокортекса крыс на 5 и 10 постнатальные сутки

Слои коры	Количество интернейронов на условной ед. площади	
	Сроки развития	
	П5	П10
I	6.2 ± 0.4	5.8 ± 1.2
II–III	18.6 ± 1.4	$9.0 \pm 1.3^*$
IV	12.5 ± 1.8	10.7 ± 1.2
V	8.0 ± 1.4	7.4 ± 0.9
VI	19.3 ± 1.2	$8.5 \pm 0.8^*$

* Различия между животными разных возрастных групп достоверны при $P < 0.05$.

В слоях II–III число иммунопозитивных нейронов значительно меньше (9.0 ± 1.3), чем на предыдущем исследованном сроке (табл. 1), при этом в нейропиле присутствует сеть иммуноокрашенных отростков и синаптических структур, которые локализуются не только на отростках, но и телах пирамидных нейронов.

В слоях IV и V наблюдается сходная картина. Здесь присутствуют веретеновидные, мультиполярные и пирамидные клетки. Число ГАМК-иммунопозитивных нейронов примерно такое же, как в верхних слоях (10.7 ± 1.2 и 7.4 ± 0.9) (табл. 1). В нейропиле выявляется плотная сеть иммуноокрашенных отростков и синаптических структур, располагающихся как на отростках, так и на и телах подавляющего большинства клеток.

В слое VI число иммунопозитивных нейронов примерно такое же, как в верхних слоях II–III, при этом значительно ниже, чем в таковых на П5 (табл. 1). В нейропиле сеть иммунореактивных отростков и синаптических структур менее плотная, чем в верхних слоях.

Таким образом, на П5 в верхних слоях II–III и глубоком слое VI число нейронов, содержащих ГАМК, существенно превышает их количество в слоях IV и V (в 1.5 и 2.3 раза соответственно). К концу неонатального периода (П10) картина меняется: в верхних слоях II–III и слое VI число иммунопозитивных клеток значительно снижается (в 2.1 и 2.3 раза соответственно) и соответствует значениям в слоях IV и V, в которых их число не изменяется в течение неонатального периода.

Интенсивность иммуногистохимического мечения GAT₁ в разных слоях соматосенсорной области неокортекса на 5 и 10 постнатальные сутки (оценка оптической плотности окрашивания (D) в усл. ед.)

На П5 самая высокая интенсивность иммуноокрашивания на GAT₁ имела место в слое I ($0.280 \pm$

Таблица 2. Интенсивность иммуногистохимической реакции на GAT₁ в разных слоях соматосенсорной области неокортекса крыс на 5 и 10 постнатальные сутки (представлены значения оптической плотности продукта иммунной реакции (D) в отн. ед.)

Локализация	D, отн. ед.	
	Сроки развития	
Слой коры	П5	П10
I	0.280 ± 0.004	0.142 ± 0.007*
II–III	0.044 ± 0.002	0.138 ± 0.005*
IV	0.071 ± 0.003	0.091 ± 0.004*
V	0.095 ± 0.004	0.123 ± 0.008*
VI	0.048 ± 0.005	0.069 ± 0.003

* Различия значений D между животными разных возрастных групп достоверны при $P < 0.05$.

± 0.004) (табл. 2, рис. 1а). Интенсивность иммуногистохимической реакции на GAT₁ в других слоях была различной: в слоях II–III и VI она была относительно низкой (0.044 ± 0.002 и 0.048 ± 0.003 соответственно) (рис. 1б), а в слоях IV и V – существенно выше, чем в верхних слоях II–III и слое VI (табл. 2, рис. 1в).

На П10 иммунореактивность на GAT₁ в слое I снижается в 2 раза по сравнению с таковым значением на П5 (рис. 1а, г), в остальных слоях неокортекса (II–III, IV, V и VI) существенно повышается (в 3.1, 1.3 и 1.4 раза соответственно) (рис. 1б, в, д, е, табл. 2). Иногда в глубоких слоях встречаются одиночные иммунопозитивные нейроны (рис. 1е, короткая стрелка).

Таким образом, на П5 самая высокая интенсивность иммуномечения GAT₁ обнаруживается в слое I, в остальных слоях (по сравнению со слоем I) она значительно ниже: в слоях II–III в 6.4 раза, в слоях IV и V – в 3.5 и 3.0 раза, в слое VI – в 5.8 раз. К концу неонатального периода (П10) в слое I интенсивность иммуномечения GAT₁ снижается в 2 раза (по сравнению со значениями на П5), в остальных слоях этот показатель существенно увеличивается: более всего интенсивность иммуномечения GAT₁ повышается в верхних слоях II–III (в 3.1 раза), в слоях IV и V – в 1.3 раза, а в слое VI – в 1.4 раза (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Созревание ГАМКергической системы у большинства млекопитающих и человека, в основном, происходит в постнатальный период (Warm et al., 2021). В ходе пренатального развития тормозные интернейроны неокортекса возникают из различных популяций прогениторных клеток, локализующихся в вентральной части конечного мозга в области sub-pallium, которая в этот период имеет пять основных

пролиферативных зон: латеральное, медиальное и каудальное ганглиозные возвышения, преоптическую область и перегородку (Wonders, Anderson, 2006; Gelman, Marín, 2010). Подавляющее большинство интернейронов происходит из медиального ганглиозного возвышения (Butt et al., 2005; Flames et al., 2007; Fogarty et al., 2007; Inan et al., 2012; Taniguchi et al., 2013) и миграция предшественников интернейронов начинается на 14 эмбриональный день (Warm et al., 2021). Однако механизмы, которые контролируют распределение мигрирующих интернейронов по слоям во время развития неокортекса, в настоящее время до конца не ясны. Вместе с тем, существует несколько версий. Предполагают, что этот процесс связан с изменением направления миграции интернейронов: от тангенциального к радиальному, во время которого они распределяются по слоям коры (Lavdas et al., 1999; Marín, Rubenstein, 2001; Wichterle et al., 2001). Есть доказательство, что интернейроны заселяют глубокие или верхние слои коры в зависимости от получаемых специфических сигналов от пирамидных нейронов, локализующихся в этих слоях (Lodato et al., 2011). С другой стороны, полагают, что в медиальном ганглиозном возвышении присутствуют две разные линии прогениторных клеток: одна генерирует интернейроны в основном для глубоких слоев (V и VI) и другая – для верхних слоев (II–IV) (Ciceri et al., 2013). И, наконец, есть мнение, что в ходе развития на более ранних сроках возникает популяция интернейронов, которая заселяет глубокие слои (VI и V), а интернейроны, появляющиеся на более поздних сроках, распределяются в верхних слоях (II–IV) неокортекса (Valcanis, Tan, 2003; Pla et al., 2006; Rymar, Sadikot, 2007).

Установлено, что во время развития мозга незрелые нейроны высвобождают ГАМК, которая выступает в это время в качестве возбуждающего трансмиттера, необходимого для процессов миграции (в этот момент высвобождаемая ГАМК представляет хемоаттрактант), дифференцировки, экспрессии рецепторов и установления нейронных связей (Rheims et al., 2008; Teppola et al., 2019). Созревание тормозной системы совпадает с появлением коррелированных паттернов спонтанной активности нейронов у новорожденных грызунов и человека, которая обеспечивается деполяризацией незрелых нейронов, вызванной возбуждающим эффектом ГАМК. Считают, что деполяризация и нейронная активность являются ключевыми регуляторами субклеточных процессов, которые лежат в основе смены в развитии сигналов ГАМК, таких как экспрессия транспортеров, изменение концентрации хлоридов, экспрессия рецепторов к ГАМК и ГАМКергический синаптогенез (Flossmann et al., 2019; Hanson et al., 2019). Было выявлено, что для поддержания уровня сетевой активности необходима определенная численность популяции интернейронов в развивающемся мозге (Sukenic et al., 2021).

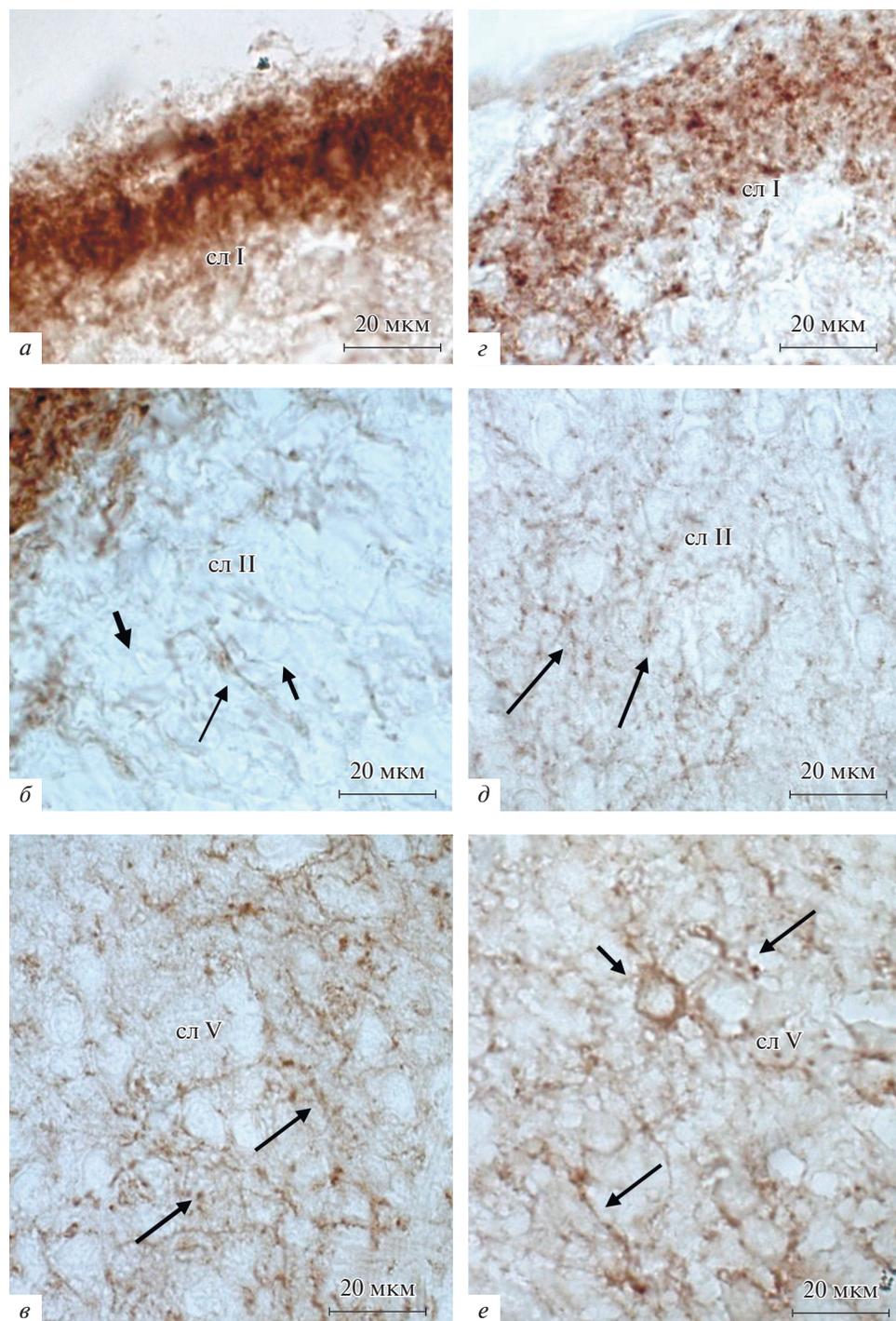


Рис. 1. Соматосенсорная область неокортекса крысы на П5 (а–в) и на П10 (г–е); иммуногистохимическая реакция на GAT_1 . а, г – Слой I, снижение интенсивности иммуногистохимической реакции на GAT_1 к концу неонатального периода (к П10). б, д – Слой II, видны тела неокрашенных нейронов (короткие стрелки), увеличение интенсивности иммуногистохимической реакции на GAT_1 к концу неонатального периода (к П10), иммуноокрашенные отростки и синаптические структуры (длинные стрелки). в, е – слой V, наблюдаются высокая интенсивность иммуногистохимической реакции на GAT_1 на П5 и П10, иммуноокрашенные отростки и синаптические структуры (длинные стрелки), одиночные иммунопозитивные нейроны (короткие стрелки). Увел.: об. 100×.

Результаты проведенного исследования показали, что на протяжении неонатального периода в разных слоях неокортекса количество нейронов, содер-

жащих ГАМК, изменяется. На более раннем сроке (П5) неонатального периода самая высокая численность популяции интернейронов была отмечена в

слоях II–III и VI. В это время в верхних слоях II–III отмечены слабо развитый нейропилль, веретеновидная форма клеток, которая свойственна незрелым нейронам, а также крайне малое количество синаптических структур. Это дает основание предполагать, что окончательное становление верхних слоев и дифференцировка как пирамидных нейронов, так и интернейронов в это время еще не завершены, в отличие от глубоких слоев IV, V и VI, в которых нейроны часто имеют пирамидную или мультиполярную форму и несколько отростков, где более развит нейропилль и присутствуют синаптические структуры. Это согласуется с утверждением, что к середине неонатального периода в неокортексе завершается стратификация и нейроны начинают формировать синапсы (Wargm et al., 2021). Результаты нашего исследования свидетельствуют, что к концу неонатального периода (P10) нейроны, содержащие ГАМК, примерно равномерно распределяются по всем слоям (II–III–VI) коры, также отмечено, что уровень экспрессии GAT_1 в этих слоях значительно повышается по сравнению с предыдущим сроком развития, что может свидетельствовать об увеличении трансмиссии ГАМК.

Полагают, что одним из факторов, оказывающих влияние на миграционное поведение нейронов, является программа внутреннего созревания ГАМКергических нейронов. В соответствии с этим предположением, в неокортексе мигрирующие нейроны могут находиться в периоде ожидания завершения определенного этапа своей дифференцировки или созревания своих мишеней и далее продолжать миграцию (Bartolini et al., 2013). В связи с этим, большое количество молодых интернейронов в верхних слоях (на P5) можно рассматривать как их временное локальное скопление в период ожидания дифференцировки и созревания. Вероятно, окончательное завершение этих процессов в верхних слоях происходит к концу неонатального периода, и результатом этого является значительное снижение численности нейронов, содержащих ГАМК. Известно, что в неонатальный период продолжается миграция клеток в неокортексе, при этом они проходят через белое вещество мозга, слой VI и далее распределяются по всем вышележащим слоям развивающегося неокортекса (Marín, Rubenstein, 2001). На P5 скопление интернейронов в слое VI может свидетельствовать о том, что здесь также временно может находиться популяция молодых интернейронов, которые после определенного периода ожидания будут распределяться по разным слоям неокортекса до конца неонатального периода. Полученные данные согласуются с наблюдениями других авторов о том, что миграция нейронов завершается к концу 1-й постнатальной недели (Lim et al., 2018). Скопления молодых интернейронов, обнаруженные в верхних II–III и глубоком VI слоях, также можно рассматривать как временные и необходимые для осуществления нейронной активности, за которой последуют процессы созревания, смены

функции ГАМК, экспрессия рецепторных белков и транспортеров.

Слой I играет особую критическую роль в формировании слоев и неокортекса в целом (Marín-Padilla, 1998; Soriano, del Rio, 2005). Слой I содержит две основные популяции нейронов: клетки Кахалья–Ретциуса, локализующиеся в поверхностном субслое, и ГАМКергические интернейроны, мигрирующие сюда из области subpallium и располагающиеся в нижнем субслое (Hevner et al., 2003; Villar-Cerviño et al., 2013). Присутствующие в нейропилле отростки локальных интернейронов и аксоны клеток Мартиноцци, образуют мощные ГАМКергические связи с клетками Кахалья–Ретциуса, также здесь находятся дендриты пирамидных нейронов нижележащих слоев (Cossgrave, Massaferrì, 2012). Результаты данного исследования показали, что на P5 и P10 в слое I присутствует одинаковое количество интернейронов, при этом на P5 имеет место самая высокая интенсивность экспрессии GAT_1 . Далее, к концу неонатального периода, интенсивность экспрессии GAT_1 в слое I значительно снижается (в 2 раза). В одной из работ (Dvorzhak, et al., 2010) было показано, что количество самой ГАМК вблизи ГАМКергических синапсов на клетках Кахалья–Ретциуса снижается в 2 раза в период с P2 до P7 и имеет тенденцию к дальнейшему снижению. Уменьшение количества ГАМК будет приводить к снижению экспрессии транспортера GAT_1 . Подтверждением этого предположения могут быть данные, полученные при изучении синтеза поверхностных белков, показавших, что снижение экспрессии поверхностного транспортера GAT_1 коррелирует с сокращением транспорта ГАМК. Вероятно, изменение трансмиссии ГАМК к концу неонатального периода связано с окончанием формирования верхних слоев неокортекса, установлением дефинитивных синаптических связей и, в результате, снижением трансмиссии ГАМК в слое I, которая в этот ранний период может выполнять модуляторную роль.

Таким образом, в неонатальный период в неокортексе происходят завершающие процессы формирования тормозных ГАМКергических локальных сетей. Показано, что эти процессы сопровождаются изменением количества ГАМКергических нейронов в разных слоях коры и изменением интенсивности иммуногистохимической реакции на GAT_1 . На начальных этапах неонатального периода в слоях II–III и VI имеет место высокая численность популяции нейронов, содержащих ГАМК, которая к концу неонатального периода значительно снижается и тормозные интернейроны распределяются во всех слоях примерно равномерно. К концу неонатального периода, по данным иммуногистохимического анализа, значительно повышается уровень GAT_1 , что, вероятно, может свидетельствовать об увеличении синаптической тормозной нейропередачи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00052/22).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными проводили в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” и при соблюдении требований Директив Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных животных. Протоколы экспериментов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор сообщает об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Augood S.J., Herbison A.E., Emson P.C.* 1995. Localization of GAT-1 GABA transporter mRNA in rat striatum: cellular co-expression with GAD, mRNA, GAD, immunoreactivity, and parvalbumin mRNA. *J. Neuroscience*. V. 15. P. 665.
- Bartolini G., Ciceri G., Marín O.* 2013. Integration of GABAergic interneurons into cortical cell assemblies: lessons from embryos and adults. *Neuron*. V. 79. P. 849.
- Bernstein E.M., Quick M.W.* 1999 Regulation of γ -aminobutyric acid (GABA) transporters by extracellular GABA. *J. Biol. Chem.* V. 274. P. 889.
- Butt S.J., Fuccillo M., Nery S., Noctor S., Kriegstein A., Corbin J.G., Fishell G.* 2005. The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron*. V. 48. P. 591.
- Ciceri G., Dehorter N., Sols I., Huang Z. J., Maravall M., Marín O.* 2013. Lineage-specific laminar organization of cortical GABAergic interneurons. *Nat. Neurosci.* V. 16. P. 1199.
- Cosgrove K.E., Maccaferri G.* 2012. mGlu1 α -dependent recruitment of excitatory GABAergic input to neocortical Cajal-Retzius cells. *Neuropharmacology*. V. 63. P. 486.
- Dvorzhak A., Myakhar O., Unichenko P., Kirmse K., Kirischuk S.* 2010 Estimation of ambient GABA levels in layer I of the mouse neonatal cortex in brain slices. *J. Physiol.* V. 588. P. 2351.
- Fattorini G., Melone M., Conti F.* 2020. A reappraisal of GAT-1 localization in neocortex. *Front. Cell Neurosci.* V. 14. P. 9.
- Fishell G., Rudy B.* 2011. Mechanisms of inhibition within the telencephalon: “Where the wild things are”. *Annu. Rev. Neurosci.* V. 34. P. 535.
- Flames N., Pla R., Gelman D.M., Rubenstein J.L., Puelles L., Marín O.* 2007. Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J. Neurosci.* V. 27. P. 9682.
- Flossmann T., Kaas T., Rahmati V., Kiebel S.J., Witte O.W., Holthoff K., Kirmse K.* 2019. Somatostatin interneurons promote neuronal synchrony in the neonatal hippocampus. *Cell Rep.* V. 26. P. 3173.
- Fogarty M., Grist M., Gelman D., Marín O., Pachnis V., Kessaris N.* 2007. Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *J. Neurosci.* V. 27. P. 10935.
- Gadea A., Lopez-Colome A.M.* 2001. Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. *J. Neurosci. Res.* V. 63. P. 461.
- Gelman D.M., Marín O.* 2010. Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *Eur. J. Neurosci.* V. 31. P. 2136.
- Guthmann A., Fritschy J.M., Ottersen O.P., Torp R., Herbert H.* 1998. GABA, GABA transporters, GABA(A) receptor subunits, and GAD mRNAs in the rat parabrachial and Kolliker-Fuse nuclei. *J. Comp. Neurol.* V. 400. P. 229.
- Hanson E., Armbruster M., Lau L.A., Sommer M.E., Klaf Z.J., Swanger S.A., Traynelis S., Moos S.J., Noubary F., Chadchankar J., Dulla C.G.* 2019. Tonic activation of GluN2C/GluN2D-containing NMDA receptors by ambient glutamate facilitates cortical interneuron maturation. *J. Neurosci.* V. 39. P. 3611.
- Hevner R.F., Neogi T., Englund C., Daza R.A.M., Fink A.* 2003. Cajal–Retzius cells in the mouse: Transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Dev. Brain Res.* V. 141. P. 39.
- Inan M., Welagen J., Anderson S.A.* 2012. Spatial and temporal bias in the mitotic origins of somatostatin- and parvalbumin-expressing interneuron subgroups and the chandelier subtype in the medial ganglionic eminence. *Cereb. Cortex*. V. 22. P. 820.
- Khazipov R., Zaynutdinova D., Ogievetsky E., Valeeva G., Mitrushkina O., Manent J.-B., Represa A.* 2015. Atlas of the postnatal rat brain in stereotaxic coordinates. *Front. Neuroanat.* V. 9. P. 161.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00161>
- Klausberger T., Somogyi P.* 2008. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science*. V. 321. P. 53.
- Lavdas A.A., Grigoriou M., Pachnis V., Parnavelas J.G.* 1999. The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* V. 19. P. 7881.
- Lim L., Pakan J.M.P., Selten M.M., Marques-Smith A., Llorca A., Bae S.E.* 2018. Optimization of interneuron function by direct coupling of cell migration and axonal targeting. *Nat. Neurosci.* V. 21. P. 920.
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0162-9>
- Lodato S., Rouaux C., Quast K.B., Jantrachotechatchawan C., Studer M., Hensch T.K., Arlotta P.* 2011. Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron*. V. 69. P. 763.
- Loo D.D., Eskandari S., Boorer K.J.* 2000. Role of Cl⁻ in electrogenic Na⁺-coupled cotransporters GAT1 and SGLT1. *J. Biol. Chem.* V. 275. P. 37414.
- Lu C.C., Hilgemann D.W.* 1999. GAT1 (GABA:Na⁺:Cl⁻) cotransport function. Steady state studies in giant *Xenopus* oocyte membrane patches. *J. Gen. Physiol.* V. 114. P. 429.
- Marín O., Rubenstein J.L.R.* 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 2. P. 780.
- Marín-Padilla M.* 1998. Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci.* V. 21. P. 64.

- Pla R., Borrell V., Flames N., Marín O.* 2006. Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling. *J. Neurosci.* V. 26. P. 6924.
- Rheims S., Minlebaev M., Ivanov A., Represa A., Khazipov R., Holmes G., Ben-Ari Y., Zilberter Y.* 2008. Excitatory GABA in rodent developing neocortex in vitro. *J. Neurophysiol.* V. 100. P. 609.
- Rymar V.V., Sadikot A.F.* 2007. Laminar fate of cortical GABAergic interneurons is dependent on both birthdate and phenotype. *J. Comp. Neurol.* V. 501. P. 369.
- Sahara S., Yanagawa Y., O'Leary D.D., Stevens C.F.* 2012. The fraction of cortical GABAergic neurons is constant from near the start of cortical neurogenesis to adulthood. *J. Neurosci.* V. 32. P. 4761.
- Soriano E., del Río J.A.* 2005. The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron.* V. 46. P. 389.
- Sukenik N., Vinogradov O., Weinreb E., Segal M., Levina A., Moses E.* 2021. Neuronal circuits overcome imbalance in excitation and inhibition by adjusting connection numbers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, V. 118. P. e2018459118.
- Taniguchi H., Lu J., Huang Z.J.* 2013. The spatial and temporal origin of chandelier cells in mouse neocortex. *Science.* V. 339. P. 70.
- Teppola H., Aćimović J., Linne M.L.* 2019. Unique features of network bursts emerge from the complex interplay of excitatory and inhibitory receptors in rat neocortical networks. *Front. Cell. Neurosci.* V. 13. P. 377.
- Valcanis H., Tan S.S.* 2003. Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse neocortex. *J. Neurosci.* V. 23. P. 5113.
- Villar-Cerviño V., Molano-Mazón M., Catchpole T., Valdeolmillos M., Henkemeyer M., Martínez L.M., Borrell V., Marín O.* 2013. Contact repulsion controls the dispersion and final distribution of Cajal-Retzius cells. *Neuron.* V. 77. P. 457.
- Warm D., Schroer J., Sinning A.* 2021. Gabaergic interneurons in early brain development: conducting and orchestrated by cortical network activity. *Front. Mol. Neurosci.* V. 14. P. 807969.
- Wichterle H., Turnbull D.H., Nery S., Fishell G., Alvarez-Buylla A.* 2001. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development.* V. 128. P. 3759.
- Wonders C.P., Anderson S.A.* 2006. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 7. P. 687.

Distribution of GABAergic Interneurons and GAT₁ GABA Transporter in Neocortical Layers in the Neonatal Period In Rats

L. I. Khozhai*

Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, 199034 Russia

**e-mail: astarta0505@mail.ru*

We studied the distribution of neurons containing GABA and the intensity of immunohistochemical labeling of the GAT₁ GABA transporter in different layers of the neocortex during the neonatal period in rats. At the initial stages of the neonatal period in layers II–III and VI, there is a high population of neurons containing GABA, which significantly decreases by the end of the neonatal period and inhibitory interneurons are distributed approximately evenly in all layers. By the end of the neonatal period, the level of GAT₁ immunolabeling significantly increases, which may indicate an increase in synaptic inhibitory neurotransmission

Keywords: GABA, GAT₁, GABAergic neurons, neocortex, neonatal period

УДК 616.5-006.81.04:576.08

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ В16 ПО ФАЗАМ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ДАКАРБАЗИНА

© 2022 г. Е. З. Лапкина¹, А. Р. Есимбекова¹, В. Д. Беленюк², А. А. Савченко², Т. Г. Рукша¹, *¹Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, 660022 Россия²Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Красноярск, 660022 Россия

*E-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2022 г.

После доработки 21.07.2022 г.

Принята к публикации 31.08.2022 г.

Одним из механизмов развития лекарственной устойчивости опухолевых клеток является обратимый переход в фазу покоя (G_0) клеточного цикла. В эксперименте был использован цитостатический препарат дакарбазин, которым воздействовали на клетки меланомы линии В16 для изучения распределения клеток по фазам клеточного цикла и способности переходить в фазу G_0 с помощью методов иммуноцитохимии и проточной цитометрии с использованием окрашивания клеток для выявления белка Ki-67. Показано, что при воздействии дакарбазином на клетки меланомы В16 увеличивается пул G_0 -положительных клеток, а также происходит снижение доли клеток в фазах G_1 и G_2 клеточного цикла.

Ключевые слова: меланома В16, дакарбазин, клеточный цикл, фаза G_0 , Ki-67, дормантность клеток, клеточное старение

DOI: 10.31857/S0041377122060074

Меланома — злокачественное новообразование кожи, развивающееся из меланоцитов, клеток нейронального происхождения (McConnell, Zon, 2021). Несмотря на внедрение в клиническую практику BRAF-ингибиторов и модуляторов контрольных точек иммунного ответа опухолевых клеток, терапия меланомы остается сложной задачей для онкологов из-за высокой инвазивности и быстрой диссеминации опухоли, что, в свою очередь, обусловлено рядом факторов (Сугулова et al., 2014). В данном контексте репарация ДНК рассматривается как важный процесс приобретения опухолевыми клетками лекарственной устойчивости (Mattia et al., 2018). Повреждение ДНК может индуцироваться целым рядом стрессовых агентов, в том числе противоопухолевыми препаратами, что вызывает остановку клеточного цикла, инициацию процессов репарации ДНК или гибель клетки. В зависимости от нахождения клетки в той или иной фазе клеточного цикла и активности контрольных точек клеточного цикла может меняться чувствительность к химиотерапевтическому агенту (Shah, Schwartz, 2001). Репарация ДНК опухолевых клеток зависит от функционирования контрольных точек в фазах S и G_2 клеточного цикла.

В выборе стратегии противоопухолевой терапии наиболее привлекательной терапевтической мишенью является таргетное воздействие на контрольную точку фазы G_2 , так как контрольная точка S-фазы способствует лишь замедлению клеточного цикла.

Клетка с поврежденной ДНК может пройти контрольную точку S-фазы до остановки в G_2 . Арест G_2 не позволяет включаться механизмам репарации ДНК, в результате чего клетки переходят в состояние апоптоза (Xu, McArthur, 2016). Опухолевая трансформация меланоцитов сопровождается увеличением пролиферации, что связано с изменениями регуляции клеточного цикла, опосредуемыми многочисленными молекулами. При переходе G_1/S ключевыми белками-регуляторами клеточного цикла являются pRb, p16^{INK4a} (p16), циклин D1, p27^{Kip1} (p27), p53 и p21^{Waf1/Cip1} (p21) (Li et al., 2006). В реализации апоптоза опухолевых клеток участвует сигнальный каскад киназ MAPK, регулирующий активность контрольных точек клеточного цикла, особенно при переходе G_2/M (Manke et al., 2005). Известно, что в основе геномной нестабильности и прогрессирования меланомы лежат дефекты реакции на повреждение ДНК, при этом около 50–75% меланом имеют мутации в гене BRAF, кодирующем компонент сигнального каскада MAPK (Cheng et al., 2018). Экспрессия проонкогенного BRAF может негативно влиять на функциональную активность контрольной точки G_2 в клетках с дефектами p16 и p53, тем самым усиливая нестабильность генома в клетках с повреждением ДНК.

Одним из недавно идентифицированных процессов, который вносит вклад в развитие лекарственной устойчивости клеток меланомы, является переход

клеток в дормантное (дремлющее) состояние – обратимый переход в фазу покоя (G_0) клеточного цикла (Ruksha, 2019). Показано, что дормантные клетки, устойчивые к действию противоопухолевых агентов, могут избегать апоптоз-индуцирующих стимулов и ответа со стороны системы иммунобиологического надзора (Risson et al., 2020). Таким образом, изучение механизмов инициации перехода опухолевых клеток в фазу покоя клеточного цикла, характеристика фенотипа пула покоящихся клеток имеет потенциальную клиническую значимость в онкологии. Ранее нами было показано, что свойством инициации дормантности обладает в отношении клеток меланомы вемурафениб (Николаева, 2020). Дакарбазин является стандартным химиотерапевтическим средством при диссеминированных формах меланомы, который оказывает противоопухолевое действие в основном за счет алкилирования ДНК, вызывающее остановку клеточного цикла с последующим развитием апоптоза или некроза клеток. К сожалению, лечение дакарбазином неэффективно у большинства пациентов (85–90%) (Huncharek et al., 2001). Только 2% из всех пациентов с метастатической меланомой, получающих это лечение, демонстрируют значительный ответ и только 11.2% демонстрируют частичный ответ (Lui et al., 2007). Устойчивость к дакарбазину связана с активацией антиапоптотических механизмов, аутофагией и репарацией ДНК в опухолевых клетках (Al-Qatati et al., 2017). Несмотря на свои умеренные эффекты, дакарбазин продолжает оставаться стандартным методом лечения метастатической меланомы, поскольку ни одно другое химиотерапевтическое лечение не показало более выраженного эффекта (Domingues et al., 2018). Помимо этого, дакарбазин используется как референсный метод терапии при разработке новых способов лечения диссеминированной формы опухоли (Charman et al., 2011). Известно, что дакарбазин способен вызывать арест клеточного цикла в фазах S и G_2/M клеток меланомы (Olszewska-Słonina et al., 2005).

В связи со сказанным выше, вероятно, что низкая эффективность дакарбазина может быть обусловлена, в том числе, обратимым переходом клеток меланомы в состояние G_0 в качестве механизма избегания апоптоза и в дальнейшем приводить к прогрессии заболевания.

Таким образом, цель настоящей работы заключалась в изучении влияния дакарбазина на распределение клеток меланомы линии В16 по фазам клеточного цикла и способности клеток переходить в дормантное состояние (фазу покоя G_0).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные линии и условия их культивирования. Использовали клеточную линию меланомы В16, любезно предоставленную НИИ клинической иммуно-

логии (Новосибирск, Россия). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Москва, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (HyClone, GmbH, Parsching, Австрия) и 1% антибиотика/антимикотика (Gibco Life Technologies, Гранд-Айленд, США). Клетки культивировали в инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 (Sanyo MSO-5AC, Осака, Япония).

МТТ-тест. Концентрацию полумаксимального ингибирования (IC_{50}) и максимального ингибирования ($2 \times IC_{50}$) активности клеточного метаболизма на 50 и 100% соответственно противоопухолевым агентом дакарбазин (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) оценивали для клеточной линии меланомы В16 с помощью реакции восстановления соли тетразолия (МТТ-тест). В стерильные 96-луночные планшеты высевали 2×10^4 кл./мл. Через 24 ч меняли питательную среду на среду, содержащую дакарбазин в диапазоне конечных концентраций 0–1000 мкг/мл, и клетки культивировали при 37°C и 5% CO_2 в течение 72 ч. Клетки без добавления препарата служили контролем. Затем клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), добавляли питательную среду с 5 мг/мл реагента МТТ-бромид (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Нидерланды) в каждую лунку, инкубировали еще 4 ч, затем среду осторожно удаляли и добавляли по 100 мкл ДМСО (Helicon, Москва, Россия) в каждую лунку для растворения образовавшихся кристаллов МТТ-формазана. Оптическую плотность (ОП) измеряли при длине волны 560 нм на спектрофотометре Эфос-9305 (Фотосистемы Швабе, Москва, Россия). Значения IC_{50} определяли по калибровочной зависимости метаболической активности от концентрации препарата.

В дальнейшем клетки подвергали воздействию дакарбазином в течение 72 ч в концентрациях, соответствующих $1 \times IC_{50}$ и $2 \times IC_{50}$. После этого культуральную среду, содержащую дакарбазин, заменяли стандартной (указанной выше). Клетки культивировались дополнительно 48 ч с целью преимущественной элиминации апоптотических клеток (согласно данным из литературы о превалирующем развитии апоптоза в первые 48 ч после воздействия повреждающим агентом (Mhaidat et al., 2007)).

Иммуноцитохимия. Клетки, культивируемые в 24-луночных планшетах в течение 72 ч в присутствии дакарбазина и далее в течение 48 часов в RPMI с FBS, 1% антибиотика/антимикотика, но без дакарбазина, в дальнейшем промывали PBS, фиксировали 10%-ным формалином и пермеабелизировали 0.5% Triton X100 (Biotechnik GmbH, Гайберг, Германия) в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали в культуральной среде в течение ночи при 4°C с первичными кроличьими моноклональными антителами к Ki-67 (ab15580; Abcam, США) в разведении 1 : 100 в присутствии 10% FBS. В качестве вторичных антител использовали

козьи антикроличьи антитела Alexa Fluor 488 IgG (H+L) в разведении 1 : 200 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) при комнатной температуре в темноте в течение 1 ч. Ядра окрашивали DAPI (1 мкг/мл; AppliChem GmbH, Дармштадт, Германия) в течение 15 мин. Клетки считали не менее чем в 10 полях зрения с использованием станции визуализации клеток Fluid (Thermo Fisher Scientific, Карлсбад, США). Ядра пролиферирующих клеток окрашивались в зеленый цвет, тогда как ядра непролиферирующих живых клеток окрашивались в синий цвет. Результаты выражали средними значениями количества клеток (%) на стадии G_0 .

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла с помощью антител к Ki-67 методом проточной цитометрии. Влияние на распределение фаз клеточного цикла клеток меланомы оценивали с помощью проточной цитометрии. Клетки меланомы V16 культивировали во флаконах объемом 25 см² и подвергали воздействию дакарбазином в течение 72 ч при 37°C; определяли (IC_{50} , $2 \times IC_{50}$). Через 72 ч клетки промывали PBS (Хеликон, Москва, Россия), помещали в свежую питательную среду и культивировали еще 48 ч. Затем клетки промывали PBS, фиксировали 10%-ным формалином, пермеабелизировали 0.1%-ным Тритоном X100 и инкубировали с моноклональными антителами к Ki-67 (SolA15), FITC, eBioscience (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Карлсбад, США) в концентрации 1 : 100 и 100 мкг/мл окрашивающего раствора йодистого пропидия (PI) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Карлсбад, США). Долю клеток в каждой фазе определяли с помощью проточного цитометра Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, Inc.) с использованием программного обеспечения Navios Software v. 1.2 и Kaluza v. 2.1.1 (версия 2.2; Beckman Coulter, Квебек, Канада), используя лазер с длиной волны 488 нм и необходимые фильтры. Полоса пропускания для FITC составляла 530/30 нм и для PI – 610/20 нм. В каждой пробе анализировали не менее 50 тыс. клеток. Гейтирование клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, осуществляли в логарифмическом режиме. Клетки, находящиеся в фазе G_0 , являются негативными по Ki-67 и имеют низкие уровни PI, их гейтирование осуществляли в диапазоне значений до 100 отн. ед. по шкале флуоресценции Ki67-FITC (отрицательный результат) и в диапазоне значений флуоресценции PI 0.7–1.3 отн. ед. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла методом проточной цитометрии проводили в Центре коллективного пользования КНЦ СО РАН.

Статистическая обработка. Все эксперименты повторяли трижды. Полученные значения представлены как средние значения из трех повторностей и их стандартные отклонения. Различия считали статистически значимыми при $P < 0.05$. Статистическую обработку проводили с помощью U-критерия Манна–Уитни в программе Statistica 7.0 (StatSoft, Рос-

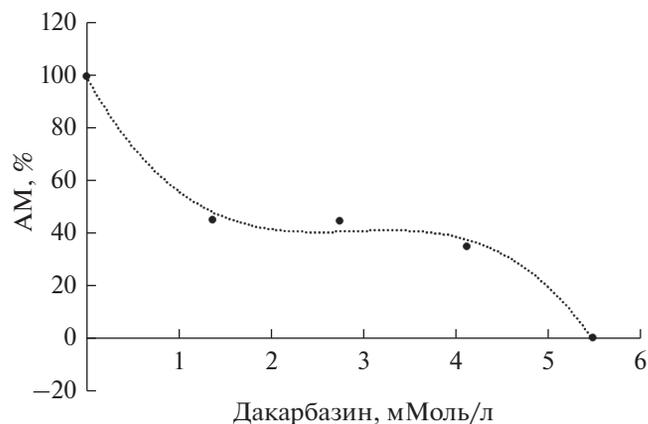


Рис. 1. Изменение активности метаболизма клеток меланомы V16 в зависимости от концентрации дакарбазина после 72-часового воздействия. Результаты МТТ-теста представлены в виде средних значений.

сия). Статистические результаты получены с использованием GraphPad Prism (GraphPad Software, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение значений IC_{50} и $2 \times IC_{50}$ дакарбазина для клеток меланомы проводили на основании МТТ-теста. Результат снижения метаболической активности клеток может являться как следствием их апоптоза, так и перехода в фазу покоя. После воздействия дакарбазина на клетки меланомы V16 наблюдали снижение активности метаболизма при увеличении его концентрации. В ходе анализа МТТ-теста определили ингибирующие клетки V16 концентрации IC_{50} и $2 \times IC_{50}$ дакарбазина, которые составили соответственно 1.86 и 3.73 мМоль/л (рис. 1).

При микроскопическом исследовании культуры клеток после воздействия дакарбазином наблюдали изменения их морфологии: звездчатая форма клеток с соединяющими клетки ламеллоподиями изменялась на веретенообразную удлинённую форму без ламеллоподий с упорядоченным столбчатым расположением (рис. 2). Отмечали большое количество клеток с крупными ядрами, что может косвенно свидетельствовать об увеличении ploидности клеток меланомы V16.

Для разделения клеток в фазах G_0/G_1 и выявления доли G_0 -положительных (покоящихся) клеток в дальнейшем, при изучении распределения клеток по фазам клеточного цикла с помощью проточной цитометрии использовали окрашивание клеток моноклональными антителами к Ki-67, которые позволяют визуализировать клетки, находящиеся во всех фазах клеточного цикла за исключением G_0 .

По результатам иммуноцитохимического окрашивания доля Ki-67-негативных, G_0 -позитивных,

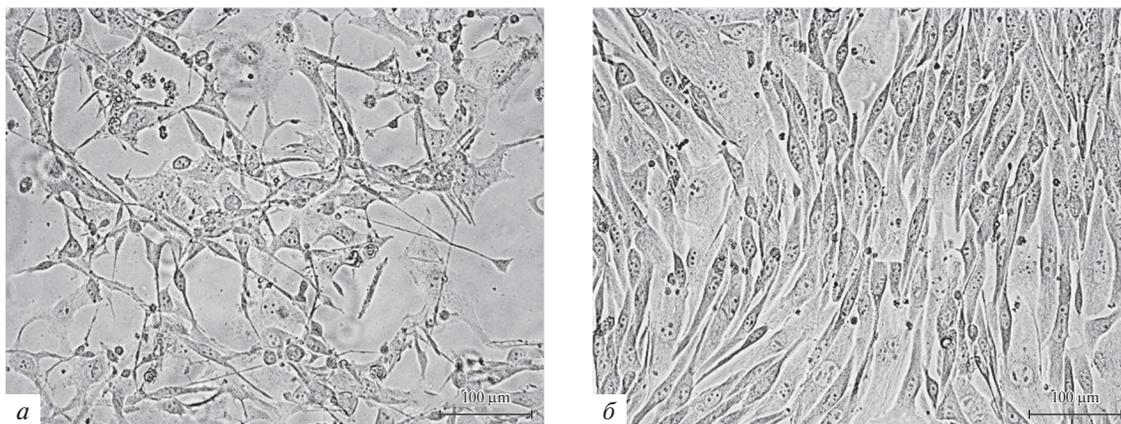


Рис. 2. Клетки меланомы V16 в контроле (а) и после воздействия дакарбазина в концентрации полумаксимального ингибирования (1.86 ммоль/л; б) в течение 72 ч.

клеток увеличивалась в 2 раза при воздействии дакарбазином в концентрации 3.73 мМоль/л, соответствующей $2 \times IC_{50}$ (рис. 3).

При воздействии на клетки меланомы дакарбазином в концентрации 340 мкг/мл, соответствующей IC_{50} , по результатам проточной цитометрии отмечали увеличение доли клеток в фазах G_0 и в S в 1.95 и в 2.44 раза соответственно, а доли клеток, находящихся в фазах G_1 и G_2 снижались в 1.44 и 3.22 раза соответственно. В негативной популяции присутствовали клетки с содержанием ДНК, превышающем значения, характерные для фаз G_0/G_1 , что, может быть также связано с дефектом митотической сегрегации и повышением доли анеуплоидных клеток под действием препарата, описанным ранее (Reyes-Reyes et al., 2013). После воздействия дакарбазином на клетки меланомы V16 в концентрации 680 мкг/мл, что соответствовало $2 \times IC_{50}$, отмечали увеличение доли клеток в фазах G_0 и S в 3.43 и 2.50 раза соответственно, снижение в 2.58 раза доли клеток в фазе G_1 и в 1.70 раза в фазе G_2 (рис. 4).

Таким образом, установлено увеличение пула G_0 -положительных клеток при воздействии цитостатическим препаратом дакарбазин.

ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку в литературе есть данные о присутствии в гетерогенной популяции опухолевых клеток G_0 -положительных клеток, а также о возможности перехода опухолевых клеток в фазу покоя под воздействием разнообразных стрессовых факторов (Carpel et al., 2018), мы осуществили культивирование клеток меланомы в присутствии противоопухолевого препарата дакарбазин с последующей оценкой доли покоящихся (G_0 -положительных) опухолевых клеток и динамики ее изменений.

Алкилирующие агенты, к которым относится дакарбазин, широко применяются в терапии злокаче-

ственных новообразований, в том числе меланомы кожи, на протяжении нескольких десятков лет. Установлено, что дакарбазин вызывает остановку клеточного цикла преимущественно в фазах G_2/M с последующим развитием клеточного старения и апоптоза. Однако ранее выполненные нами исследования показали, что определенная доля клеток меланомы (10–15%) сохраняет жизнеспособность после воздействия дакарбазина, что, в свою очередь, может быть связано с развитием лекарственной устойчивости (Tumentseva et al., 2021). Известно, что дакарбазин характеризуется низкой эффективностью в отношении меланомы, хотя точные механизмы этого остаются до сих пор неясными.

В первую очередь, при воздействии дакарбазином на клетки мышинной меланомы V16 наблюдали очевидные визуальные изменения морфологии клеток. В частности, клетки приобретали веретенообразную форму с отсутствием ламеллоподий. Действительно, целый ряд публикаций указывает на то, что алкилирующие агенты вызывают изменения цитоскелета в опухолевых клетках, связывая это с меняющейся способностью к миграции и инвазии опухолевых клеток (Wang et al., 2016; Avci et al., 2020).

В ряде работ по исследованию влияния дакарбазина на клеточный цикл есть сведения об эффектах дакарбазина на процессы некроза, апоптоза клеток меланомы и остановку клеточного цикла в фазах S и G_2/M (Huang et al., 2017). Дакарбазин и другие алкилирующие агенты продемонстрировали способность индуцировать блок клеточного цикла в фазах G_1 и G_2 . Установлено, что клетки после блока G_2/M более восприимчивы к индукции апоптоза по сравнению с более устойчивыми клетками после остановки клеточного цикла в фазе G_1 , которые способны обратимо выходить из клеточного цикла, переходить в фазу G_0 или развивать стресс эндоплазматического ретикулума, что приводит к деградации поврежденных белков и сохранению жизнеспособности опухолевых

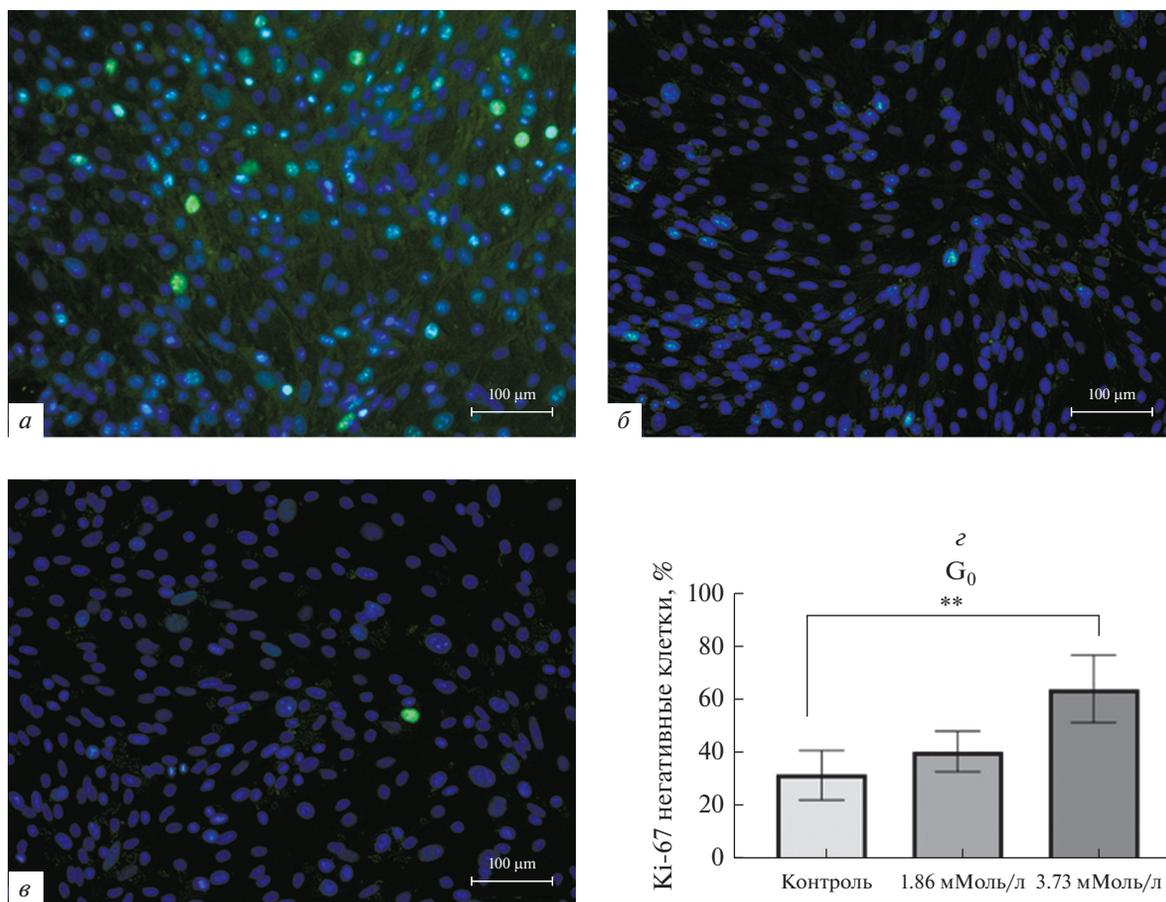


Рис. 3. Клетки меланомы линии В16, окрашенные флуоресцентно мечеными антителами к Ki-67 через 48 ч после прекращения действия дакарбазина. *а* – Контроль (К), *б* – дакарбазин в концентрации 1.86 мМоль/л (IC50), *в* – дакарбазин (Д) в концентрации 3.73 мМоль/л ($2 \times IC50$); ядра Ki-67-положительных клеток окрашены в зеленый цвет, ядра Ki-67-негативных (G_0 -позитивных) клеток – в синий (окраска DAPI). *з* – Графическое отображение полученных результатов; указана концентрация дакарбазина; (**) – различия между контролем и действием 3.73 мМоль/л дакарбазина достоверны при $P \leq 0.05$.

клеток (Hill et al., 2014; Beaumont et al., 2016). Наши результаты проточной цитометрии подтверждают способность дакарбазина снижать долю клеток в фазах G_1 и G_2 клеточного цикла с параллельным повышением доли клеток в фазе G_0 клеточного цикла.

Часто генетическим и эпигенетическим изменениям при онкологических заболеваниях подвергаются регуляторы клеточного цикла, такие как циклин D1/CDK4/pRb. Известно, что сигнальный каскад циклин D/p16–CDK4/6-Rb нарушен в 90% меланом и, следовательно, является очевидной терапевтической мишенью для этого заболевания. Основным результатом активации CDK4 является фосфорилирование Rb. Кроме того, CDK4 непосредственно фосфорилирует другие белки, которые способствуют прогрессии клеточного цикла и ингибируют клеточное старение и апоптоз (Sheppard, McArthur, 2013). Основываясь на роли CDK4 и CDK1 в развитии клеточного цикла, можно предположить, что их ингибирование под воздействием химиотерапевти-

ческих препаратов может вызывать остановку клеток в G_1 или G_2 (Joshi et al., 2007).

Для определения доли G_0 -положительных клеток меланомы В16 после воздействия дакарбазином мы использовали маркер пролиферации опухолевых клеток Ki-67. Распределение Ki-67 резко меняется во время прогрессии клеточного цикла, что связано с различными его функциями. Во время интерфазы он необходим для распределения гетерохроматинных антигенов и ядрышковой ассоциации гетерохроматина, а во время митоза – для формирования перихромосомного слоя, рибонуклеопротеиновой оболочки, покрывающей хромосомы. В фазе G_0 клетки становятся отрицательными по антигену Ki-67, в то время как во всех других фазах клеточного цикла этот антиген присутствует (Sun et al., 2018).

Как отмечалось выше, арест клеточного цикла, переход клеток в G_0 с последующим развитием апоптоза наблюдается через 72 ч культивирования в присутствии дакарбазина (Mhaidat et al., 2007; Sun et al., 2018; Pawlowska, 2018). Мы оценивали распре-

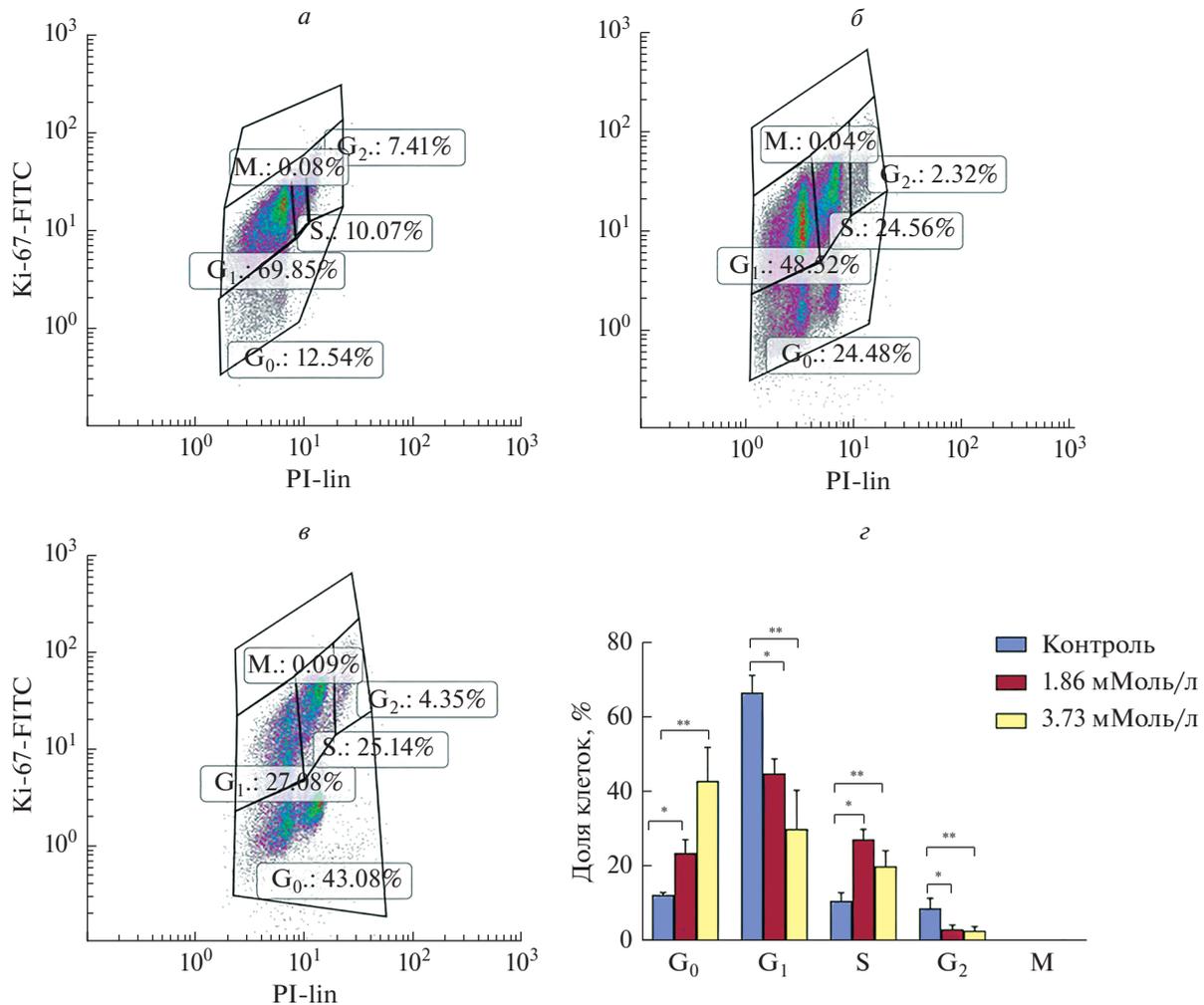


Рис. 4. Распределение клеток меланомы В16 по фазам клеточного цикла через 48 ч после прекращения действия дакарбазина. Проточная цитометрия. По горизонтали и вертикали – интенсивность флуоресценции йодида пропидия (PI) и анти-Ki-67 моноклональных антител соответственно. G₀-позитивные клетки находятся в нижнем квадранте. а – Контроль (без воздействия), б – 1.86 мМоль/л (IC₅₀) дакарбазина, в – 3.73 мМоль/л (2 × IC₅₀) дакарбазина. г – Процентное распределение клеток по фазам клеточного цикла до и после воздействия дакарбазина; показаны средние значения и их ошибки; различия между контролем и действием 1.86 мМоль/л (*) или 3.73 мМоль/л (**) дакарбазина достоверны при P ≤ 0.05.

деление клеток меланомы по фазам клеточного цикла после воздействия дакарбазином через 5 сут с помощью проточной цитометрии (72 ч культивирования с дакарбазином и 48 ч культивирования в стандартной среде после элиминации апоптических клеток). Повышение доли G₀-положительных клеток может рассматриваться как механизм перепрограммирования опухолевых клеток под действием повреждающего фактора, которым в данном случае является дакарбазин, накопления мутаций и транскрипционного перепрофилирования, позволяющего обеспечить выживаемость опухолевых клеток.

Увеличение доли клеток в фазе G₀ под воздействием дакарбазина может свидетельствовать о снижении активности сигнального пути MAPK-ERK1/2 и PI3K/AKT (Ossowski et al., 2010). Регуляция хода клеточного цикла осуществляется соотно-

шением сигнальных путей киназ ERK1/2 и p38. Высокий уровень активности ERK1/2 способствуют пролиферации, тогда как повышенная активность MAP-киназы p38 активирует ответ каскада белков, способствуя аресту клеточного цикла и сохранению жизнеспособности клеток (Fares et al., 2020).

При иммуноцитохимическом анализе было также выявлено увеличение доли G₀-положительных клеток после воздействия дакарбазином, что соотносится с результатами проточной цитометрии. В митотических клетках Ki-67 локализуется в области перихромосомного слоя, что выражено характерным ярким зеленым окрашиванием. При вступлении клеток в раннюю фазу G₁ наблюдается фокальный характер экспрессии Ki-67 в ядрах клеток, что при иммунофлуоресцентной микроскопии выраже-

но в виде единичных зеленоватых вкраплений (Matheson, Kaufman, 2017).

Таким образом, при воздействии дакарбазином на клетки меланомы В16 в клеточном цикле увеличивается доля G_0 -положительных клеток, а также происходит снижение доли клеток в фазах G_1 и G_2 . С учетом сохраняющейся способности покоящихся G_0 -положительных клеток к пролиферации, феномен перехода в G_0 , в равной степени как и сама популяция таких клеток, может быть целенаправленным объектом в рамках противоопухолевой терапии. Помимо этого, ранее мы наблюдали схожие изменения в клетках меланомы после воздействия таргетным препаратом вемурафениб, ингибитора белка BRAF (Николаева, 2020), что может указывать на универсальность подобных изменений вне зависимости от действующего лекарственного средства, и подчеркивает необходимость разработки целенаправленных стратегий в отношении G_0 -положительных клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Результаты работы методом проточной цитометрии получены в Центре коллективного пользования Красноярского научного центра СО РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00110, <https://rscf.ru/project/19-15-00110/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зинченко И.С., Палкина Н.В., Рукша Т.Г. 2022. Изменение профиля микроРНК в клетках меланомы, резистентных к действию дакарбазина. Цитология. Т. 64. № 1. С. 26. (Zinchenko I.S., Palkina N.V., Ruksha T.G. 2022. Changes in miRNA profile in melanoma cells resistant to dacarbazine. Tsitologiya. V. 64. № 1. S. 26.)
- Николаева Е.Д., Дубовцева И.Ю., Белоногов Р.Н., Наркевич А.Н., Мошев А.В., Савченко А.А., Рукша Т.Г. 2020. Вемурафениб индуцирует повышение уровня дормантных (Ki-67-негативных) клеток при BRAF-негативном статусе меланомы. Цитология. V. 62. № 11. С. 793. (Nikolaeva E.D., Dubovtseva I.Yu., Belonogov R.N., Narkevich A.N., Moshev A.V., Savchenko A.A., Ruksha T.G. 2020. Vemurafenib induces an increase in dormant (Ki-67-negative) cells in BRAF-negative melanoma. Tsitologiya. V.62. № 11. P. 793.)
- Al-Qatati A., Aliwaini S. 2017. Combined pitavastatin and dacarbazine treatment activates apoptosis and autophagy resulting in synergistic cytotoxicity in melanoma cells. Oncol. Letters. V. 14. P. 7993.
- Avci N.G., Ebrahimzadeh-Pustchi S., Akay Y.M., Esquenazi Y., Tandon N., Zhu J.J., Akay M. 2020. NF- κ B inhibitor with Temozolomide results in significant apoptosis in glioblastoma via the NF- κ B(p65) and actin cytoskeleton regulatory pathways. Sci. Rep. V. 10. P. 13352.
- Beaumont K.A., Hill D.S., Daignault S.M., Lui G., Sharp D.M., Gabrielli B., Weninger W., Haass N.K. 2016. Cell cycle phase-specific drug resistance as an escape mechanism of melanoma cells. J. Invest. Dermatol. V. 136. P. 1479.
- Cappel S.D., Mark K.G., Garbett D., Pack L.R., Rape M., Meyer T. 2018. EMI1 switches from being a substrate to an inhibitor of APC/C^{CDH1} to start the cell cycle. Nature. V. 7709. P. 313
- Chapman P.B., Hauschild A., Robert C., Haanen J.B., Ascierto P., Larkin J., Dummer R., Garbe C., Testori A., Maio M., Hogg D., Lorigan P., Lebbe C., Jouary T., Schadendorf D. et al. 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. New England J. Med. V. 364. P. 2507.
- Cheng L., Lopez-Beltran A., Massari F., MacLennan G.T., Montironi R. 2018. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. Mod. Pathol. V. 31. P. 24.
- Domingues B., Lopes J.M., Soares P., Populo H. 2018. Melanoma treatment in review. Immunotargets Ther. V. 7. P. 35–49.
- Fares J., Fares M.Y., Khachfe H.H., Salhab H.A., Fares Y. 2020. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. Signal Transd. Targeted Ther. V. 5. P. 28.
- Gyrylova S.N., Aksenenko M.B., Gavriluk D.V., Palkina N.V., Dyhno Y.A., Ruksha T.G., Artyukhov I.P. 2014. Melanoma incidence mortality rates and clinico-pathological types in the Siberian area of the Russian Federation. Asian Pac. J. Cancer Prev. V. 15. P. 2201.
- Huncharek M., Caubet J.F., McGarry R. 2001. Single-agent DTIC versus combination chemotherapy with or without immunotherapy in metastatic melanoma: a meta-analysis of 3273 patients from 20 randomized trials. Melanoma Res. V. 11. P. 75.
- Huang X., He J.X., Zhang H.T., Sun K., Yang J., Wang H.J., Zhang H.X., Guo Z.Z., Zha Z.G., Zhou C.R. 2017. Effect of dacarbazine on CD44 in live melanoma cells as measured by atomic force microscopy-based nanoscopy. Int. J. Nanomed. V. 12. P. 8867.
- Hill D.S., Lovat P.E., Haass N.K. 2014. Induction of endoplasmic reticulum stress as a strategy for melanoma therapy: is there a future? Melanoma Manag. V. 2. P. 127.
- Joshi K.S., Rathos M.J., Mahajan P., Wagh V., Shenoy S., Bhatia D., Sharma S. 2007. P276-00, a novel cyclin-dependent inhibitor induces G_1 – G_2 arrest, shows antitumor activity on cisplatin-resistant cells and significant in vivo efficacy in tumor models. Mol. Cancer Ther. V. 6. P. 926.
- Li W., Sanki A., Karim R.Z., Thompson J.F., Lee C.S., Zhuang L.Q., Zhuang L., McCarthy S.W., Scolyer R.A. 2006. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. Pathol. V. 38. P. 287.
- Lui P., Cashin R., Machado M., Hemels M., Corey-Lisle P.K., Einarson T.R. 2007. Treatments for metastatic melanoma:

- synthesis of evidence from randomized trials. *Cancer Treat. Rev.* V. 33. P. 665.
- Manke I.A., Nguyen A., Lim D., Stewart M.Q., Elia A.E., Yaffe M.B. 2005. MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G₂/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol. Cell.* V. 17. P. 37.
- Mattia G., Puglisi R., Ascione B., Malorni W., Carè A., Matarrese P. 2018. Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies. *Cell Death Dis.* V. 9. P. 112.
- Matheson T.D., Kaufman P.D. 2017. The p150N domain of chromatin assembly factor-1 regulates Ki-67 accumulation on the mitotic perichromosomal layer. *Mol. Biol. Cell.* V. 28. P. 21.
- McConnell A.M., Zon L.I. 2021. Dissecting melanocytes to predict melanoma. *Nat. Cell Biol.* V. 23. P. 930.
- Mhaidat N.M., Zhang X.D., Jiang C.C., Hersey P. 2007. Docetaxel-induced apoptosis of human melanoma is mediated by activation of c-Jun NH₂-terminal kinase and inhibited by the mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *Clin. Cancer Res.* V. 13. P. 1308.
- Olszewska-Słonińska D.M., Styczyński J., Drewa T.A., Olszewski K.J., Czajkowski R. 2005. B16 and cloudman S91 mouse melanoma cells susceptibility to apoptosis after dacarbazine treatment. *Acta Pol. Pharm.* V. 62. P. 473.
- Oliferenko S., Kaverina I., Small J.V., Huber L.A. 2000. Brief report hyaluronic acid (HA) binding to CD44 activates Rac1 and induces lamellipodia outgrowth. *J. Cell Biol.* V. 148. P. 1159.
- Ossowski L., Aguirre-Ghiso J.A. 2010. Dormancy of metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* V. 23. P. 41.
- Pawlowska E., Szczepanska J., Szatkowska M., Blasiak J. 2018. An interplay between senescence, apoptosis and autophagy in glioblastoma multiforme-role in pathogenesis and therapeutic perspective. *Int. J. Mol. Sci.* V. 19. P. 889.
- Reyes-Reyes E.M., Jin Z., Vaisberg A.J., Hammond G.B., Bates P.J. 2013. Physangulidine A, a withanolide from *Physalis angulata*, perturbs the cell cycle and induces cell death by apoptosis in prostate cancer cells. *J. Nat. Prod.* V. 1. P. 2.
- Ruksha T.G. 2019. MicroRNAs' control of cancer cell dormancy. *Cell Div.* V. 14. P. 11.
- Risson E., Nobre A.R., Maguer-Satta V., Aguirre-Ghiso J.A. 2020. The current paradigm and challenges ahead for the dormancy of disseminated tumor cells. *Nat. Cancer.* V. 7. P. 672.
- Ralhan R., Kaur J. 2007. Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Path.* V. 17. P. 1061.
- Shah M.A., Schwartz G.K. 2001. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* V. 7. P. 2168.
- Sheppard K.E., McArthur G.A. 2013. The cell-cycle regulator CDK4: an emerging therapeutic target in melanoma. *Clin Cancer Res.* V. 19. P. 5320.
- Sun X., Kaufman P.D. 2018. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* V. 127. P. 175.
- Tyumentseva A., Averchuk A., Palkina N., Zinchenko I., Moshev A., Savchenko A., Ruksha T. 2021. Transcriptomic profiling revealed plexin A2 downregulation with migration and invasion alteration in dacarbazine-treated primary melanoma cells. *Front. Oncol.* V. 11. P. 732501.
- Xu W., McArthur G. 2016. Cell cycle regulation and melanoma. *Curr. Oncol. Rep.* V. 18. P. 34.
- Wang H., Feng W., Lu Y., Li H., Xiang W., Chen Z., He M., Zhao L., Sun X., Lei B., Qi S., Liu Y. 2016. Expression of dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1 (DHC2) associated with glioblastoma cell resistance to temozolomide. *Sci. Rep.* V. 6. P. 28948.

Cell Cycle Phase Distribution in B16 Melanoma Cells under Dacarbazine Treatment

E. Z. Lapkina^a, A. R. Esimbekova^a, V. D. Beleniuk^b, A. A. Savchenko^b, and T. G. Ruksha^{a, *}

^a*Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022 Russia*

^b*Research Institute for Medical Problems in the North, Krasnoyarsk, 660022 Russia*

*e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Reversible transition to the resting phase (G₀) of the cell cycle is implicated in the development of cancer cells drug resistance. The effect of dacarbazine on B16 melanoma cells was used to study the distribution of phases of the cell cycle of melanoma cells. The ability of cells to enter into a G₀ phase of cell cycle was determined by immunocytochemistry and flow cytometry based on the negative staining of Ki-67 protein. The pool of G₀-positive cells was increased with subsequent decrease in the proportion of cells in the G₁ and G₂ phases in the cell cycle in dacarbazine-treated B16 melanoma cells.

Keywords: melanoma, B16, dacarbazine, cell cycle, G₀ phase, Ki-67, cell dormancy, cell senescence

УДК 577.24

УЧАСТИЕ ТРАНСЛОКАТОРНОГО БЕЛКА В ИНДУКЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ ОТКРЫТИЯ ПОРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ В МИТОХОНДРИЯХ КЛЕТОК ГЛИОМЫ С6

© 2022 г. Ю. Л. Бабурина¹, Л. Д. Сотникова¹, О. В. Крестинина¹, *¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московской обл., 142290, Россия

*E-mail: ovkres@mail.ru

Поступила в редакцию 05.07.2022 г.

После доработки 02.08.2022 г.

Принята к публикации 08.08.2022 г.

Транслокационный белок (TSPO), ранее называвшийся бензодиазепиновым рецептором периферического типа (peripheral-type benzodiazepine receptor, PBR) представляет собой белок с молекулярной массой 18 кДа, локализованный во внешней митохондриальной мембране и участвующий в клеточной пролиферации и апоптозе. В настоящей работе мы обнаружили TSPO в виде мономера и димера в клетках глиомы крысы С6. Мы показали, что сниженный уровень экспрессии TSPO в клетках влияет на индукцию поры неспецифической митохондриальной проницаемости (mitochondrial permeability transition pore, мПТР). Снижение экспрессии TSPO стимулировало Ca^{2+} -индуцированное открытие мПТР. Природный эндогенный лиганд TSPO протопорфирин IX (PPIX) ускорял открытие мПТР. Стимулирующий эффект PPIX был сильнее в митохондриях клеток глиомы С6 дикого типа, чем в клетках глиомы С6 с нокадауном по TSPO. Фосфорилирование мембранных рецепторов, ионных каналов и транскрипционных факторов – важное событие внутриклеточной передачи сигналов, ответственное за регуляцию различных ферментов и многих клеточных функций. В настоящем исследовании PPIX модулировал белковое фосфорилирование. Мы предположили, что TSPO является важным белком в регуляции клеточного выживания и может участвовать в функционировании мПТР.

Ключевые слова: митохондрии, клетки глиомы С6, окислительный стресс, митохондриальная пора неспецифической проницаемости, протопорфирин IX (PPIX), транслокационный белок (TSPO)

DOI: 10.31857/S0041377122060025

Митохондрии считаются важной органеллой в клетке. Поддержание структурной и функциональной целостности митохондрий является важнейшей предпосылкой нормальной клеточной функции, поскольку митохондрии играют ключевую роль в энергетическом обмене, а также в поддержании окислительно-восстановительного состояния клеток и регуляции апоптоза (Nunnari, Suomalainen, 2012). Окислительный стресс считается одним из факторов риска развития митохондриальной дисфункции, что приводит к различным патологическим состояниям в организме (Kowalczyk, et al., 2021). Известно, что регулятором клеточной гибели считается открытие неспецифической поры в митохондриях (mitochondrial permeability transition pore, мПТР) (Crompton, Costi, 1990).

Окислительный стресс и пороговая концентрация Ca^{2+} рассматриваются как индукторы мПТР (Takeyama et al., 1993). Функционирование мПТР приводит к изменению проницаемости митохондриальной внутренней мембраны, сопровождающемуся падением митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), деполяризацией мембраны, повреждением внешней митохондриальной мембраны и, в конечном итоге, к клеточной смерти (Javadov, Karmazyn, 2007). Точная структура мПТР до сих пор не определена, однако считается, что регуляторами мПТР являются транслоказа адениновых нуклеотидов (ANT), потенциал-зависимый анионный канал (VDAC), TSPO, циклофилин Д и другие факторы.

TSPO, ранее известный как бензодиазепиновый рецептор периферического типа (peripheral-type benzodiazepine receptor, PBR) (Papadopoulos et al., 2006) распространен в сердце, мозге, надпочечниках, почках, слюнных железах, тромбоцитах, коже и печени (Gavish et al., 1999). Было показано, что лиганды TSPO модулируют митохондриальный и цитозольный Ca^{2+} (Campanella et al., 2008, Крестинина и др.,

Принятые сокращения. АФК – активные формы кислорода; МГ – митохондрии, изолированные из клеток глиомы С6; мПТР – пора неспецифической проницаемости (mitochondrial permeability transition pore); ANT – транслоказа адениновых нуклеотидов (adenine nucleotide translocase); PPIX – протопорфирин IX; TPP – тетрафенилфосфоний; TSPO – транслокационный белок; VDAC – потенциал-зависимый анионный канал.

2009), а сам TSPO может ослаблять клеточную митофагию (Gatliff et al., 2014).

К известным лигандам TSPO относятся природные, такие как протопорфирин IX (PPIX), диазепам-связывающий ингибитор (diazepam binding inhibitor) и синтетические, такие как PK11195 и Ro 5-4864. PPIX вырабатывается в клетках через синтез гема из субстрата аминолевулиновой кислоты и может использоваться для обнаружения опухолей и фотодинамической терапии. В фотодинамической терапии используется свойство PPIX инициировать образование АФК в раковых клетках при возбуждении видимым светом, что приводит к их гибели (Yoshioka et al., 2018).

Одной из посттрансляционных модификаций и важной регуляторной системой передачи сигнала является белковое фосфорилирование (дефосфорилирование), которое регулирует многие стороны клеточных функций. Эта регуляция может сильно влиять на свойства ферментативной активности белков, их структуру, субклеточную локализацию и стабильность (Lim et al., 2016). Последние несколько десятилетий митохондрии все чаще рассматриваются как центр передачи клеточных сигналов; сообщалось, что многие киназы и фосфатазы, благодаря которым осуществляется фосфорилирование (дефосфорилирование) белков, локализуются в митохондриях и играют важные функции (Lim et al., 2016). Кроме того, изменение путей фосфорилирования может привести к серьезным заболеваниям, в частности, к онкологическим. Многие сигнальные пути, включая тирозинкиназу, MAP-киназу, комплекс кадгерин–катенин, циклин-зависимую киназу и т.д., являются основными участниками циклических клеточных процессов и было показано, что нарушение регуляции фосфорилирования (дефосфорилирования) в их каскадах ассоциируется с различными типами рака (Singh et al., 2017).

В настоящей работе мы исследовали роль TSPO в транспорте Ca^{2+} при Ca^{2+} -индуцированном открытии мРТР в митохондриях, выделенных из клеток глиомы С6, с использованием PPIX – природного высокоаффинного лиганда TSPO. Мы сравнили параметры открытия мРТР и изменение степени фосфорилирования белков в митохондриях, выделенных из клеток глиомы С6 (МГ) дикого типа и в митохондриях, выделенных из клеток глиомы С6 с нокдауном по TSPO. Поскольку экспрессия TSPO повышена в клетках глиом, для исследования была выбрана клеточная линия глиомы С6.

Изучение участия TSPO в индукции и регуляции открытия поры неспецифической проницаемости в митохондриях представляет огромную важность как для фундаментального понимания функционирования мРТР и апоптоза, так и в прикладном плане, т. к. лиганды TSPO являются лекарственными препаратами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделение митохондрий из клеточной линии глиомы С6. Клеточные линии глиомы С6 (дикого типа и с нокдауном по TSPO) подарены д-ром М. Gavish (Технион, Израиль). Митохондрии изолировали из клеток глиомы С6 дикого типа (МГ дикого типа) и из клеток глиомы С6 с нокдауном по TSPO (МГ с нокдауном). Выделение митохондрий из клеток проводили при 4°C по опубликованной методике (Leissring et al., 2004). Монослои клеток глиомы С6 соскребали скребком, промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), осаждали при 500 g в течение 3 мин. Осадок растворяли в буфере, содержащем 0.32 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.02% бычьего сывороточного альбумина (фракция V), 10 мМ Трис-НСI (рН 7.4). Клеточные мембраны разрушали при помощи механического гомогенизатора Dounce (Великобритания) (40 пасов при 10000 об./мин) и осаждали при 500 g в течение 5 мин. Осадок повторно суспендировали в том же ледяном буфере и разрушали с помощью гомогенизатора Dounce. Супернатанты после двух центрифугирований осаждали при 3000 g в течение 4 мин для удаления неразрушенных клеток и ядер. Полученный супернатант центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. Осадок митохондрий суспендировали в ледяной среде, содержащей 0.32 М сахарозы и 10 мМ трис-НСI (рН 7.4), и центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. Выделенные митохондрии ресуспендировали в том же растворе. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда (Bio-Rad Protein assay; Bio-Rad, Германия).

Оценка митохондриальных функций. Все параметры измеряли, как описано ранее (Azarashvili et al., 2007). Митохондрии (1 мг/мл) инкубировали в мультифункциональной ячейке со встроенными селективными электродами (тетрафенилфосфониевым (TRP^+), Ca^{2+} -селективным и кислородным Clark-type O_2) в 1 мл в среды, содержащей 125 мМ KCl, 10 мМ Трис-НСI, 0.4 мМ K_2HPO_4 , 5 мМ сукцината калия и 5 мкМ ротенона, рН 7 при 25°C. Скорость потребления кислорода измеряли с помощью O_2 -электрода (Clark-type, Россия), рассчитывали в нг-атомах O за 1 мин на 1 мг белка и измеряли в закрытой ячейке. Митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\psi$) оценивали, измеряя распределение TRP^+ между митохондриальным матриксом и инкубационной средой с помощью TRP^+ -селективного электрода (Нико Аналит, Россия). Ca^{2+} -индуцированную диссипацию мембранного потенциала выражали в виде скорости входа TRP^+ после первой и второй добавок Ca^{2+} (TRP^+ , нмоль за 1 мин на 1 мг белка). Транспорт Ca^{2+} ($\sqrt{V^{\text{Ca}^{2+}}}$) измеряли с помощью Ca^{2+} -чувствительного электрода (Нико Аналит, Россия) и оценивали, как скорость входа Ca^{2+} после первой и второй добавок и рассчитывали, как коли-

чество нмоль Ca_{in}^{2+} за 1 мин на 1 мг белка. Изменение потоков TPP^+ и Ca^{2+} измеряли в открытой ячейке.

Электрофорез и Вестерн-блот-анализ. Аликвоту клеточного и митохондриального белка (15 мкг) солиобилизовали в буфере Лэммли, кипятили в течение 3 мин. Для иммуноблотинга полученные лизаты разделяли в денатурирующих условиях (12.5% SDS-PAGE) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0.2 мкм). Поликлональные антитела к TSPO получены от Abcam (Cambridge, Великобритания). Активность пероксидазы определяли с помощью хемилюминесцентных реагентов ECL (Pierce, Rockford, IL США). Количественную оценку плотности полос иммуноблотов проводили с использованием денситометра (GS-100 Calibrated Densitometer Bio-Rad, США) и рассчитывали с помощью программного обеспечения Gell Pro Software (Bio-Rad США).

Оценка фосфорилирования белков. Для оценки степени фосфорилирования белков аликуты митохондриальной суспензии (15 мкг белка) добавляли олигомицин (1.5 мкМ) для предотвращения гидролиза АТФ. Затем в образец добавляли смесь меченой $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ и немеченый Mg^{2+} -АТФ для достижения конечных концентраций 2 мМ Mg^{2+} , 400 мкМ АТФ и 185000 Бк $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$. Образцы митохондрий инкубировали 3 мин при комнатной температуре, реакцию останавливали добавлением буфера Лэммли, далее образцы нагревали на кипящей водяной бане в течение 3 мин (Azarashvili et al., 2003). Солюбилизованные митохондрии, содержащие 15 мкг белка, разделяли методом электрофореза в денатурирующих условиях (15% SDS-PAGE). Радиоактивные полосы в полиакриламидных гелях визуализировали путем экспонирования на пленке Kodak X-Omat AR-5 при -80°C . Через 1 сут пленку проявляли с помощью проявителя и закрепителя. Для оценки уровня фосфорилирования белка пленки сканировали с помощью денситометра (Bio-Rad, США).

Статистический анализ. Значения измеренных параметров выражали средними значениями и их среднестатистическими отклонениями из 3–4 экспериментов. Достоверности различий оценивали с использованием тестов *t*-критерия Стьюдента при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сначала мы проверили содержание TSPO в клеточных и митохондриальных лизатах, приготовленных из клеток глиомы С6 дикого типа и с нокдауном по TSPO. На рис. 1а показано распределение TSPO в клеточных лизатах. В контрольных клеточных лизатах (клетки глиомы С6 дикого типа) антитела к TSPO распознавали интенсивно окрашенные белки с молекулярной массой 36 кДа и 18 кДа, которые соответствуют димерной и мономерной формам. В клетках глиомы С6 со сниженной экспрессией TSPO полосы мономера и димера имели одинаковую интенсивность. На рис. 1а' показаны усредненные

количественные значения уровней TSPO в клетках глиомы С6. Оказалось, что мономерная форма TSPO (18 кДа) в клетках глиомы С6 с нокдауном по TSPO снижалась на 40% по сравнению с контрольными клетками (дикого типа) глиомы С6. Снижение уровня белка с молекулярной массой 36 кДа почти в 2.5 раза обнаруживалось в клетках глиомы С6 со сниженной экспрессией TSPO.

На рис. 1б показано изменение уровня TSPO в митохондриях, изолированных из исследуемых клеток глиомы С6, а ниже (рис. 1б') представлен количественный анализ содержания TSPO в изолированных митохондриях. На рисунке видно, что в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6 дикого типа присутствует и мономерная, и димерная формы белка (18 и 36 кДа), в то время как в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6 с нокдауном по TSPO белковые полосы не обнаружены.

Ранее было показано существование TSPO с мол. массой 36 кДа, способного связывать меченный радиоактивным изотопом PK14105 ([N-methyl-N-(1-methyl-propyl)-1(2-fluoro-5-nitrophenyl)isoquinoline-3-carboxamide]) в экстрактах митохондрий клеток CHO (Riond et al., 1989). Олигомеры TSPO также были обнаружены и другими авторами (Delavoie et al., 2003). В клетках Jurkat и лимфоцитах был обнаружен белок с мол. массой 36 кДа, что свидетельствует о наличии в этих клетках димера TSPO (Costa et al., 2006). Димерные и олигомерные формы могут образовываться в ответ на окислительный стресс в присутствии АФК. Сообщали, что, вероятно, из-за высокого уровня эндогенных свободных радикалов клетки агрессивного рака молочной железы человека содержат в основном димерную форму TSPO (Hardwick et al., 1999). Позже было сделано предположение, что АФК-индуцированное перекрестное связывание TSPO включает образование дитиозина, и TSPO может быть мишенью для АФК (Delavoie et al., 2003). В настоящем исследовании мономер и димер TSPO были обнаружены в клетках глиомы С6 дикого типа и с нокдауном по TSPO, но содержание TSPO в клетках с нокдауном было ниже. Можно предположить, что TSPO принимает участие в развитии опухолей.

Далее мы исследовали функциональное состояние митохондрий, изолированных из клеток обоих типов, измеряя скорость потребления кислорода в изолированных митохондриях в присутствии сукцината в качестве дыхательного субстрата. На рис. 2а показаны кривые дыхательной активности в состоянии 2, 3 и 4. Рис. 2б отражает количественные характеристики скоростей дыхания. На рисунке видно, что скорости потребления O_2 (V_2 -субстрат-зависимое дыхание не отличались в митохондриях, изолированных из клеток обоих типов, тогда как скорость потребления кислорода митохондриями в фосфорилирующем состоянии (V_3) снижалась в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6 с нокдауном

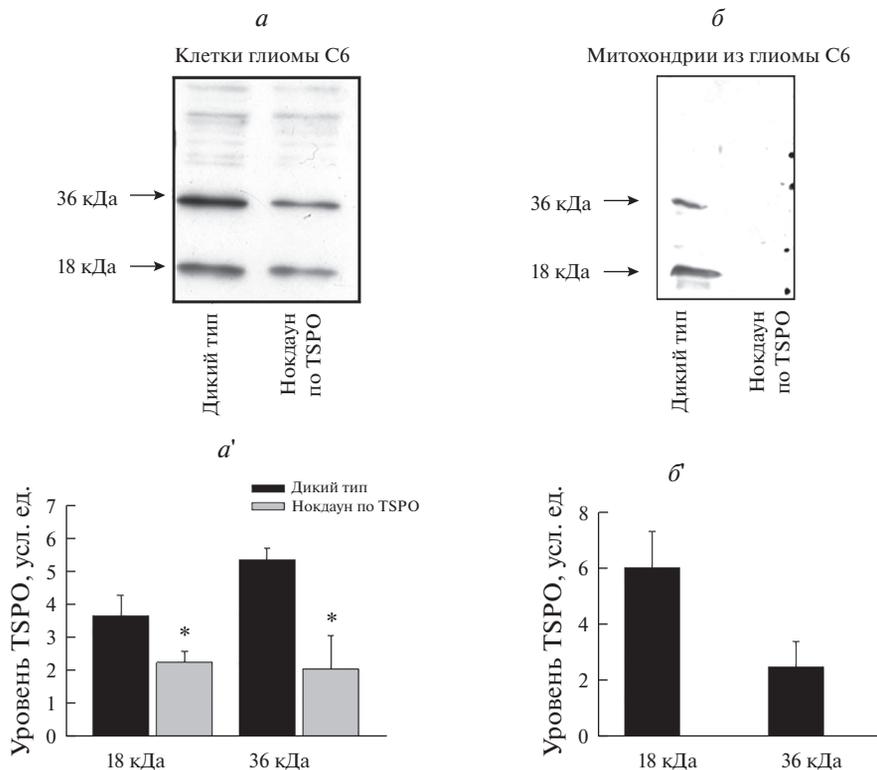


Рис. 1. Уровень TSPO в клеточных (*а, а'*) и митохондриальных (*б, б'*) лизатах клеток глиомы С6 (МГ) дикого типа и с нокдауном по TSPO. *а, б* – Иммуноблоты TSPO; *а', б'* – результаты денситометрии белковых полос, показанных соответственно на *а* и *б*. * Различия с соответствующим контролем достоверны при $P < 0.05$.

ном по TSPO на 30% по сравнению со значением V_3 в митохондриях клеток глиомы С6 дикого типа. Скорости потребления кислорода в состоянии 4, т.е. в восстановленном состоянии после истощения избытка АДФ (V_4) в митохондриях значимо не отличались. Дыхательный контроль (ДК) митохондрий, изолированных из клеток глиомы С6 с нокдауном по TSPO, снижался на 15% по сравнению с ДК в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6 дикого типа и составлял 3.43 и 4.01 соответственно.

В литературе есть данные о том, что в микроглии животных с нокдауном по TSPO наблюдается более низкий синтез АТФ и скорость потребления кислорода, чем в клетках дикого типа, что позволило авторам предположить, что дефицит TSPO может приводить к изменениям метаболической активности микроглии (Vanati et al., 2014). Исследование функционального состояния митохондрий, выделенных из обоих типов клеток глиомы С6, показало, что снижение уровня TSPO в клетках глиомы С6 сопровождается подавлением дыхательной способности митохондрий в состоянии 3 и снижением ДК, которое могло происходить из-за нарушения работы переносчиков электронов. Кроме того, снижение TSPO в лизатах и отсутствие белка в митохондриях из клеток глиомы С6 с нокдауном по TSPO могло привести к нарушению проницаемости мембраны.

Поэтому следующий этап нашей работы заключался в изучении изменения транспорта Ca^{2+} , пороговой концентрации Ca^{2+} (т.е. концентрации при которой происходит открытие мРТР) и мембранного потенциала при Ca^{2+} -индуцированном открытии мРТР в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6. При этом выясняли влияние снижения экспрессии TSPO в клетках глиомы С6 на функционирование мРТР в митохондриях и действие PPIХ на индукцию мРТР в митохондриях, изолированных из обоих типов клеток глиомы С6.

Ранее мы сообщали, что PPIХ индуцировал открытие мРТР в митохондриях, изолированных из мозга крыс (Krestinina et al., 2018).

На рис. 3а показаны кривые изменения транспорта Ca^{2+} при Ca^{2+} -индуцированном открытии мРТР в присутствии 1 мкМ PPIХ в обоих типах клеток. Как видно на рисунке, первое добавление Ca^{2+} (50 нмоль на 1 мг белка) во всех случаях приводило к устойчивому накоплению Ca^{2+} в митохондриях с последующим восстановлением. Однако после 5-ой добавки Ca^{2+} или после 4-ой в присутствии PPIХ к МГ дикого типа происходил выход Ca^{2+} из митохондрий. В МГ с нокдауном выход Ca^{2+} из митохондрий наблюдали после 4-ой добавки Ca^{2+} , а в присутствии PPIХ – после 3-ей.

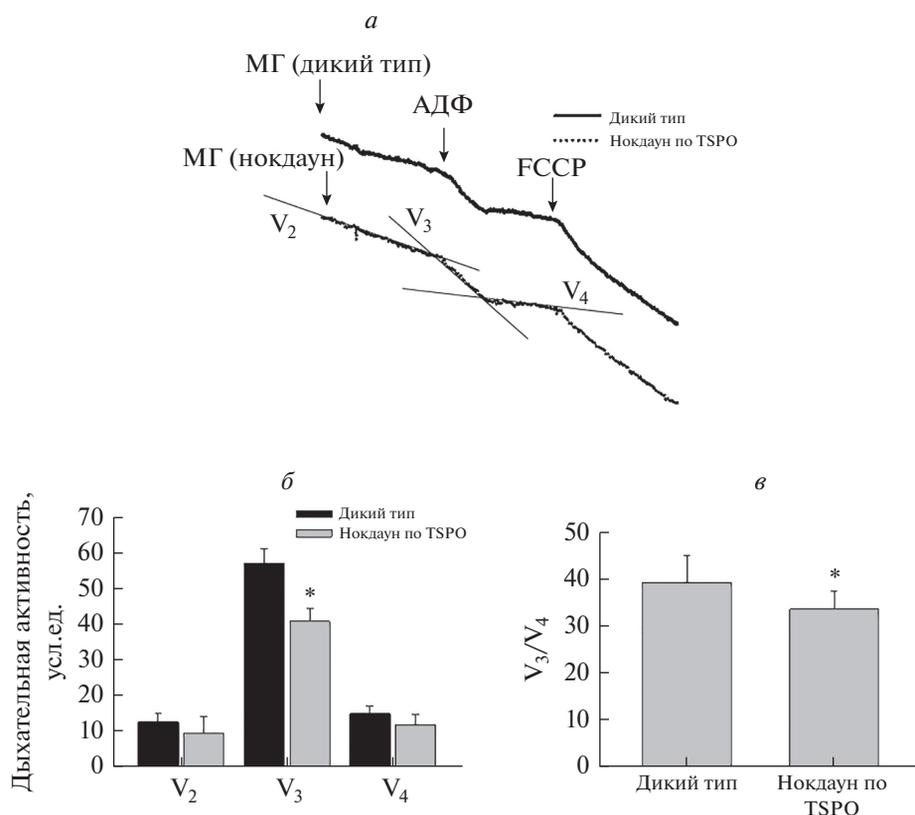


Рис. 2. Влияние TSPO на дыхательную активность в митохондриях клеток глиомы С6 дикого типа (МГ дикого типа) и с нокдауном по TSPO. *а* – Кривые изменения потребления кислорода митохондриями. Стрелками отмечены места добавления митохондрий, АДФ и FCCP (разобщителя митохондриального фосфорилирования). *б* – Показатели потребления кислорода в состоянии 2 (V_2), 3 (V_3) и 4 (V_4); потребление O_2 выражено в нг-атом O_2 за 1 мин на 1 мг белка. *в* – Дыхательный контроль (отношение V_3 к V_4); показаны средние значения и их стандартные отклонения из трех независимых экспериментов; * различие с контролем (дикий тип) достоверно при $P < 0.05$).

На рис. 3б, в показаны количественные изменения скорости входа Ca^{2+} после 1-ой ($V_1^{Ca^{2+}}$) и 2-ой ($V_2^{Ca^{2+}}$) добавок Ca^{2+} и изменение пороговой концентрации Ca^{2+} соответственно. В присутствии РРiX в МГ дикого типа, значение $V_1^{Ca^{2+}}$ снижалось на 40%, а $V_2^{Ca^{2+}}$ существенно не изменялось по сравнению с соответствующим контролем (МГ дикого типа). В МГ с нокдауном значение $V_1^{Ca^{2+}}$ снижалось на 35%, а $V_2^{Ca^{2+}}$ существенно не изменялось по сравнению с контролем (МГ дикого типа). Добавление Ca^{2+} к МГ с нокдауном в присутствии РРiX приводило к снижению $V_1^{Ca^{2+}}$ на 25%, а $V_2^{Ca^{2+}}$ – на 40% по сравнению с соответствующим контролем (МГ с нокдауном).

Пороговая концентрация Ca^{2+} в МГ с нокдауном снижалась на 50% по сравнению с МГ дикого типа. При добавлении РРiX к МГ дикого типа пороговая $[Ca^{2+}]$ снижалась на 35% по сравнению с этим параметром в МГ дикого типа, в то время как в МГ с нок-

дауном РРiX снижал этот параметр на 10% по сравнению с соответствующим контролем (МГ с нокдауном). РРiX индуцировал открытие мРТР в обеих клеточных линиях, однако в МГ с нокдауном по TSPO – в более низкой степени.

Параллельно с транспортом Ca^{2+} мы изучили изменение мембранного потенциала в тех же экспериментальных условиях. Рис. 4а отражает кривые распределения иона TPP^+ между митохондриальным матриксом и цитозолем при Ca^{2+} -индуцированном открытии мРТР. Количественные изменения в скорости входа TPP^+ в митохондрии после 1-ой ($V_1^{TPP^+}$) и 2-ой ($V_2^{TPP^+}$) добавок Ca^{2+} показаны на рис. 4б. В присутствии РРiX, в МГ дикого типа, значение $V_1^{TPP^+}$ снижалось на 23%, а $V_2^{TPP^+}$ на 20% по сравнению с соответствующим контролем (МГ дикого типа). В МГ нокдаун, значение $V_1^{TPP^+}$ снижалось на 60%, а $V_2^{TPP^+}$ – на 50% по сравнению с контролем (МГ дикого типа). РРiX не изменял значения $V_1^{TPP^+}$

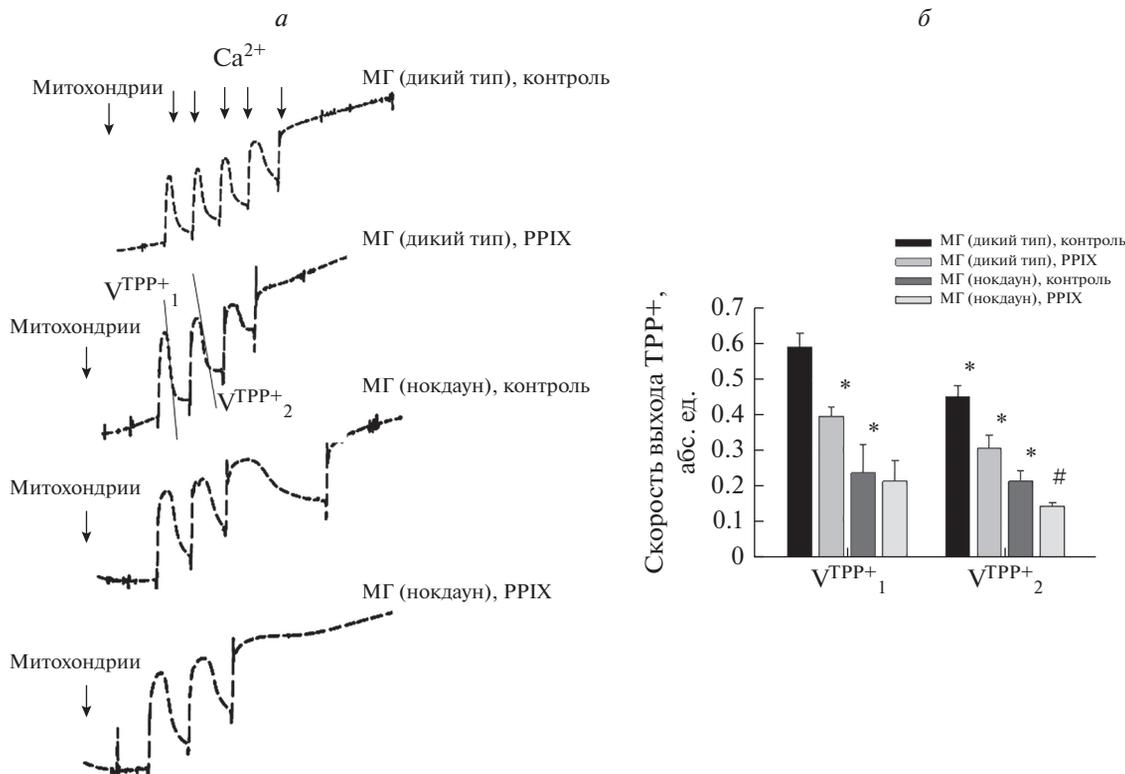


Рис. 3. Влияние нокдауна по TSPO на изменение мембранного потенциала в митохондриях (МГ), изолированных из клеток глиомы С6 дикого типа и с нокдауна по TSPO, в присутствии PPIX. *а* – Кривые распределения TPP⁺ при Ca²⁺-индуцированном открытии мРТР в митохондриях, изолированных из клеток обоих типов; *б* – скорость входа иона TPP⁺ в присутствии PPIX после 1-ой (V_{TPP+}¹) и 2-ой (V_{TPP+}²) добавок Ca²⁺. Различия с соответствующим контролем (* дикий тип без добавок или # соответствующее значение митохондриального параметра в клетках глиомы С6 с нокдауном по TSPO), достоверно при $P < 0.05$.

в МГ с нокдауном, однако значение V₂^{TPP+} снижалось на 20% по сравнению с соответствующим контролем (МГ с нокдауном).

Полученные результаты указывают на то, что подавление экспрессии гена TSPO связано со снижением емкости Ca²⁺ и скорости входа Ca²⁺ и TPP⁺ в МГ с нокдауном, которое привело к индукции открытия мРТР. Добавление PPIX к митохондриям, изолированных из глиомы С6 обоих типов, индуцировало открытие мРТР. Следует отметить, что стимулирующее действие PPIX на МГ дикого типа было сильнее, чем на МГ с нокдауном. Левин и соавторы (Levin et al., 2005) показали, что митохондриальные экстракты, полученные из клеток глиомы С6 с нокдауном по TSPO, более чем в 2 раза снижали способность связывать РК11195, экзогенный лиганд TSPO, по сравнению с клетками глиомы С6 дикого типа. В наших экспериментах мы наблюдали, что такая способность связывания эндогенного лиганда PPIX с TSPO также могла нарушаться из-за отсутствия TSPO в митохондриях, поэтому стимулирующее действие PPIX на МГ с нокдауном было более выраженным.

Белковое фосфорилирование (дефосфорилирование) считается одной из ключевых регуляторных

сигнальных систем, контролируемых многими аспектами клеточных функций (Lim et al., 2016). Ранее в митохондриях мозга крысы мы обнаружили белки, которые при функционировании мРТР изменяли уровень фосфорилирования: кальпаин с молекулярной массой 67 кДа (Baburina et al., 2021), фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов (46 кДа) (Azarashvili et al., 2014), изоформы миелинового основного белка (17 и 14.4 кДа) (Крестинина et al., 2013), субъединицу F₀F₁-АТФ-азы (3.5 кДа) (Azarashvili et al., 2002). Мы обнаружили, что открытие мРТР коррелировало с изменением степени фосфорилирования белков. В настоящей работе было изучено изменение уровней фосфорилирования мажорных белков с молекулярной массой 46, 14.4 и 3.5 кДа в митохондриях, изолированных из исследуемых типов клеток в присутствии и отсутствии PPIX.

На рис. 5а, б показана автордиограмма с включенной меченой [γ -³²P]АТФ в митохондриальные белки клеток глиомы С6 дикого типа, и в митохондриальные белки МГ с нокдауном. На этом же рисунке (а', б') показаны результаты денситометрии, отражающие количественные изменения уровней фосфорилирования белков. На рис. 5а показано, что уровень фосфорилирования белка с молекулярной

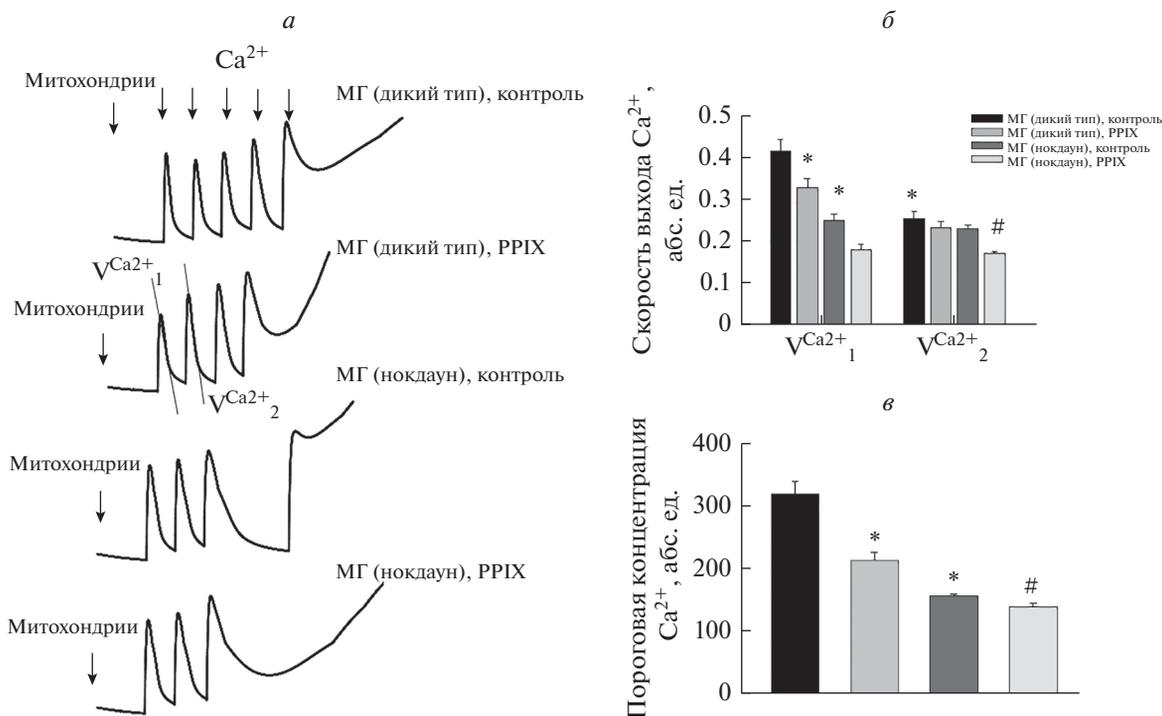


Рис. 4. Влияние нокдауна по TSPO в клетках глиомы С6 на изменение транспорта Ca²⁺ в митохондриях (МГ), изолированных из клеток дикого типа и с нокдауном по TSPO, в присутствии PPIX. *а* – Кривые транспорта Ca²⁺ в изолированных митохондриях; *б* – влияние PPIX на скорость входа Ca²⁺ в митохондрии в присутствии PPIX после 1- и 2-ой добавки Ca²⁺ к митохондриям (V_{Ca²⁺¹}, V_{Ca²⁺²} соответственно); *в* – изменение пороговой концентрации Ca²⁺ в митохондриях. клетки глиомы С6 дикого типа являются контролем; показаны средние значения и их стандартные отклонения из трех независимых экспериментов; различие с контролем (* дикий тип без добавок или #соответствующее значением митохондриального параметра в клетках глиомы С6 с нокдауном по TSPO), достоверно при $P < 0.05$.

массой 46 кДа в МГ дикого типа увеличивался при Ca²⁺-индуцированном открытии мРТР на 60%, уровень белка с молекулярной массой 14.4 кДа не изменялся, а с молекулярной массой 3.5 кДа снижался на 45% по сравнению с контролем (без Ca²⁺-индукции). PPIX усиливал степень включения [γ-³²P]АТФ в белок 46 кДа в 4 раза, в белок 14.4 кДа – на 50%, но снижал уровень фосфорилирования белка 3.5 кДа на 50% по сравнению с контролем (без Ca²⁺-индукции). Добавление Ca²⁺ к митохондриям, инкубированным с PPIX (МГ дикого типа), снижало уровень фосфорилирования белков 46 и 3.5 кДа на 50%, но существенно не изменяло уровень фосфорилирования белка 14.4 кДа по сравнению с действием только PPIX (без Ca²⁺).

На рис. 5б показано, что в МГ с нокдауном при Ca²⁺-индуцированном открытии мРТР уровень фосфорилирования белка 46 кДа не изменялся, тогда как уровень белка 14.4 кДа в этих условиях повышался на 20%, а белка 3.5 кДа снижался на 45% по сравнению с контролем (без Ca²⁺). Добавление PPIX привело к повышению уровня фосфорилирования белка 46 кДа в 2 раза и снижению степени включе-

ния [γ-³²P]АТФ в белок 14.4 кДа на 25%, а в белок 3.5 кДа – на 40% по сравнению с контролем (без Ca²⁺). В присутствии PPIX при Ca²⁺-индуцированном открытии мРТР степень включения [γ-³²P]АТФ в белок 46 кДа не изменялась, в белок 14.4 кДа – повышалась на 40% и снижалась на 20% в случае белка 3.5 кДа по сравнению с действием одного PPIX (без Ca²⁺).

Несмотря на то, что TSPO участвует в различных биологических функциях, регуляторные пути, связанные с ним, а также первичные механизмы действия TSPO мало изучены. Ранее мы наблюдали, что некоторые мембранно-связанные белки в митохондриях мозга и печени крыс подвергались фосфорилированию, регулируемому Ca²⁺, как вторичным мессенджером (Azarashvili et al., 2002). Более того, было установлено, что уровень фосфорилирования сильно изменялся при Ca²⁺-индуцированном открытии мРТР. В настоящей работе мы предположили, что поскольку PPIX при функционировании мРТР может модулировать фосфорилирование белков, то TSPO можно считать важным участником в регуляции клеточного выживания. На основании полу-

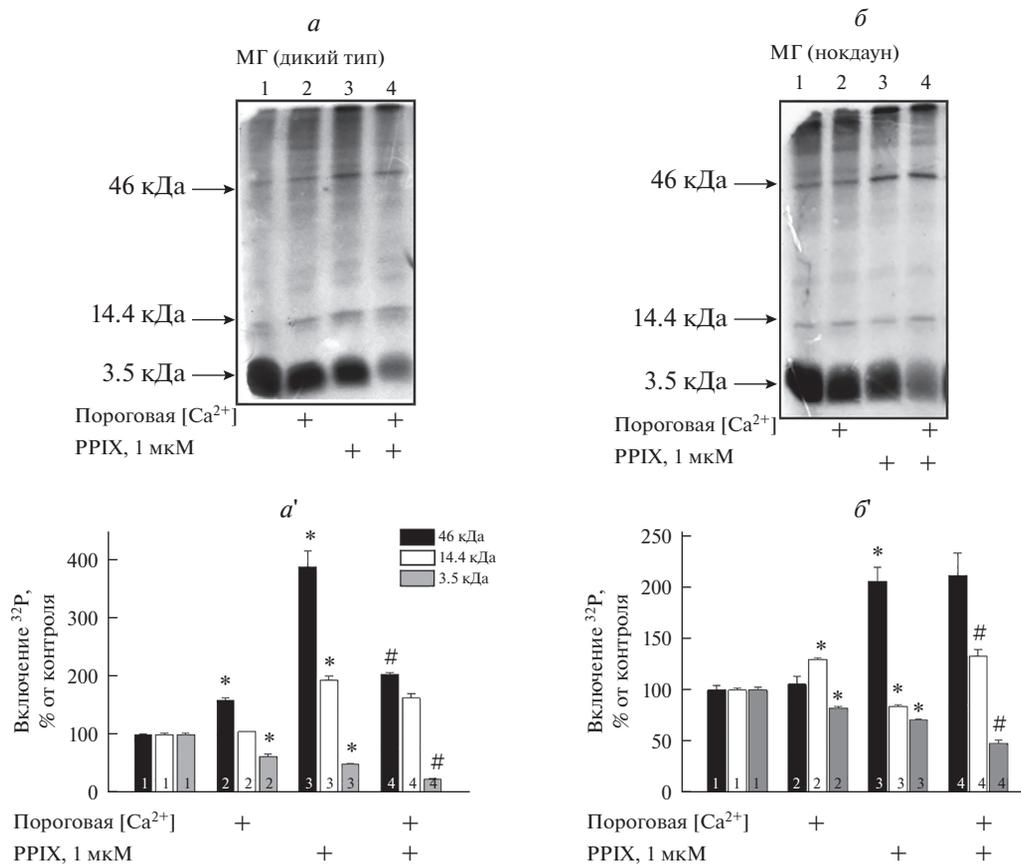


Рис. 5. Влияние РРІХ на изменение степени включения $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ в белки с молекулярной массой 46, 14.4 и 3.5 кДа митохондрий (МГ) из клеток глиомы С6 дикого типа (*а, а'*) и с нокдауном по TSPO (*б, б'*) при открытии мРТР. Пороговая концентрация Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) – это та концентрация, при которой происходит открытие мРТР. *а, б* – Авторадиограмма включения меченой $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$. *а', б'* – Диаграмма, отражающая уровень фосфорилирования белков в митохондриях, изолированных их клеток глиомы С6 дикого типа и с нокдауном по TSPO соответственно; изменение достоверно по сравнению с (*) соответствующим значением в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6 дикого типа и с нокдауном по TSPO, или по сравнению с (#) соответствующим значением в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6 дикого типа и с нокдауном по TSPO в присутствии РРІХ) при $P < 0.05$.

ченных результатов, мы предполагаем, что TSPO может выполнять дополнительную роль в качестве модулятора фосфорилирования митохондриальных белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, мы изучили участие TSPO в функционировании мРТР. Объектом исследования были митохондрии, изолированные из клеток глиомы С6 дикого типа и с нокдаун по TSPO. В клеточных лизатах обоих типов клеток обнаружены мономер и димер TSPO. Поскольку в клетках глиомы С6 со сниженной экспрессией TSPO уровень как мономерного, так и димерного белка снижался, мы предположили, что TSPO способен участвовать в развитии опухолей. Дыхательный контроль в митохондриях, изолированных из клеток со сниженной экспрессией TSPO был ниже, чем в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6 дикого типа. Кроме того, поро-

вая концентрация Ca^{2+} в митохондриях, изолированных из клеток с нокдауном по TSPO снижалась, что ускоряло открытие мРТР, а РРІХ (лиганд TSPO) стимулировал открытие мРТР. Изменение мембранного потенциала коррелировало с изменением пороговой $[\text{Ca}^{2+}]$. При функционировании мРТР, РРІХ был способен модулировать фосфорилирование белков, и мы предположили, что TSPO можно считать важным регулятором клеточного выживания. На основании полученных результатов, мы предполагаем, что TSPO является важным белком в развитии и выживании клетки и может участвовать в функционировании мРТР.

БЛАГОДАРНОСТИ

В настоящей работе были использованы приборы ЦКП Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (№ 075-01027-22-00).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Крестинина О.В., Грачев Д.Е., Одинокова И.В., Райзер Г., Евтодиенко Ю.В., Азарашвили Т.С.* 2009. Влияние лигандов периферического бензодиазепинового рецептора (PBR/TSPO) на открытие Ca^{2+} -индуцированной поры и фосфорилирование 3.5 кДа-полипептида в митохондриях мозга крыс. *Биохимия*. Т. 74. № 4. С. 522. (*Krestinina O.V., Grachev D.E., Odinokova I.V., Reiser G., Evtodienko Y.V., Azarashvili T.S.* 2009. Effect of peripheral benzodiazepine receptor (PBR/TSPO) ligands on opening of Ca^{2+} -induced pore and phosphorylation of 3.5-kDa polypeptide in rat brain mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*. V. 74. № 4. P. 421.)
- Крестинина О.В., Бабурина Ю.Л., Гордеева А.Е., Азарашвили Т.С.* 2013. Идентификация фосфорилированных форм основного белка миелина, ассоциированных с митохондриями. *Нейрохимия*. Т. 30. № 4. С. 321. (*Krestinina O.V., Makarov P.R., Baburina Y.L., Gordeeva A.E., Azarashvili T.S.* 2013. The identification of phosphorylated forms of myelin basic protein associated with mitochondria. *Neurochemical J.* V. 7. № 4. P. 284.)
- Azarashvili T., Grachev D., Krestinina O., Evtodienko Y., Yurkov I., Papadopoulos V., Reiser G.* 2007. The peripheral-type benzodiazepine receptor is involved in control of Ca^{2+} -induced permeability transition pore opening in rat brain mitochondria. *Cell Calcium*. V. 42. P. 27.
- Azarashvili T., Krestinina O., Galvita A., Grachev D., Baburina Y., Stricker R., Reiser G.* 2014. Identification of phosphorylated form of 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNase) as 46 kDa phosphoprotein in brain non-synaptic mitochondria overloaded by calcium. *J. Bioenerg. Biomembr.* V. 46. P. 135.
- Azarashvili T., Krestinina O., Odinokova I., Evtodienko Y., Reiser G.* 2003. Physiological Ca^{2+} level and Ca^{2+} -induced Permeability Transition Pore control protein phosphorylation in rat brain mitochondria. *Cell Calcium*. V. 34. P. 253.
- Azarashvili T.S., Tuynela J., Odinokova I.V., Grigorjev P.A., Baumann M., Evtodienko Y.V., Saris N.E.* 2002. Phosphorylation of a peptide related to subunit c of the F_0F_1 -ATPase/ATP synthase and relationship to permeability transition pore opening in mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* V. 34. P. 279.
- Baburina Y., Sotnikova L., Krestinina O.* 2021. Identification of phosphorylated calpain 3 in rat brain mitochondria under mPTP opening. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 10613.
- Banati R.B., Middleton R., Chan R.J., Hatty C.R., Kam W.W., Quin C., Graeber M.B., Parmar A., Zahra D., Callaghan P., Fok S., Howell N.R., Gregoire M., Szabo A., Pham T., Davis E., Liu G.J.* 2014. Positron emission tomography and functional characterization of a complete PBR/TSPO knockout. *Nat. Commun.* V. 5. P. 5452.
- Campanella M., Szabadkai G., Rizzuto R.* 2008. Modulation of intracellular Ca^{2+} signalling in HeLa cells by the apoptotic cell death enhancer PK11195. *Biochem. Pharmacol.* V. 76. P. 1628.
- Costa B., Salvetti A., Rossi L., Spinetti F., Lena A., Chelli B., Rechichi M., Da Pozzo E., Gremigni V., Martini C.* 2006. Peripheral benzodiazepine receptor: characterization in human T-lymphoma Jurkat cells. *Mol. Pharmacol.* V. 69. P. 37.
- Crompton M., Costi A.* 1990. A heart mitochondrial Ca^{2+} -dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *Biochem. J.* V. 266. P. 33.
- Delavoie F., Li H., Hardwick M., Robert J.C., Giatzakis C., Peranzi G., Yao Z.X., Maccario J., Lacapere J.J., Papadopoulos V.* 2003. In vivo and in vitro peripheral-type benzodiazepine receptor polymerization: functional significance in drug ligand and cholesterol binding. *Biochemistry*. V. 42. P. 4506.
- Gatliff J., East D., Crosby J., Abeti R., Harvey R., Craigen W., Parker P., Campanella M.* 2014. TSPO interacts with VDAC1 and triggers a ROS-mediated inhibition of mitochondrial quality control. *Autophagy*. V. 10. P. 2279.
- Gavish M., Bachman I., Shoukrun R., Katz Y., Veenman L., Weisinger G., Weizman A.* 1999. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol. Rev.* V. 51. P. 629.
- Hardwick M., Fertikh D., Culty M., Li H., Vidic B., Papadopoulos V.* 1999. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. *Cancer Res.* V. 59. P. 831.
- Javadov S., Karmazyn M.* 2007. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol. Biochem.* V. 20. P. 1.
- Kowalczyk P., Sulejczak D., Kleczkowska P., Bukowska-Osko I., Kucia M., Popiel M., Wietrak E., Kramkowski K., Wrzosek K., Kaczynska K.* 2021. Mitochondrial oxidative stress – a causative factor and therapeutic target in many diseases. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 13384.
- Krestinina O.V., Baburina Y.L., Odinokova I.V., Azarashvili T.S., Akatov V.S.* 2018. Melatonin Modulates Phosphorylation of 2',3'-Cyclic Nucleotide-3'-Phosphodiesterase in the Presence of Protoporphyrin IX in the Brain Mitochondria of Rats during the Functioning of the Non-Specific Mitochondrial Pore. *Neurochem. J.* V. 12. P. 33.
- Levin E., Premkumar A., Veenman L., Kugler W., Leschiner S., Spanier I., Weisinger G., Lakomek M., Weizman A., Snyder S.H., Pasternak G.W., Gavish M.* 2005. The peripheral-type benzodiazepine receptor and tumorigenicity: isoquinoline binding protein (IBP) antisense knockdown in the C6 glioma cell line. *Biochemistry*. V. 44. P. 9924.
- Leissring M.A., Farris W., Wu X.N., Christodoulou D.C., Haggis M.C., Guarente L., Selkoe D.J.* 2004. Alternative translation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria. *Biochem. J.* V. 383. P. 439.
- Lim S., Smith K.R., Lim S.T., Tian R., Lu J., Tan M.* 2016. Regulation of mitochondrial functions by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Biosci.* V. 6. P. 25.

- Nunnari J., Suomalainen A.* 2012. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. V. 148. P. 1145.
- Papadopoulos V., Baraldi M., Guilarte T.R., Knudsen T.B., Lacapere J.J., Lindemann P., Norenberg M.D., Nutt D., Weizman A., Zhang M.R., Gavish M.* 2006. Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci.* V. 27. P. 402.
- Riond J., Vita N., Le Fur G., Ferrara P.* 1989. Characterization of a peripheral-type benzodiazepine-binding site in the mitochondria of Chinese hamster ovary cells. *FEBS Lett.* V. 245. P. 238.
- Singh V., Ram M., Kumar R., Prasad R., Roy B.K., Singh K.K.* 2017. Phosphorylation: implications in cancer. *Protein J.* V. 36. P. 1.
- Takeyama N., Matsuo N., Tanaka T.* 1993. Oxidative damage to mitochondria is mediated by the Ca²⁺-dependent inner-membrane permeability transition. *Biochem. J.* V. 294. P. 719.
- Yoshioka E., Chelakkot V.S., Licursi M., Rutihinda S.G., Som J., Derwish L., King J.J., Pongnopparat T., Mearow K., Larijani M., Dorward A.M., Hirasawa K.* 2018. Enhancement of Cancer-Specific Protoporphyrin IX Fluorescence by Targeting Oncogenic Ras/MEK Pathway. *Theranostics.* V. 8. P. 2134.

The Participation of a Translocator Protein in the Induction and Regulation of Permeability Transition Pore Opening in Mitochondria from C6 Glioma Cells

Yu. L. Baburina^a, L. D. Sotnikova^a, and O. V. Krestinina^a, *

^a*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia*

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

Translocator protein (TSPO), formerly called the peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR), is an 18 kDa protein localized in the outer mitochondrial membrane and involved in cell proliferation and apoptosis. In the present work, we found TSPO as a monomer and dimer in C6 rat glioma cells. We have shown that a reduced level of TSPO expression in cells affects the induction of a mitochondrial permeability transition pore (mPTP). A decrease in TSPO expression stimulated the Ca²⁺-induced opening of mPTP. The natural endogenous TSPO ligand protoporphyrin IX (PPIX) accelerated the opening of mPTP. The stimulatory effect of PPIX was stronger in the mitochondria isolated from wild type C6 glioma cells than in mitochondria isolated from C6 glioma cells with TSPO knockdown. Phosphorylation of membrane receptors, ion channels, and transcription factors is an important intracellular signaling event responsible for the regulation of various enzymes and many cellular functions. In the present study, PPIX modulated protein phosphorylation. We hypothesized that TSPO is an important protein in the regulation of cell survival and may be involved in the functioning of mPTP.

Keywords: mitochondria, C6 glioma cells, oxidative stress, mitochondrial permeability transition pore (mPTP), protoporphyrin IX (PPIX), translocator protein (TSPO)

УДК 616-77

ОЦЕНКА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО СОСУДИСТОГО ИМПЛАНТАТА НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМОЙ МАТРИЦЫ И МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*

© 2022 г. Г. И. Попов¹, *, В. Н. Вавилов¹, П. В. Попрядухин², Г. Ю. Юкина¹, Е. Г. Сухорукова¹, А. А. Давыдов¹, Е. М. Иванькова², А. Е. Крюков², Н. В. Смирнова^{2,3}, В. Е. Юдин^{2,3}

¹Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022 Россия

²Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, 199004 Россия

³Санкт-Петербургский государственный политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251 Россия

*E-mail: trek-4300@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.05.2022 г.

После доработки 02.07.2022 г.

Принята к публикации 11.07.2022 г.

С целью создания тканеинженерного сосудистого имплантата получена биорезорбируемая трубчатая матрица из поли(L-лактида) и разработан метод посева и культивирования на ней мезенхимных стромальных клеток. В группе 1 крысам в брюшную аорту имплантировали матрицы без клеточного материала; в группе 2 – матрицы с предварительно культивированными мезенхимными клетками жировой ткани крысы. Сроки наблюдения в группе 1 составляли от 2 сут до 64 нед. ($n = 36$), в группе 2 – до 72 нед. ($n = 42$). Проходимость графтов в группе 1 составила 86%, в группе 2 – 97%. Морфологическое исследование имплантатов первой группы выявило постепенную биодеградацию биополимера и замещение волокон полимера соединительной тканью, однако после достижения тотальной резорбции полимера через 64 нед. во всех наблюдениях отмечено образование аневризмы зоны реконструкции. В группе 2 в имплантате определяли большее число клеток и вокруг него формировалась более толстая неоадвентиция, однако морфологическая картина на поздних сроках наблюдения качественно не отличалась от таковой в группе 1. На поздних сроках наблюдения во второй группе в четырех из девяти наблюдений (45%) развилась аневризма имплантата. Таким образом, предварительное культивирование мезенхимных стромальных клеток на матрице привело к выраженной клеточной реакции со стороны организма реципиента, что вероятно позволило снизить частоту образования аневризм, однако не обеспечило формирования структуры естественного сосуда.

Ключевые слова: тканевая инженерия, искусственный сосуд, биорезорбируемые матрицы, поли(L-лактид), мезенхимные стромальные клетки жировой ткани

DOI: 10.31857/S0041377122060098

В настоящее время согласно статистическим данным в мире продолжается рост сердечно-сосудистой заболеваемости (World health statistics 2021: Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/342703>). Основным хирургическим методом лечения остаются реконструктивные операции с использованием синтетических протезов или аутологических сосудов. Альтернативой имеющемуся пластическому материалу является разработка тканеинженерного сосудистого имплантата. Кон-

цепция его создания заключается в применении трех составляющих: биорезорбируемой матрицы, клеточного материала и сигнального воздействия механической и биологической природы (Sullivan et al., 2000). Предполагается, что под влиянием последних произойдет заселение клетками матрицы, их пролиферация и дифференцировка, что в совокупности с биорезорбцией материала каркаса приведет к формированию нового сосуда с морфологией естественного.

Ранее нами разработана относительно простая и эффективная методика посева и культивирования мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (МСК-ЖТ) на матрице из поли(L-лактида) (ПЛА) (Попов и др., 2018). Необходимость предваритель-

Принятые сокращения: ГМКИТ – гигантские многоядерные клетки инородных тел; МСК-ЖТ – мезенхимные стромальные клетки (МСК) жировой ткани (ЖТ); ПЛА – поли(L-лактид).

ного посева клеточного материала на матрицу до сих пор остается спорным вопросом (Villalona et al., 2010; Row et al., 2017), для решения которого требуется проведение длительных хронических экспериментов с этапной оценкой гистологических данных, описанием основных процессов формирования новой сосудистой стенки и определения роли посеянных мезенхимных и соматических клеток реципиента.

Цель настоящей работы заключалась в изучении процессов формирования новой сосудистой стенки тканеинженерного имплантата малого диаметра на основе биодеградируемой матрицы из ПЛА *in vivo* и оценке роли предварительно культивированных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Получение матрицы. Пористые трубчатые 3D-матрицы получали из ПЛА Purasorb PL-10 (Corbion Purasorb, Нидерланды). ПЛА растворяли в трихлорметане (хлороформе) (Sigma-Aldrich, США), концентрация раствора составляла 15%. Полученные растворы с помощью инжекторного насоса подавали через электрод-фильтр в электрическое поле с напряженностью $E = 1.5 \times 10^4 - 4 \times 10^5$ В/м при расстоянии между электродами 0.15 м, осаждение микроволокон происходило на цилиндрическом электроде диаметром 1.1 мм. Скорость вращения последнего составляла 1500 об./мин. Затем выполняли термообработку в фиксированном состоянии (Porquyadukhin et al., 2017).

Изучение структуры матрицы. Исследование образцов для определения распространения тканей в матрице и процессов резорбции осуществляли на сканирующем электронном микроскопе Supra 55VP (Carl Zeiss, Германия) в режиме регистрации вторичных электронов с предварительным нанесением тонкого слоя платины.

Стерилизация и хранение образцов. Стерилизацию матриц проводили низкотемпературной плазмой (35–60°C) и парами пероксида водорода в плазменном стерилизаторе (DGM Z200, Швейцария). Хранение образцов осуществляли в морозильной камере (при –24°C) для предупреждения их самопроизвольной кристаллизации и деструкции.

Получение и культивирование клеток. Использовали первичную культуру мезенхимных стромальных клеток (МСК) жировой ткани (ЖТ) крысы (МСК-ЖТ). Белую ЖТ, полученную методом липэктомии, подвергали гомогенизации, ферментативной обработке 0.2%-ным раствором коллагеназы (Sigma, США) и центрифугированию. Выделенные клетки культивировали в питательной среде MEM AlphaModification (Gibco, США), содержащей 15% фетальной сыворотки телят (Gibco, США) и антибиотиков: 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США). Культивирование стромальных клеток производили в CO₂-инкубаторе (Thermo Fisher

Scientific, 3423, США) в атмосфере с влажностью 70%, содержанием CO₂ 5% и температурой 37°C. Использовали традиционную методику селекции по адгезии к пластику (Zhu et al., 2013).

Посев и культивирование клеток на матрице. Посев МСК-ЖТ на матрицу производили ранее разработанным фильтрационным способом; последующее динамическое культивирование проводили в разработанном проточном биореакторе в течение 7 сут (Попов и др., 2018). В этот период через внутренний просвет матрицы непрерывно прокачивалась культуральная среда в пульсовом режиме. Далее матрица переносилась в CO₂ инкубатор и последующее культивирование проходило в пробирке с культуральной средой в течение 7 сут. После окончания срока культивирования матрицу промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и в транспортном термостатированном контейнере доставляли в течение 30 мин в операционную.

Эксперименты на животных. Эксперименты *in vivo* проводили на самцах белых крыс породы Wistar в соответствии с правилами работ на экспериментальных животных (Хельсинская декларация Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными 1996 г.). Операции выполняли под общей интраперитонеальной анестезией (растворы: 0.1 мл Zoletil 100 и 0.0125 мл Rometar (20 мг/мл) из расчета на 0.1 кг массы животного). Выполняли Y-образную лапаротомию, мобилизацию инфаренального отдела аорты, ее протезирование биодеградируемым протезом. В группе 1 ($n = 36$) имплантировали матрицу из ПЛА без предварительного культивирования МСК-ЖТ, сроки наблюдения в этой группе составили 2 сут, 1, 2, 4, 12, 24, 48, 56 и 64 нед. (по 4 животных для каждого срока). В группе 2 ($n = 42$) применяли матрицу с МСК, сроки наблюдения составляли: 2 сут, 1, 2, 4, 12, 24, 48, 56, 64 (по 4 животных для каждого срока) и 72 нед. (6 животных). Антикоагулянты и дезагреганты не использовали. Проподимость оценивали с помощью классической методики – последовательное пережатие микрохирургическим пинцетом сосуда ниже дистального анастомоза, сдавливание крови в сосуде вторым пинцетом в каудальном направлении, контрольный запуск кровотока с оценкой скорости заполнения сосуда кровью (Acland, 1972). После операции животных содержали в виварии в отдельных клетках при свободном доступе к пище и воде. Проводили наблюдение за цветом и температурой кожных покровов задних конечностей животных, а также их двигательной активностью.

Морфологическое исследование. Материал фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине на PBS (рН 7.4) в течение 24 ч и обезвоживали с помощью изопропилового спирта и петролейного эфира. Срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозинном (Биовитрум, Россия). Визуализацию соединительной ткани осуществляли методом Маллори

(Биовитрум, Россия). Микроскопический анализ проводили с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Германия), используя окуляр 10× и объективы с увеличением 4×, 10×, 40× и 100×. Запись цифровых изображений выполняли с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия).

Морфометрическое исследование. Толщину неointимы и неоадвентиции, подсчет клеток производили на изображениях имплантата с помощью программы ImageScore Color (версия M), используя окуляр 10× и объектив 40×. Исследование выполняли на препаратах с продольным сечением матрицы. В одном поле зрения (0.3×0.25 мм) считали число ядер клеток во внутренней и наружной половинах стенки матрицы. Для этого проводили вертикальную линию длиной, равной толщине стенки матрицы. Программа автоматически определяла ее середину, далее чертили горизонтальную линию, которая разделяла стенку матрицы на две равные половины (внутреннюю и наружную). Клетки считали в каждой матрице по описанной схеме.

Иммуногистохимическое исследование. Для выявления макрофагов использовали первичные моноклональные мышинные антитела Anti-CD68 (ab 31630; Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 1000 при комнатной температуре и экспозиции длительностью 1 ч. Для выявления связавшихся первичных антител использовали мультимерную безбиотиновую систему детекции (D&A, Reveal-Biotin-Free Polyvalent DAB, Spring Bioscience Corporation, США). Препараты докрашивали гематоксилином Майера (Биовитрум, Россия).

Для выявления актин-содержащих клеток после стандартной процедуры депарафинирования срезов препараты обрабатывали мышинными моноклональными антителами к гладкомышечному альфа-актину (клон 1A4, разведение 1 : 2000) (AbCam, Великобритания) в течение 10 мин при комнатной температуре. В качестве вторичных реагентов применяли набор MACH2 Mouse (Biocare medical, США). Для визуализации продукта иммуногистохимической реакции препараты обрабатывали 3',3'-диаминобензидином (DAB+, Dako, Дания).

Флуоресцентная микроскопия матриц из ПЛА с мезенхимными стромальными клетками жировой ткани. Треки МСК-ЖТ *in vivo* отслеживали с помощью метки РКН-26 (Sigma, США) согласно протоколу производителя.

Флуоресцентную микроскопию в красном спектре проводили на микроскопе LSM 5 Pascal (Carl Zeiss, Германия).

Статистический анализ. Полученные результаты обрабатывали с использованием статистической программы Statistica 7.0 Stat.Soft for Windows. Значимость различий оценивали с помощью критерия знаковых рангов Уилкоксона для независимых выборок, различия считали значимыми при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Структура матрицы. Полученная матрица имела внутренний диаметр 1.1 мм и толщину стенки 250 ± 11 мкм. По данным электронной микроскопии ее стенка состоит из микроволокон ПЛА диаметром 2.5 ± 0.5 мкм. Волокна не имеют определенной ориентации, между ними располагаются поры размером 55 ± 12 мкм. Последнее соответствует среднему размеру МСК и превышает таковые всех соматических клеток крысы.

Посев и культивирование клеток на матрице. Фильтрационный посев МСК-ЖТ приводил к распределению клеток во всем объеме матрицы. Формировался градиент их распространения от максимального на внутренней поверхности трубки до минимального на ее внешней поверхности. Последующее культивирование в условиях проточного биореактора приводило к распространению клеток во внешние слои графта (Попов и др., 2018). Таким образом, удалось добиться равномерного распределения клеток в объеме матрицы.

Эксперименты на животных. Проведение опытов по протезированию брюшной аорты в первой группе не вызывало больших трудностей. Среднее время выполнения оперативного вмешательства составило 92.5 ± 11.3 мин. При манипулировании протезом в операционной ране не происходило значимой его деформации, при прокалывании и проведении атравматической иглы дефекты не образовывались, при формировании и затягивании узлов стенка графта не прорезывалась.

В группе 2 среднее время операции составило 98.3 ± 12.9 мин и требовало максимальной аккуратности и внимательности, так как стенка ПЛА матрицы после 14 сут культивирования в питательной среде становилась более мягкой. После пуска кровотока в обеих группах происходило пропитывание стенки матрицы элементами крови и фибрином, что приводило к изменению окраски матрицы на красный цвет, однако значимого кровотечения сквозь стенку матрицы и в области анастомозов не было. В первые сутки после операции животные начинали активно двигать задними конечностями; признаков ишемии не наблюдали. Пройодимость имплантатов в группе 1 составляла 86%; пять раз зарегистрировали тромбоз матрицы: на 3 сут ($n = 3$) и на 7 сут ($n = 2$) после операции. В группе 2 проходимость имплантатов составила 97%: тромбоз в отсутствие признаков ишемии задних конечностей зарегистрирован на 2-ой неделе эксперимента при заборе материала.

Макроскопическая оценка сосудистых графтов. Макроскопически у животных обеих групп на всех сроках выведения в зоне имплантации матрицы отсутствовали признаки острого воспаления и какие-либо патологические изменения окружающих тканей. Органы брюшной полости и забрюшинного пространства имели нативный вид. Лимфоаденопатии не было. Рубцовые процессы в области операции не выра-

жены. Снаружи имплантаты покрывались тонкой соединительнотканной капсулой (неоадвентицией) с множеством мелких сосудов. С течением времени окраска матриц приобретала оттенки нативных тканей (рис. 1, 2).

В группе 1 через 64 нед. во всех случаях в зоне имплантации ПЛА матрицы развились аневризмы различной степени выраженности (рис. 1а). В группе 2 образование аневризмы в зоне операции зарегистрировано в одном случае через 56 нед. ($n = 4$), в двух случаях — через 64 нед. ($n = 4$), а также в двух случаях отмечено образование аневризмы через 72 нед. ($n = 6$), тогда как интактные имплантаты по своему внешнему виду не отличались от брюшной аорты крысы (рис. 2а).

Флуоресцентная микроскопия. В группе 2 через 2, 7 и 14 сут после операции при флуоресцентной микроскопии в красном спектре выявляли МСК-ЖТ в стенке матрицы, меченные красителем РКН-26; последние преобладали в ее внутренних слоях. С течением времени отмечено снижение интенсивности сигнала. Через 14 сут регистрировали единичные меченые МСК-ЖТ.

Гистологическое исследование. На 2-е сут эксперимента в препаратах обеих групп отсутствовали признаки острой воспалительной реакции. Внутренняя поверхность графтов выстлана неравномерным слоем фибрина, заполняющим также пространство между волокнами полимера. В стенке матриц выявляли нейтрофилы, лимфоциты, лейкоциты и эритроциты. В группе 1 в наружной половине стенки матрицы определяли 85 ± 10.2 , во внутренней — 47.2 ± 5.6 клеток в поле зрения. В группе 2 наблюдали большее число клеток и практически равномерное их распределение в наружной и во внутренней частях стенки матрицы: 159.8 ± 13.7 и 154.2 ± 12.9 клеток соответственно в поле зрения (рис. 3). Снаружи поверхность матриц окружена единичными фибробластами, лимфоцитами и макрофагами. Наличие последних более отчетливо прослеживали в препаратах группы 2.

На сроках 1–2 нед. после имплантации гистологическая картина не претерпевала значимых изменений. В зоне анастомозов выявляли распространение эндотелиальных клеток с аорты на графт. Наружная и внутренняя части стенки матрицы были заселены клетками: в группе 1 — 127.0 ± 7.1 и 62.2 ± 7.5 соответственно в поле зрения, а в группе 2 — 170.0 ± 10.3 и 120.5 ± 10.5 соответственно в поле зрения (рис. 3). На этих сроках эксперимента в обеих группах выявляли α -актин-содержащие клетки (миофибробласты и гладкомышечные), располагающиеся в формирующемся субэндотелиальном слое и в неоадвентиции, а также единичные среди волокон матрицы. Отметим, что в группе 2 α -актин-содержащих клеток больше, и они располагаются во всей стенке матрицы. В обеих группах CD-68⁺-клетки (макрофаги, моноциты, гигантские многоядерные клетки инородных тел

(ГМКИТ)) равномерно распределены в стенке матрицы. Они выявляются непосредственно вокруг волокон полимера, при этом в неоадвентиции ГМКИТ формируют неравномерный вал вдоль поверхности матрицы. Отличительной особенностью имплантатов группы 2 является развитие выраженной неоадвентиции вокруг матрицы. Клеточный состав последней представлен фибробластами, макрофагами, единичными ГМКИТ и лимфоцитами.

Через 4 нед. эксперимента в зоне анастомозов определяли ровный переход интимы с брюшной аорты на матрицу без признаков миоинтимальной гиперплазии. Вся внутренняя поверхность матрицы выстлана эндотелием. Субэндотелиальный слой выражен слабо. Число клеток в стенке матрицы по-прежнему превалировало в группе 2, где наблюдали их равномерное распределение (рис. 3). Отметим, что α -актин-содержащие клетки в обеих группах преобладали в субэндотелиальном слое, но также встречались в неоадвентиции. С этого срока наблюдения отмечали более равномерное распространение CD-68⁺-клеток в основном в наружной половине стенки матрицы и неоадвентиции, гораздо чаще встречались ГМКИТ. В группе 1 большую часть клеток также регистрировали в наружной части стенки матрицы. Более толстую неоадвентицию выявляли вокруг имплантатов группы 2. Неоадвентиция содержала многочисленные кровеносные сосуды, по краю графта располагались ГМКИТ.

Через 12 нед. эксперимента в обеих группах в зоне анастомозов интима брюшной аорты ровно переходит на интралюминальную поверхность матрицы. Неоинтима состоит из эндотелиальных клеток и сформированного субэндотелиального слоя, представленного α -актин-содержащими клетками. Расположение CD-68⁺-клеток в стенке матрицы соответствует таковому на предыдущем сроке. Выявляются первые признаки биорезорбции полимера матрицы в обеих группах: отдельные волокна распадаются на фрагменты. В группе 2 клеток в матрице больше и, в отличие от группы 1, они равномерно распределены по всему объему графта (рис. 3). По внешнему краю имплантатов группы 2 располагались многочисленные ГМКИТ, снаружи они покрыты более толстой неоадвентицией, содержащей множество сосудов (табл. 1).

Через 24 нед. эксперимента в имплантатах обеих групп продолжает увеличиваться толщина неоинтимы (табл. 1). При этом в зоне анастомозов с брюшной аортой признаки миоинтимальной гиперплазии отсутствуют. В остальном гистологическая картина соответствует вышеописанной.

В группе 1 через 64 нед. ($n = 4$) эксперимента стенка имплантата представлена соединительной тканью и резидуальными фрагментами волокон ПЛА. На внутренней поверхности сформирована неоинтима, состоящая из эндотелия и субэндотелиального слоя с α -актин-содержащими клетками

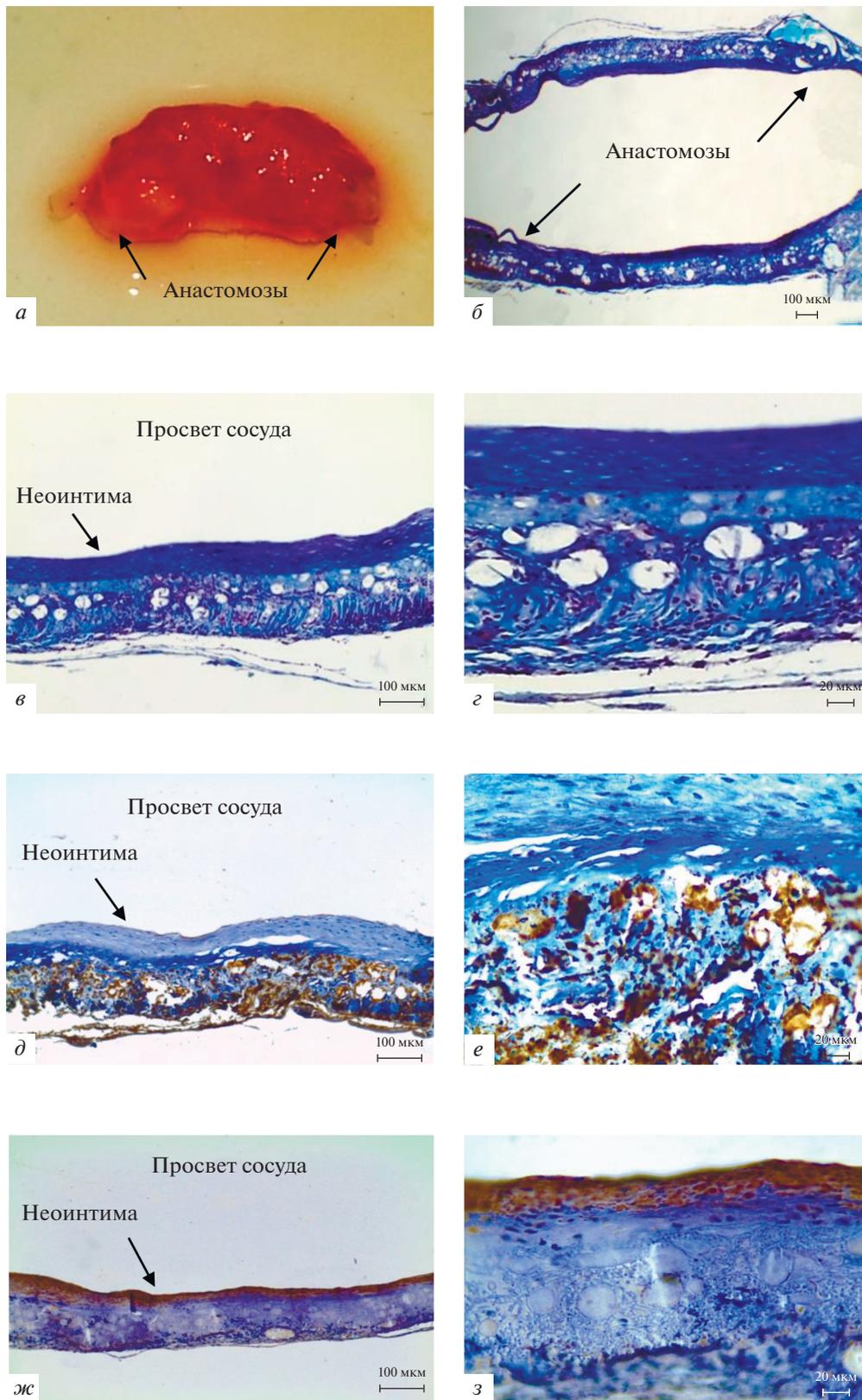


Рис. 1. Тканеинженерный сосудистый имплантат, полученный на основе матрицы из поли(L-лактида) (ПЛА) через 64 нед. после имплантации (группа 1). *а* – Фотография имплантата. *б–з* – Гистологические препараты: *б–з* – окраска по Маллори; *д, е* – иммуногистохимическое (ИГХ) выявление антигена к CD-68 (коричневый цвет); *ж, з* – ИГХ-выявление антигена к α -SMA (коричневый цвет). Увел. об.: 4 \times (*б*), 10 \times (*в, д, ж*), 40 \times (*з, е, з*); *и, к* – электронная микроскопия имплантата.

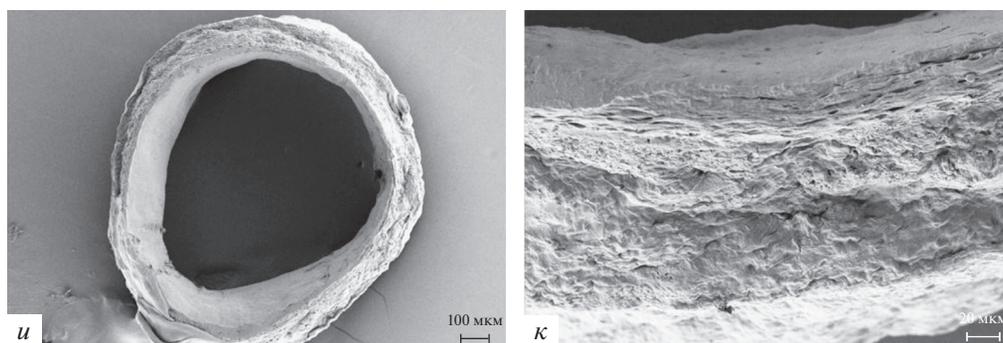


Рис. 1. Окончание

(рис. 1б, г, ж, з). Неомедия и неоадвентиция представлены в основном фибробластами, волокнами соединительной ткани и единичными α -актин-содержащими клетками. Клетки CD-68⁺ в подавляющем большинстве располагаются преимущественно в стенке матрицы и в составе неоадвентиции на границе с полимером (рис. 1в, д, е). В группе 2 через 72 нед. ($n = 6$) стенка имплантатов, в которых не было аневризмы ($n = 4$), представлена неоинтимой, основным средним слоем, сформированным на месте ПЛА матрицы, и толстой неоадвентицией (рис. 2). Неоинтима на внутренней поверхности графта состояла из эндотелиальных клеток и субэндотелиального слоя, выполненного из фибробластов, гладкомышечных клеток и коллагеновых волокон. Основным средним слоем представлен фибробластами и фиброцитами, и волокнами соединительной ткани (в основном коллагеновыми). Между ними выявлялись фрагменты полимера. Неоадвентиция состоит в основном из коллагеновых волокон, в ней определяются в небольшом количестве лимфоциты, макрофаги и ГМКИТ. В неоадвентиции отмечено формирование *vasa vasorum*. Дальнейшего увеличения числа клеток в стенке и толщины неоадвентиции не

происходит (рис. 3). В случае образования аневризмы зоны реконструкции выявляли истонченную стенку, состоящую из фибробластов, остатков ПЛА и единичных коллагеновых волокон.

ОБСУЖДЕНИЕ

Применение разработанных матриц в качестве сосудистых протезов показало их высокую надежность. При работе в операционной ране и выполнении сосудистого анастомоза не нарушалась целостность стенки графтов. Несмотря на их высокую пористость, после пуска кровотока не развивалось кровотечение сквозь стенку или по линии анастомоза. Проприодимость имплантатов в группе 1 составляла 86%; в группе 2 – 97%. Высокие показатели проходимости, вероятно, обусловлены наличием неоинтимы, которая состояла из эндотелия, распространяющегося на поверхность матрицы из зон анастомозов с брюшной аортой, и вновь сформированного субэндотелиального слоя. При этом здесь во всех случаях отсутствовали признаки миоинтимной гиперплазии, что, скорее всего, объясняется высокой пористостью, множеством переплетающихся мик-

Таблица 1. Морфометрическое исследование неоинтимы и неоадвентиции в имплантированных матрицах

Время, нед.	Толщина неоинтимы, мкм		Толщина неоадвентиции, мкм	
	Группа 1	Группа 2	Группа 1	Группа 2
2 сут	–	–	–	–
1	8.6 ± 1.8	9.1 ± 1.8	152 ± 10.3	636.0 ± 12.7 ^а
2	9.5 ± 1.2	10.3 ± 2.0	336.1 ± 13.4	684.0 ± 7.8 ^б
4	11.9 ± 1.1	13 ± 1.4	525.8 ± 15.4	728.4 ± 15.9 ^в
12	23.1 ± 4.1	28.4 ± 3.1	616.2 ± 19.6	932.0 ± 44.1 ^г
24	75.6 ± 8.5	95.6 ± 3.4	621.2 ± 11.8	961.6 ± 23.9 ^д
48	357.6 ± 13.0	327 ± 13.5	652.6 ± 10.5	818.0 ± 27.5 ^е
64	366.2 ± 13.0	299 ± 11.2	654.2 ± 11.4	821.0 ± 19.3 ^ж

Отличия от аналогичных показателей в группе 1 статистически значимы при: ^а $P = 0.0285$, ^б $P = 0.0285$, ^в $P = 0.0285$, ^г $P = 0.0285$, ^д $P = 0.0285$, ^е $P = 0.0285$, ^ж $P = 0.0285$.

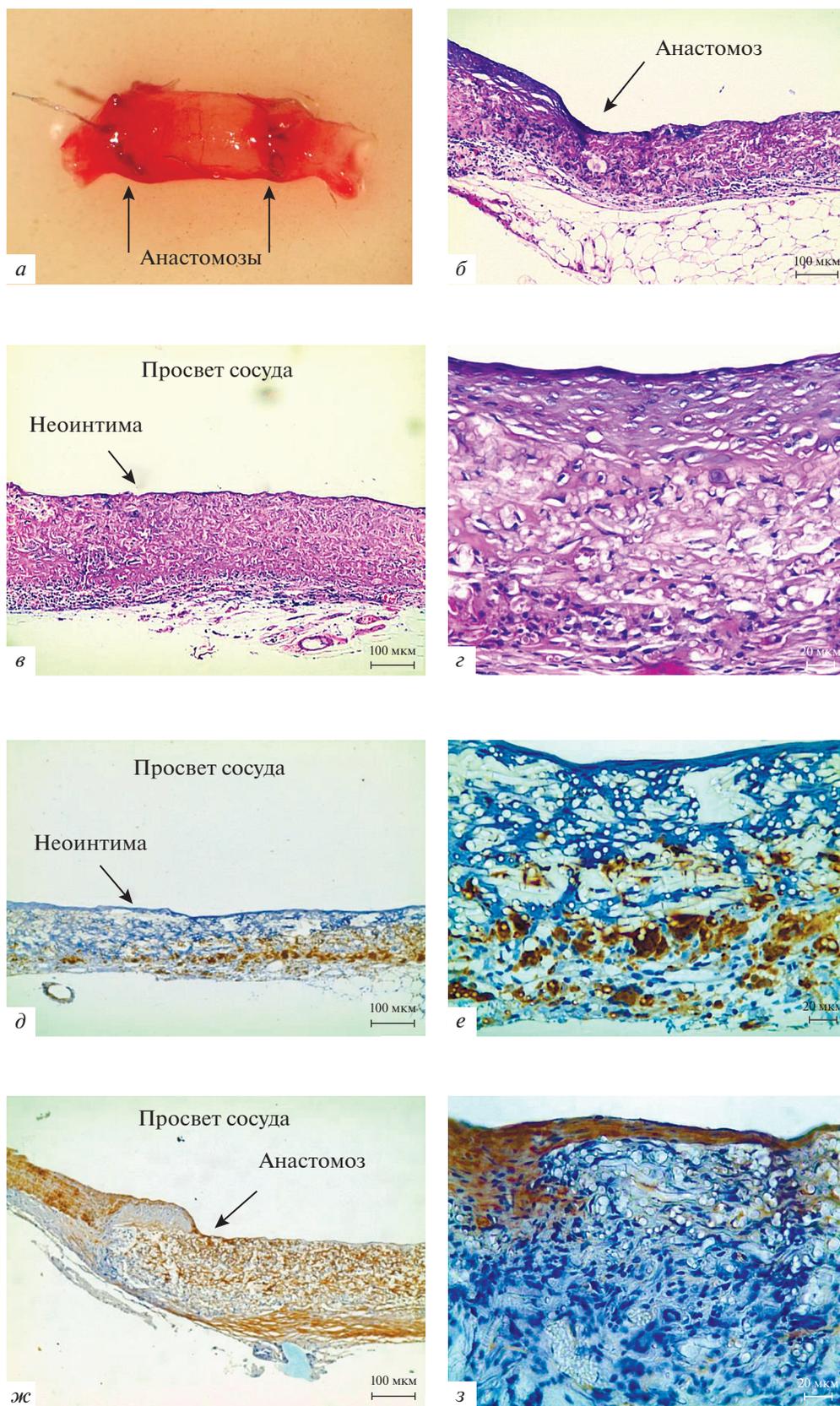


Рис. 2. Тканеинженерный сосудистый имплантат, полученный на основе матрицы из ПЛА и МСК-ЖТ через 72 нед. после имплантации (группа 2). *а* – Фотография имплантата. *б–з* – Гистологические препараты: *б–г* – окраска гематоксилином-эозином; *д, е* – ИГХ-выявление антигена к CD-68 (коричневый цвет); *ж, з* – ИГХ-выявление антигена к α SMA (коричневый цвет). Увел об.: $10\times$ (*б, в, д, ж*) или $40\times$ (*г, е, з*).

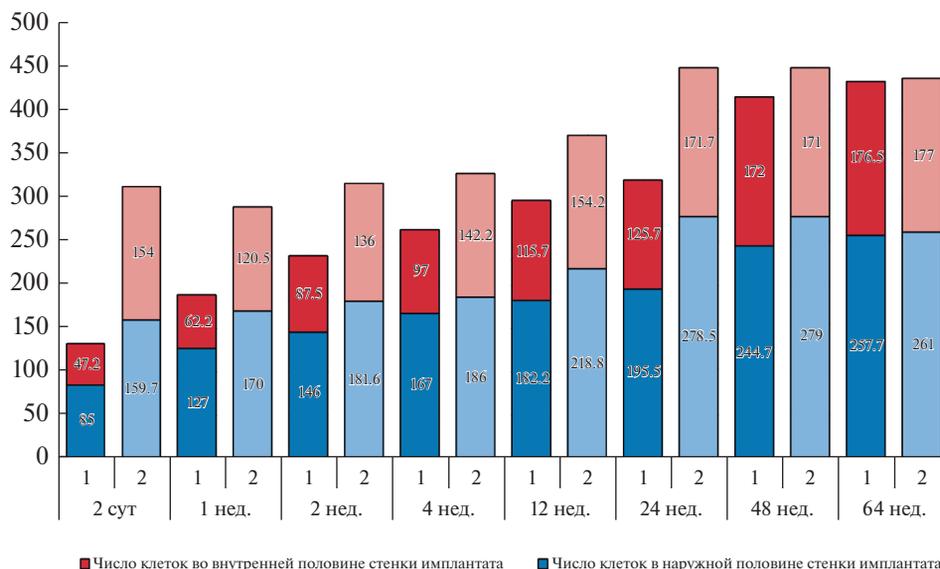


Рис. 3. Морфометрические показатели препаратов групп 1 и 2 (2 сут.–64 нед.). На столбцах указано число клеток в наружной (синий и голубой цвета) и внутренней (красный и розовый цвета) половинах стенки имплантата.

роволокон и постепенной биодеградацией матрицы (Курьянов и др., 2008). Высокий уровень проходимости в группе 2, вероятно, обусловлен супрессией адгезии тромбоцитов мезенхимными стромальными клетками за счет наличия на их поверхности гепарансульфат-протеогликанов (Hashi et al., 2007; Krawiec, Vogt, 2012).

Гистологическое исследование имплантатов выявило различия двух групп на ранних сроках наблюдения. В группе 1 происходило постепенное проникновение клеток (фибробласты, макрофаги) в стенку матрицы с ее наружной поверхности, тогда как в группе 2 отмечали присутствие клеток в большом количестве и равномерное их распределение в стенке матрицы. Возможным объяснением являются цитокины и факторы роста (VEGF, bFGF, PDGF-BB, TGF- β и пр.), секретируемые культивированными на матрице МСК и привлекающие клетки соединительной ткани (Калинина, 2011). Другим вероятным механизмом может быть изменение свойств полимера (в частности) и матрицы в целом после длительного культивирования в питательной среде (например, увеличение гидрофильности), а также присутствие элементов среды в стенке матрицы. Рекрутирование клеток реципиента также привело к быстрому образованию более толстой неоадвентиции на наружной поверхности матрицы.

Однако на поздних сроках не наблюдали значимого качественного различия в морфологии имплантатов.

Иммуногистохимическое исследование выявило неспецифический иммунный ответ на инородное тело в виде распространения CD-68⁺-клеток в зоне расположения полимера. Основной средний слой

имплантатов после тотальной резорбции полимера представлен соединительной тканью, при этом α -актин-содержащие клетки (гладкомышечные, миофибробласты) отчетливо находили только в субэндотелиальном слое и неоадвентиции. В итоге аневризма имплантата формировалась в группе 1 во всех случаях через 16 мес., а в группе 2 – в 4 из 9 наблюдений (45%) на поздних сроках. Последнее, по-видимому, обусловлено вышеописанной разницей в динамике формирования новой сосудистой стенки.

Таким образом, разработанные биодеградируемые матрицы малого диаметра пригодны для имплантации в сосудистое русло. Предварительное культивирование на них МСК-ЖТ приводит к повышению показателей проходимости, привлечению клеток реципиента в структуру имплантата и формированию толстой соединительнотканной неоадвентиции, однако не обеспечивает образования структуры естественного сосуда. В настоящее время предварительное культивирование соматических клеток на матрице *in vitro* (эндотелиальных, гладкомышечных) представляется возможным решением этой насущной задачи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-73-30003).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа с животными выполнена в соответствии с правилами использования экспериментальных животных (согласно принципам Европейской конвенции, Страсбург, 1986 г. и Хельсинской декларации Всемирной меди-

цинской ассоциации о гуманном обращении с животными, 1996 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Парфенова Е.В., Ткачук. 2011. Мезенхимальные стромальные клетки в процессах роста и репарации тканей. *Acta naturae*. Т. 3. № 4. С. 32. (Kalinina N.I., Sysoeva V.Yu., Rubina K.A., Parfenova E.V., Tkachuk. 2011. Mesenchymal stem cells in the processes of tissue growth and repair. *Acta naturae*. V. 3. № 4. P. 32.)
- Курьянов П.С., Разуваев А.С., Вавилов В.Н. 2008. Гиперплазия интимы в зоне сосудистого анастомоза. Ангиология и сосудистая хирургия. Т. 14. № 4. С. 146. (Kuryanov P.S., Razuvaev A.S., Vavilov V.N. 2008. Intimal hyperplasia in the area of vascular anastomosis. *Angiol. Vascular Surgery*. V. 14. № 4. P. 146.)
- Попов Г.И., Крюков А.Е., Попрыдухин П.В., Нащекина Ю.А., Иванькова Е.М., Вавилов В.Н., Юдин В.Е., Смирнова Н.В. 2018. Выбор оптимальных методов посева и культивирования мезенхимных стволовых клеток на биоразлагаемой матрице из L-полилактида. *Цитология*. Т. 60. № 4. С. 279. (Popov G.I., Kryukov A.E., Popryadukhin P.V., Naschekina Yu.A., Ivankova E.M., Vavilov V.N., Yudin V.E., Smirnova N.V. 2018. Determining optimal methods of cell seeding and cultivation on l-poly lactide biodegradable scaffold. *Tsitologiya*. V. 60. № 4. P. 279.)
- Acland R.D. 1972. Signs of patency in small vessel anastomosis. *Surgery*. V. 72. P. 744.
- Hashi C.K., Zhu Y., Yang G., Young W.L., Hsiao B.S., Wang K., Chu B., Li S. 2007. Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 104. P. 11915.
- Krawieca J.T., Vorp D.A. 2012. Adult stem cell-based tissue engineered blood vessels: A review. *Biomaterials*. V. 33. P. 3388.
- Popryadukhin P.V., Popov G.I., Yukina G.Yu., Dobrovolskaya I.P., Ivan'kova E.M., Vavilov V.N., Yudin V.E. 2017. Tissue-engineered vascular graft of small diameter based on electrospun polylactide microfibers. *Int. J. Biomater.* Article ID 9034186. <https://doi.org/10.1155/2017/9034186>
- Row S., Santandreu A., Swartz D.D., Andreadis S.T. 2017. Cell-free vascular grafts: Recent developments and clinical potential. *Technology (Singap. World Sci.)*. V. 5. P. 13.
- Sullivan S.J., Brockbank K.G.M. 2000. Small-diameter vascular grafts. In: *Principles of tissue engineering*. Second edition. Acad. Press. P. 447.
- Villalona G.A., Udelsman B., Duncan D.R., McGillicuddy E., Sawh-Martinez R.F., Hibino N., Painter C., Mirensky T., Erickson B., Shinoka T., Breuer C.K. 2010. Cell-seeding techniques in vascular tissue engineering. *Tiss. Eng. Part B. Rev.* V. 16. P. 341.
- Zhu Y., Carido M., Meinhardt A., Kurth T., Karl M.O., Ader M., Tanaka E.M. 2013. Three-dimensional neuroepithelial culture from human embryonic stem cells and its use for quantitative conversion to retinal pigment epithelium. *PLoS One*. V. 8. P. e54552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054552>

Evaluation of Tissue-Engineered Vascular Grafts Based on the Biodegradable Scaffold and Mesenchymal Stem Cells in the Long-Term *in vivo* Experiment

G. I. Popov^{a, *}, V. N. Vavilov^a, P. V. Popryadukhin^b, G. Yu. Yukina^a, E. G. Sukhorukova^a, A. A. Davydov^a, E. M. Ivankova^b, A. E. Kryukov^{b, c}, and V. E. Yudin^{b, c}

^a*Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, 197022 Russia*

^b*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199004 Russia*

^c*Peter the Great St. Petersburg State Polytechnic University, St. Petersburg, 195251 Russia*

*e-mail: trek-4300@yandex.ru

In order to create a tissue-engineered vascular graft, the bioresorbable tubular scaffold from poly(L-lactide) and the method for mesenchymal stem cells seeding and culturing were developed. In group 1, scaffolds without pre-seeded cells were implanted into the abdominal rat aorta; in group 2 scaffolds with pre-cultured rat adipose-derived mesenchymal cells were used. Follow-up in the group 1 was from 2 days to 64 weeks ($n = 36$), in the group 2 up to 72 weeks ($n = 42$). Patency in the group 1 – 86% (31/36), in the group 2 – 97% (41/42). Histology revealed gradual polymer biodegradation and replacement with connective tissue, however, after 64 weeks a total polymer resorption was achieved and an aneurysm formation was noted in all cases in the group 1. Cells amount and neoadventitia thickness were above in the group 2, however the graft morphology did not fundamentally differ from the group 1. Aneurysm formation was noted only in 45% of grafts at the later stages of follow-up in the group 2. Thus, the preliminary cultivation of mesenchymal stem cells on the scaffold led to a pronounced host cellular reaction, which probably made it possible to reduce the incidence of aneurysm formation, but did not ensure the formation of a natural vessel structure.

Keywords: tissue engineering, artificial vessel, bioresorbable scaffold, poly(L-lactide), adipose-derived mesenchymal stem cells

УДК 576.524

ДЕЙСТВИЕ ПРОНАЗЫ НА НЕРВНЫЕ ГАНГЛИИ МОЛЛЮСКА, ПИЯВКИ И ЛЯГУШКИ ВЫЗЫВАЕТ ОБРАЗОВАНИЕ НЕЙРОННО-НЕЙРОНАЛЬНЫХ ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ

© 2022 г. О. С. Сотников^{1, *}, С. С. Сергеева¹, Н. М. Парамонова²¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

*E-mail: ossotnikov@mail.ru

Поступила в редакцию 05.03.2022 г.

После доработки 11.05.2022 г.

Принята к публикации 13.05.2022 г.

Впервые при помощи электронной микроскопии изучено действие проназы на нервные ганглии моллюска, пиявки и лягушки. Выявлено, что действие проназы вызывает ретракцию и удаление глиальных оболочек, денудацию нервных волокон и тел нейронов с одновременным сближением нейромембран этих структур и приводит к образованию щелевых контактов (ЩК). Такое действие проназы на мембраны относится к ряду необычных, непредвиденных функций, а наблюдаемый эффект был получен нами впервые. Так как нами ранее при таких же условиях в ганглиях лягушки и пиявки была зарегистрирована реверберация нервного импульса, мы полагаем, что полученные морфологические данные представляют собой доказательство формирования электрических синапсов (ЭС) при действии проназы на нервные ганглии.

Ключевые слова: электрические синапсы, щелевые контакты, проназа, нервные ганглии, септы

DOI: 10.31857/S0041377122060104

Общепризнанной функцией протеаз является протеолиз – ферментативный гидролиз амидных связей в белках и пептидах, в связи с этим протеазы используются при выделении отдельных клеток для создания культуры ткани (Сотников, Костенко, 1981). Долгое время функции протеолитических ферментов связывали исключительно с их ролью в деструкции, в катаболических процессах (Антонов, 1991). Однако оказалось, что функции протеаз этим не ограничиваются (Kerstein et al., 2017). Привлекают внимание и регуляторные функции этих ферментов. Так, активный протеолиз в химическом синапсе признан ключевым фактором в управлении динамическими изменениями формы и функции дендритных шипиков (Magnowska et al., 2016). Металлопротеазы, увеличивая внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , способствуют активации ветвления (арборизации) нейритов (Allen et al., 2016).

Хотя существует огромный выбор протеолитиков для экспериментов в биологии и эти ферменты обладают высокой специфичностью, мы считали целесообразным использовать проназу, т. к. она представляет собой комплекс нескольких протеаз одновременно. В качестве объектов для исследования действия прона-

зы были выбраны нервные ганглии моллюска, пиявки и симпатический ганглий лягушки, морфологические и электрофизиологические характеристики которых хорошо известны.

В настоящее время щелевые контакты (ЩК) однозначно признаны жизненно важным компонентом в схемах мозга млекопитающих. В обзорах последних лет отмечается их важность и широкое распространение (Alcamí, Pereda, 2019; Ixmatlahua et al., 2020; Thomas et al., 2020). Изучение целого ряда свойств и морфологических особенностей ЩК в мозге *in vivo* сдерживает ряд факторов, главным из которых считается экспериментально сложная доступность к нервным клеткам, и незначительное количество ЩК в объеме мозга. Работы в основном проведены на мышах, нокаутных по коннексинам (Cx36, Cx45, Cx26), и с применением их блокаторов (Wang, Belousov, 2011; Xu et al., 2020; Wang, Wu, 2021; Talukdar et al., 2022). Сложнее провести морфологическое изучение структур ЩК, крайне редких в мозге. Считается, что ЩК и плотные контакты (ПК) между нейромембранами позволяют только косвенно определять их функциональную роль (Кириченко и др., 2008). Некоторые авторы описывают частично слившиеся мембраны нейронов и волокон под названием ЩК, даже не подозревая, что такой же функцией обладают межнейронные перфорации

Принятые сокращения: ЩК – щелевой контакт; ПК – плотный контакт; ЭС – электрический синапс.

(синцитии) (Fontes et al., 2015; Spray et al., 2019; Nakagawa, Hosoya, 2019). ЩК в нейромембранах не только осуществляют метаболическую связь между нейронами, они способствуют упорядочиванию высокочастотной нервной импульсации, вместо одного импульса могут формировать серию (Сергеева и др., 2020; Сотников, 2021).

Целью работы было исследование на ультраструктурном уровне экспериментально полученных с помощью проназы ЩК, которые по всем морфологическим критериям соответствуют классическим, известным структурам ЭС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили ганглии моллюска (*Lymnaea stagnalis*) ($n = 5$), ганглии мозга медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis* L.) ($n = 6$) и симпатический ганглий травяной лягушки (*Rana temporaria*) ($n = 6$). Использовали 0.4% раствор проназы (лиофилизированная проназа из *Streptomyces griseus*, Serva, Германия) в который помещали ганглии на 60 мин.

Для электронно-микроскопического исследования нервные ганглии фиксировали в течение 1 ч в охлажденном растворе 2.5%-ного глутарового альдегида (Acros Organics, США) и 4%-ного параформальдегида, приготовленном на 0.1 М какодилатном буфере (рН 7.2–7.4), затем в 1%-ном растворе охлажденной четырехокиси осмия (Sigma-Aldrich, Германия). После дегидратации в растворах этилового спирта восходящей концентрации и абсолютном ацетоне образцы заливали в смесь аралдитов (аралдит М, аралдит Н, аралдит В, дибутилфталат) (Fluka, Швейцария). Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB-5 (Швеция) и контрастировали методом тройного контрастирования (цитрат свинца, уранил ацетат, цитрат свинца) (Sigma-Aldrich, Германия). Просмотр и фотосъемку проводили в электронном микроскопе FEI Tecnai G² Spirit BioTWIN (Нидерланды) при напряжении 80 кВ, предоставленном Центром коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Количество качественных снимков равнялось до 50 экземпляров в каждой серии экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы провели эксперименты на нервных ганглиях моллюска, брюшном мозге медицинской пиявки и симпатическом ганглии лягушки. При анализе контрольного материала мы не обнаружили ЩК на наших препаратах. Как известно, ЩК встречаются крайне редко. После обработки материала проназой, во всех видах ганглиев отмечается неспецифический процесс разрушения и удаления из ганглия глиальных оболочек. Оставшиеся незначительные фрагменты отростков глиоцитов сокращаются и образу-

ют варикозные расширения (рис. 1а), которые можно видеть, в частности, в щелях, оставшихся после протеолиза глиоцитов (рис. 1б). Многие нервные волокна, лишённые глиоцитов, прилегают друг к другу на обычном межклеточном расстоянии, равном 20 нм. Другие противолежачие мембраны нервных волокон образуют ЩК или ПК. На некоторых препаратах мозга лягушки после обработки проназой ЩК образуются почти между всеми соседними клетками (рис. 2). Особенность мембран при обработке проназой состоит в том, что белки аксолеммы со временем при денатурации, агрегируя с мембраной, существенно утолщают ее поверхностные образования (“бахрома”) и маскируют светлую полосу, соответствующую гидрофобным жирным кислотам билипидной мембраны, и ее наружные контуры.

В случае образованных глиоцитами оболочек нервных клеток и волокон ЩК выявляются на всех препаратах. Внутри щели бахромы часто маскирует слой билипидных мембран. По бокам ЩК нередко наблюдаются расширения межклеточного пространства (рис. 3), которые, по-видимому, формируются за счет скопления “свободной воды”, образующейся в результате процесса протеолиза мембранных белков. Обращает на себя внимание также и большое количество одиночных локальных ЩК (рис. 4). Их щели заполнены осмиофильными белковыми агрегатами, маскирующими семислойное строение ЩК. Встречаются и множественные, серийные ЩК в форме цепочки (рис. 5). Они расположены последовательно на пресинапсах.

На ультраструктурном уровне контакты между нейронами моллюска, лягушки и пиявки имеют сходное строение. Их число достигает шести на одном нейрите. При этом следует вновь обратить внимание на многочисленные почти сплошные семислойные ЩК. На рис. 5 наряду с множественными ЩК представлены химические синапсы, характерной особенностью которых является отсутствие типичных пресинаптических и постсинаптических хеморецепторных специализаций в области скопления синаптических пузырьков, что является последствием протеолиза.

Удивительно, но в результате действия проназы, комплекса протеолитических ферментов, формируются межклеточные септы, представляющие собой агрегаты межнейрональных белков (рис. 6). Иногда они имеют сходные размеры и чередуются, располагаясь примерно на одном расстоянии друг от друга. Встречается небольшое количество и узких белковых глиально-нейрональных мостиков (рис. 6). Межклеточные белковые околосмембранные агрегаты локализируются поперек мембран и имеют утолщения на своих концах. Они выпячиваются и внутрь, и наружу от обеих мембран, маскируя размеры межклеточной щели и, по-видимому, нарушая ее изоляционную функцию. В тех случаях, когда прослеживается межклеточная щель, можно отметить, что обе мембраны

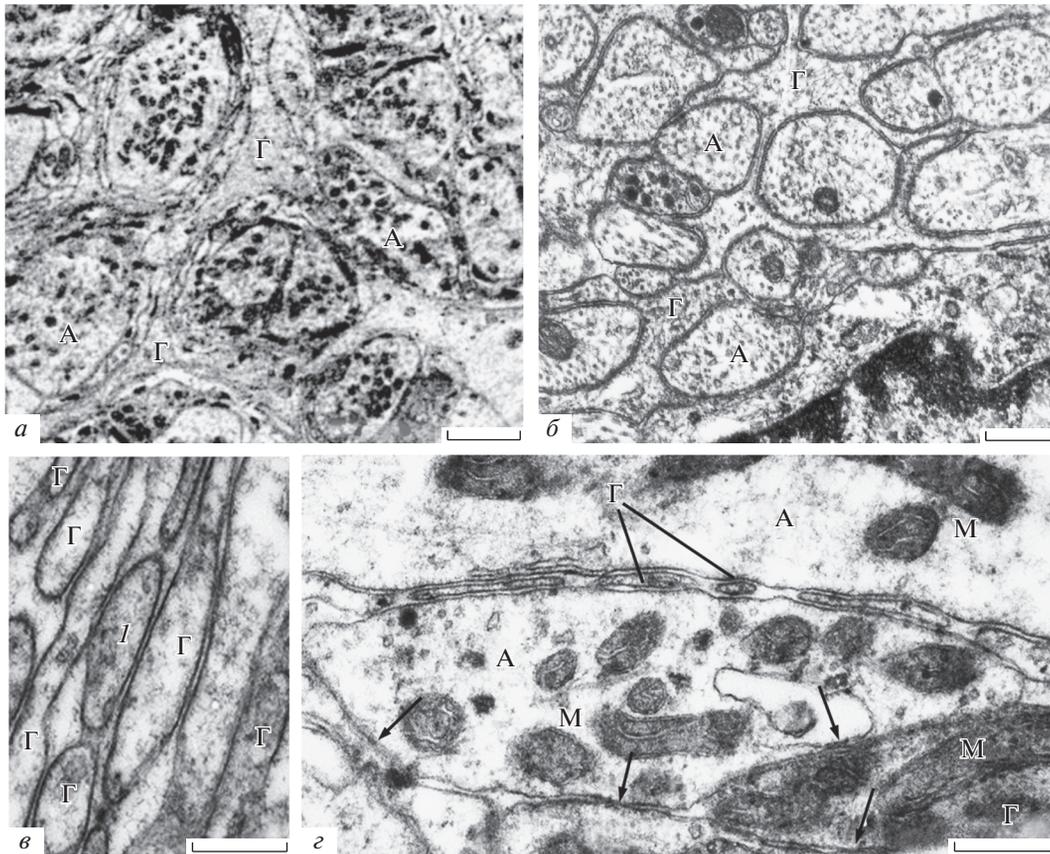


Рис. 1. Фрагменты неспецифических изменений наружной и внутренней глиальных оболочек симпатических ганглиев пиявки, моллюска и лягушки в норме и после обработки проназой. *а* – Ганглий пиявки в норме; *б* – ганглий лягушки в норме; *в* – массовая диссоциация глиальной наружной оболочки в ганглии пиявки, варикозности после воздействия проназы; *г* – остатки глиальной оболочки между двумя нейронами в ганглии лягушки; *И* – варикозная форма фрагмента глиоцита после его отрыва, перед окончательным лизисом; стрелка – щелевой контакт; Г – глиа; А – аксон; М – митохондрия. Электронная микроскопия. Масштабная линейка: *а* – 1.5 мкм; *б* – 1.5 мкм; *в* – 3 мкм; *г* – 4 мкм.

оказываются связанными поперечными, плохо видимыми белковыми мостиками. Перемычки продолжают внутрь нейролеммы и обычно имеют пирамидальную форму. В результате действия проназы получено значительное разнообразие структур.

ОБСУЖДЕНИЕ

Новообразование ЩК при действии проназы относится к ряду необычных, непредвиденных функций проназы. С помощью обработки ганглиев позвоночного и беспозвоночных животных 0.4%-ных раствором проназы впервые получены экспериментальные ЩК. Впервые выявлено деструктивное действие проназы на химические синапсы, приводящее к утрате пре- и постсинаптических структур. Новообразование ЩК при сближении мембран может встречаться при травмах, воспалениях, и приводить к изменению электрогенеза (Belousov et al., 2017). В химических синапсах, как известно, имеется четыре составляющих: пре- и постсинаптические структуры, синаптическая щель и пузырьки с медиатором в

терминалях аксона. При протеолизе исчезают хеморецепторные околосинаптические белковые комплексы, а пузырьки, ограниченные липидной мембраной, остаются хорошо видимыми.

Экспериментальные исследования, проводимые на “простых нервных системах”, вносят определенный вклад в различные разделы физиологии, позволяя изучать клеточные, молекулярные, генетические механизмы. Известно, что белковые агрегаты липидных бислоев (септы), могут быть электропроницаемыми (Беркинблит и др., 1981). Наши эксперименты, проведенные с проназой, продемонстрировали еще один вариант использования нервной системы моллюска, пиявки и лягушки. Поскольку проназа не изменяет амплитудные и кинетические характеристики ионных токов, участвующих в генерации нервных импульсов (Lun'ko et al., 2014), наша экспериментальная модель может быть полезной для изучения многих еще не понятых свойств и особенностей ЩК как ЭС. Действительно, в предыдущих наших электрофизиологических исследованиях было показано, что созданные *de novo* цепочки ЭС

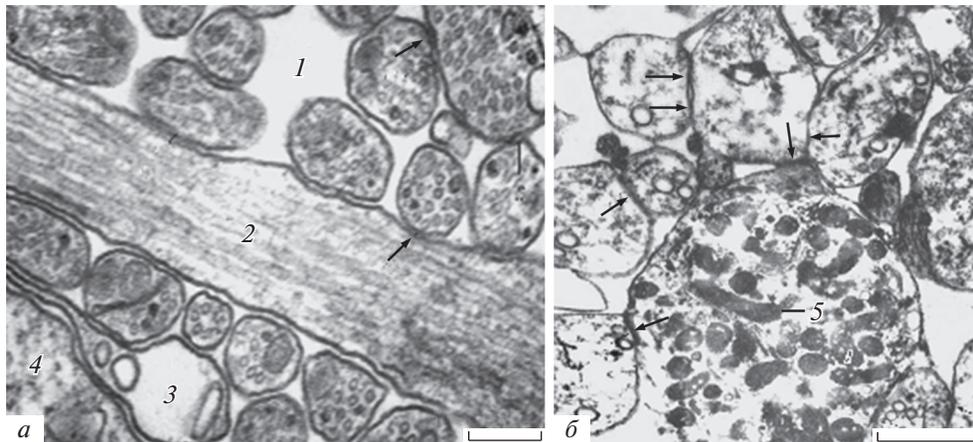


Рис. 2. Безглиальные нервные волокна ганглия моллюска (*a*) и группа денудированных вегетативных нервных волокон ганглия лягушки, образующих мембранные контакты (*б*) после обработки проназой. 1 – пустоты, где ранее находились отростки глиоцитов; 2 – микротрубочки; 3 – остаток сократившейся в результате протеолиза “культи” глиальной оболочки; 4 – нейрон; 5 – митохондрии; стрелки – межнейронные щелевые контакты. Электронная микроскопия. Масштабная линейка: *a* – 2 мкм; *б* – 3 мкм.

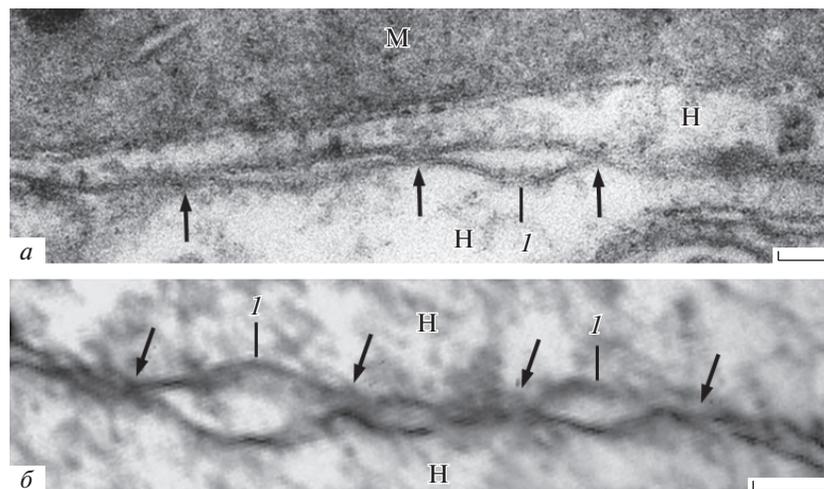


Рис. 3. Варианты спаренных щелевых контактов волокон мозга пиявки и ганглия лягушки после действия проназы. *a* – Три ЩК на препарате мозга пиявки; *б* – четыре ЩК на препарате ганглия лягушки; *I* – межнейронные щели, расширенные за счет накопления “свободной воды” после денатурации белков; стрелки – электрические синапсы; М – митохондрия; Н – нейроны. Электронная микроскопия. Масштабная линейка: *a* – 1 мкм; *б* – 2 мкм.

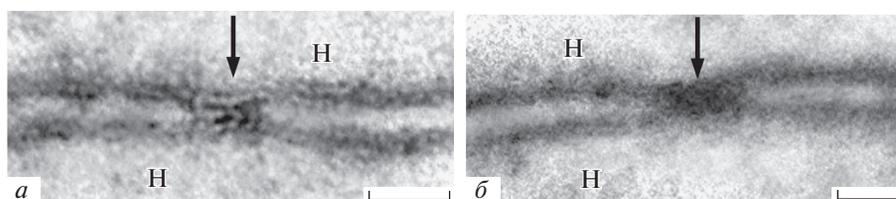


Рис. 4. Одиночные щелевые контакты после обработки мозга пиявки 0.4%-ной проназой в течение 60 мин. Стрелки – щелевые контакты. Электронная микроскопия. Масштабная линейка: *a*, *б* – 40 нм.

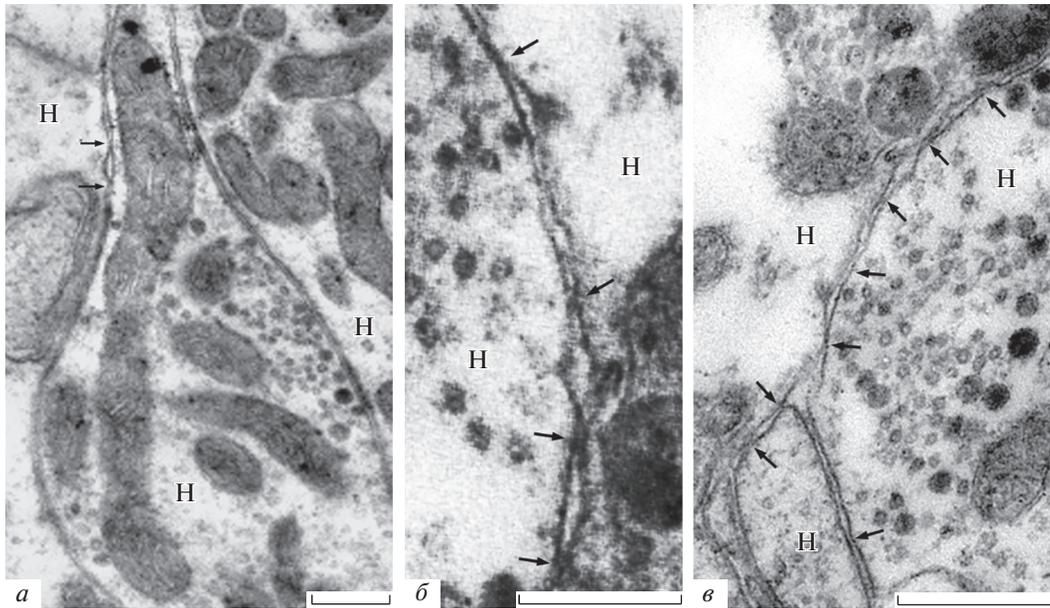


Рис. 5. Множественные щелевые контакты в области химических синапсов, утратившие хеморецепторные специализации (специфические морфологические признаки пре- и постсинаптических мембран) после обработки проназой, в ганглиях моллюска (*а, в*) и лягушки (*б*). Н – нейрон; стрелки – щелевые и плотные нейро-нейрональные контакты разной величины. Электронная микроскопия. Масштабная линейка: *а–в* – 1 мкм.

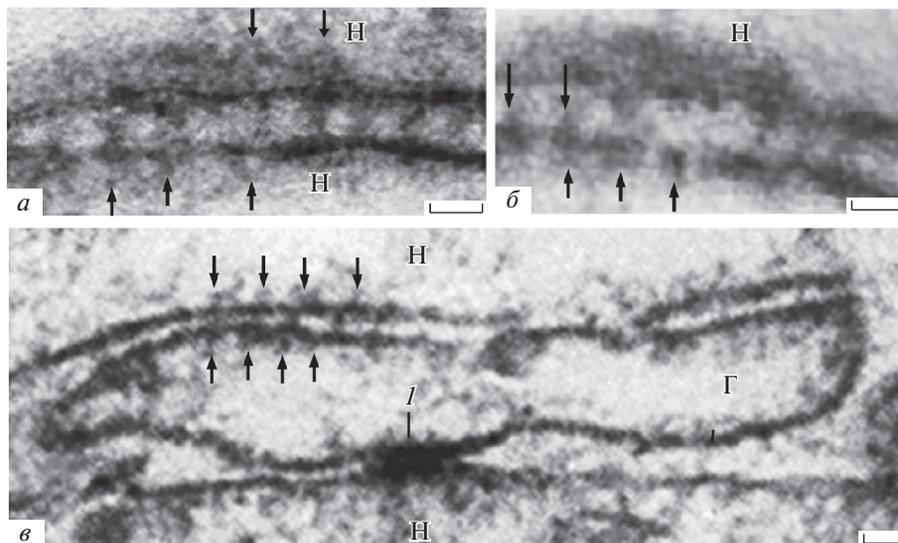


Рис. 6. Множественные межклеточные трансмембранные мостики, выявляемые после обработки препарата проназой. *а* – Сформировавшиеся септы после обработки ганглия лягушки проназой; *б* – формирующиеся септы после обработки проназой ганглия лягушки; *в* – узкие нейронно-глиальные септы моллюска; *l* – непрерывный нейронно-глиальный контакт нейролеммы и глиолеммы сохранившейся варикозности отростка глиоцита после обработки проназой; стрелки – межнейрональные, нейронно-глиальные мостики и агрегаты околочембранных белков пирамидальной формы; Г – глия; Н – нейрон. Электронная микроскопия. Масштабная линейка: *а, б* – 20 нм; *в* – 40 нм.

между мембранами нервных волокон у моллюска, пиявки и лягушки имеют особые электрические функции – они на один раздражающий импульс образуют частотную серию (6–8) спайков, формируют реакцию реверберации (Сергеева и др., 2020; Сотников, 2021). Известно, что классическая фи-

зиология предположительно объясняет возникновение реверберации возбуждения круговой связью между цепочкой естественных ШК в головном мозге. Мы впервые получили этот нервный процесс на экспериментальных, четко морфологически установленных ШК.

Результатом настоящей работы является подтверждение на ультраструктурном уровне формирования большого числа ЩК в ганглиях моллюска, пиявки и лягушки под влиянием проназы. Так как в подобных условиях под действием проназы ранее нами доказано появление электрических синапсов, можно предполагать, что ЩК являются морфологическим эквивалентом ЭС.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0134-2019-0001.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили в соответствии с требованиями Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) 1986 г. и решением об использовании лабораторных животных Комиссии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН по гуманному обращению с животными № 26/12 от 26 декабря 2019 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антонов В.К. 1991. Химия протеолиза. М.: Наука. (Antonov V.K. 1991. Chemistry of proteolysis. M.: Nauka.)
- Беркинблит М.Б., Божкова В.П., Бойцова Л.Ю., Миттельман Л.А., Потапова Т.В., Чайлахян Л.М., Шаровская Ю.Ю. 1981. Высокопроницаемые контактные мембраны. М.: Наука. (Berkinblit M.B., Bozhkova V.P., Boitsova L.Yu., Mitelman L.A., Potapova T.V., Chailakhyan L.M., Sharovskaya Yu.Yu. 1981. Highly permeable contact membranes. M.: Nauka.)
- Кириченко Е.Ю., Повилайтите П.Е., Сухов А.Г. 2008. Роль щелевых контактов в локальном ритмогенезе корковых колонок. Морфология. Т. 133. № 1. С. 31. (Kirichenko E.Y., Povilaitite P.E., Sukhov A.G. 2009. Role of gap junctions in local rhythmogenesis in cortical columns. Neurosci. Behav. Physiol. V. 39. № 2. P. 199.)
- Сергеева С.С., Сотников О.С., Парамонова Н.М. 2020. Способ создания нейрофизиологической модели простой нервной системы, обладающей реверберацией. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. Т. 106. № 9. С. 1163. (Sergeeva S.S., Sotnikov O.S., Paramonova N.M. 2020. A method for creating a neurophysiological model of a simple nervous system with reverberation. Fiziol. Zh. im. I.M. Sechenova. V. 106. № 9. P. 1163.) <https://doi.org/10.31857/S0869813920080075>
- Сотников О.С., Костенко М.А. 1981. Реактивные изменения живых нервных окончаний в культуре изолированных нейронов, лишенных глии. Архив АГЭ. Т. 80. № 6. С. 17. (Sotnikov O.S., Kostenko M.A. 1981. Reactive changes of living nerve endings in the culture of isolated neurons deprived of glia. Archive of the ASGE. V. 80. №. 6. P. 17)
- Сотников О.С. 2021. Серия экспериментальных электрических синапсов и реверберация нервного импульса. Технол. Живых Сист. Т. 18. № 3. С. 52. (Sotnikov O.S. 2021. A series of experimental electrical synapses and reverberation of a nerve impulse. Tekhnol. Zhivyykh Sist. V. 18. № 3. P. 52.) <https://doi.org/10.18127/j20700997-202103-05>
- Alcami P., Pereda A.E. 2019. Beyond plasticity: the dynamic impact of electrical synapses on neural circuits. Nat. Rev. Neurosci. V. 20. P. 253. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0133-5>
- Allen M., Ghosh S., Ahern G.P., Villapol S., Maguire-Zeiss K.A., Conant K. 2016. Protease induced plasticity: matrix metalloproteinase-1 promotes neurostructural changes through activation of protease activated receptor 1. Sci. Rep. V. 6. P. 35497. <https://doi.org/10.1038/srep35497>
- Fontes J.D., Ramsey J., Polk J.M., Koop A., Denisova J.V., Belousov A.B. 2015. Death of neurons following injury requires conductive neuronal gap junction channels but not a specific connexin. PLoS One. V. 10. e0125395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125395>
- Ixmattalhua D.J., Vizcarra B., Gómez-Lira G., Romero-Maldonado I., Ortiz F., Rojas-Piloni G., Gutiérrez R. 2020. Neuronal glutamatergic network electrically wired with silent but activatable gap junction. J. Neurosci. V. 40. P. 4661. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2590-19>
- Kerstein P.C., Patel K.M., Gomez T.M. 2017. Calpain-mediated proteolysis of TALIN and FAK regulates adhesion dynamics necessary for axon guidance. J. Neurosci. V. 37. P. 1568. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2769-16.2016>
- Lun'ko O.O., Isaiev D.S., Maxymiuk O.P., Kryshal' O.O., Isaieva O.V. 2014. The effect of enzymatic treatment using proteases on properties of persistent sodium current in CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus. Fiziol. Zh. V. 60. P. 75.
- Magnowska M., Gorkiewicz T., Suska A., Wawrzyniak M., Rutkowska-Wlodarczyk I., Kaczmarek L., Wlodarczyk J. 2016. Transient ECM protease activity promotes synaptic plasticity. Sci. Rep. V. 6. P. 27757. <https://doi.org/10.1038/srep27757>
- Nakagawa N., Hosoya T. 2019. Slow dynamics in microcolumnar gap junction network of developing neocortical pyramidal neurons. Neuroscience. V. 406. P. 554. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.02.013>
- Spray D.C., Iglesias R., Shraer N., Suadicani S.O., Belzer V., Hanstein R., Hanani M. 2019. Gap junction mediated signaling between satellite glia and neurons in trigeminal ganglia. Glia. V. 67. P. 791. <https://doi.org/10.1002/glia.23554>
- Talukdar S., Emdad L., Das S.K., Fisher P.B. 2022. GAP junctions: multifaceted regulators of neuronal differentiation. Tissue Barriers. V. 10. 1982349. <https://doi.org/10.1080/21688370.2021.1982349>
- Thomas D., Senecal J.M., Lynn B.D., Traub R.D., Nagy J.I. 2020. Connexin 36 localization along axon initial segments in the mammalian CNS. Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol. V. 12. P. 153.
- Wang Y., Belousov A.B. 2011. Deletion of neuronal gap junction protein connexin 36 impairs hippocampal LTP. Neurosci. Lett. V. 502. P. 30. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.07.018>

- Wang G., Wu X. 2021. The potential antiepileptogenic effect of neuronal Cx36 gap junction channel blockage. *Transl. Neurosci.* V. 12. P. 46. <https://doi.org/10.1515/tnsci-2021-0008>
- Xu Y., Shen F.Y., Liu Y.Z., Wang L., Wang Y.W., Wang Z. 2020. Dependence of generation of hippocampal CA1 slow oscillations on electrical synapses. *Neurosci. Bull.* V. 36. P. 39. <https://doi.org/10.1007/s12264-019-00419-z>

Action of Pronase on the Nerve Ganglia Causes Formation of Neural-Neuronal Gap Contacts

O. S. Sotnikov^{a,*}, S. S. Sergeeva^a, and N. M. Paramonova^b

^a*Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, 199034 Russia*

^b*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, 194223 Russia*

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

The effect of pronase on the nerve ganglia of molluscs, leeches, and frogs was studied using electron microscopy for the first time. It was revealed that action of pronase causes retraction and removal of glial membranes, denudation of nerve fibers and neuronal bodies with simultaneous convergence of the neuromembranes of these structures and leads to the formation of gap junctions. This effect on the membranes is an unusual and unforeseen function of pronase, observed by us for the first time. Since we previously recorded reverberation of a nerve impulse in the ganglia of frogs and leeches under the same conditions, we believe that morphological data obtained here are evident for the formation of electrical synapses under the action of pronase on the nerve ganglia.

Keywords: electrical synapses, gap junctions, pronase, nerve ganglia, septa

100 ЛЕТ ПРОФЕССОРУ АНДРЕЮ ПАВЛОВИЧУ ДЫБАНОУ (18.04.1922–24.02.2013)

DOI: 10.31857/S0041377122060086



18 апреля 2022 г. исполнилось 100 лет со дня рождения профессора Дыбана Андрея Павловича – выдающегося ученого, внесшего существенный вклад в эмбриологию и биологию развития млекопитающих. А.П. Дыбан – доктор медицинских наук (1960 г.), профессор (1961 г.), заслуженный деятель науки РФ (1998 г.), Почетный доктор ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины” (2000 г.), Почетный доктор Национального общества регенеративной медицины (2014 г.).

Андрей Павлович Дыбан родился 18 апреля 1922 г. в г. Умань Киевской (Черкасской) области в семье земских врачей – известных клиницистов (отец – окулист, кандидат медицинских наук, мать – фтизиатр), внесших существенный вклад в развитие здравоохранения на Украине.

В 1939 г. А.П. Дыбан поступил в Киевский медицинский институт (КМИ), который и окончил в 1944 г. в г. Челябинске, куда КМИ был эвакуирован.

А.П. Дыбан был ассистентом кафедры гистологии и эмбриологии Киевского медицинского института (1943–1947 гг.), заведующим кафедрой гистологии и эмбриологии Львовского медицинского института (1947–1963 гг.), руководителем отдела эмбриологии Института экспериментальной медицины (ИЭМ, Ленинград–Санкт-Петербург, 1963–1991 гг.), прикомандированным руководителем лаборатории Чикагского института репродуктивной генетики (Чикаго, 1991–1994 гг.), ведущим научным сотрудником Отдела молекулярной генетики ИЭМ (Санкт-Петербург, 1992–2013 гг.).

А.П. Дыбан защитил кандидатскую диссертацию на тему “Гистологические структуры аномальных зародышей человека” (1947 г.), а по материалам своей монографии (“Очерки патологической эмбриологии человека”, 1959 г.) докторскую диссертацию (1960 г.).

Проф. А.П. Дыбан, обладая научным предвидением и энциклопедическими знаниями не только в области экспериментальной эмбриологии, внес существенный вклад как в классические, так и в новые научные области (экспериментальная тератология, цитогенетика развития млекопитающих, генетика поведения, трансгенез млекопитающих).

Современный этап развития тератологии начался после талидомидной трагедии, когда группа экспертов, представленная всемирно известными специалистами (в том числе и проф. А.П. Дыбаном), под эгидой ВОЗ разработала основные принципы тестирования тератогенности и эмбриотоксичности лекарственных веществ (1968 г.).

Сотрудники отдела эмбриологии ИЭМ АМН СССР под руководством проф. А.П. Дыбана установили общие закономерности повреждающего действия различных агентов на разных стадиях эмбриогенеза. Полученные данные были положены в основу составленных этим коллективом правил доклинической проверки лекарственных препаратов на тератогенную и эмбриотоксическую активность, утвержденных Минздравом СССР (1972 г., 1986 г.) и внедренных в здравоохранение.

Заслуженное признание получили работы проф. А.П. Дыбана по экспериментальной цитогенетике развития млекопитающих, в частности о влиянии числовых и структурных хромосомных абераций на ключевые звенья эмбриогенеза. Проф. А.П. Дыбаном были сформулированы новые положения о роли различных хромосом в раннем развитии и сочетании участия генов и эпигеномных факторов в контролируемых механизмах раннего эмбриогенеза млекопитающих. Проф. А.П. Дыбан и сотрудники Отдела эмбриологии ИЭМ совместно с коллегами лаборатории генетики поведения кафедры ВНД МГУ (руководитель – член-корр. АН СССР Л.В. Крушинский) на основе полученных пионерских данных о положительном влиянии центрального слияния определенных аутосом на некоторые поведенческие акты у мышей сформулировали по-

ложение о возможной роли робертсоновских транслокаций в адаптивной эволюции млекопитающих.

Цитогенетические работы на ранних зародышах мышей, выполненные акад. А. Тарковским (Польша), проф. А.П. Дыбаном (СССР) и проф. А. Гроппом (Германия) послужили фундаментом для создания пренатальной генетической диагностики человека (J.L. Simpson, 2010).

Заслуженное признание получили пионерские исследования проф. А.П. Дыбана и сотрудников Отдела эмбриологии ИЭМ по трансгенезу млекопитающих. Особенно широкий резонанс получили работы Отдела эмбриологии ИЭМ совместно с лабораторией генной инженерии (С.И. Городецкий, ИОГ АН СССР, Москва), в результате которых впервые в СССР были созданы трансгенные мыши (1984 г.) и впервые в мире крысы (1986 г.), экспрессирующие ген гормона роста человека. Использование интродукции чужеродных клонированных генов позволило получить новые данные о механизмах начального эмбриогенеза млекопитающих.

Проф. А.П. Дыбан – основатель отечественной школы по изучению нормального и патологического развития млекопитающих, основоположник петербургской школы цитогенетиков и биологов развития, подготовивший 45 кандидатов и 5 докторов наук (член-корр. РАН В.С. Баранов, проф. И.Р. Барилляк, проф. Е.Л. Паткин, д. м. н. Н.А. Самошкина; к. м. н. и к. б. н.: Б.Л. Вайсман, И.И. Тиходеева, Г.Ф. Голинский, Г.Г. Секирина, Е.Л. Северова, Е.М. Нониашвили, В.Б. Попов, Н.А. Чеботарь, Т.В. Игнатьева, В.М. Михайлов и др.).

Профессор А.П. Дыбан – автор 289 статей, 20 глав в книгах и коллективных монографиях, 6 монографий, две из которых были изданы в Германии (Dyban A.P. Grundriss der pathologischen Embryologie des

Menschen. Jena, Gustav Fisher Verlag, 1962; Dyban A.P., Baranow W.S. Die Zytogenetik der Sauger-Embryogenese. Berlin und Hamburg, Verlag Paul Parey, 1990), а одна – в Великобритании (Dyban A.P., Baranov V.S. Cytogenetics of mammalian embryonic development. Oxford, Oxford Univ. Press, 1987). Он был не только ученым-теоретиком и автором обзоров и монографий (в том числе монографии “Раннее развитие млекопитающих” (1988) и др.), посвященных узловым процессам оогенеза и раннего развития млекопитающих, послуживших базисом для становления нескольких поколений ученых, но и блестящим экспериментатором, вплоть до 86 лет непосредственно участвовавшим в эксперименте, автором методик по цитогенетике, цитологии, гистологии, эмбриологии.

Проф. А.П. Дыбан был членом редколлегии и редсоветов журналов “Онтогенез”, “Цитология”, “Архив анатомии, гистологии, эмбриологии”.

Доклады и лекции на различного рода научных мероприятиях проф. А.П. Дыбана – ученого мирового уровня, блестящего оратора и полемиста со сверхбыстрой реакцией, энциклопедически образованного, обладавшего удивительным аналитическим умом, в совершенстве владевшим английским, немецким и польскими языками, – завораживали как отечественных, так и зарубежных коллег, которые специально приходили “на Андрея Павловича” не только ознакомиться с новыми достижениями отдела эмбриологии и ведущих лабораторий мира, но и соприкоснуться с обобщениями, в которых нередко зарождались современные пути развития эмбриологии, биологии развития, цитогенетики млекопитающих.

*В.Б. Васильев, Е.Л. Паткин,
Е.М. Нониашвили, П.А. Дыбан*