

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 63, номер 4, 2021

Перспективные технологии 3D биопечати <i>Д. В. Леонов, Ю. А. Спирина, А. А. Яценко, В. А. Кушнарев, Е. М. Устинов, С. В. Баранников</i>	309
Снижение эффективности репарации и антиоксидантной защиты способствует накоплению повреждений ДНК при старении клеток <i>П. И. Дерябин, А. В. Бородкина</i>	322
Сравнительный анализ влияния антител к эндоглину на функциональные характеристики клеток эндотелия HUVEC и EA.hy926 <i>А. Ю. Столбовая, И. В. Смирнов, А. А. Пиневич, Н. Л. Вартамян, И. Ю. Крутецкая, Л. А. Терехина, К. Л. Маркова, А. Б. Малашичева, М. П. Самойлович</i>	335
Органоидные и первичные эпителиальные культуры предстательной железы человека показывают ключевую роль эпителиально-мезенхимного перехода в формировании тканеспецифических стромальных клеток <i>В. М. Рябов, А. О. Георгиева, М. А. Воскресенский, Б. К. Комяков, О. В. Рогоза, Р. В. Грозов, Я. Г. Муразов, Д. Г. Прохоров, Б. В. Попов</i>	352
Дифференциальная регуляция <i>BBC3/PUMA</i> и <i>PMAIP1/Noxa</i> при ионизирующем излучении: роль p53 <i>О. А. Кучур, П. Д. Кучур, Д. О. Кузьмина, А. В. Завирский, А. А. Штиль</i>	363
Вальпроевая кислота повышает уровень экспрессии генов, кодирующих BDNF, GDNF и их рецепторы, в эмбриональном мозге мышей и индуцирует стереотипное поведение <i>А. А. Семёнова, Е. В. Харитоновна, Е. Д. Хилажева, А. Б. Салмина</i>	373
Роль СК19-позитивных клеток портальных зон при тиацетамид-индуцированном циррозе печени крыс <i>Е. И. Лебедева</i>	379
Сравнительный анализ цитотоксического действия флавоноидсодержащих растительных экстрактов на клеточную линию СНО <i>М. Н. Курчатова, А. С. Фомин, А. А. Широков, Н. А. Дурнова</i>	390
Повреждения средней кишки медоносной пчелы ноземой <i>Е. К. Еськов, М. Д. Еськова, А. С. Роженков, Е. В. Шестакова</i>	398

## Письмо в редакцию

Различия превращения гистидина у человека и других млекопитающих <i>А. В. Малиновский</i>	403
--	-----

# Contents

---

---

Vol. 63, No. 4, 2021

---

---

## Review

Advanced 3D bioprinting technologies

*D. V. Leonov, Yu. A. Spirina, A. A. Yatsenko, V. A. Kushnarev,  
E. M. Ustinov, S. V. Barannikov*

309

## Original articles

Reduced efficiency of DNA repair and antioxidant defense promote the accumulation of DNA damage during cell senescence

*P. I. Deryabin, A. V. Borodkina*

322

Comparative analysis of endoglin antibodies effect on the functional characteristics of endothelial cells HUVEC and EA.hy926

*A. Y. Stolbovaya, I. V. Smirnov, A. A. Pinevich, N. L. Vartanyan, I. Y. Krutetskaya,  
L. A. Terekhina, K. L. Markova, A. B. Malashicheva, M. P. Samoilovich*

335

Organoid and primary epithelial cell cultures from human prostate show the key role of epithelial-to-mesenchymal transition in the formation of the tissue specific stromal cells

*V. M. Ryabov, A. O. Georgieva, M. A. Voskresenskiy, B. K. Koyakov, O. V. Rogoza,  
R. V. Grozo, Ya. G. Murazov, D. G. Prokhorov, B. V. Popov*

352

Differential regulation of *BBC3/PUMA* and *PMAIP1/Noxa* by ionizing radiation: A role for p53

*O. A. Kuchur, P. D. Kuchur, D. O. Kuzmina, A. V. Zavrisky, A. A. Shtil*

363

Valproic acid increases the level of expression of BDNF, GDNF and their receptors in the embryonic brain of mice and induces the stereotype behavior

*A. A. Semenova, E. V. Kharitonova, E. D. Khilazheva, A. B. Salmina*

373

The role of CK19-positive cells of the portal zones in thioacetamide-induced cirrhosis of rat liver

*E. I. Lebedeva*

379

Comparative analysis of the cytotoxic effect of flavonoid-containing plant extracts on the CHO cell line

*M. N. Kurchatova, A. C. Fomin, A. A. Shirokov, N. A. Durnova*

390

Damage to the honey bee's midgut caused by *Nosema*

*E. K. Eskov, M. D. Eskova, A. S. Rozhenkov, and E. V. Shestakova*

398

---

---

## Letter to editor

Differences of histidine conversion in human and other mammals

*A. V. Malinovsky*

403

---

---

УДК 573.6

## ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ 3D БИОПЕЧАТИ

© 2021 г. Д. В. Леонов<sup>1</sup>, \*, Ю. А. Спирина<sup>1</sup>, А. А. Яценко<sup>1</sup>, В. А. Кушнарев<sup>2</sup>,  
Е. М. Устинов<sup>1</sup>, С. В. Баранников<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Амурская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Благовещенск, 675006 Россия

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова Министерства здравоохранения  
Российской Федерации, Санкт-Петербург, Песочный, 191124 Россия

\*E-mail: d.leonov1998@gmail.com

Поступила в редакцию 13.03.2021 г.

После доработки 12.04.2021 г.

Принята к публикации 13.04.2021 г.

В обзоре рассмотрены семь наиболее перспективных для тканевой инженерии технологий трехмерной печати: струйная, экструзионная, лазерная, стереолитографическая, 4D-печать, томографическая печать, цифровая световая печать (digital light processing). Проанализированы возможности и недостатки методик, механизмы их работы. Приведены примеры успешных тканеинженерных разработок, выполненных этими методами биопечати.

**Ключевые слова:** тканевая инженерия, 3D-биопечать, 3D-печать

**DOI:** 10.31857/S0041377121040064

В настоящее время во всем мире существует острая проблема нехватки органов для трансплантологии. По данным Федерального научного центра трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова (Москва) в 2019 г. было выполнено 1473 пересадки почек, 584 пересадки печени, 25 трансплантаций легких, 337 пересадок сердца. При этом в листе ожидания в настоящее время находятся 9500 пациентов (<https://vademec.ru/news/2020/03/19/kolichestvo-transplantatsiy-organov-v-2019-vyroslo-na-11/>).

По данным Министерства здравоохранения и социальных служб США (MoHSS) за 2019 г. было проведено около 11900 трансплантаций. Этот показатель является одним из самых высоких по числу трансплантаций во всем мире, однако потребность составляет около 113000 трансплантаций (<https://optn.transplant.hrsa.gov/news/organ-donation-again-sets-record-in-2019/>). Для операции по трансплантации характерна проблема совместимости, например, необходимо учитывать гистосовместимость тканей, а для непарных органов трудно найти донора. Одним из решений этих проблем является 3D-биопечать.

Биопечать – технология аддитивного производства, которая позволяет создавать сложные трехмерные тканеинженерные конструкции, используя биоматериалы в качестве микросреды для живых клеток, за короткое время. Одним из наиболее важных составляющих биопечати являются биочернила. Биочернила – это комбинация из биополимерных

гелей (жидкой фазы) и живых клеток, используемая для печати трехмерных тканевых структур. Они содержат как малодифференцированные мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК), так и дифференцированные, например, фибробласты, кератиноциты, гепатоциты и т.д. (Ong et al., 2018; Hong et al., 2018). В качестве жидкой фазы используют биополимеры, такие как желатин, коллаген, агароза и др. (Xia et al., 2018). Выбор метода печати базируется не только на скорости и выживаемости клеток, а также на разрешающей способности. Разрешающая способность представляет собой размер самой маленькой детали, которую может напечатать принтер в одном слое.

В настоящее время существуют различные технологии биопечати. Самая простая из них – экструзионная печать (Lee, Yeong, 2016), при которой создание объекта происходит послойно снизу-вверх с помощью одной печатающей головки.

К более сложным технологиям относятся томографическая печать (Kelly et al., 2017), когда объект печатается с помощью луча света определенной длины волны, который полимеризует фотополимер; при этом объект воссоздается без разделения на слои, что позволяет создавать более сложные и в то же время более прочные трехмерные конструкции (Bernal et al., 2019). Эта биотехнология имеет большие перспективы в фармацевтической промышленности, поскольку является одним из наиболее быстрых сегодня способов создания клеточного продукта

**Таблица 1.** Сравнительный анализ технологий биопечати

Технология 3D-печати	Преимущество	Недостатки	Разрешение, мкм	Скорость печати	Выживаемость клеток, %	Источник <sup>a</sup>
Струйная	Низкая стоимость, простота в эксплуатации	Ограниченность в выборе биочернил, низкая выживаемость клеток	5–50	150 кап/мин	85	[1]
Экструзионная	Высокая выживаемость клеток, простота в эксплуатации, низкая стоимость	Низкая скорость печати	5–100	10–50 мкм/с	>95	[2]
Лазерная	Высокая скорость печати, возможность печати высоковязкими биочернилами	Фото-механическое повреждение клеток при печати, высокая стоимость	>50	200–1600 мм/с	85–95	[3]
Стереолитографическая	Высокая скорость печати, возможность создания сложных трехмерных структур	Канцерогенное влияние на клетки при печати, ограниченность в выборе материалов	20	100 мкм/с–1000 мм/с	90	[4, 5]
Цифровая световая (digital light processing)	Очень высокая скорость	Высокая цена, ограниченность в выборе материалов	10–100	30–100 см/ч по оси Z	90–95	[6, 7]
Томографическая	Очень высокая скорость, бесшовная печать	Высокая стоимость и сложность в эксплуатации	16–33	1–2 мм <sup>2</sup> /с	80–90	[8, 9, 10]
4D-биопечать	Возможность создания сложных трехмерных конструкций,	Ограниченность в выборе материалов, высокая цена	—	—	—	[11]

<sup>a</sup> Литература: 1. Matsusaki et al., 2013; 2. Kolesky et al., 2016; 3. Hong et al., 2017; 4. Au et al., 2014; 5. Ligon et al., 2017; 6. Pirlo et al., 2012; 7. Ligon et al., 2017; 8. Loterie et al., 2018; 9. Kelly et al., 2018; 10. Bernal et al., 2019; 11. Miri et al., 2019.

(Hong et al., 2018), на котором можно исследовать лекарственные препараты (Lawrence et al., 2015). Помимо этого, биопечать позволяет создавать трехмерные опухолевые тканеинженерные конструкции (Knowlton et al., 2015). Такие тканевые аналоги позволят более точно подбирать и корректировать тактику противоопухолевой терапии (Lv et al., 2017).

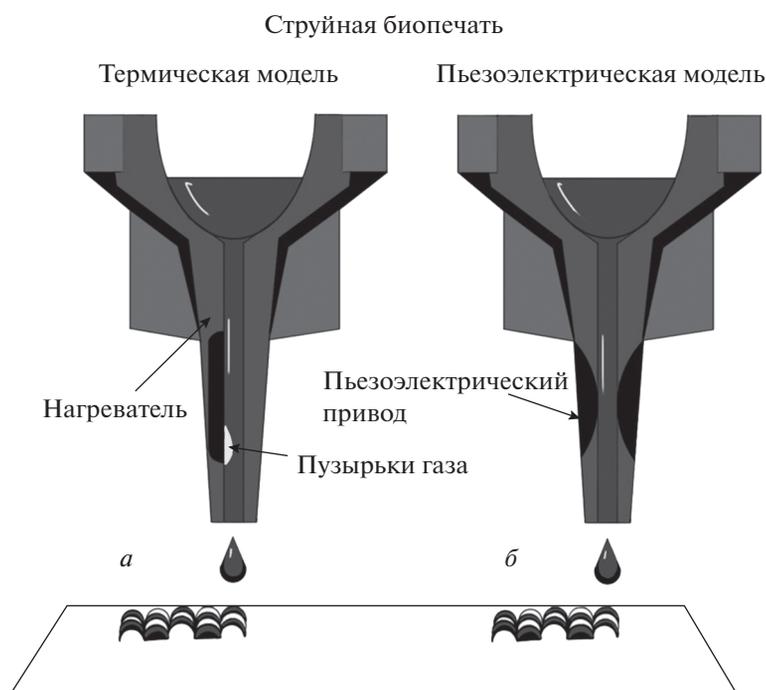
В настоящее время существует большое количество технологий 3D-биопечати и их модификаций, но не все они показали себя одинаково эффективно. Среди множества статей сложно выделить ключевую информацию об эффективности того или иного вида биопечати. Поэтому мы решили осветить важные аспекты современных методик биопечати в представленной обзорной работе, в которой рассматриваются семь наиболее перспективных технологий трехмерной печати для создания сложных тканеинженерных структур.

К основным технологиям относятся струйная, экструзионная, лазерная, стереолитографическая и 4D-печать, а также их модификации: томографическая печать и цифровая световая печать (digital light processing), преимущества, недостатки и другие характеристики которых описаны в табл. 1.

## СТРУЙНАЯ БИОПЕЧАТЬ

Первый биопринтер был разработан на основе модифицированного коммерческого струйного принтера, однако у него имелись технические ограничения, которые заключались в небольшом размере сопла и низкой выживаемости клеток. Вскоре после этого был создан полноценный 3D-биопринтер (Bishop et al., 2017).

Существуют две технологии печати: термическая и пьезоэлектрическая. Принцип работы данных тех-



**Рис. 1.** Схема работы струйной печати. *а* – Термическая модель; давление создается нагревающимися пластинами. *б* – Пьезоэлектрическая модель; давление создается благодаря кристаллам, которые расширяются под действием тока (адаптировано из: Derakhshanfar et al., 2018).

нологий можно увидеть на рис. 1. В первом случае в экструдере располагается нагревательный элемент, при работе которого происходит быстрое локальное повышение температуры до 300°C в течение нескольких микросекунд. Вследствие этого появляются пузырьки газа, которые вытесняют капли из сопла. Во второй технологии используется пьезоэлектрические кристаллы, которые расширяются и сжимаются под действием переменного тока. Благодаря этому создается повышенное давление (Li et al., 2016), печать происходит капельно, послойно снизу вверх (Ma et al., 2018).

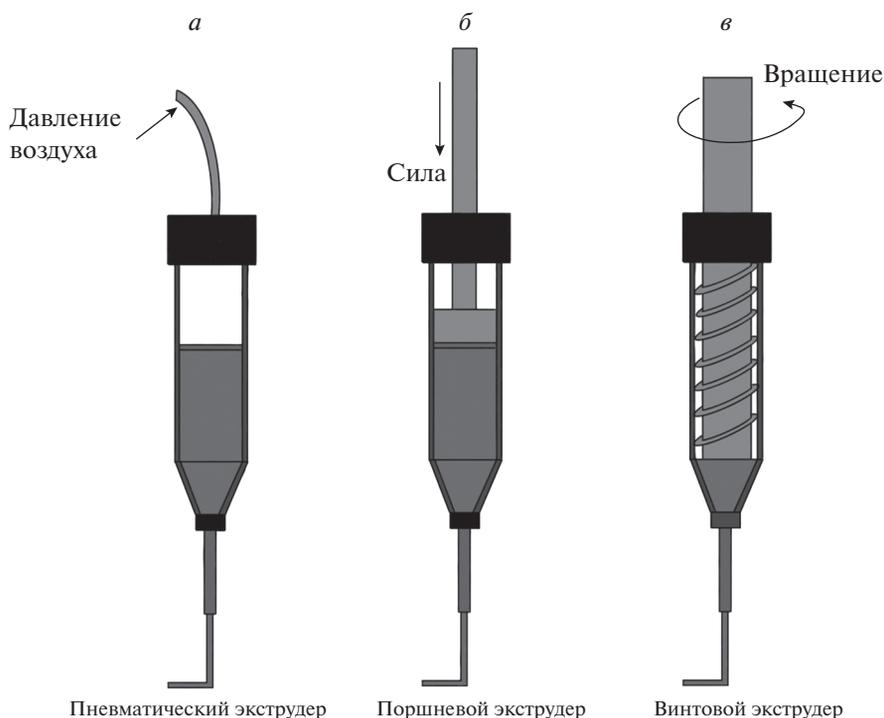
Эта технология позволяет производить печать несколькими печатающими головками с разными типами клеток, что делает возможным создание многокомпонентных тканей с достаточно высокой скоростью (1–10000 капель/с) (Hong et al., 2018). Выживаемость клеток составляет 85% (Angelopoulos et al., 2019). Разрешающая способность составляет 5–50 мкм (Hong et al., 2018). Еще одним преимуществом является низкая цена по сравнению с конкурентами (Cui et al., 2012).

Небольшие размеры сопла не позволяют использовать биочернила с высокой вязкостью (>15 Па·с), а также с высокой плотностью клеток (>1 × 10<sup>6</sup> кл./мл) (Guillot et al., 2010; Pepper et al., 2011). Все это приводит к недостаточной механической прочности и накладывает ограничение на создание сложных трехмерных тканеподобных структур (Angelopoulos et al., 2019).

Несмотря на это, существуют примеры создания многокомпонентных систем с помощью данной технологии. Например, были созданы искусственная ткань сердца, способная сокращаться в ответ на электрические импульсы (Xu et al., 2009), нервная (Li et al., 2018) и костная (Gao et al., 2014) ткани. Па-таки и его команда (Pataky et al., 2012) смогли создать разветвленную сосудистую сеть. Они использовали альгинат натрия в качестве биочернил, который печатался на подложку из пропитанного кальцием желатина, после их взаимодействия альгинат полимеризовался и приобретал форму капли. Это позволило преодолеть естественную склонность гидрогелей распространяться и объединяться. С помощью этой технологии смогли создать модель пигментированной кожи полной толщины (Min et al., 2017). Для этого авторы напечатали дермальный слой в виде нескольких слоев гидрогеля с фибробластами, после чего послойно наносили меланоциты и кератиноциты. Спустя 4 сут на границе разделения фаз воздух-жидкость появился пигмент.

### ЭКСТРУЗИОННАЯ ПЕЧАТЬ

Экструзионная печать может выполнять широкий спектр задач, поскольку позволяет применять гидрогели различной вязкости (6–30 × 10<sup>7</sup> Па·с) (Derakhshanfar et al., 2018). Для печати могут быть использованы как органические естественные материалы – коллаген (Wu et al., 2016), желатин (Jia et al.,



**Рис. 2.** Схема подходов экструзионной печати. *а* – Пневматический, давление обеспечивается за счет сжатого воздуха. *б*, *в* – Поршневой и винтовой соответственно, выталкивание биочернила происходит под действием механического давления (адаптировано из: Derakhshanfar et al., 2018).

2016), хитозан (Gu et al., 2017), альгинат (Tabriz et al., 2015), так и материалы, имеющие синтетическую природу – полиэтиленгликоль (Ashammakhi et al., 2019), метакрилат (Chen et al., 2012), полилактат (Brigham et al., 2009).

В экструзионной печати существуют 3 основных подхода. Наглядно данные подходы изображены в виде схем на рис. 2. На рис. 2*а* изображен пневматический метод, в котором сжатый воздух нагнетается с помощью специального насоса. Из-за того, что система нагнетает воздух из окружающей среды, он должен проходить через ряд фильтров для обеспечения стерильности. Также такой подход наиболее хорош при работе с гидрогелем низкой вязкости (Ozbolat et al., 2016).

Поршневой и винтовой способ (рис. 2*б*, *в*) основаны на давлении на гидрогель вертикальной и вращательной механической силой соответственно. Оба способа обеспечивают высокую разрешающую способность печати и возможность использования более вязких гидрогелей. Принтеры, использующие одновременно эти два метода, имеют большую стоимость, а также сложны в обслуживании и стерилизации.

Благодаря непрерывности печати обеспечивается наличие большого числа клеток в скаффолде и выживаемость клеток составляет более 95%. Из недостатков этой технологии можно выделить низкую скорость печати, которая находится в диапазоне от 10 до 50 мкм/с (Murphy, Atala, 2014; Zhu et al., 2016).

В среднем разрешающая способность 100 мкм (Miri et al., 2019), но существуют данные о разрешающей способности до 5 мкм (Ozbolat et al., 2016). Благодаря своим преимуществам технология экструзионной печати показывает хорошие результаты при создании тканей с простой микроструктурой по типу хрящей и костей (Tao et al., 2017).

Существует несколько успешных модификаций данной технологии. Так, разработан 3D-принтер (Liu et al., 2017), печатающий семью биочернилами одновременно. Экструдер состоит из нескольких капилляров, подсоединенных к резервуарам с биочернилами. Переключение между резервуарами происходит быстро и плавно, что позволяет программно комбинировать потоки биочернил. С помощью данного подхода удалось напечатать многокомпонентную сердечную органоподобную структуру.

Другие авторы (Росса et al., 2018) напечатали сердце, почку и другие сложные трехмерные объекты в микромасштабе благодаря печатающей головке, которая имеет несколько сопел. Точное дозирование альгината удалось достичь программно. Помимо этого, во время печати используется ванна, наполненная Pluronic F127 (PF-127), который обладает обратимыми свойствами фазового перехода золь–гель при различных температурах благодаря образованию мицелл. При температуре 37°C гидрогель затвердевал и выступал в качестве поддержки для печатаемого объекта. Когда орган был напеча-

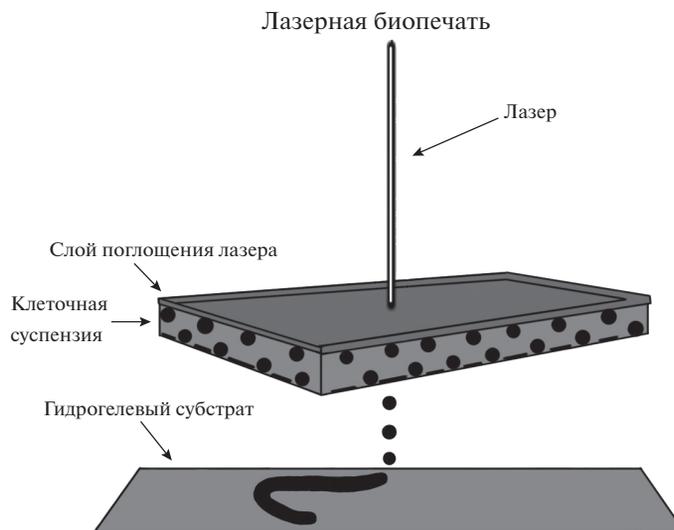


Рис. 3. Схема лазерной печати, нагревание поглощающей пластинки лазером (адаптировано из: Tasoglu et al., 2013).

тан, гидрогель охлаждали до 4°C для его сжижения и извлечения объекта.

### ЛАЗЕРНАЯ ПЕЧАТЬ

Лазерная биопечать основана на двух технологиях: прямая лазерная запись (*laser direct-write*) (Mandrycky et al., 2016) и лазерно-индуцированный перенос (*laser-induced transfer*) (Duocastella et al., 2007). Оба метода позволяют печатать в жидкой и твердой фазе.

Лазерный принтер состоит из следующих частей: лазерная установка, поглощающая пластинка и подложка, на которую попадают осажденные капли (Ma et al., 2018). Поглощающая пластинка имеет две части: энергопоглощающую пластинку из титана (Ali et al., 2014) или золота (Barron et al., 2004) и биочернила.

На рис. 3 представлен принцип работы лазерного 3D биопринтера. Во время печати луч с длиной волны 325 нм действует на верхний слой пластины – слой поглощения лазера. Это приводит к локальному наносекундному нагреву его поверхности с образованием на внутренней стороне энергопоглощающего слоя пузырька воздуха. Благодаря этому происходит локальное повышение давления, вследствие чего биочернила с клеточной суспензией переносятся с пластинки на подложку – гидрогелевый субстрат (Arcaute et al., 2011).

Отличительной особенностью этого способа является отсутствие механического контакта между биочернилами и лучом. Это ведет к высокой выживаемости клеток (85–95%) (Mandrycky et al., 2016) и скорости печати (200–1600 мм/с) (Hong et al., 2018). Вдобавок эта технология позволяет печатать высоковязкими биочернилами (1–300 Па·с) (Guillemot et al.,

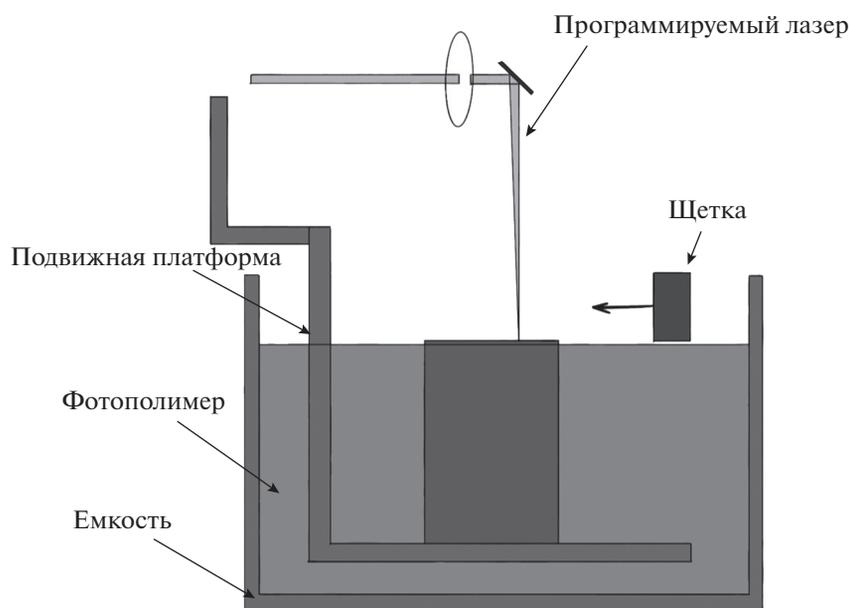
2010). Разрешающая способность составляет более 50 мкм (Guillot et al., 2010).

Недостатком метода является малое количество исследований о воздействии энергии лазерного излучения на клетки. Существуют статьи, указывающие на то, что быстрое локальное нагревание, вызванное лучом света, является основным поражающим фактором для них (Barron et al., 2005; Lin et al., 2010). Для решения этой проблемы были использованы фемтосекундные лазеры с целью сокращения негативного влияния. Однако дальнейшие исследования показали, что это решение только увеличило летальность клеток, что связано с более интенсивным фотомеханическим воздействием (Hopp et al., 2012).

В настоящее время существует малое количество принтеров с лазерной печатью, что обусловлено сложностью производства этих устройств, а также их стоимостью. Исходя из этого, исследователи больше сконцентрированы не на создании новых принтеров, а на исследовании корреляции между параметрами лазера, такими как длина волны, интенсивность и время импульса с качеством конечных образцов (Duan et al., 2013; Duarte Campos et al., 2013).

Используя мезенхимные стволовые клетки для создания трансплантата с последующей дифференцировкой в адипоциты, удалось показать, что лазерная печать не влияет на пролиферативную и дифференциальную активность мезенхимных стволовых клеток (Grüne et al., 2011). Другие авторы смогли создать разветвленную сосудистую сеть при помощи комбинации эндотелиальных и мезенхимных стволовых клеток (Kérouédan et al., 2019). В этом случае клетки печатали на коллаген первого типа, после чего на них помещали еще один слой коллагена вместе со стволовыми клетками апикального сосочка.

## Стереолитографическая печать



**Рис. 4.** Схема стереолитографической печати. Скаффолд создается в результате взаимодействия света определенной длины волны и фотополимера (адаптировано из: Tamay et al., 2019).

## СТЕРЕОЛИТОГРАФИЧЕСКАЯ ПЕЧАТЬ

Эта печать является модификацией фотолитографии. На рис. 4 представлены основные компоненты стереолитографического 3D биопринтера. Биопечать осуществляется с использованием фотополимеризующихся гидрогелей, которые находятся в емкости на движущейся платформе, внутри емкости находится столик на подвижной платформе. С помощью программируемого лазера подается свет определенного спектра, что инициирует сшивание фотополимера (Vijayavenkataraman et al., 2018). Для печати объекта используются трехмерные модели, которые загружаются в компьютер. После полимеризации первого слоя щетка удаляет лишний фотополимер с верхней поверхности напечатанного объекта, затем платформа вместе с емкостью опускается на одну ступень ниже. Так послойно формируется трехмерный объект (Wang et al., 2018). Высота ступеней может быть 5–20 мкм. Кроме того, существуют модели принтеров с инвертированным столиком и излучателем света (Tamay et al., 2019).

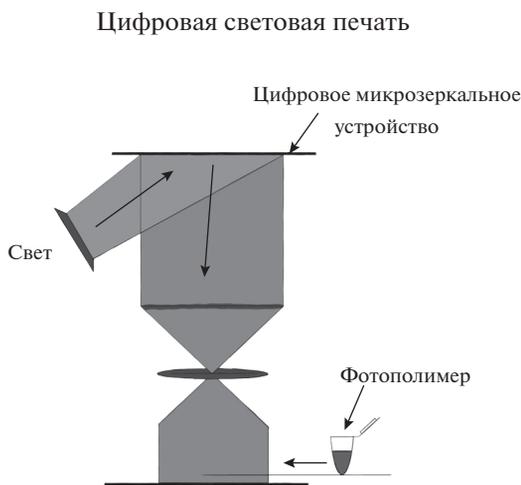
В стереолитографической печати скорость и жесткость сшивки гидрогеля зависит от концентрации фотоинициаторов: чем выше концентрация, тем прочнее и быстрее сшивка (Knowlton et al., 2017). Но в то же время высокая концентрация фотоинициатора обладает выраженным цитотоксическим действием (Sabnis et al., 2009). Существует два основных фотоинициатора: ирракур (Irgacure) 2959 для ультрафиолетовой сшивки и эозин Y для видимого света (Mondschein et al., 2017). Более цитотоксическим яв-

ляется ирракур 2959 (Mondschein et al., 2017). Ультрафиолетовое излучение во время печати оказывает повреждающее действие на ДНК (Ikehata, Ono, 2011). Исходя из этого, большинство исследователей предпочитают использовать луч света с видимым спектром излучения.

Основным преимуществом стереолитографической печати является ее скорость (100 мкм/с–1000 мм/с), поскольку печать всего слоя происходит одновременно. Разрешающая способность в среднем составляет 20 мкм (Pirilo et al., 2012). Выживаемость – более 90% (Catros et al., 2011). Благодаря инвертированному столику и печати сверху вниз становится возможным создавать сложную трехмерную архитектуру. Основным недостатком является ограничение в выборе гидрогелей, сложность и дороговизна 3D-биопринтеров.

Стереолитографию применяют для изготовления сложных и нестандартных по форме каркасов для лицевой хирургии на основе снимков компьютерной томографии. В качестве материала для каркаса авторы используют бета-трикальцийфосфатколлаген, что позволяет делать каркасы прочными при низкой цене производства (Scalera et al., 2014).

С помощью стереолитографического принтера и собственной разработки смогли напечатать гидрогелевые скелетные мышцы, которые являются частью мини-роботов bio-bots (Cvetkovic et al., 2014). Bio-bots могли совершать движения с максимальной скоростью ~156 мкм/с, что превышает 1.5 длины тела за 1 мин. Ученые исследовали влияние белков



**Рис. 5.** Схема цифровой световой печати (digital light processing). Печать осуществляется с помощью двух тысяч световых точек, под действием которых биочернила полимеризуются (адаптировано из: Ma et al., 2018).

внеклеточного матрикса, коллагена I типа, фибрина и инсулиноподобного фактора роста на силу сокращения напечатанных скелетных мышц. Им удалось достичь улучшения способности генерировать силу и функциональные характеристики этой сконструированной ткани, дифференцируя мышечные полоски в оптимизированной среде ЕСМ на основе фибрина с добавлением фактора роста IGF-1.

### ЦИФРОВАЯ СВЕТОВАЯ ПЕЧАТЬ

Эта печать (digital light processing) является одной из разновидностей стереолитографической печати. Компьютерная программа управляет интенсивностью света с помощью цифрового микрозеркального устройства – DMD-чипа (DMD – digital micro-mirror device) (Hribar et al., 2014). На рис. 5 представлена схема работы цифрового светового 3D биопринтера, где ключевую роль играет DMD-чип. Он состоит из двух миллионов микрозеркал, способных менять свое положение независимо друг от друга (Zhu et al., 2016). Печать происходит послойно снизу-вверх с помощью двух тысяч световых точек.

Наиболее часто используют свет видимого спектра для уменьшения цитотоксичности (Lim et al., 2018). В качестве биочернил могут быть использованы различные фотополимеры с диапазоном вязкости 1–2000 Па · с, к ним относятся полиэтиленгликольдиакрилат (PEGDA), глицидилметакрилат-гиалуроновая кислота (GMHA) (Cui et al., 2018) и желатин-метакрилат (GelMA). Последний обладает низкой цитотоксичностью и способен полимеризоваться от видимого спектра, ввиду чего его выбор в качестве биочернил является предпочтительным (Lim et al., 2018).

Скорость печати при этой технологии выражается в см/ч по оси Z, так как объект полимеризуется по всей площади. Скорость печати с высоким разреше-

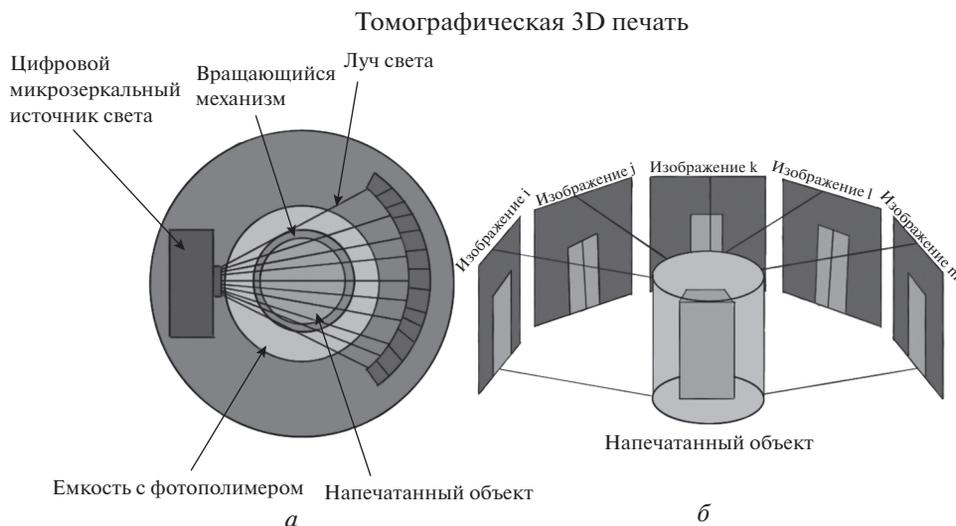
нием менее 100 мкм составляет 30 см/ч по оси Z, при более низкой разрешающей способности достигается скорость в 100 см/ч по оси Z. Разрешающая способность составляет 10–100 мкм. Выживаемость клеток – 90–95%. В силу отсутствия сопел исключается возможность их засорения. Образец получается бесшовным, что увеличивает его прочность и позволяет создавать более сложную архитектуру (Tamay et al., 2019).

Недостатками является сложное устройство принтера, из-за чего увеличивается его стоимость, а также трудность обслуживания. Цитотоксическое влияние фотополимеров и фотомеханическое действие света отрицательно сказываются на выживаемости клеток (Tamay et al., 2019).

Несколько лет назад удалось создать органоподобную ткань печени (Ma et al., 2016). Модель представляла собой группу печеночных долек, состоящих из гепатоцитов, которые были получены из индуцированных стволовых клеток, эндотелиальных клеток, а также мезенхимных клеток. Исследователи использовали два гидрогеля: желатин метакрилат (GelMA) и глицидную метакрилат-гиалуроновую кислоту (GMHA) в соотношении 1 : 1. Размер долек был приближен к физиологичным. Печать происходила в два этапа: вначале наносились гепатоциты с 5%-ной GMHA, затем – эндотелиальные и мезенхимные клетки с 2.5%-ной и 1%-ной GMHA соответственно.

### ТОМОГРАФИЧЕСКАЯ 3D-ПЕЧАТЬ

За основу взят принцип компьютерной томографии. Для начала создается модель на компьютере, после чего объект разделяют на множество проекций (вокселизация). Затем набор проекций от 0° до 360° рассчитывается с использованием алгоритма Радона для достижения кумулятивного эффекта при



**Рис. 6.** Схемы процесса томографической 3D-печати (а) и устройства томографического 3D-биопринтера (б). Создание объекта происходит с помощью комплекса линз, преломляющих свет, для печати в разных проекциях. б – адаптировано из: Brett et al., 2019.

печати. Схематично процесс создания объекта во время томографической 3D биопечати представлен на рис. 6а. Точное вычисление набора проекций с применением фильтра Рам-Лака позволяет рассчитать оптимальное распределение излучения. Фильтр также позволяет компенсировать эффект размытия, свойственный проекциям (Brett et al., 2019).

Механизм печати происходит следующим образом. Оптическая установка состоит из шести лазерных диодов с длиной волны 405 нм. Диоды объединены в один луч с помощью линзы. Луч выходит из волокна, проходит через асферическую линзу и проецируется на цифровое микрзеркальное устройство. Затем луч проходит через цилиндрическую стеклянную емкость, содержащую фотополимер. Вогнутая цилиндрическая линза, расположенная в непосредственной близости от флакона, исправляет искажение, вызванное цилиндрической поверхностью раздела флакона (Bernal et al., 2019). Общий план строения томографического 3D биопринтера представлен на рис. 6б.

Когда все пиксели на цифровом микрзеркальном устройстве находятся в состоянии “Вкл”, мощность светового луча, направляемого во флакон, составляет приблизительно 1.6 Вт (Bernal et al., 2019).

Скорость печати зависит от вязкости фотополимера. В среднем объект в несколько квадратных сантиметров печатается менее 30 с с максимальной скоростью  $\sim 1\text{--}2\text{ мм}^2/\text{с}$ . Выживаемость клеток составляет 80–90%. Разрешающая способность – 16–33 мкм (Bernal et al., 2019). Модель печатается полностью одновременно, что позволяет создавать трехмерные конструкции со сложной архитектурой и большим количеством полостей.

Эта технология имеет большинство стандартных недостатков для принтеров, основанных на фотоли-

тографии. Основным недостатком является сложность компьютерных программ для принтера и сложность его устройства (Loterie et al., 2018).

#### 4D-БИОПЕЧАТЬ

Основная задача этого подхода – решить проблемы, с которыми не справляется стандартная 3D-биопечать. К ним относится создание сложных полых конструкций по типу разветвленной сосудистой сети с мелкими капиллярами. Помимо этого, печать стандартными методами не может обеспечить рост и пролиферацию клеток в центре сложных трехмерных структур (Gao et al., 2016).

4D-биопечать позволяет создавать конструкции, которые меняют свою форму или функции со временем или под действием внешней стимуляции, такой как тепло, влажность, свет, магнитное поле или величина pH. Для печати используют умные материалы (smart materials) (Gao et al., 2016), которые могут собираться (Kirillova et al., 2017), раскладываться (Ionov, 2018) и имеют хотя бы один из таких свойств, как память формы, самопроизвольное срабатывание и др. (Kokkinis et al., 2015). Основные типы стимулов и ответов на них умных материалов представлены на рис. 7.

В качестве примера 4D-биопечати приведем мультисомы, которые в основном представляют собой водные капли, заключенные в масло (1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин). Печать таких мультисом в воде заставляет водные капли прилипать друг к другу, образуя бислои, в которых заключенные в каплю компоненты высвобождаются при изменении величины pH или температуры (Villar et al., 2011). В будущем продукты печати могут использоваться в малоинвазивных операциях, с возможностью самостоятельной

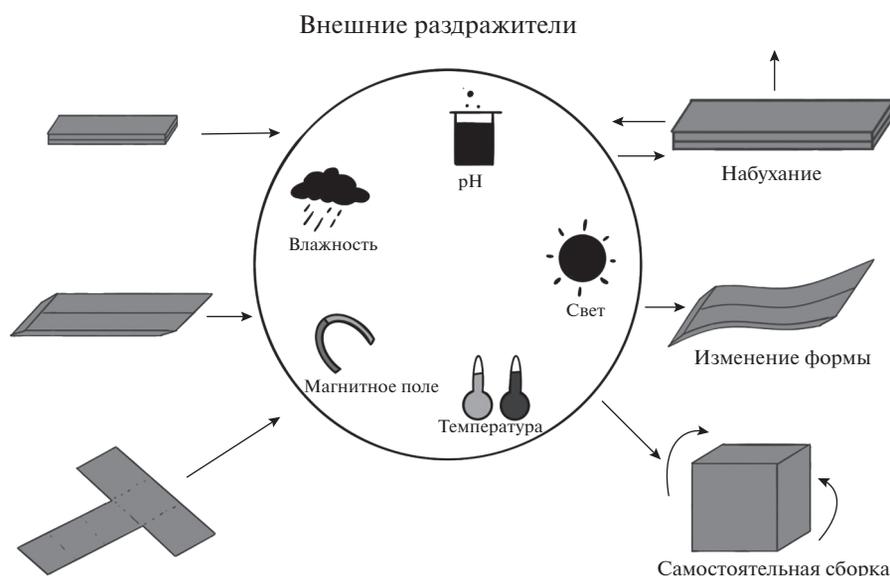


Рис. 7. Типы стимулов и ответов, наблюдаемых в умных материалах (адаптировано из: Tamay et al., 2019).

сборки до необходимой формы внутри организма человека.

Из графена и гидрогеля был изготовлен гибридный электроактивный скаффолд (Servant et al., 2014). Авторы этой работы сначала создали пластинки из графена путем его молекулярного взаимодействия с меламином. Затем был создан гибридный гидрогель из метакриловой кислоты и N,N'-метиленабисакриламида, а также инициатора пероксодисульфата калия. После чего в гидрогель были добавлены графеновые пластины (0.2 мг/мл), размером от 100 нм до 1 мкм. Эти электроактивные скаффолды демонстрируют пульсирующее высвобождение лекарственного средства при напряжении электрического поля постоянного тока 10 В (Servant et al., 2014).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

На основе проанализированной литературы по технологиям 3D-биопринтинга мы можем сделать вывод, что данные технологии будут играть важную роль в области ортопедии, регенеративной медицины и тканевой инженерии. В будущем биопринтинг будет использоваться для создания многофункциональных объектов и устройств, включая имплантаты, которые будут имитировать биологические функции, а также реагировать на меняющиеся внешние раздражители.

Уже сегодня существуют проекты, которым удалось создать модели костной, эпителиальной, мышечной ткани *in vitro* (Mandrusky et al., 2016). Данные модели схожи с тканями организма, благодаря чему они позволяют проводить доклинические исследования лекарственных молекул. Несмотря на это имеется ряд нерешенных проблем, таких как созда-

ние разветвленных сосудистых сетей и сложных многокомпонентных тканей. По этой причине пока невозможно создание полноценных органов для трансплантации (Huang et al., 2017). Кроме того, сейчас отсутствует возможность печати клеточного продукта непосредственно на месте раны.

Из представленного краткого обзора можно сделать вывод о том, что для различных потребностей необходимы различные технологии изготовления. Поэтому большинство современных разработок сосредоточены на объединении технологий для оптимизации процесса создания тканеподобных структур и ликвидации существующих у недостатков у каждой из них.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств Амурской государственной медицинской академии Министерства здравоохранения РФ.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа выполнена без участия животных или людей в качестве объектов исследования.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ali M., Pages E., Ducom A., Fontaine A., Guillemot F. 2014. Controlling laser-induced jet formation for bioprinting mesenchymal stem cells with high viability and high resolution.

- Biofabrication. V. 6. P. 045001.  
<https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/4/045001>
- Angelopoulos I., Allenby M.C., Lim M., Zamorano M. 2019. Engineering inkjet bioprinting processes toward translational therapies. *Biotechnol. Bioeng.* V. 117. P. 272.  
<https://doi.org/10.1002/bit.27176>
- Arcaute K., Mann B.K., Wicker R.B. 2011. Fabrication of off-the-shelf multilumen poly (ethylene glycol) nerve guidance conduits using stereolithography. *Tiss. Eng. Part C Methods.* V. 17. P. 27.  
<https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2010.0011>
- Ashammakhi N., Ahadian S., Xu C., Montazerian H., Ko H., Nasiri R., Barros N., Khademhosseini A. 2019. Bioinks and bioprinting technologies to make heterogeneous and biomimetic tissue constructs. *Mater. Today Bio.* V. 1. P. 100008.  
<https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2019.100008>
- Au A.K., Lee W., Folch A. 2014. Mail-order microfluidics: evaluation of stereolithography for the production of microfluidic devices. *Lab. Chip.* V. 14. P. 1294.  
<https://doi.org/10.1039/c3lc51360b>
- Barron J.A., Krizman D.B., Ringeisen B.R. 2005. Laser printing of single cells: Statistical analysis, cell viability, and stress. *Ann. Biomed. Eng.* V. 33. P. 121.  
<https://doi.org/10.1007/s10439-005-8971-x>
- Barron J.A., Rosen R., Jones-Meehan J., Spargo B.J., Belkin S., Ringeisen B.R. 2004. Biological laser printing of genetically modified *Escherichia coli* for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* V. 20. P. 246.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.01.011>
- Bernal P. N., Delrot P., Loterie D., Li Y., Malda J., Moser C., Levato R. 2019. Volumetric bioprinting of complex living-tissue constructs within seconds. *Adv. Mater.* V. 31. P. 1904209.  
<https://doi.org/10.1002/adma.201904209>
- Bishop E.S., Mostafa S., Pakvasa M., Luu H.H., Lee M.J., Wolf J.M., Ameer G.A., He T.C., Reid R.R. 2017. 3D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends. *Genes Dis.* V. 4. P. 185.  
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.10.002>
- Brett K., Indrasen B., Hossein H., Maxim S., Christopher S., Hayden T. 2019. Volumetric additive manufacturing via tomographic reconstruction. *Science.* 363. V. 363. P. 1075.  
<https://doi.org/10.1126/science.aau7114>
- Brigham M.D., Bick A., Lo E., Bendali A., Burdick J.A., Khademhosseini A. 2009. Mechanically robust and bioadhesive collagen and photocrosslinkable hyaluronic acid semi-interpenetrating networks. *Tiss. Eng. A.* V. 15. P. 1645.  
<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0441>
- Catros S., Fricain J. C., Guillotin B., Pippenger B., Bareille R., Remy M., Lebraud E., Desbat B., Amédée J., Guillemot F. 2011. Laser-assisted bioprinting for creating on-demand patterns of human osteoprogenitor cells and nano-hydroxyapatite. *Biofabrication.* V. 3. P. 025001.  
<https://doi.org/10.1088/1758-5082/3/2/025001>
- Chen Y.C., Lin R.Z., Qi H., Yang Y., Bae H., Melero-Martin J.M., Khademhosseini A. 2012. Functional human vascular network generated in photocrosslinkable gelatin methacrylate hydrogels. *Adv. Funct. Mater.* V. 22. P. 2027.  
<https://doi.org/10.1002/adfm.201101662>
- Cui H., Miao S., Esworthy T., Zhou X., Lee S. J., Liu C., Yu Z.X., Fisher J. P., Mohiuddin M., Zhang L. G. 2018. 3D bioprinting for cardiovascular regeneration and pharmacology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* V. 132. P. 252.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.014>
- Cui X., Breitenkamp K., Finn M.G., Lotz M., D'Lima D.D. 2012. Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. *Tiss. Eng. A.* V. 18. P. 1304.  
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0543>
- Cvetkovic C., Raman R., Chan V., Williams B.J., Tolish M., Bajaj P., Sakar M.S., Asada H.H., Saif M.T.A., Bashir R. 2014. Three-dimensionally printed biological machines powered by skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* V. 111. P. 10125.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1401577111>
- Derakhshanfar S., Mbeleck R., Xu K., Zhang X., Zhong W., Xing M. 2018. 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. *Bioact. Mater.* V. 3. P. 144.  
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.11.008>
- Duan B., Hockaday L. A., Kang K. H., Butcher J. T. 2013. 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 101. P. 1255.  
<https://doi.org/10.1002/jbmb.a.34420>
- Duarte Campos D. F., Blaeser A., Weber M., Jäkel J., Neuss S., Jähnen-Dechent W., Fischer, H. 2013. Three-dimensional printing of stem cell-laden hydrogels submerged in a hydrophobic high-density fluid. *Biofabrication.* V. 5. P. 015003.  
<https://doi.org/10.1088/1758-5082/5/1/015003>
- Duocastella M., Colina M., Fernández-Pradas J.M., Serra P., Morenza J.L. 2007. Study of the laser-induced forward transfer of liquids for laser bioprinting. *Appl. Surf. Sci.* V. 253. P. 7855.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2007.02.097>
- Gao B., Yang Q., Zhao X., Jin G., Ma Y., Xu F. 2016. 4D Bioprinting for biomedical applications. *Trends Biotechnol.* V. 34. P. 746.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.03.004>
- Gao G., Schilling A.F., Yonezawa T., Wang J., Dai G., Cui X. 2014. Bioactive nanoparticles stimulate bone tissue formation in bioprinted three-dimensional scaffold and human mesenchymal stem cells. *Biotechnol. J.* V. 9. P. 1304.  
<https://doi.org/10.1002/biot.201400305>
- Gruene M., Pflaum M., Deiwick A., Koch L., Schlie S., Unger C., Wilhelmi M., Haverich A., Chichkov B. N. 2011. Adipogenic differentiation of laser-printed 3D tissue grafts consisting of human adipose-derived stem cells. *Biofabrication.* V. 3. P. 015005.  
<https://doi.org/10.1088/1758-5082/3/1/015005>
- Gu Q., Tomaskovic-Crook E., Wallace G.G., Crook J.M. 2017. 3D Bioprinting human induced pluripotent stem cell constructs for in situ cell proliferation and successive multilineage differentiation. *Adv. Healthc. Mater.* V. 6. P. 10.1002.  
<https://doi.org/10.1002/adhm.201700175>
- Guillemot F., Souquet A., Catros S., Guillotin B., Lopez J., Facon M., Pippenger B., Bareille R., Rémy M., Bellance S., Chabassier P., Fricain J.C., Amédée J. 2010. High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. *Acta Biomater.* V. 6. P. 2494.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.029>
- Guillot B., Souquet A., Catros S., Duocastella M., Pippenger B., Bellance S., Bareille R., Rémy M., Bordenave L., Amédée J., Guillemot F. 2010. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization.

- Biomaterials. V. 31. P. 7250.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.055>
- Hong N., Yang G.H., Lee J., Kim G. 2018. 3D bioprinting and its in vivo applications. *Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* V. 106. P. 444.  
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.33826>
- Hopp B., Smausz T., Szabó G., Kolozsvari L., Nogradi A., Kafetzopoulos D., Fotakis C. 2012. Femtosecond laser printing of living cells using absorbing film-assisted laser-induced forward transfer. *Optical Engineering.* V. 51. P. 014302.  
<https://doi.org/10.1117/1.OE.51.1.014302>
- Hribar K. C., Soman P., Warner J., Chung P., Chen S. 2014. Light-assisted direct-write of 3D functional biomaterials. *Lab. Chip.* V. 14. P. 268.  
<https://doi.org/10.1039/c3lc50634g>
- Huang Y., Zhang X.F., Gao G., Yonezawa T., Cui X. 2017. 3D bioprinting and the current applications in tissue engineering. *Biotechnol. J.* V. 12. P. 1600734.  
<https://doi.org/10.1002/biot.201600734>
- Ikehata H., Ono T. 2011. The mechanisms of UV mutagenesis. *J. Radiat. Res.* V. 52. P. 115.  
<https://doi.org/10.1269/jrr.10175>
- Ionov L. 2018. 4D biofabrication: Materials, methods, and applications. *Adv. Healthc Mater.* V. 7. P. 1800412.  
<https://doi.org/10.1002/adhm.201800412>
- Jia W., Gungor-Ozkerim P.S., Zhang Y.S., Yue K., Zhu K., Liu W., Pi Q., Byambaa B., Dokmeci M.R., Shin S.R., Khademhosseini A. 2016. Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials.* V. 106. P. 58.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.038>
- Kelly B., Bhattacharya I., Heidari H., Shusteff M., Spadaccini C., Taylor H. 2019. Volumetric additive manufacturing via tomographic reconstruction. *Science.* V. 363.  
<https://doi.org/10.1126/science.aau7114>
- Kelly B., Bhattacharya I., Shusteff M., Taylor H., Spadaccini C. 2017. "Computed axial lithography (CAL) for rapid volumetric 3D additive manufacturing" in solid freeform fabrication. *Proc. 28th Annual Int. Solid Freeform Fabrication Symposium (University of Texas at Austin)*, P. 938.
- Kérourédan O., Bourget J. M., Rémy M., Crauste-Manciet S., Kalisky J., Catros S., Thébaud N. B., Devillard R. 2019. Micropatterning of endothelial cells to create a capillary-like network with defined architecture by laser-assisted bioprinting. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* V. 30. P. 28.  
<https://doi.org/10.1007/s10856-019-6230-1>
- Kirilova A., Maxson R., Stoychev G., Gomillion C.T., Ionov L. 2017. 4D biofabrication using shape-morphing hydrogels. *Adv. Mater.* V. 29. P. 1703443.  
<https://doi.org/10.1002/adma.201703443>
- Knowlton S., Onal S., Yu C.H., Zhao J.J., Tasoglu S. 2015. Bioprinting for cancer research. *Trends Biotechnol.* V. 33. P. 504.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.007>
- Knowlton S., Yenilmez B., Anand S., Tasoglu S. 2017. Photocrosslinking-based bioprinting: examining crosslinking schemes. *Bioprinting.* V. 5. P. 10.  
<https://doi.org/10.1016/j.bprint.2017.03.001>
- Kokkinis D., Schaffner M., Studart A.R. 2015. Multimaterial magnetically assisted 3D printing of composite materials. *Nat Commun.* V. 6. P. 8643.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms9643>
- Kolesky D.B., Homan K.A., Skylar-Scott M.A., Lewis J.A. 2016. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 113. P. 3179.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1521342113>
- Lawrence J., Cameron D., Argyle D. 2015. Species differences in tumour responses to cancer chemotherapy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* V. 370. P. 1673.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0233>
- Lee J.M., Yeong W.Y. 2016. Design and printing strategies in 3D bioprinting of cell-hydrogels: A review. *Adv. Healthc. Mater.* V. 5. P. 2856.  
<https://doi.org/10.1002/adhm.201600435>
- Li J., Chen M., Fan X., Zhou H. 2016. Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects. *J. Transl. Med.* V. 14. P. 271.  
<https://doi.org/10.1186/s12967-016-1028-0>
- Li X., Chen J., Liu B., Wang X., Ren D., Xu T. 2018. Inkjet printing for biofabrication. In: Ovsianikov A., Yoo J., Mironov V. (Eds.). *3D Printing and Biofabrication. Ref. Series Biomed. Eng.* P. 1.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-45444-3\\_26](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45444-3_26)
- Ligon S.C., Liska R., Stampfl J., Gurr M., Mühlaupt R. 2017. Polymers for 3D printing and customized additive manufacturing. *Chem. Rev.* V. 117. P.10212.  
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00074>
- Lim K.S., Levato R., Costa P.F., Castilho M.D., Alcalá-Orozco C.R., van Doremalen K., Melchels F., Gawlitta D., Hooper G.J., Malda J., Woodfield T. 2018. Bio-resin for high resolution lithography-based biofabrication of complex cell-laden constructs. *Biofabrication.* V. 10. P. 034101.  
<https://doi.org/10.1088/1758-5090/aac00c>
- Lin Y., Huang G., Huang Y., Tzeng T., Chrisey D. 2010. Effect of laser fluence in laser-assisted direct writing of human colon cell. *Rapid Prototyping J.* V. 16. P. 202.  
<https://doi.org/10.1108/13552541011034870>
- Liu W., Zhang Y.S., Heinrich M.A., De Ferrari F., Jang H.L., Bakht S.M., Alvarez M.M., Yang J., Li Y.C., Trujillo-de Santiago G., Miri A.K., Zhu K., Khoshakhlagh P., Prakash G., Cheng H., Guan X., Zhong Z. et al. 2017. Rapid continuous multimaterial extrusion bioprinting. *Adv. Mater.* V. 29. P. 10.1002.  
<https://doi.org/10.1002/adma.201604630>
- Loterie D., Delrot P., Moser C. 2018. Volumetric 3D printing of elastomers by tomographic back-projections. Preprint.  
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20027.46889>
- Lv D., Hu Z., Lu L., Lu H., Xu X. 2017. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncol. Lett.* V. 14. P. 6999.  
<https://doi.org/10.3892/ol.2017.7134>
- Ma X., Liu J., Zhu W., Tang M., Lawrence N., Yu C., Gou M., Chen S. 2018. 3D bioprinting of functional tissue models for personalized drug screening and in vitro disease modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* V. 132. P. 235.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.011>
- Ma X., Qu X., Zhu W., Li Y. S., Yuan S., Zhang H., Liu J., Wang P., Lai C. S., Zanella F., Feng G. S., Sheikh F.,

- Chien S., Chen S.* 2016. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 113. P. 2206. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524510113>
- Mandrycky C., Wang Z., Kim K., Kim D.H.* 2016. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol. Adv.* V. 34. P. 422. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>
- Rocca M., Fragasso A., Liu W., Heinrich M.A., Zhang Y.S.* 2018. Embedded multimaterial extrusion bioprinting. *SLAS Technol.* V. 23. P. 154. <https://doi.org/10.1177/2472630317742071>
- Matsusaki M., Sakaue K., Kadowaki K., Akashi M.* 2013. Three-dimensional human tissue chips fabricated by rapid and automatic inkjet cell printing. *Adv. Healthc. Mater.* V. 2. P. 534. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200299>
- Min D., Lee W., Bae I.H., Lee T.R., Croce P., Yoo S.S.* 2017. Bioprinting of biomimetic skin containing melanocytes. *Exper. Dermatol.* V. 27. P. 453. <https://doi.org/10.1111/exd.13376>
- Miri A.K., Mostafavi E., Khorsandi D., Hu S.K., Malpica M., Khademhosseini A.* 2019. Bioprinters for organs-on-chips. *Biofabrication*. V. 11. P. 042002. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab2798>
- Mondschein R.J., Kanitkar A., Williams C.B., Verbridge S.S., Long T.E.* 2017. Polymer structure-property requirements for stereolithographic 3D printing of soft tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. V. 140. P. 170. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.06.005>
- Murphy S.V., Atala A.* 2014. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* V. 32. P. 773. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>
- Ong C.S., Yesanatharao P., Huang C.Y., Mattson G., Boktor J., Fukunishi T., Zhang H., Hibino N.* 2018. 3D bioprinting using stem cells. *Pediatr. Res.* V. 83. P. 223. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.252>
- Ozbolat I.T., Hospodiuk M.* 2016. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*. V. 76. P. 321. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.076>
- Pataky K., Braschler T., Negro A., Renaud P., Lutolf M.P., Brugger J.* 2012. Microdrop printing of hydrogel bioinks into 3D tissue-like geometries. *Adv. Mater.* V. 24. P. 391. <https://doi.org/10.1002/adma.201102800>
- Pepper M.E., Seshadri V., Burg T., Booth B.W., Burg K.J., Groff R.E.* 2011. Cell settling effects on a thermal inkjet bioprinter. *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* V. 2011. P. 3609. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2011.6090605>
- Pirlo R. K., Wu P., Liu J., Ringeisen B.* 2012. PLGA/hydrogel biopapers as a stackable substrate for printing HUVEC networks via BioLP. *Biotechnol. Bioeng.* V. 109. P. 262. <https://doi.org/10.1002/bit.23295>
- Sabnis A., Rahimi M., Chapman C., Nguyen K. T.* 2009. Cyto-compatibility studies of an in situ photopolymerized thermoresponsive hydrogel nanoparticle system using human aortic smooth muscle cells. *J. Biomed. Mater. Res. A*. V. 91. P. 52. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32194>
- Scalera F., Corcione C. E., Montagna F., Sannino A., Maffezzoli A.* 2014. Development and characterization of UV curable epoxy/hydroxyapatite suspensions for stereolithography applied to bone tissue engineering. *Ceram. Int.* V. 40. P. 15455. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.06.117>
- Servant A., Leon V., Jasim D., Methven L., Limousin P., Fernandez-Pacheco E.V., Prato M., Kostarelos K.* 2014. Graphene-based electroresponsive scaffolds as polymeric implants for on-demand drug delivery. *Adv. Healthc. Mater.* V. 3. P. 1334. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400016>
- Tabriz A.G., Hermida M.A., Leslie N.R., Shu W.* 2015. Three-dimensional bioprinting of complex cell laden alginate hydrogel structures. *Biofabrication*. V. 7. P. 045012. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/7/4/045012>
- Tamay D. G., Dursun Usal T., Alagoz A. S., Yucel D., Hasirci N., Hasirci V.* 2019. 3D and 4D printing of polymers for tissue engineering applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 7. P. 164. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00164>
- Tao J., Hu Y., Wang S., Zhang J., Liu X., Gou Z., Cheng H., Liu Q., Zhang Q., You S., Gou M.* 2017. A 3D-engineered porous conduit for peripheral nerve repair. *Sci. Rep.* V. 7. P. 46038. <https://doi.org/10.1038/srep46038>
- Tasoglu S., Gurkan U. A., Wang S., Demirci U.* 2013. Manipulating biological agents and cells in micro-scale volumes for applications in medicine. *Chem. Soc. Rev.* V. 42. P. 5788. <https://doi.org/10.1039/c3cs60042d>
- Vijayavenkataraman S., Yan W. C., Lu W. F., Wang C. H., Fuh J.* 2018. 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* V. 132. P. 296. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.004>
- Villar G., Heron A.J., Bayley H.* 2011. Formation of droplet networks that function in aqueous environments. *Nat. Nanotechnol.* V. 6. P. 803. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.183>
- Wang Z., Kumar H., Tian Z., Jin X., Holzman J. F., Menard F., Kim K.* 2018. Visible light photoinitiation of cell-adhesive gelatin methacryloyl hydrogels for stereolithography 3D bioprinting. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. V. 10. P. 26859. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b06607>
- Wu Z., Su X., Xu Y., Kong B., Sun W., Mi S.* 2016. Bioprinting three-dimensional cell-laden tissue constructs with controllable degradation. *Sci. Rep.* V. 6. P. 24474. <https://doi.org/10.1038/srep24474>
- Xia Z., Jin, S., Ye K.* 2018. Tissue and organ 3D bioprinting. *SLAS Technol.: Translating Life Sci. Innov.* V. 23. P. 301. <https://doi.org/10.1177/2472630318760515>
- Xu T., Baicu C., Aho M., Zile M., Boland T.* 2009. Fabrication and characterization of bio-engineered cardiac pseudo-tissues. *Biofabrication*. V. 1. P. 035001. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/1/3/035001>
- Zhu W., Ma X., Gou M., Mei D., Zhang K., Chen S.* 2016. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* V. 40. P. 103. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.03.014>

## Advanced 3D Bioprinting Technologies

**D. V. Leonov<sup>a,\*</sup>, Yu. A. Spirina<sup>a</sup>, A. A. Yatsenko<sup>a</sup>, V. A. Kushnarev<sup>b</sup>, E. M. Ustinov<sup>a</sup>, and S.V. Barannikov<sup>a</sup>**

*<sup>a</sup>Amur State Medical Academy Ministry of Health of the Russian Federation, Blagoveshchensk, 675006 Russia*

*<sup>b</sup>Petrov National Medical Research Center of Oncology, St. Petersburg, 191124 Russia*

*\*e-mail: d.leonov1998@gmail.com*

The review considers seven most promising 3D printing technologies for tissue engineering: inkjet, extrusion, laser, stereolithography, 4D printing, tomographic printing and digital light processing. We have analyzed possibilities and disadvantages of the methods, the mechanisms of their work and given examples of successful tissue engineering developments carried out by these bioprinting methods.

**Keywords:** tissue engineering, 3D bioprinting, 3D printing

## СНИЖЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕПАРАЦИИ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ СПОСОБСТВУЕТ НАКОПЛЕНИЮ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ПРИ СТАРЕНИИ КЛЕТОК

© 2021 г. П. И. Дерябин<sup>1</sup>, А. В. Бородкина<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

\*E-mail: borodkina618@gmail.com

Поступила в редакцию 22.03.2021 г.

После доработки 30.03.2021 г.

Принята к публикации 01.04.2021 г.

Накопление стареющих клеток в организме положительно коррелирует с возрастом и рассматривается как один из факторов риска возраст-зависимого увеличения частоты опухолевых заболеваний. Во многом опухоль-промотирующую роль стареющих клеток связывают с паракринным влиянием на клетки микроокружения ассоциированного со старением секреторного фенотипа. Однако согласно недавним исследованиям, неопластическая трансформация также может быть обусловлена геномной нестабильностью стареющих клеток, возникающей вследствие накапливающихся повреждений ДНК. Настоящая работа посвящена исследованию молекулярных механизмов, которые могут обуславливать возникновение и накопление повреждений ДНК при старении клеток. В качестве моделей клеточного старения мы использовали репликативное и стресс-индуцированное старение эндометриальных стромальных клеток человека (эСК). Мы показали, что для обоих типов старения эСК характерно образование персистирующих фокусов повреждения ДНК. Используя генетически-кодируемый биосенсор НуРег, мы выявили снижение эффективности антиоксидантной защиты в стареющих эСК. Одновременно с этим в таких клетках существенно увеличивался уровень эндогенных активных форм кислорода (АФК), что в совокупности может приводить к возникновению фокусов повреждения ДНК в стареющих клетках. В свою очередь, накопление фокусов повреждения ДНК может быть опосредовано снижением эффективности работы систем репарации при старении эСК, о чем свидетельствуют как данные транскриптомного анализа, так и результаты оценки динамики репарации повреждений, вызванных окислительным стрессом или ионизирующим излучением. Таким образом, накопление повреждений ДНК в стареющих эСК связано, с одной стороны, с неэффективной антиоксидантной защитой и повышенным уровнем АФК, а с другой стороны, с низкой эффективностью репарации повреждений.

**Ключевые слова:** клеточное старение, геномная нестабильность, повреждения ДНК, репарация, активные формы кислорода, НуРег, эндометриальные стромальные клетки человека

**DOI:** 10.31857/S0041377121040027

Старение принято рассматривать как односторонний и необратимый процесс ухудшения работы организма на молекулярном, клеточном, тканевом и органном уровнях (Hayflick, 2002). Помимо общего снижения функциональной активности всех систем организма, с возрастом существенно повышается риск развития рака, остеопороза, сердечно-

сосудистых заболеваний, деменций и множества других патологий самой разной этиологии (Kirkwood, 2005). Сегодня для оценки реального биологического возраста человека и поиска корреляций с риском развития тех или иных патологий и (или) смертности проводят комплексный анализ, комбинируя самые разнообразные показатели, начиная от самых общих, таких как индекс массы тела, качество слуха и зрения, двигательная активность, признаки старческой астении, уровень кровяного давления, гемоглобина, глюкозы, холестерина, апополипротеина В, до более специфических – таких как, длина теломера и статус метилирования ДНК, измеренный при помощи эпигенетических часов Horvath/Hannum/GrimAge/PhenoAge (Levine, 2013; Li et al., 2020).

Отдельное место в ряду маркеров биологического возраста занимает клеточное старение. Во-первых,

**Принятые сокращения:** АФК – активные формы кислорода; эСК – эндометриальные стромальные клетки человека; BER – эксцизионная репарация оснований (base excision repair); CAT – каталаза; DSBs – двуцепочечные разрывы ДНК (double-strand breaks); GPX1 – глутатионпероксидаза 1; HR – гомологичная рекомбинация (homologous recombination); MMR – репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch repair); NER – эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair); NHEJ – негомологичное соединение концов (non-homologous end joining); SA-β-Gal – ассоциированная со старением бета-галактозидаза; SOD1 – супероксиддисмутаза.

установлено, что практически у всех позвоночных с возрастом происходит накопление стареющих клеток в организме (Jeupalan et al., 2007; Liu et al., 2009). Во-вторых, показано, что накопление стареющих клеток в тканях сопровождается прогрессией различных возраст-ассоциированных заболеваний, включая атеросклероз, остеопороз, рак, нейродегенеративные заболевания и множество других (Roos et al., 2016; Chinta et al., 2018; Zhang et al., 2019; Alimirah et al., 2020; Chandra et al., 2020; Kirkland, Tchkonja, 2020). Более того, экспериментальные работы с использованием трансгенных мышечных моделей демонстрируют, что клеточное старение скорее является причиной организменного старения, нежели его следствием (Baker et al., 2016). Последнее подчеркивает необходимость детального изучения молекулярных основ клеточного старения, что в перспективе может помочь не только устанавливать корреляции между возрастом и какими-либо функциональными изменениями, а понимать причины этих возрастных изменений.

Существует несколько механизмов появления стареющих клеток в тканях. Так, укорочение теломера опосредует запуск репликативного старения, мутации, приводящие к активации онкогенов или инактивации тумор-супрессоров, обуславливают индукцию онкоген-индуцированного старения и, наконец, воздействие различных стрессов (окислительный, УФ-облучение,  $\gamma$ -радиация, тепловой и др.) способствует развитию стресс-индуцированного старения (Hernandez-Segura et al., 2018). Независимо от разнообразных индукторов, выделяют ряд характерных признаков стареющих клеток, к которым относятся необратимая потеря пролиферативной активности, гипертрофия, активация сигнальных путей p53/p21 и p16/Rb, появление активности бета-галактозидазы, ассоциированной со старением (SA- $\beta$ -Gal), дисфункция митохондрий, повышение уровня активных форм кислорода (АФК), аккумуляция липофусцина, изменение состава секретируемых факторов и накопление повреждений ДНК (Hernandez-Segura et al., 2018). Стоит подчеркнуть, что это далеко не полный перечень модификаций, которые сопровождают старение клеток (Hernandez-Segura et al., 2018).

Несмотря на драматические внутриклеточные изменения и необратимую остановку клеточного цикла, в течение длительного времени стареющие клетки остаются жизнеспособными и сохраняют метаболическую активность. При благоприятном сценарии, стареющие клетки, несущие повреждения, распознаются и удаляются из организма клетками иммунной системы (Prata et al., 2018; Kale et al., 2020). В противном случае, эти клетки накапливаются и за счет своей паракринной активности негативно влияют на микроокружение, постепенно приводя к дисфункции тканей, в которых они локализируются (Ovadya, Krizhanovsky, 2014; Zhu et al., 2014; The Tabula Muris Consortium, 2020).

Вплоть до недавнего времени эти два сценария очень упрощенно описывали вклад стареющих клеток в прогрессию организменного старения. Важно, что оба сценария предполагают, что клеточное старение по аналогии со старением организма — это запрограммированный и однонаправленный процесс постепенной дисрегуляции всех внутриклеточных систем, который в конечном итоге заканчивается клеточной гибелью. Однако работы последних лет свидетельствуют о том, что постепенное накопление персистирующих повреждений ДНК в стареющих клетках и “адаптация” к этим повреждениям в ряде случаев могут приводить к возвращению стареющих клеток в цикл и, таким образом, способствовать онкотрансформации (Gosselin et al., 2009; Graziano, Gonzalo, 2017; Coutelier et al., 2018; Zampetidis et al., 2021).

В связи с этим, вопрос поддержания геномной стабильности по мере развития старения клеток является принципиально важным как в контексте общего старения организма, так и в контексте развития рака. В настоящей работе мы сфокусировались на исследовании молекулярных причин, которые могут обуславливать геномную нестабильность стареющих клеток — эндометриальных стромальных клеток (ЭСК). А именно, мы постарались разобраться с тем, что может приводить к возникновению и накоплению персистирующих повреждений ДНК в стареющих ЭСК.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Культивирование эндометриальных стромальных клеток человека (ЭСК).** В настоящей работе использовали ЭСК человека (линия 2804), ранее полученные и охарактеризованные сотрудниками ИИЦ РАН (Санкт-Петербург) (Земелько и др., 2011). ЭСК культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки (NuClone, США), 1% гентамицина и 1% глутамакса, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

**Моделирование репликативного и стресс-индуцированного старения ЭСК.** Клетки (ЭСК) считали репликативно старыми после достижения 28-ого пассажа, когда клетки практически полностью утрачивали пролиферативную активность. Для индукции стресс-индуцированного старения ЭСК на ранних пассажах (6–9) подвергали сублетальному окислительному воздействию, добавляя в бессывороточную среду H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (конечная концентрация 200 мкМ), раствор которой готовили из 30%-ной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> непосредственно перед использованием. Обработку клеток проводили в течение 1 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, после чего клетки дважды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и далее культивировали в свежей ростовой среде (клетки не пересеивали, так как сразу после обработки H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> клетки останавливались в цикле и полностью утра-

чивали способность пролиферировать). Наличие маркеров старения анализировали не ранее, чем на 28-м пассаже в случае репликативного старения ЭСК и не ранее, чем через 14 сут после окислительного воздействия в случае стресс-индуцированного старения.

**Анализ пролиферативной активности, размера и автофлуоресценции клеток.** Прикрепленные клетки снимали с чашек смесью растворов трипсина и Версена (0.05%), осаждали центрифугированием и промывали раствором PBS. Для построения кривых роста образец окрашивали йодистым пропидием (PI; 50 мкг/мл) и анализировали количество PI-негативных (живых) клеток в указанные временные точки на цитофлуориметре CytoFlex или CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Изменение размера клеток оценивали по изменению прямого светорассеяния (FS) живых клеток. Накопление липофусцина (агрегатов поврежденных макромолекул, накапливающихся в лизосомах стареющих клеток) оценивали по среднему значению его автофлуоресценции. Данные анализировали с помощью программы CytExpert (версии 1.2 и 2.0).

**Оценка уровня внутриклеточных АФК.** Использовали флуоресцентный краситель 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетат ( $H_2DCF-DA$ ) (Molecular Probes, США). Прикрепленные к поверхности чашки клетки инкубировали в течение 20 мин при 37°C в темноте в среде без сыворотки, содержащей 10 мкМ красителя. После окончания времени инкубации с красителем клетки промывали PBS, переводили в суспензионное состояние при помощи смеси растворов трипсина и Версена (0.05%) и анализировали на проточном цитометре. В каждом образце анализировали не менее 10 тыс. клеток.

**Количественный и качественный анализ активности SA- $\beta$ -Gal.** Для количественной оценки активности SA- $\beta$ -Gal использовали флуоресцентный краситель  $C_{12}FDG$  (5-dodecanoylamino fluorescein Di- $\beta$ -D-galactopyranoside) (Invitrogen, США). Проникая в клетки, этот субстрат расщепляется  $\beta$ -галактозидазой и превращается во флуоресцирующий продукт, который удерживается в клетке. Процедуру пробоподготовки проводили в соответствии с инструкцией производителя, последующий анализ интенсивности флуоресценции осуществляли на проточном цитометре. Качественно активность SA- $\beta$ -Gal выявляли с помощью фирменного набора Senescence-galactosidase staining kit (Cell Signaling, США). Все процедуры осуществляли в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Клетки на чашках промывали PBS, фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре 1-кратным фиксирующим раствором, после чего дважды промывали PBS и окрашивали в  $\beta$ -галактозидазном растворе при 37°C в течение ночи. Об активности SA- $\beta$ -Gal судили по появлению синих гранул в цитоплазме клеток.

**Функциональная характеристика антиоксидантных систем клетки.** Оценивали скорость восстановления генетически кодируемого сенсора перекиси водорода HuPer (Belousov et al., 2006) после однократного добавления  $H_2O_2$  в клеточную среду. В экспериментах использовали линию ЭСК, экспрессирующую HuPer в клеточной цитоплазме (Lyublinskaya et al., 2018). Оценивали динамику изменения флуоресцентного сигнала HuPer, отражающего уровень окисления сенсора. Клетки ресуспензировали в свежей ростовой среде (50 тыс. кл./мл), 20 мин выдерживали при 5%  $CO_2$  и 37°C, добавляли в суспензию 200 мкМ  $H_2O_2$ , аликвотировали в микропробирки по 200 мкл, после чего каждые 5 мин последовательно анализировали пробы на проточном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США) на протяжении 45 мин. Для калибровки флуоресцентного сигнала биосенсора использовали образцы клеток, инкубированные в течение 10 мин с избыточными дозами  $H_2O_2$  (1 мМ) и дитиотреитола (30 мМ), соответственно принимая уровень сигнала в этих пробах за 1 (полностью окисленный сенсор) и 0 (полностью восстановленный сенсор) (Lyublinskaya et al., 2018). В ходе предварительных экспериментов проверяли скорость самопроизвольного восстановления сенсора: к клеткам после 5-минутного действия  $H_2O_2$ , которая приводила к полному окислению HuPer, добавляли каталазу (1000 U), которая мгновенно элиминирует  $H_2O_2$  в клеточной среде. В этих условиях флуоресцентный сигнал HuPer возвращался к своему базальному уровню в течение 3–5 мин, что позволило нам использовать этот сенсор для анализа кинетики существенно более медленных процессов восстановления сенсора при элиминации экзогенного  $H_2O_2$  клетками.

**Электрофорез и иммуноблоттинг.** Пробоподготовку, электрофорез и иммуноблоттинг осуществляли в соответствии с процедурой подробно описанной в нашей предыдущей работе (Дерябин и др., 2015). Для специфического выявления белков использовали антитела против ингибитора циклин-зависимых киназ p21, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, clone 14C10), фосфорилированной формы белка Rb (p-Rb; Ser807/811), фосфорилированной формы гистона H2AX (p-(H2AX; Ser139), белков ламин А и С (LMNA/C) и ядерного негистонного белка (high-mobility group protein B1, HMGB1 (D3E5)). В качестве вторичных антител применяли козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика (GAR-HRP) или мыши (GAM-HRP). Все антитела приобретены в фирме Cell Signaling (США).

**Имунофлуоресцентный анализ.** Клетки выращивали на покровных стеклах 8 × 8 мм (Menzel-Glaser, Германия), помещенных в пластиковые чашки диаметром 35 мм (Corning, США). Стекла с клетками дважды промывали теплым PBS, затем клетки фиксировали 4%-ным раствором формалина (Sigma,

США) в течение 15 мин при комнатной температуре. После фиксации клетки промывали PBS и пермеабелизовали 10 мин при комнатной температуре раствором PBS, содержащим 0.1% Тритона. Далее стекла инкубировали в 1%-ном растворе BSA в PBS для блокирования неспецифического связывания. Аналогичный по составу раствор использовали для разведения первичных антител. Для специфического выявления белков использовали следующие первичные антитела: моноклональные мышинные антитела против киназы ATM, фосфорилированной по Ser1981 (Invitrogen, США); поликлональные кроличьи антитела против  $\gamma$ H2AX (Ser139) (Cell Signaling, США). С первичными антителами клетки инкубировали в течение ночи при 4°C. После окончания инкубации клетки промывали раствором PBS, содержащим 0.01% Tween-20. Далее клетки инкубировали с вторичными антителами в течение 30 мин при 37°C в темноте. В качестве вторичных антител применяли козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 568 (Life Technologies, США) или козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США). Ядра клеток окрашивали с помощью DAPI (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл. Далее покровные стекла заключали в глицериновый буфер с 2% пропилгаллата. Распределение флуоресцентно-меченных белков в клетках изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal (Carl Zeiss, Германия), оборудованного цифровой камерой DCF 420C (Leica, Германия). Использовали объективы с увеличением 40 $\times$  и 100 $\times$ .

**Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени.** Выделение РНК, обратную транскрипцию и ПЦР в реальном времени проводили в соответствии с процедурой, подробно описанной в нашей предыдущей работе (Griukova et al., 2019). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали следующие специфические праймеры к генам каталазы (*CAT*): прямой 5'-ТТААТССАТТССГАТСТСАСС-3' и обратный 5'-GGCGGTGAGTGTСAGGАТАG-3', температура отжига 59°C (210 н.п.); супероксиддисмутазы 1 (*SOD1*): прямой 5'-GGTCCSTCACTTTAATCCCTC-TAT-3' и обратный 5'-САТСТТТGTСAGCAGTCA-САТТ-3', температура отжига 59°C (97 п.н.); глутатионпероксидазы 1 (*GPXI*): прямой 5'-CGCCACCGC-GCTTATGACCG-3' и обратный 5'-GCAGCACT-GCAACTGCCAAGCAG-3', температура отжига 59°C (238 п.н.). В качестве количественного и качественного контроля кДНК использовали олигонуклеотидные праймеры для *GAPDH* прямой 5'-GAG-GTCAATGAAGGGGTСAT-3' и обратный 5'-AGT-CAACGGATTTGGTСGTA-3', температура отжига 59°C (100 п.н.). Все праймеры получены из фирмы Евроген (Россия).

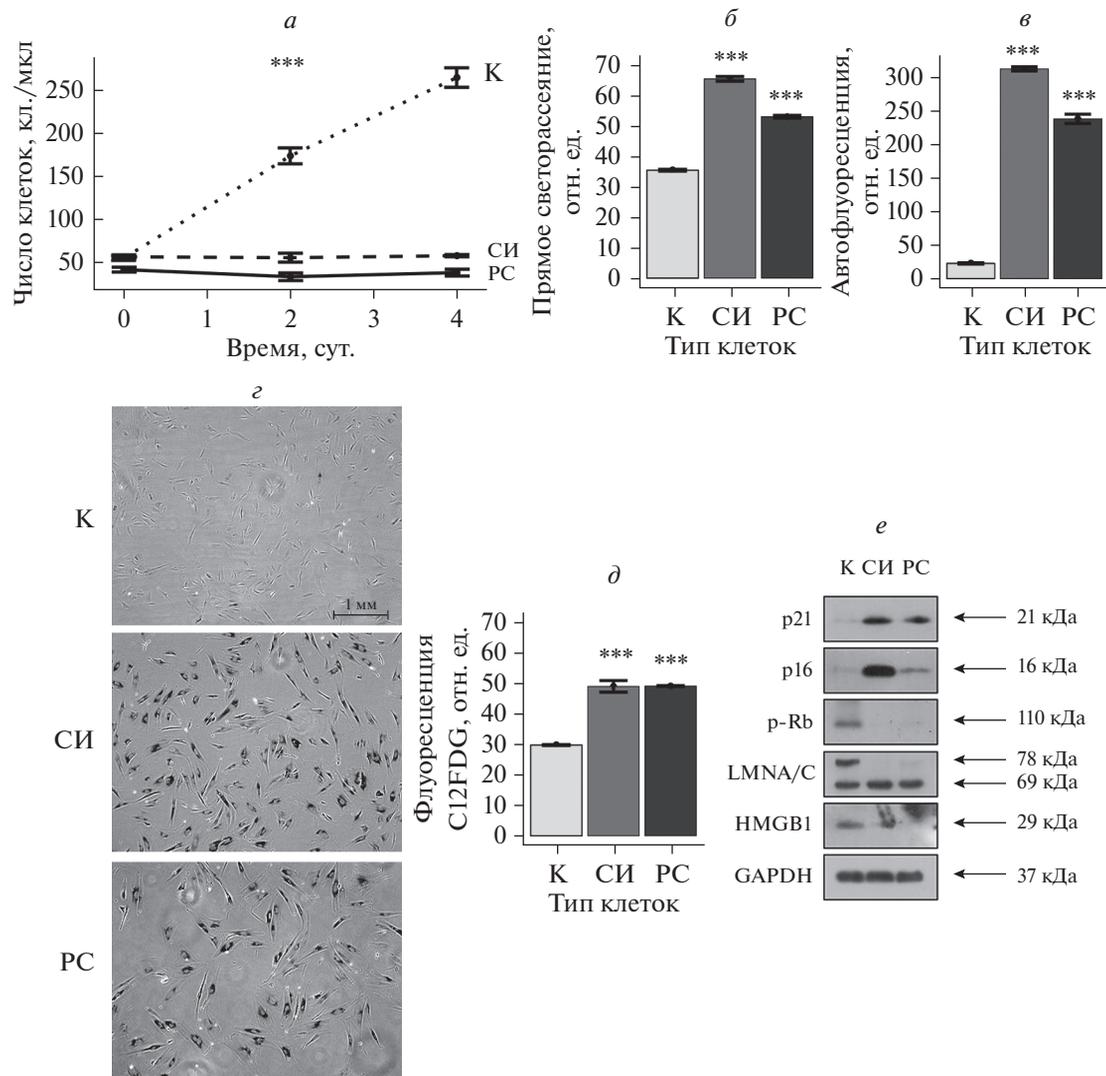
**Биоинформатический анализ.** В работе использовали набор данных РНК-секвенирования, полученный нами ранее и доступный в публичном репозито-

рии Gene Expression Omnibus по идентификатору GSE160702. Обработка сырых данных, квантификация единиц экспрессии транскриптов, суммирование транскриптов до уровня генов и статистическое тестирование дифференциальной экспрессии проводили с использованием инструментов FastqPuri (версия 1.0.7), BBtools (версия 38.75), salmon (версия 1.1.0), tximeta (версия 1.4.5) и пакета DESeq2 (версия 1.26.0) для программы R. Подробное описание параметров анализа приведено в нашей опубликованной работе (Deryabin et al., 2021). Анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA) выполняли с использованием пакетов R-Studio clusterProfiler (версия 3.14.3) и fgsea (версия 1.12.0) на основании баз Gene Ontology (GO) и Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway (KEGG Pathway).

**Статистическая обработка данных.** Статистический анализ выполнен с использованием программы R. Данные представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений ( $n = 3$ ). При установлении достоверности различий данных между двумя группами использовали *t*-тест Стьюдента, для множественных сравнений между группами применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Тьюки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Характеристика репликативно- и стресс-индуцированно стареющих ЭСК.** Для исследования молекулярных причин, способствующих возникновению и накоплению повреждений ДНК в стареющих клетках, мы использовали две наиболее распространенные модели клеточного старения – репликативное и стресс-индуцированное. Для индукции репликативного старения ЭСК пассировали до достижения 28 пассажа, когда клетки практически полностью утрачивали способность пролиферировать. Для запуска стресс-индуцированного старения ЭСК на ранних пассажах подвергали однократному сублетальному окислительному воздействию (200 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 ч) с последующим культивированием в свежей ростовой среде в течение минимум 14 сут. Для верификации состояния старения мы проанализировали панель классических маркеров клеточного старения. Как показано на рис. 1а–е, вне зависимости от типа, стареющие ЭСК характеризовались потерей пролиферативной активности, увеличением размера, накоплением липофусцина, появлением активности SA- $\beta$ -Gal, активацией классических сигнальных путей p21/Rb и p16/Rb, а также снижением экспрессии ламина А/С (LMNA/С) и ядерного негистонового HMGВ1 белка (рис. 1а–е). Таким образом, выбранные нами модели адекватно отражают репликативную и стресс-индуцированную формы старения ЭСК, и, соответственно, могут быть использованы для анализа механизмов, опосредующих накопление повреждений ДНК при старении клеток.

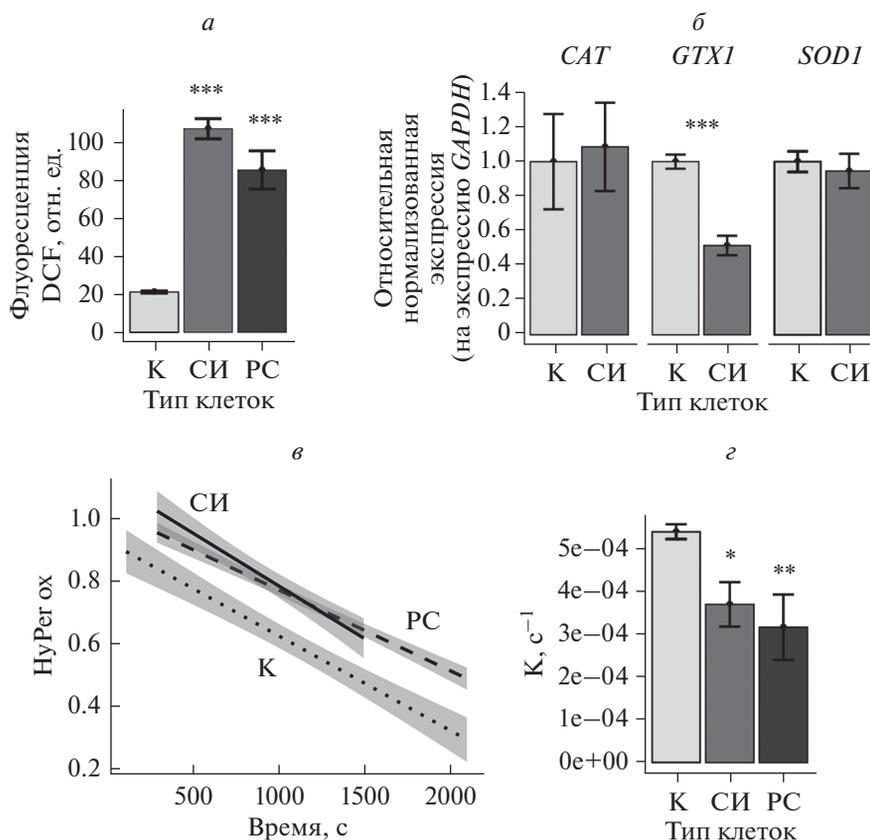


**Рис. 1.** Основные характеристики стареющих эндометриальных стромальных клеток человека (ЭСК). *а* – Кривые роста контрольных (К), репликативно состаренных (РС) и стресс-индуцированно (СИ) состаренных ЭСК. *б* – Средний размер клеток, определенный по прямому светорассеянию. *в* – Уровень автофлуоресценции клеток, отражающий накопление липофусциновых гранул. *з*, *д* – Активность SA-β-Gal в контрольных, РС и СИ-состаренных ЭСК, выявленная цитохимически или по интенсивности флуоресценции красителя C<sub>12</sub>FDG соответственно. *е* – Уровни экспрессии белков p16, p21, LMNA/C, HMGB1 и фосфорилирования Rb, выявленные с помощью специфических антител; справа указаны мол. массы; в качестве контроля нагрузки использовали GAPDH. *а*, *б*, *в*, *д* – Данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений ( $n = 3$ ); различия достоверны (\*\*\*) при  $p < 0.001$ : при наличии внутригрупповых отличий для каждого типа клеток (*а*, тест ANOVA) и по сравнению с контролем (*б*, *в*, *з*, тест ANOVA с поправкой по Тьюки).

**Репликативный и стресс-индуцированный типы старения ЭСК сопровождаются накоплением повреждений ДНК.** На следующем этапе мы оценили наличие маркеров повреждения ДНК в стареющих ЭСК. Известно, что персистирующие фокусы повреждения ДНК характерны для всех типов клеточного старения, однако первоначальные источники их появления при репликативном и стресс-индуцированном старении различаются. Так, в случае репликативного старения незащищенные концы теломер, образующиеся в результате их укорочения до критического уровня, распознаются клеткой как двойные

разрывы ДНК (Takai et al., 2003). В случае стресс-индуцированного старения сами ДНК-повреждающие стимулы непосредственно приводят к формированию двойных разрывов, часть из этих повреждений затем может успешно репарироваться, а часть может сохраняться (Borodkina et al., 2014; Shmulevich, Krizhanovsky, 2021). Вне зависимости от источника, в местах повреждения ДНК собираются уникальные белковые комплексы, которые, с одной стороны, распознают повреждения, а с другой стороны, запускают каскад сигнальных событий, называемый ответом на повреждение ДНК (Shmulevich, Krizhanovsky, 2021).





**Рис. 3.** Модуляция уровня внутриклеточных АФК (а), экспрессии генов *CAT*, *SOD1*, *GPXI* (б) и эффективности антиоксидантной защиты (в) в контрольных (К), репликативно (РС) и стресс-индуцированно (СИ) стареющих эСК. а – Интенсивность флуоресценции в клетках DCF после введения АФК-зависимого зонда H<sub>2</sub>DCF-DA. б – Экспрессия мРНК генов *SOD1*, *CAT* и *GPXI*; значения экспрессии нормированы на уровень референсного гена *GAPDH*. в – Динамика временного восстановления генетически кодируемого сенсора перекиси водорода H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в контрольных и состаренных эСК после индукции окислительного стресса добавлением 200 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клеточную среду (серая зона вдоль кривых – доверительные интервалы). з – Константа скорости восстановления сенсора в эСК, определенная при аппроксимации экспоненциальной зависимостью графиков, представленных на рисунке, в. Данные (а–з) представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (n = 3); различия достоверны при p < 0.05 (\*), p < 0.01 (\*\*) или p < 0.001 (\*\*\*) по сравнению с контролем: а, з, – тест ANOVA с поправкой по Тьюки, б – t-критерий Стьюдента.

никновение и накопление повреждений ДНК при старении клеток.

**Повышение эндогенного уровня АФК и изменение способности нейтрализовать окислители могут способствовать возникновению повреждений ДНК в старых эСК.** Наиболее вероятной молекулярной причиной формирования повреждений ДНК в стареющих клетках в настоящее время считают повышенный уровень эндогенных АФК (Borodkina et al., 2014; Davalli et al., 2016; Liguori et al., 2018). Так, показано, что высокий уровень АФК характерен для репликативного, стресс-индуцированного и онкоген-индуцированного типов старения (Lu, Finkel, 2008; Jeong, Cho, 2015; Shmulevich, Krizhanovsky, 2021). В связи с этим, мы в первую очередь сравнили уровень внутриклеточных АФК в молодых клетках и эСК, состаренных репликативно или в результате действия сублетального окислительного стресса. Используя флуоресцентный краситель H<sub>2</sub>DCF-DA, мы показа-

ли, что уровень внутриклеточных АФК в обоих типах старых эСК значительно выше, чем в молодых клетках (рис. 3а). Стоит подчеркнуть, что интенсивность флуоресценции окисленного красителя, отражающая уровень АФК, была сопоставима в обоих типах старых эСК (рис. 3а). Сходный высокий уровень АФК в репликативно- и стресс-индуцированно-состаренных эСК может свидетельствовать в пользу некой универсальности внутриклеточных механизмов генерации АФК при различных типах старения, не зависящих от индуктора.

Основным источником повышенного уровня АФК в стареющих клетках считаются митохондрии (Karlson et al., 2013; Korolchuk et al., 2017). Согласно нашим предыдущим результатам и данным из литературы, старение клеток, и в частности эСК, сопровождается дисфункцией митохондрий и нарушением окислительного фосфорилирования, что и приводит к

росту уровня внутриклеточных АФК (Borodkina et al., 2014, Kwon et al., 2019).

Повышенная генерация в результате нарушенной работы митохондрий может оказаться не единственным условием для столь значительного накопления АФК в стареющих ЭСК. Хорошо известно, что в клетке функционируют различные системы антиоксидантной защиты, которые в норме должны нейтрализовать избыток АФК. В связи с этим, мы оценили уровень экспрессии ряда генов ферментов антиоксидантной защиты, включая ген *CAT*, *SOD1* и *GPXI*, в молодых и старых ЭСК. Оказалось, что уровни экспрессии *CAT* и *SOD1* практически не изменились, а уровень *GPXI* был заметно ниже в старых ЭСК по сравнению с молодыми клетками (рис. 3б).

Стоит отметить, что данные из литературы, касающиеся эффективности работы антиоксидантных систем при старении, весьма противоречивы. Так, например, было показано значительное снижение экспрессии *CAT* и глутатионтрансферазы в сателлитных клетках, полученных от пожилых доноров, по сравнению с таковой в клетках молодых доноров (Fulle et al., 2005). С другой стороны, в клетках, полученных от пациентов с синдромом Вернера (генетического заболевания, характеризующегося преждевременным старением), не было выявлено никаких дефектов в системе антиоксидантной защиты (Root, 1991). Результаты сравнительно недавней работы, в которой оценивали уровень экспрессии и активность работы ферментов антиоксидантной защиты в молодых и репликативно старых миофибробластах, также свидетельствуют об отсутствии значимых различий уровней экспрессии *SOD1*, *CAT* и *GPXI* в молодых и старых клетках (Khor et al., 2017). Одновременно с этим показано, что в эндотелиальных прогениторных клетках, полученных от пожилых доноров, экспрессия *SOD1* и *CAT* не изменяется, тогда как экспрессия и активность *GPXI* существенно снижена по сравнению с клетками молодых доноров (He et al., 2009). Согласно данным этих авторов, такое изменение экспрессии и активности *GPXI* приводило тому, что клетки пожилых доноров хуже справлялись с окислительным воздействием, чем клетки молодых доноров (He et al., 2009).

Мы также предположили, что сниженная экспрессия *GPXI* в стареющих ЭСК может приводить к снижению эффективности систем антиоксидантной защиты клеток. Для проверки этого предположения мы применили подход, основанный на использовании генетически кодируемого сенсора перекиси водорода *HyPer* (Belousov et al., 2006). *HyPer* является химерным белком, который получен путем внедрения пермутированной формы желтого флуоресцентного белка (срYFP) в регуляторный домен *OxyR* бактериального транскрипционного фактора, чувствительного к  $H_2O_2$ . Под действием  $H_2O_2$  домен *OxyR* претерпевает конформационные изменения, которые влияют на структуру срYFP и приводят к изме-

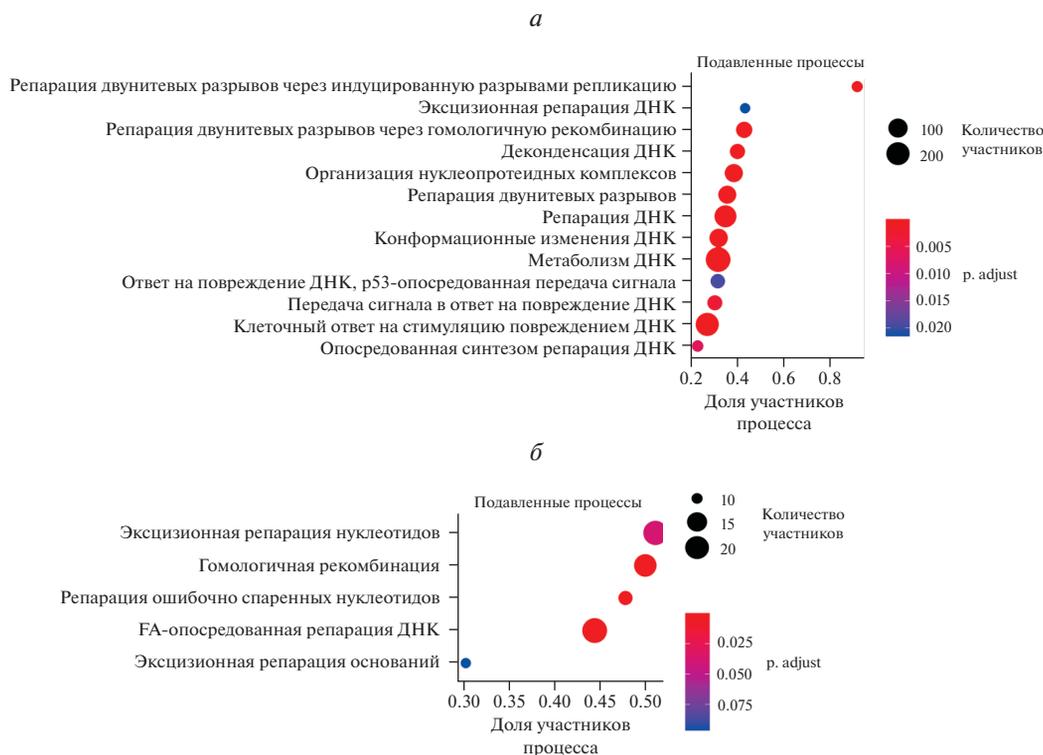
нению его флуоресцентных свойств. Отслеживая флуоресцентный сигнал *HyPer* в клетках, подвергнутых  $H_2O_2$ -индуцированному окислительному воздействию, можно оценивать, как быстро восстанавливается сенсор и, следовательно, как быстро клетки справляются с окислительным стрессом и элиминируют экзогенный пероксид (Malinouski et al., 2011).

В настоящей работе мы использовали проточную цитометрию для анализа реакции на экзогенный пероксид молодых и состаренных ЭСК, экспрессирующих *HyPer* в клеточной цитоплазме (Lyublinskaya et al., 2018). Оказалось, что в состаренных ЭСК скорость восстановления *HyPer* была существенно замедлена по сравнению с молодыми клетками (рис. 3в, г). Полученные результаты могут свидетельствовать как о замедлении процесса элиминации внутриклеточных окислителей, так и о замедлении процесса восстановления окисленных белков в стареющих клетках, что в совокупности или по отдельности приводит к снижению эффективности их систем антиоксидантной защиты.

Интересно отметить, что обе использованные нами модели клеточного старения характеризовались одинаково низкими скоростями восстановления сенсора *HyPer*, что подтверждает наше предположение о схожем функционально-метаболическом редокс-статусе ЭСК (их одинаково низкой способности противостоять окислительным воздействиям) при развитии репликативного и стресс-индуцированного старения.

Суммируя результаты, полученные в этой части работы, можно предполагать следующий сценарий возникновения повреждений ДНК в ходе репликативного и стресс-индуцированного старения ЭСК. Дисфункция митохондрий приводит к повышенной генерации АФК, однако несмотря на увеличение уровня внутриклеточных АФК, экспрессия генов ферментов антиоксидантной защиты не возрастает, а остается неизменной или даже падает, что коррелирует со снижением эффективности работы защитных систем. Это способствует накоплению окислителей, которые, в свою очередь, и могут приводить к повреждению ДНК в ходе развития старения ЭСК. Соответственно, накопление внутриклеточных АФК может негативно сказываться на геномной стабильности стареющих клеток. И действительно, в одной из работ было показано, что именно АФК, накапливающиеся в стареющих клетках, могут выступать в качестве тумор-промотирующих факторов, которые способствуют переходу стареющих клеток в трансформированные туморогенные клетки (Gosselin et al., 2009).

**Снижение эффективности репарации может способствовать накоплению повреждений ДНК в стареющих ЭСК.** Выше мы постарались разобраться с тем, что может обуславливать возникновение поврежденный ДНК в стареющих ЭСК, в этой части мы постараемся выяснить, что же может способствовать накоплению этих повреждений в процессе клеточного старения. В отличие от большинства макромолекул



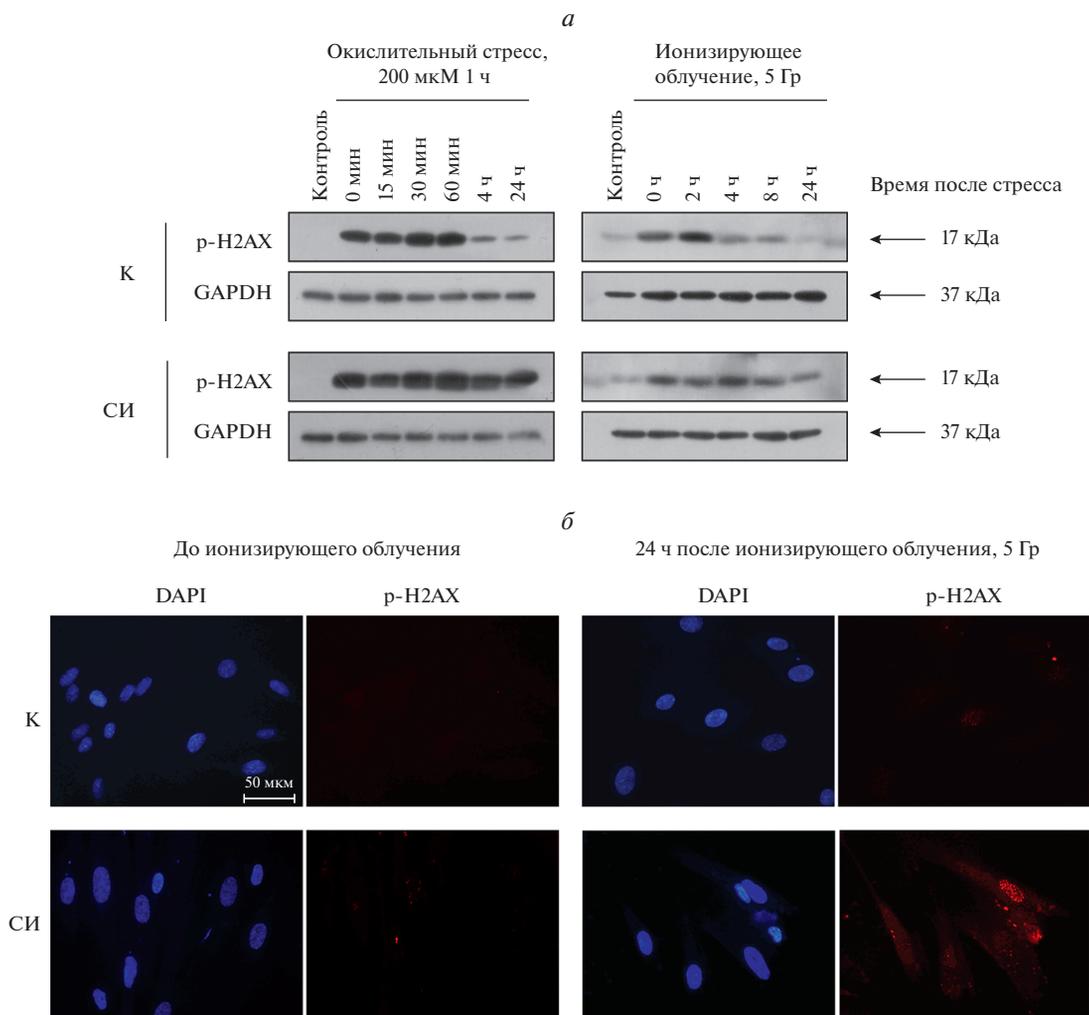
**Рис. 4.** Эффективность репарации ДНК снижена в стареющих эСК. Анализ GSEA в терминах баз данных GO:BP (а) и KEGG Pathway (б).

в клетке, которые в случае повреждения достаточно быстро удаляются при помощи различных механизмов деградации и заменяются вновь синтезированными, ДНК при повреждении не может быть деградирована и синтезирована вновь, поскольку именно она и является матрицей практически для всех синтетических процессов (Yousefzadeh et al., 2021). В связи с этим в клетке постоянно функционируют механизмы эффективной репарации различных повреждений ДНК, включая эксцизионную репарацию оснований (base excision repair, BER), эксцизионную репарацию нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER), репарацию ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch repair, MMR), гомологичную рекомбинацию (homologous recombination, HR) и негомологичное соединение концов (non-homologous end joining, NHEJ). Такое многообразие систем репарации ДНК обусловлено необходимостью коррекции самых различных повреждений, например поперечных сшивок, одноцепочечных и двуцепочечных разрывов ДНК и так далее, которые могут возникать в клетках как спонтанно, так и в ответ на различные стрессы (Yousefzadeh et al., 2021).

Мы предположили, что одной из причин накопления повреждений ДНК в стареющих эСК как раз может оказаться снижение эффективности работы систем, обеспечивающих репарацию ДНК. Для проверки этого предположения мы использовали данные РНК-секвенирования образцов молодых и ста-

рых эСК (идентификационный номер в базе данных Gene Expression Omnibus – GSE160702). Функциональный анализ транскриптомных данных в категориях биологических процессов и путей баз данных GO и KEGG Pathway однозначно свидетельствует о том, что активность процессов репарации ДНК, репарации двуцепочечных разрывов ДНК (DSBs), и в частности путей BER, NER, MMR, HR, NHEJ и Fanconi anemia pathway подавлена в стареющих эСК (рис. 4а, б).

Существенное снижение эффективности работы всех систем репарации в стареющих эСК хорошо согласуется с результатами, недавно описанными для других моделей клеточного старения, включая онкоген-индуцированное старение эпителиальных клеток молочной железы, репликативное старение эндотелиальных клеток, этопозид-индуцированное старение фибробластов WI38 и Ras-индуцированное старение фибробластов IMR90 (Collin et al., 2018). При помощи биоинформатического анализа данных РНК-секвенирования авторы обнаружили подавление экспрессии генов, вовлеченных в NER, BER, MMR, HR во всех типах стареющих клеток (Collin et al., 2018). Таким образом, можно сделать вывод о том, что снижение эффективности репарации ДНК, является общей чертой для различных типов стареющих клеток, в том числе и для стареющих эСК.



**Рис. 5.** Анализ динамики образования и элиминации фокусов  $\gamma$ H2AX в контрольных (К) и стресс-индуцированно (СИ) стареющих эСК после окислительного стресса или ионизирующего облучения. К и СИ-состаренные эСК подвергали окислительному воздействию (200 мкМ, 1 ч) или ионизирующему облучению (5 Гр) и в указанные временные точки анализировали фосфорилирование  $\gamma$ H2AX методами иммуноблоттинга (*a*) или иммунофлуоресценции (*б*; красный и синий цвет – соответственно p-H2AX и DAPI, об.: 40 $\times$ ). В качестве контроля нагрузки использовали GAPDH.

Для валидации данных биоинформатического анализа мы сравнили экспериментально функционирование систем репарации в молодых и старых эСК на примере репарации DSBs. В качестве индукторов мы выбрали пероксид водорода (200 мкМ) и ионизирующее  $\gamma$ -излучение (5 Гр), которые, согласно данным из литературы, приводят к возникновению DSBs, и оценивали динамику активации гистона H2AX (Driessens et al., 2009; Vignard et al., 2013). Известно, что динамика образования и элиминации фокусов  $\gamma$ H2AX хорошо отражает кинетику репарации DSBs (Sedelnikova et al., 2008). Мы обнаружили, что действие  $H_2O_2$ , равно как и  $\gamma$ -излучение приводят к формированию фокусов повреждения ДНК и в молодых, и в старых эСК (рис. 5*a*). Важно, что через 24 ч после стрессовых воздействий в контрольных клетках уровень фосфорилированного гистона H2AX

уменьшается практически до базального уровня, тогда как в старых эСК он оставался повышенным, что свидетельствует об уменьшении эффективности репарации ДНК при старении эСК (рис. 5*a, б*). Эти результаты хорошо подтверждают данные биоинформатического анализа, описанные выше.

В литературе также есть свидетельства, что в молодых пролиферирующих клетках повреждения ДНК эффективно репарируются за счет BER, NER и HR, а в клетках, полученных от пожилых доноров, эти системы репарации работают значительно менее эффективно (Dizdaroglu, 2012; Pole et al., 2016). Более того, экспериментально установлено, что подавление экспрессии какого-либо из генов, участвующих в репарации, может само по себе приводить к клеточному старению, а оверэкспрессия этих генов, наоборот, в некоторых случаях может ингибировать старе-

ние (Mao et al., 2012; Sedic et al., 2015; Collin et al., 2018). Таким образом, снижение эффективности репарации может обуславливать накопление повреждений ДНК в стареющих ЭСК. Важно, что такие нерепарируемые повреждения ДНК могут крайне негативно сказываться на геномной стабильности стареющих клеток. Яркое подтверждение этого предположения было описано для стареющих эпителиальных клеток (Nassour et al., 2016). Так, было показано, что накопление нерепарируемых повреждений ДНК может обуславливать возвращение пролиферативной активности в эпителиальных клетках, достигших состояния репликативного старения, и, соответственно, может являться первым шагом к злокачественным новообразованиям (Nassour et al., 2016).

По результатам проведенного нами исследования можно сделать следующее заключение. Процесс старения ЭСК сопровождается повышением уровня эндогенных АФК, в частности за счет неэффективной антиоксидантной защиты; АФК могут приводить к возникновению новых повреждений ДНК, а низкая эффективность репарации способствует накоплению образующихся повреждений, что, в конечном итоге, может привести к геномной нестабильности стареющих клеток.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Люблинской О.Г. (ИНЦ РАН) за помощь в проведении цитометрических экспериментов с NuPer.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-10038).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных и людей в качестве объектов исследования.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дерябин П.И., Бородкина А.В., Никольский Н.Н., Бурова Е.Б. 2015. Взаимное влияние p53/p21/Rb и MAP-киназных сигнальных путей в эндометриальных стволовых клетках человека в условиях окислительного стресса. Цитология. Т. 57. № 11. С. 788. (Deryabin P.I., Borodkina A.V., Nikolsky N.N., Burova E.B. 2015. Relationship between p53/p21/rb and mapk signaling pathways in human endometrium-derived stem cells under oxidative stress. Tsitologiya. V. 57. P. 788.)

Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С.,

Никольский Н.Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. № 12. С. 919. (Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artzibasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Bichevaia N.K., Korsak V.S., Nikolsky N.N. 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: Isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. Tsitologiya. V. 53. P. 919.)

Alimirah F., Pulido T., Valdovinos A., Alptekin S., Chang E., Jones E., Diaz D.A., Flores J., Velarde M.C., Demaria M., Davalos A.R., Wiley C.D., Limbad C., Desprez P.Y., Campisi J. 2020. Cellular senescence promotes skin carcinogenesis through p38MAPK and p44/42MAPK signaling. Cancer Res. V. 80. P. 3606.

Baker D.J., Childs B.G., Durik M., Wijers M.E., Sieben C.J., Zhong J., Saltness R.A., Jeganathan K.B., Verzosa G.C., Pezeshki A., Khazaie K., Miller J.D., van Deursen J.M. 2016. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. Nature. V. 530. P. 184.

Belousov V.V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Staroverov D.B., Shakhbazov K.S., Terskikh A.V., Lukyanov S. 2006. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. Nat. Met. V. 3. P. 281.

Borodkina A., Shatrova A., Abushik P., Nikolsky N., Burova E. 2014. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. Aging. V. 6. P. 481.

Chandra A., Lagnado A.B., Farr J.N., Monroe D.G., Park S., Hachfeld C., Tchkonja T., Kirkland J.L., Khosla S., Passos J.F., Pignolo R.J. 2020. Targeted reduction of senescent cell burden alleviates focal Radiotherapy-Related bone loss. J. Bone Miner. Res. V. 35. P. 1119.

Chinta S.J., Woods G., Demaria M., Rane A., Zou Y., McQuade A., Rajagopalan S., Limbad C., Madden D.T., Campisi J., Andersen J.K. 2018. Cellular senescence is induced by the environmental neurotoxin paraquat and contributes to neuropathology linked to Parkinson's disease. Cell Rep. V. 22. P. 930.

Collin G., Huna A., Warnier M., Flaman J.M., Bernard D. 2018. Transcriptional repression of DNA repair genes is a hallmark and a cause of cellular senescence. Cell Death Dis. V. 9. P. 259.

Coutelier H., Xu Z., Morisse M.C., Lhuillier-Akakpo M., Pelet S., Charvin G., Dubrana K., Teixeira M.T. 2018. Adaptation to DNA damage checkpoint in senescent telomerase-negative cells promotes genome instability. Genes Dev. V. 32. P. 1499.

Davalli P., Mitic T., Caporali A., Lauriola A., D'Arca D. 2016. ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases. Oxid. Med. Cell. Longev. 2016. P. 3565127. <https://doi.org/10.1155/2016/3565127>

Deryabin P., Domnina A., Gorelova I., Rulev M., Petrosyan M., Nikolsky N., Borodkina A. 2021. "All-In-One" genetic tool assessing endometrial receptivity for personalized screening of female sex steroid hormones. Front. Cell Dev. Biol. 9. P.624053. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.624053>

Dizdaroglu M. 2012. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. Cancer Lett. V. 327. P. 26.

- Driessens N., Versteijhe S., Ghaddhab C., Burniat A., De Deken X., Van Sande J., Dumont J.E., Miot F., Corvilain B.* 2009. Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocr. Relat. Cancer*. V. 16. P. 845.
- Fulle S., Di Donna S., Puglielli C., Pietrangelo T., Beccafico S., Bellomo R., Protasi F., Fanò G.* 2005. Age-dependent imbalance of the antioxidative system in human satellite cells. *Exp. Gerontol.* V. 40. P. 189.
- Gosselin K., Martien S., Poutier A., Vercamer C., Ostoich P., Morat L., Sabatier L., Duprez L., T'kint de Roodenbeke C., Gilson E., Malaquin N., Wernert N., Slijepcevic P., Ashtari M., Chelli F., et al.* 2009. Senescence-associated oxidative DNA damage promotes the generation of neoplastic cells. *Cancer Res.* V. 69. P. 7917.
- Graziano S., Gonzalo S.* 2017. Mechanisms of oncogene-induced genomic instability. *Biophys. Chem.* V. 225. P. 49.
- Griukova A., Deryabin P., Shatrova A., Burova E., Severino V., Farina A., Nikolsky N., Borodkina A.* 2019. Molecular basis of senescence transmitting in the population of human endometrial stromal cells. *Aging*. V. 11. P. 9912.
- Hayflick L.* 2002. *Handbook of the biology of aging*. Amsterdam: Elsevier. 416 pp.
- He T., Joyner M.J., Katusic Z.S.* 2009. Aging decreases expression and activity of glutathione peroxidase-1 in human endothelial progenitor cells. *Microvasc. Res.* V. 78. P. 447.
- Hernandez-Segura A., Nehme J., Demaria M.* 2018. Hallmarks of cellular senescence. *Trends Cell Biol.* V. 28. P. 436.
- Jeong S.G., Cho G.W.* 2015. Endogenous ROS levels are increased in replicative senescence in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 460. P. 971.
- Jeyapalan J.C., Ferreira M., Sedivy J.M., Herbig U.* 2007. Accumulation of senescent cells in Mitotic tissue of aging primates. *Mech. Ageing Dev.* V. 128. P. 36
- Kale A., Sharma A., Stolzing A., Desprez P-Y., Campisi J.* 2020. Role of immune cells in the removal of deleterious senescent cells. *Immun. Ageing*. 17. <https://doi.org/10.1186/s12979-020-00187-9>
- Kaplon J., Zheng L., Meissl K., Chaneton B., Selivanov V.A., Mackay G., van der Burg S.H., Verdegaal E.M., Cascante M., Shlomi T., Gottlieb E., Peepers D.S.* 2013. A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature*. V. 498. P. 109.
- Khor S.C., Ngah W.Z.W., Yusof Y.A.M., Karim N.A., Makpol S.* 2017. Tocotrienol-rich fraction ameliorates antioxidant defense mechanisms and improves replicative senescence-associated oxidative stress in human myoblasts. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. P. 3868305. <https://doi.org/10.1155/2017/3868305>
- Kirkland J.L., Tchkonja T.* 2020. Senolytic drugs: From discovery to translation. *J. Intern. Med.* V. 288. P. 518.
- Kirkwood T.B.* 2005. Understanding the odd science of aging. *Cell*. V. 120. P. 437.
- Korolchuk V.I., Miwa S., Carroll B., von Zglinicki T.* 2017. Mitochondria in cell senescence: Is mitophagy the weakest link? *EbioMedicine*. V. 21. P. 7.
- Kwon S.M., Hong S.M., Lee Y.K., Min S., Yoon G.* 2019. Metabolic features and regulation in cell senescence. *BMB Rep.* V. 52. P. 5.
- Levine M.E.* 2013. Modeling the rate of senescence: can estimated biological age predict mortality more accurately than chronological age? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* V. 68. P. 667.
- Li X., Ploner A., Wang Y., Magnusson P.K., Reynolds C., Finkel D., Pedersen N.L., Jylhävä J., Hägg S.* 2020. Longitudinal trajectories, correlations and mortality associations of nine biological ages across 20-years follow-up. *Elife*. 9: e51507. <https://doi.org/10.7554/eLife.51507>
- Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Morte D.D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P.* 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging*. V. 13. P. 757.
- Liu Y., Sanoff H.K., Cho H., Burd C.E., Torrice C., Ibrahim J.G., Thomas N.E., Sharpless N.E.* 2009. Expression of p16 (INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell*. V. 8. P. 439.
- Lu T., Finkel T.* 2008. Free radicals and senescence. *Exp. Cell Res.* V. 314. P. 1918.
- Lyublinskaya O.G., Antonov S.A., Gorokhovtsev S.G., Pugovkina N.A., Kornienko J.S., Ivanova J.S., Shatrova A.N., Akse- nov N.D., Zenin V.V., Nikolsky N.N.* 2018. Flow cytometric HyPer-based assay for hydrogen peroxide. *Free Rad. Biol. Med.* V. 128. P. 40.
- Mao Z., Tian X., Van Meter M., Ke Z., Gorbunova V., Seluanov A.* 2012. Sirtuin 6 (SIRT6) rescues the decline of homologous recombination repair during replicative senescence. *PNAS*. V. 109. P. 11800.
- Malinouski M., Zhou Y., Belousov V.V., Hatfield D.L., Gladyshev V.N.* 2011. Hydrogen peroxide probes directed to different cellular compartments. *PLoS One*. 6: e14564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014564>
- Nassour J., Martien S., Martin N., Deruy E., Tomellini E., Malaquin N., Bouali F., Sabatier L., Wernert N., Pinte S., Gilson E., Poutier A., Pluquet O., Abbadie C.* 2016. Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Nat. Commun.* V. 7. P. 10399.
- Roos C.M., Zhang B., Palmer A.K., Ogrodnik M.B., Pirtskhalava T., Thalji N.M., Hagler M., Jurk D., Smith L.A., Casacang Verzosa G., Zhu Y., Schafer M.J., Tchkonja T., Kirkland J.L., Miller J.D.* 2016. Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell*. V. 15. P. 973.
- Ovadya Y., Krizhanovskiy V.* 2014. Senescent cells: SASPected drivers of age-related pathologies. *Biogerontol.* V. 15. P. 627.
- Pole A., Dimri M., Dimri G.P.* 2016. Oxidative stress, cellular senescence and ageing. *AIMS Mol. Sci.* V. P. 300.
- Poot M.* 1991. Oxidants and antioxidants in proliferative senescence. *Mutation Res./DNAging*. V. 256. P. 177.
- Prata L.G.P.L., Ovsyannikova I.G., Tchkonja T., Kirkland J.L.* 2018. Senescent cell clearance by the immune system: Emerging therapeutic opportunities. *Semin. Immunol.* 40:101275. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.04.003>
- Sedelnikova O.A., Horikawa I., Redon C., Nakamura A., Zimonjic D.B., Popescu N.C., Bonner W.M.* 2008. Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging. *Aging Cell*. V. 7. P. 89.
- Sedic M., Skibinski A., Brown N., Gallardo M., Mulligan P., Martinez P., Keller P.J., Glover E., Richardson A.L., Cowan J.,*

- Toland A.E., Ravichandran K., Riethman H., Naber S.P., Näär A.M., et al.* 2015. Haploinsufficiency for BRCA1 leads to cell-type-specific genomic instability and premature senescence. *Nat. Commun.* V. 6. P. 7505.
- Shmulevich R., Krizhanovsky V.* 2021. Cell Senescence, DNA damage, and metabolism. *Antioxid. Redox Signal.* V. 34. P. 324.
- Takai H., Smogorzewska A., de Lange T.* 2003. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol.* V. 13. P. 1549.
- The Tabula Muris Consortium.* 2020. A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse. *Nature.* V. 583. P. 590.
- Vignard J., Mirey G., Salles B.* 2013. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up. *Radiother. Oncol.* V. 108. P. 362.
- Yousefzadeh M., Henpita C., Vyas R., Soto-Palma C., Robbins P., Niedernhofer L.* 2021. DNA damage-how and why we age?. *Elife.* 10: e62852. <https://doi.org/10.7554/eLife.62852>
- Zampetidis C., Galanos P., Angelopoulou A., Zhu Y., Karamitros T., Polyzou A., Mourkioti I., Lagopati N., Mirzazadeh R., Polyzos A., Garnerone S., Gusmao E.G., Sofiadis K., Pefani D.E., Demaria M., et al.* 2021. Genomic instability is an early event driving chromatin reorganization and escape from oncogene-induced senescence. *BioRxiv preprint.* <https://doi.org/10.1101/2020.12.20.423639>
- Zhang P., Kishimoto Y., Grammatikakis I., Gottimukkala K., Cutler R.G., Zhang S., Abdelmohsen K., Bohr V.A., Misra Sen J., Gorospe M., Mattson M.P.* 2019. Senolytic therapy alleviates Ab-associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nat. Neurosci.* V. 22. P. 719.
- Zhu Y., Armstrong J.L., Tchkonja T., Kirkland J.L.* 2014. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype in age-related chronic diseases. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* V. 17. P. 324.

## Reduced Efficiency of DNA Repair and Antioxidant Defense Promote the Accumulation of DNA Damage During Cell Senescence

P. I. Deryabin<sup>a</sup> and A. V. Borodkina<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: borodkina618@gmail.com*

The accumulation of senescent cells within the organism positively correlates with age and is considered as one of the risk factors for an age-dependent increase in the incidence of cancer. The tumor-promoting role of senescent cells is commonly considered to be realized via the paracrine effects of the senescence-associated secretory phenotype on the cellular microenvironment. However, according to recent research, neoplastic transformation may also be due to the genetic instability of senescent cells resulting from accumulating DNA damage. The present study aimed to unravel the intracellular molecular causes that can mediate the occurrence and accumulation of DNA damage during cell senescence. Here we applied replicative and stress-induced senescence of human endometrial stromal cells (ESCs) as models of cell senescence. We revealed that both types of ESCs senescence were accompanied by the formation of persistent DNA damage foci. We detected a decrease in the effectiveness of antioxidant defense in senescent ESCs using the genetically encoded HyPer biosensor. At the same time the level of endogenous reactive oxygen species (ROS) significantly increased in senescent cells, which may mediate the formation of the DNA damage foci. Further accumulation of DNA damage foci can be associated with a decrease in the efficiency of the repair systems in senescent ESCs, as evidenced by both transcriptomic analysis and the results reflecting the dynamics of DNA damage repair caused by oxidative stress or ionizing radiation. Thus, the accumulation of DNA damage in senescent ESCs is, on the one hand, mediated by the ineffective antioxidant protection and increasing ROS levels, and on the other hand, by a low efficiency of damage repair.

**Keywords:** cell senescence, genetic instability, DNA damage, DNA repair, reactive oxygen species, HyPer, human endometrial stromal cells

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ АНТИТЕЛ К ЭНДОГЛИНУ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ HUVEC И EA.hy926

© 2021 г. А. Ю. Столбовая<sup>1,2,\*</sup>, И. В. Смирнов<sup>1</sup>, А. А. Пиневиц<sup>1,3</sup>, Н. Л. Варганян<sup>1</sup>, И. Ю. Крутецкая<sup>1</sup>,  
Л. А. Терехина<sup>1</sup>, К. Л. Маркова<sup>4</sup>, А. Б. Малашичева<sup>2</sup>, М. П. Самойлович<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, 197341 Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра цитологии и гистологии,  
Санкт-Петербург, 199034 Россия

<sup>4</sup>Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта,  
Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*E-mail: anastasia.stolbova@gmail.com

Поступила в редакцию 22.03.2021 г.

После доработки 01.04.2021 г.

Принята к публикации 05.04.2021 г.

Эндоглин, корцептор ростовых факторов семейства TGF- $\beta$ , является маркером эндотелиальных клеток. В предыдущей работе нами было показано, что моноклональные антитела (МКАТ) к эндоглину могут изменять функциональные свойства клеток эндотелия линии EA.hy926. Целями настоящей работы стали изучение влияния тех же антител против эндоглина на клетки эндотелия HUVEC, а также сравнительный анализ данных, полученных на клетках линий HUVEC и EA.hy926. Сопоставление *in vitro* моделей, основанных на постоянной клеточной линии эндотелия EA.hy926 и первичных клеточных линиях HUVEC, выявило, наряду с общими морфофункциональными свойствами этих линий, различия в уровне экспрессии ими адгезионных молекул и активности некоторых генов эндотелиальной дифференцировки. На линиях HUVEC было показано, что антитела против эндоглина (2C8 и 4E4) вызывают торможение миграции клеток, снижают их адгезию к твердому субстрату, изменяют расположение актиновых микрофиламентов и затрудняют формирование капилляроподобных структур. Эти эффекты проявлялись только в присутствии в культуральной среде ростового фактора TGF- $\beta$ 1 или при культивировании клеток в условиях гипоксии. Добавление в ростовую среду МКАТ 2C8 стимулировало сбрасывание (шеддинг) эндоглина с мембраны клеток HUVEC как в гипоксических условиях, так и при культивировании в нормоксии. Ряд эффектов МКАТ против эндоглина, выявленных на клетках HUVEC, совпадал с результатами, полученными в экспериментах на линии EA.hy926. Однако МКАТ 2C8 оказывали противоположное влияние на шеддинг эндоглина в клетках линий HUVEC и EA.hy926.

**Ключевые слова:** эндоглин, эндотелий, EA.hy926, HUVEC, моноклональные антитела

**DOI:** 10.31857/S0041377121040106

Эндоглин – трансмембранный гликопротеин, который экспрессируется на поверхности клеток эндотелия, мезенхимных стволовых клеток и гемопоэтических клеток-предшественников (Rokhlin et al., 1995; Vanerjee et al., 2012; Пиневиц и др, 2020). Эндоглин входит в состав рецепторного комплекса, связывающего белки семейства TGF- $\beta$ 1, регулирует ба-

ланс сигнальных путей, опосредованных белками Smad 2/3 или Smad 1/5/8 (Barbara et al., 1999; Goumans et al., 2002), переход клеток эндотелия от состояния покоя к пролиферации (Korczyńska, Makarewicz, 2012), участвует в адгезии (Rossi et al., 2014, 2018; Tian et al., 2012) и миграции клеток (Conley et al., 2004; Sanz-Rodriguez et al., 2004). Эндоглин опосредует межклеточные взаимодействия эндотелия с гладкомышечными клетками сосудов, стабилизируя их стенку (Tian et al., 2017). Он также регулирует форму эндотелиальных клеток и диаметр сосудов в ответ на гемодинамические изменения тока крови (Sugden et al., 2017). Во взрослом организме плотность молекул эндоглина значительно возрастает на мембране клеток

**Принятые сокращения:** МКАТ – моноклональные антитела; МСК – мезенхимные стволовые клетки; FGF2(b) – основной фактор роста фибробластов 2; MMP-14 – матриксная металлопротеиназа; TGF- $\beta$ 1 – трансформирующий фактор роста  $\beta$ 1; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; VEGFR1 и VEGFR2 – рецепторы к фактору роста эндотелия сосудов 1 и 2; VWF – фактор фон Виллебранда.

эндотелия в тканях, находящихся в ишемии (López-Novoa, Bernabeu, 2010), или при васкуляризации злокачественных новообразований (Korczyńska, Makarewicz, 2012). Последнее позволяет рассматривать эндоглин, как мишень для антиангиогенной терапии (Rosen et al., 2014).

В настоящее время моноклональные антитела (МКАТ) используют в качестве инструмента для направленного подавления опухолевого ангиогенеза (Rosen et al., 2014). На основе МКАТ SN6j, обладающих антиангиогенными свойствами, созданы химерные антитела против эндоглина TRC105 (TRACON, Pharmaceuticals Inc., США). На I фазе клинических испытаний была показана эффективность этих антител в лечении пациентов, страдающих солидными опухолями (Gordon et al., 2014).

В лаборатории нами была создана панель МКАТ против молекул эндоглина (Смирнов и др., 2015). Исследование этих МКАТ, проведенное на эндотелиальной клеточной линии EA.hy926 (Столбовая и др., 2019), позволило отобрать два антитела (2С8 и 4Е4), которые оказывали воздействие на миграцию, пролиферацию и адгезию культивируемых клеток эндотелия. Эти антитела замедляли миграцию клеток эндотелия EA.hy926, стимулированных ростовым фактором TGF- $\beta$ 1, и снижали образование растворимой формы эндоглина. Одно из них (2С8) снижало пролиферацию эндотелиальных клеток EA.hy926, а другое (4Е4) увеличивало адгезию моноцитоподобных клеток U937 к эндотелию EA.hy926 (Столбовая и др., 2019). Таким образом, было показано, что под влиянием МКАТ клетки EA.hy926 способны изменять функциональные характеристики.

Клетки линии EA.hy926 получены в результате слияния клеток эндотелия HUVEC с клетками карциномы легкого A549 (Edgell et al., 1983). Вследствие их гибридной природы, клетки EA.hy926 могут быть менее чувствительными к воздействиям, по сравнению с первичными культурами. В исследованиях *in vitro* эталоном модели эндотелиальных клеток считается первичная культура эндотелия пупочной вены HUVEC (Jaffe et al., 1973). Клетки HUVEC были использованы для изучения свойств антител TRC105 против эндоглина, и было показано, что под их воздействием происходит замедление миграции и формирования капилляроподобных структур на матригеле (Liu et al., 2014). Для подтверждения ранее описанных нами изменений функциональных характеристик клеток эндотелия культивируемой линии EA.hy926 (Столбовая и др., 2019) было необходимо оценить влияние МКАТ 2С8 и 4Е4 против эндоглина на первичную культуру клеток эндотелия HUVEC.

Целью настоящей работы было изучение влияния МКАТ против эндоглина 2С8 и 4Е4 на клетки эндотелия HUVEC и сравнительный анализ результатов, полученных на клетках HUVEC, с данными, полученными на линии EA.hy926.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Культивирование клеток.** Клетки эндотелия пупочной вены HUVEC были получены от четырех доноров в НМИЦ им. В.А. Алмазова. Клетки культивировали в среде для первичных культур эндотелия (Endothelial cell medium) на поверхности, покрытой фибронектином, в атмосфере с 6% CO<sub>2</sub> и 20% O<sub>2</sub> или в условиях гипоксии (6% CO<sub>2</sub>, 2% O<sub>2</sub>). В экспериментах использовали клетки HUVEC до 10 пассажа культивирования. Клетки EA.hy926 были предоставлены И.С. Фрейдлин с любезного разрешения автора (Edgell et al., 1983). Клетки EA.hy926 культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 0,5 мкМ аминокпертина, 16 мкМ тимидина и 100 мкМ гипоксантина. Эксперименты по влиянию МКАТ против эндоглина на клетки были выполнены на культурах EA.hy926, прошедших после поступления в лабораторию более 30 пассажей. Для характеристики линии EA.hy926 в качестве модели эндотелия *in vitro* исследовали культуры с 3 по 15 пассаж и после 30 пассажей культивирования. Мезенхимные стволовые клетки (МСК), полученные из жировой ткани, были охарактеризованы ранее (Пиневиц и др., 2014). МСК культивировали в среде для мезенхимальных стволовых клеток (КЭМ-Био, Россия) до 10 пассажа.

**Антитела.** При оценке функциональных характеристик клеток HUVEC использовали МКАТ против эндоглина 2С8 и 4Е4, ранее полученные в лаборатории (Столбовая и др., 2019). Во всех нижеописанных экспериментах использовали антитела изотипического контроля, не распознающие эндоглин. Меченные изотиоцианатом флуоресцеина вторичные поликлональные козы антитела против иммуноглобулинов мыши (Invitrogen, США) готовили в лаборатории по стандартной методике (Catty et al., 1989).

**Проточная цитометрия.** Для оценки насыщения связывания эндоглина на мембране клеток с антителами клетки эндотелия снимали с поверхности культуральных флаконов, проводя инкубацию в растворе версена, содержащего 0.12% трипсина. Клетки инкубировали с МКАТ к эндоглину 2С8 или 4Е4 в фосфатно-солевом растворе, содержащем 3% эмбриональной телячьей сыворотки и 0.1% азида натрия, в течение 1 ч при 4°C. Комплексы антител, связанных с эндоглином на мембране клеток, выявляли мечеными изотиоцианатом флуоресцеина козыми антителами против мышинных иммуноглобулинов, инкубацию проводили в течение 1 ч при 4°C.

Для выявления адгезионных молекул на плазматической мембране клетки эндотелия инкубировали с мечеными фикоэритрином моноклональными антителами против CD29, CD31, CD34, CD44, CD49e, CD54, CD62E, CD105, CD106, CD144, CD146, CD166 (BD Biosciences, США) в течение 1 ч при 4°C.

**Таблица 1.** Последовательности праймеров, используемых для амплификации генов

Название гена	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>GAPDH</i>	GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC	CATGAGTCCTTCCACGATACC
<i>MMP-14</i>	GGCTACAGCAATATGGCTACC	GATGGCCGCTGAGAGTGAC
<i>VWF</i>	ACCACTCCTTCTCCATTGTC	CCCCATGCTTCAGTTTCA
<i>ENG</i>	CGGGTCTCAAGACCAGGAAG	GAGGAAGGCACCAAAGGTGA
<i>TGF-<math>\beta</math>1</i>	GGCCAGATCCTGTCCAAGC	GTGGGTTTCCAACCATTAGCAC
<i>FGF2(b)</i>	AGAAGAGCGACCCTCACATCA	CGGTTAGCACACACTCCTTTG
<i>VEGF</i>	AGGGCAGAATCATCACGAAGT	AGGGTCTCGATTGGATGGCA
<i>VEGFR1</i>	TGCCGGGTTACGTCACCTA	GTCCCAGATTATGCGTTTCCAT
<i>VEGFR2</i>	GTGATCGGAAATGACACTGGAG	CATGTTGGTCACTAACAGAAGCA

Образцы анализировали на проточном цитометре BD FACSAria™ III в растворе CellWASH (BD Biosciences, США).

**ПЦР в режиме реального времени.** РНК из клеток эндотелия выделяли с помощью Trizol Reagent согласно рекомендациям производителя. В реакции обратной транскрипции использовали 500 нг РНК. Реакцию проводили согласно протоколу производителя обратной транскриптазы.

ПЦР в режиме реального времени проводили в термоцикле CFX96 Touch (Bio-Rad, Россия) в 96-ти луночных планшетах. В состав реакционной смеси объемом 25 мкл входили: 0.5 мкл кДНК (полученной в ходе обратной транскрипции), 2.5 мкл буфера для Hot-start Taq-ДНК полимеразы, 0.8 ммоль смеси dNTP, 2.5 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 0.04 ед./мкл Hot-start Taq ДНК полимеразы, 1 мкл SYBR Green. Последовательности праймеров (табл. 1) были взяты из банка праймеров Гарвардской Медицинской школы (США). Концентрация праймеров в реакционной смеси составляла 200–300 нмоль. Реакционную смесь предварительно инкубировали при температуре 95°C в течение 10 мин, затем проводили 40 циклов амплификации, состоящих из трех стадий: 1) плавление ДНК при 95°C, 30 с, 2) отжиг праймеров при 56°C, 30 с, 3) синтез молекул ДНК при 72°C, 30 с.

В качестве гена сравнения использовали уровень экспрессии гена *GAPDH*. Уровень активности исследуемых генов определяли в виде разницы ( $\Delta$ СТ) между пороговым циклом исследуемого гена и гена сравнения *GAPDH*. Пороговый цикл соответствует числу циклов амплификации, необходимых для достижения порогового уровня флуоресценции.

**Пролиферация клеток.** Клетки HUVEC рассеивали в 96-ти луночные планшеты в концентрации 10 тыс. клеток/см<sup>2</sup>. Через сутки ростовую среду полностью заменяли и вносили среду, содержащую либо антитела против эндоглина (5 мкг/мл), либо антитела и ростовые факторы TGF- $\beta$ 1 (1 нг/мл) или BMP-9 (1 нг/мл). В последующих тестах использовали антитела и ростовые факторы в указанных концентрациях. Клетки культивировали в течение 72 ч и

проводили МТТ-тест. Оптическую плотность измеряли при длине волны 540 нм с помощью планшетного мультисканера (Bio-Rad, Россия).

**Адгезия клеток к фибронектину.** Для изучения адгезионных свойств клетки эндотелия снимали с поверхности флакона с помощью скребка. Затем клетки помещали в среду, содержащую либо антитела против эндоглина, либо антитела и ростовые факторы, рассеивали в 96-ти луночный планшет, покрытый фибронектином, в концентрации 25 тыс. клеток/см<sup>2</sup> и культивировали в инкубаторе в течение 40 мин. Неприкрепившиеся клетки отмывали фосфатно-солевым раствором, прикрепившиеся клетки фиксировали 4% забуференным формальдегидом и окрашивали 0.2% кристаллическим фиолетовым. Клетки исследовали под инвертированным микроскопом Axio Zeiss (Германия) и фотографировали с помощью камеры AxioCam MRm.

Для визуализации морфологических изменений суспензию клеток с антителами рассеивали на покровные стекла, покрытые фибронектином. Клетки культивировали в течение суток, фиксировали и

**Таблица 2.** Изменение экспрессии генов клетками EA.hy926 при культивировании\*

Гены	Длительность культивирования EA.hy926, количество пассажей	
	<15	>30
<i>VWF</i>	7.8 ± 0.41	12.2 ± 0.24
<i>VEGFR1</i>	11.6 ± 1.28	14.2 ± 0.63
<i>VEGFR2</i>	7.2 ± 0.46	10.3 ± 0.51
<i>VEGF</i>	8.6 ± 0.17	8.8 ± 0.25
<i>ENG</i>	5.2 ± 0.23	5.9 ± 0.24
<i>TGF-<math>\beta</math>1</i>	6.9 ± 0.28	8.0 ± 0.2
<i>FGF2(b)</i>	6.2 ± 0.33	5.2 ± 0.26
<i>MMP-14</i>	6.4 ± 0.33	6.8 ± 0.42

\* Приведены значения  $\Delta$ СТ, разницы между пороговыми циклами исследуемых генов и гена сравнения *GAPDH*.

**Таблица 3.** Экспрессия генов клетками HUVEC, полученными от разных доноров\*

Гены	Доноры клеток HUVEC			
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
<i>VWF</i>	Нет данных	0.3	1.3	0.7 ± 0.51
<i>VEGFR1</i>	8.6	8.8	8.9 ± 0.4	10.2 ± 1.7
<i>VEGFR2</i>	7.1 ± 0.37	6.4 ± 1.98	6.5 ± 0.8	5.5 ± 0.28
<i>VEGF</i>	8.7 ± 0.6	7.6	7.2	8.3 ± 0.16
<i>ENG</i>	4.2 ± 0.24	3.1	4.0 ± 0.24	4.6 ± 0.52
<i>TGF-β1</i>	7.2 ± 0.43	7.2 ± 0.23	8.1 ± 2.4	5.7 ± 0.16
<i>FGF2(b)</i>	6.3 ± 0.21	4.6	4.5	5.7
<i>MMP-14</i>	Нет данных	3.7	Нет данных	3.9 ± 0.5

\* Приведены значения ΔСТ, разницы между пороговыми циклами исследуемых генов и гена сравнения *GAPDH*.

окрашивали актиновый цитоскелет TRITC-фаллоидином. Ядра докрашивали красителем DAPI. Клетки исследовали под флуоресцентным микроскопом Axio Zeiss (Германия) и фотографировали с помощью камеры AxioCam MRm.

**Адгезия клеток эндотелия к МСК.** МСК сокультивировали с клетками эндотелия, окрашенными красителем CFSE в 96-ти луночных планшетах, в условиях гипоксии. Эксперимент выполняли в трех вариантах. В первом варианте суспензию окрашенных CFSE клеток эндотелия инкубировали в среде с антителами при постоянном перемешивании на ротационном шейкере Intelli-Mixer RM-2 (ELMI, Россия) в течение 30 мин, отмывали от несвязавшихся антител и вносили в монослойную интактную культуру МСК. Во втором варианте окрашенные CFSE клетки эндотелия после инкубации с антителами добавляли к монослою МСК, который также предварительно культивировали в среде с антителами в течение 30 мин. В третьем варианте культуру МСК в монослое инкубировали с антителами, а затем к ним добавляли окрашенные CFSE клетки эндотелия.

Во всех трех вариантах сокультивирование проводили в течение 45 мин, после чего для удаления неприкрепившихся эндотелиальных клеток монослой МСК трижды отмывали ростовой средой с 1% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки в каждой лунке фотографировали в трех полях зрения с помощью камеры люминесцентного инвертированного микроскопа Axio Zeiss (Германия). Подсчитывали количество окрашенных CFSE клеток эндотелия, прикрепленных к монослою МСК.

**Подсчет клеток на цифровых изображениях.** Число окрашенных клеток на фотографиях определяли с помощью созданного в лаборатории приложения для автоматического подсчета клеток (Столбовая и др., 2019).

**Миграция клеток.** Исследование миграции проводили в 24-луночных планшетах, лунки которых

содержали вставки (IBIDI, Германия). Клетки по 30 тыс. рассеивали в лунки, образованные вставкой, и помещали в инкубатор. Через сутки вставки удаляли, в результате чего в монослое клеток образовывались “раны”. Клетки культивировали в среде, содержащей либо антитела, либо антитела и ростовые факторы в течение 24 ч, затем фиксировали. “Рану” в монослое в каждой лунке фотографировали до начала миграции и через 24 ч в трех полях зрения с помощью камеры AxioCam MRm инвертированного микроскопа Axio Zeiss (Германия).

Размер раны на цифровом изображении определяли с помощью приложения, разработанного в лаборатории (Столбовая и др., 2019). Были определены границы раны, и ее площадь оценивали в % от общего размера изображения. Степень закрытия раны определяли по формуле:  $C = (S_1 - S_2)/S_1 \times 100\%$ , где  $C$  – степень закрытия раны;  $S_1$  – средняя площадь раны в начале эксперимента (в %);  $S_2$  – средняя площадь раны спустя 1 сут (в %).

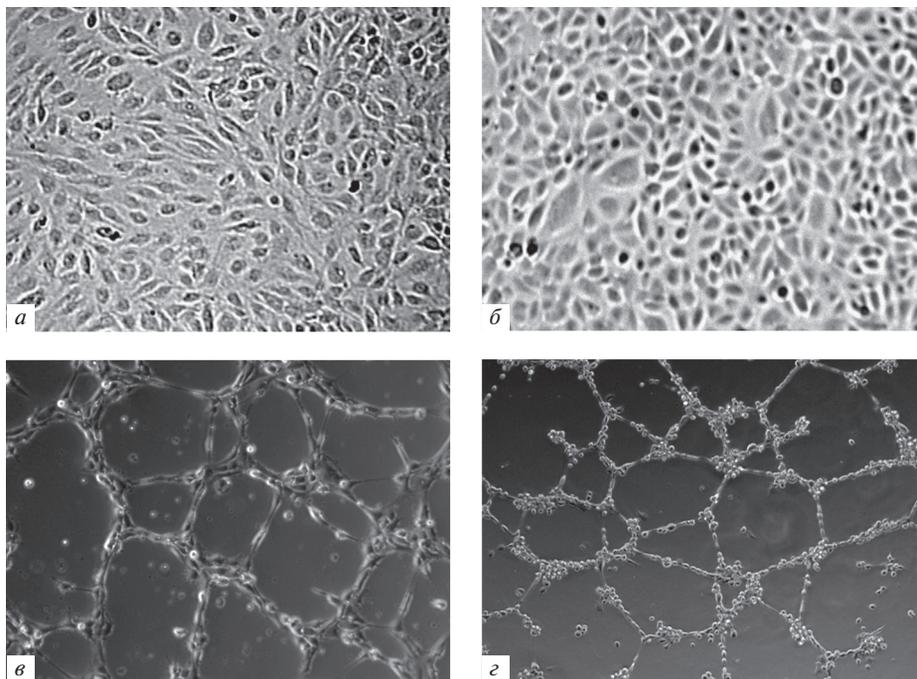
**Формирование трубок в матрикеле.** В 24-луночные планшеты, поверхность которых предварительно покрывали матрикелем, рассеивали клетки в концентрации 180 тыс./мл в ростовой среде, содержащей антитела. Клетки культивировали в течение 24 ч, фотографировали несколько полей зрения каждой лунки. Подсчитывали количество и длину капиллярноподобных структур – трубок в программе Image G.

**Влияние антител на образование растворимого эндоглина.** Клетки эндотелия рассеивали в 96-луночные планшеты. Через сутки заменяли среду и продолжали культивирование в среде, содержащей антитела, в течение 24, 48, 72 или 96 ч. В собранных образцах культуральной жидкости измеряли концентрацию растворимого эндоглина с помощью систем двухцентрового иммуноферментного анализа, разработанных в лаборатории (Столбовая и др. 2019).

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку данных выполняли с помощью функций языка R (R Core Teams, 2020). Сравнение уровней экспрессии генов в культурах HUVEC и EA.hy926 проводили с помощью дисперсионного анализа.

При анализе пролиферации клеток было построено четыре линейных модели, описывающих зависимость оптической плотности от присутствия антител при культивировании в условиях нормоксии или гипоксии, а также при добавлении ростовых факторов TGF-β1 и BMP-9. В этой серии анализов проводилась коррекция уровней значимости с помощью поправки Бонферрони (Quinn, Keough, 2002).

Для оценки влияния антител на адгезию, миграцию и формирование капиллярноподобных структур строили регрессионные линейные модели со смешанными эффектами (Zuur et al., 2009). Анализ выполняли с помощью пакета lme4. После расчетов параметров моделей проводили множественные сравнения средних значений с контролем. Оценку



**Рис. 1.** Общий вид культур клеток эндотелия HUVEC (а) и EA.hy926 (б). Капилляроподобные структуры (трубки) на поверхности матригеля, образованные клетками HUVEC (в) и EA.hy926 (г). Объектив 10 $\times$ . Фазовый контраст.

статистической значимости различий осуществляли с помощью теста Даннета (Bretz et al., 2011). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Для расчетов применяли функции пакета multcomp (Hothorn et al., 2008). Для визуализации данных использовали функции пакета ggplot2 (Wickham, 2016).

**Использованные реактивы и среды.** Среда DMEM/F12, версен, фибронектин (Биолот, Россия); среда для первичных культур эндотелия Endothelial cell medium (ScienCell Research Laboratories, США); среда для мезенхимальных стволовых клеток (Кембио, Россия); эмбриональная телячья сыворотка (Biowest Premium, Франция); аминокперин, гипоксантин, тимидин, изотиоцианат флуоресцеина, TRITC-фаллоидин, CFSE, DAPI (Sigma, США); трипсин (HyClone, США); рекомбинантные молекулы TGF- $\beta$ 1, BMP-9, эндоглина (R&D Systems, США); матригель (Corning, США); ТМВ для иммуноферментного анализа (Хема, Россия); Trizol Reagent (Life Technologies, США); обратная транскриптаза M-MuLV, смесь dNTP, random-прайма, Hot-start Taq-ДНК полимеразы, буфер для Hot-start Taq-ДНК полимеразы, раствор MgCl<sub>2</sub> (Сибэнзим, Россия); Sybr Green (BioDye, Россия); RiboLock RNase inhibitor (Thermo Scientific, США); CellWash (BD Bioscience, США).

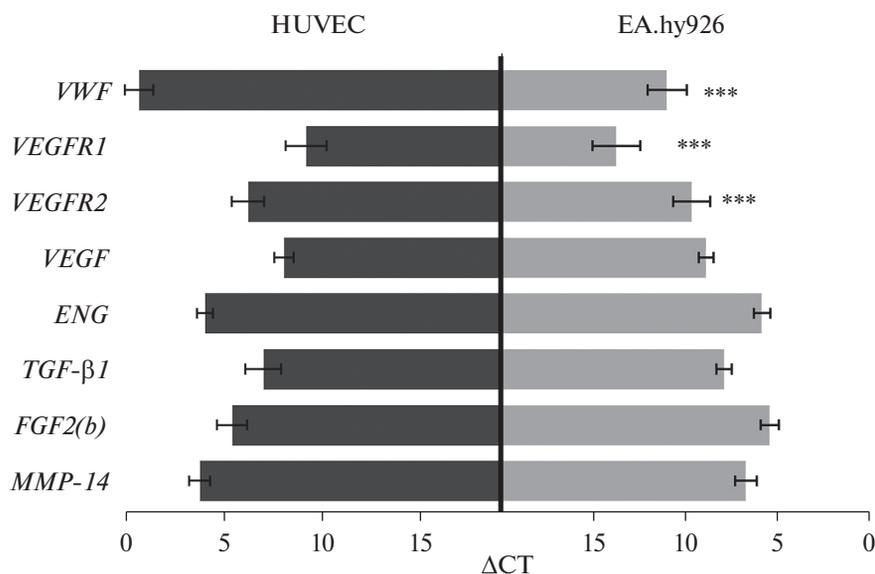
## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Сравнительная характеристика культур клеток эндотелия HUVEC и EA.hy926.** Две культуры клеток эн-

дотелия, первичная HUVEC и постоянная EA.hy926, формируют монослой по типу “булыжной мостовой” (cobblestone) (рис. 1а, б). Они способны формировать капилляроподобные трубки при культивировании на матригеле, что характерно для эндотелиальных клеток (рис. 1в, г).

При сравнении экспрессии генов в двух эндотелиальных клеточных линиях были выявлены заметные различия. Высокий уровень экспрессии гена фактора фон Виллебранда (*VWF*), характерный для дифференцированных клеток, обнаружен в клетках HUVEC (рис. 2). В клетках EA.hy926 уровень активности гена *VWF* был значительно ниже уже на протяжении первых 15 пассажей культивирования в лаборатории, несмотря на то, что клетки постоянно культивировали в среде, содержащей НАТ-компоненты. В процессе более длительного непрерывного пассирования этих клеток отмечалось дальнейшее снижение активности гена *VWF*. Первичная культура HUVEC, в отличие от линии EA.hy926, обладала более высоким уровнем экспрессии генов *VEGFR1* и *VEGFR2*, продукты которых принимают участие в процессах ангиогенеза. Экспрессия этих генов в линии EA.hy926 снижалась по мере культивирования. Активность генов ростовых факторов (*VEGF*, *TGF- $\beta$ 1*, *FGF2(b)*), генов *ENG* и *MMP-14* в клетках HUVEC и EA.hy926 была одинаковой и не изменялась в процессе культивирования последних (рис. 2).

В клетках HUVEC, выделенных от разных доноров, уровни активности исследованных генов, в том числе гена эндоглина, не были одинаковыми, но



**Рис. 2.** Экспрессия генов в клетках эндотелия HUVEC и EA.hy926, измеренная методом ПЦР в режиме реального времени. Приведены значения  $\Delta CT$ , разницы между пороговыми циклами исследуемых генов и гена сравнения *GAPDH*. \*\*\* – статистически значимые отличия между двумя клеточными культурами,  $p < 0.001$ .

различались незначительно. Наибольшие различия были отмечены для гена *TGF-β1*.

Цитофлуориметрический анализ выявил фенотипические различия между культурами HUVEC и EA.hy296 по экспрессии адгезионных молекул (рис. 3). Более 90% клеток обеих клеточных культур несли на мембране CD29, CD44, CD49e, CD105, CD144, CD166. Однако плотность вышеуказанных маркеров на поверхности клеток была разной, что отражалось в различиях медиан интенсивности флуоресценции. Популяция клеток HUVEC, в отличие от линии EA.hy296, была гетерогенна по маркерам CD44, CD49e и CD166. Плотность молекул CD105 и CD144 была выше на мембране клеток HUVEC по сравнению с EA.hy296. Плотность маркера CD166, напротив, оказалась выше на клетках EA.hy296.

Популяции клеток, имеющих антигены CD31, CD54 и CD146, в культурах HUVEC составляли более 90%, тогда как в линии EA.hy296 доля таких клеток была значительно меньше. Около 21% клеток HUVEC экспрессировали CD34; на мембране клеток EA.hy296 этот маркер не был обнаружен. Клетки, имеющие антигены CD62E и CD106, отсутствовали в обеих клеточных культурах.

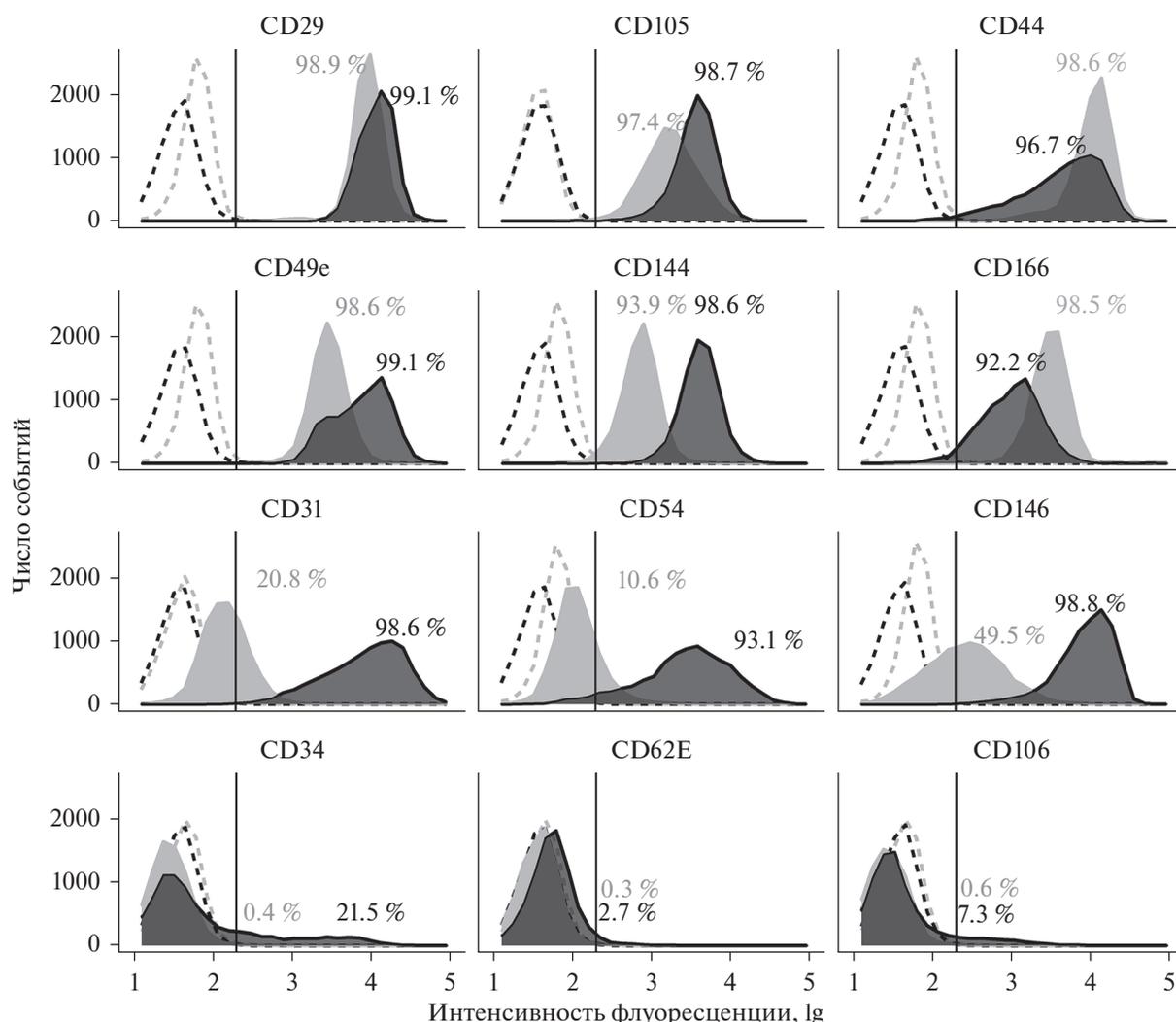
**Влияние МКАТ к эндоглину на функциональные характеристики клеток HUVEC.** Для оценки изменений функциональных характеристик первичной культуры эндотелия HUVEC в ростовую среду вносили МКАТ к эндоглину 2С8 или 4Е4 в конечной концентрации 5 мкг/мл. Методом проточной цитометрии было показано, что при такой концентрации происходило насыщение связывания антител с антигеном на клетках эндотелия (рис. 4а). При увеличении концентрации антител интенсивность флуо-

ресценции не изменялась. Несмотря на то, что плотность молекул эндоглина на мембране клеток HUVEC, культивируемых в условиях гипоксии, увеличивалась по сравнению с клетками, находящимися в условиях нормоксии (рис. 4в), насыщение связывания эндоглина наступало также при концентрации антител 5 мкг/мл (рис. 4б). Все функциональные тесты выполняли не менее трех раз на клетках HUVEC, полученных от четырех разных доноров.

Уровень пролиферации клеток эндотелия HUVEC (рис. 5а), культивируемых на фибронектине, статистически значимо не изменялся в присутствии антител 2С8 или 4Е4 как при нормоксии, так и при гипоксии. Также не было выявлено различий в уровне пролиферации клеток при одновременном добавлении в ростовую среду антител и ростовых факторов *TGF-β1* или *BMP-9* (рис. 5б, в).

В экспериментах по изучению влияния МКАТ 2С8 и 4Е4 на адгезию эндотелиальных клеток HUVEC к фибронектину не было выявлено различий по сравнению с изотипическим контролем (рис. 6а). Однако в присутствии МКАТ 2С8 и при одновременной стимуляции *TGF-β1* наблюдали уменьшение адгезивной способности клеток (рис. 6б). Аналогичный эффект снижения адгезии клеток эндотелия к фибронектину в присутствии МКАТ 2С8 был выявлен при культивировании клеток в условиях гипоксии (рис. 6з). Одновременное добавление в среду МКАТ и *BMP-9* не влияло на адгезию клеток, культивируемых в условиях нормоксии (рис. 6в).

Внесение МКАТ 2С8 или 4Е4 в суспензию предварительно снятых с подложки эндотелиальных клеток влияло на последующее распластывание клеток на субстрате. Окрашенные TRITC-фаллоидином клетки,



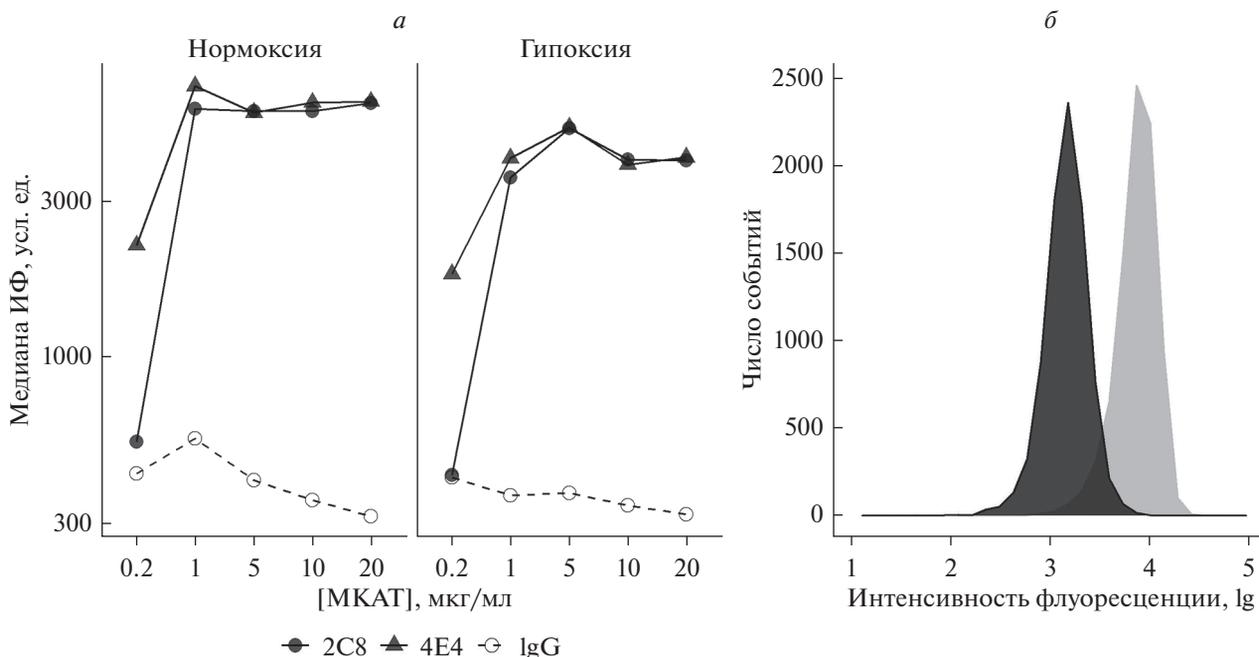
**Рис. 3.** Экспрессия адгезионных молекул на мембране клеток эндотелия HUVEC (черный цвет) и EA.hy926 (серый цвет) по результатам проточной цитометрии. Пунктирными линиями обозначены изотипические контроли. Приведены результаты анализа клеток HUVEC, выделенных от одного донора, и клеток линии EA.hy926 на 41 пассаже культивирования. Указан процент клеток, несущих на поверхности соответствующий антиген, в сравнении с изотипическим контролем.

прикрепившиеся к фибронектину в присутствии анти-тел, были сжатыми и обладали большим количеством фокальных контактов по сравнению с контролем (рис. 7). Обращает на себя внимание тот факт, что при окрашивании TRITC-фаллоидином клетки, обработанные МКАТ 2С8 или 4Е4, выглядели одинаково, тогда как в предыдущих экспериментах МКАТ 4Е4 не влияли на количество прикрепленных к фибронектину клеток (рис. 6 и 7).

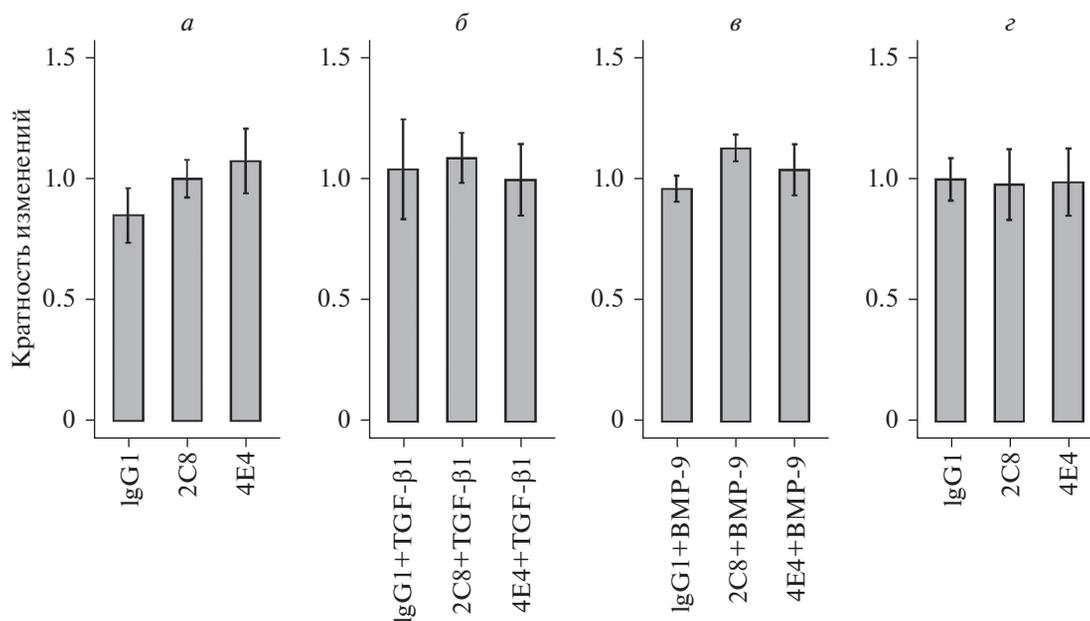
Для изучения влияния антител на межклеточные взаимодействия провели сокультивирование клеток эндотелия HUVEC с МСК в условиях гипоксии. МСК, так же, как и клетки эндотелия несут на своей поверхности эндоглин (рис. 8а), поэтому перед сокультивированием клетки инкубировали в среде с антителами в одном из трех вариантов: 1) только МСК, 2) МСК и клетки эндотелия, 3) только клетки

эндотелия. Ни в одном случае антитела не влияли на взаимодействие клеток HUVEC и МСК (рис. 8б–г).

Антитела против эндоглина 2С8 и 4Е4 не оказывали влияния на миграционную активность клеток эндотелия HUVEC, оцененную в тесте закрытия “раны”. Однако одновременное присутствие в ростовой среде МКАТ и ростового фактора TGF-β1 замедляло процесс миграции. К концу наблюдения степень закрытия раны в контроле составляла 55%, тогда как в культурах клеток с добавлением антител и TGF-β1 – 47% (рис. 9б). Добавление BMP-9 одновременно с антителами приводило к значительной вариабельности результатов экспериментов (рис. 9в). Проведение экспериментов в условиях нормоксии или гипоксии не влияло на миграцию клеток, культивируемых в среде с антителами (рис. 9а, г).



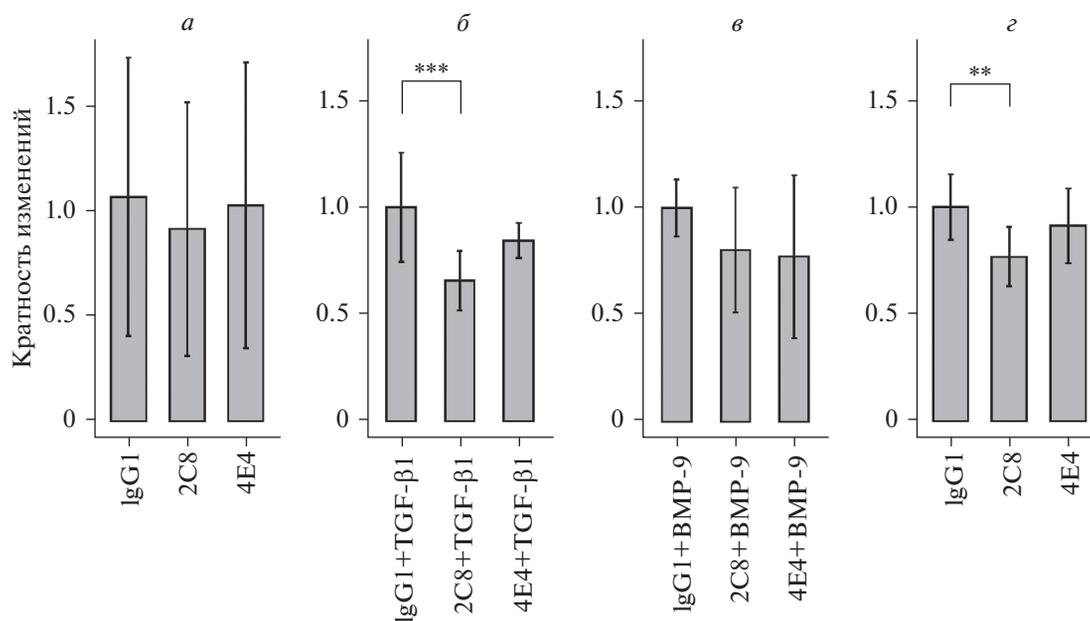
**Рис. 4.** Концентрационная зависимость связывания МКАТ 2С8 и 4Е4 с эндоглином на мембране клеток эндотелия HUVEC в условиях нормоксии (а) и гипоксии (б). Экспрессия эндоглина на поверхности клеток эндотелия HUVEC, культивируемых в условиях нормоксии (черная заливка) и гипоксии (серая заливка) (в).



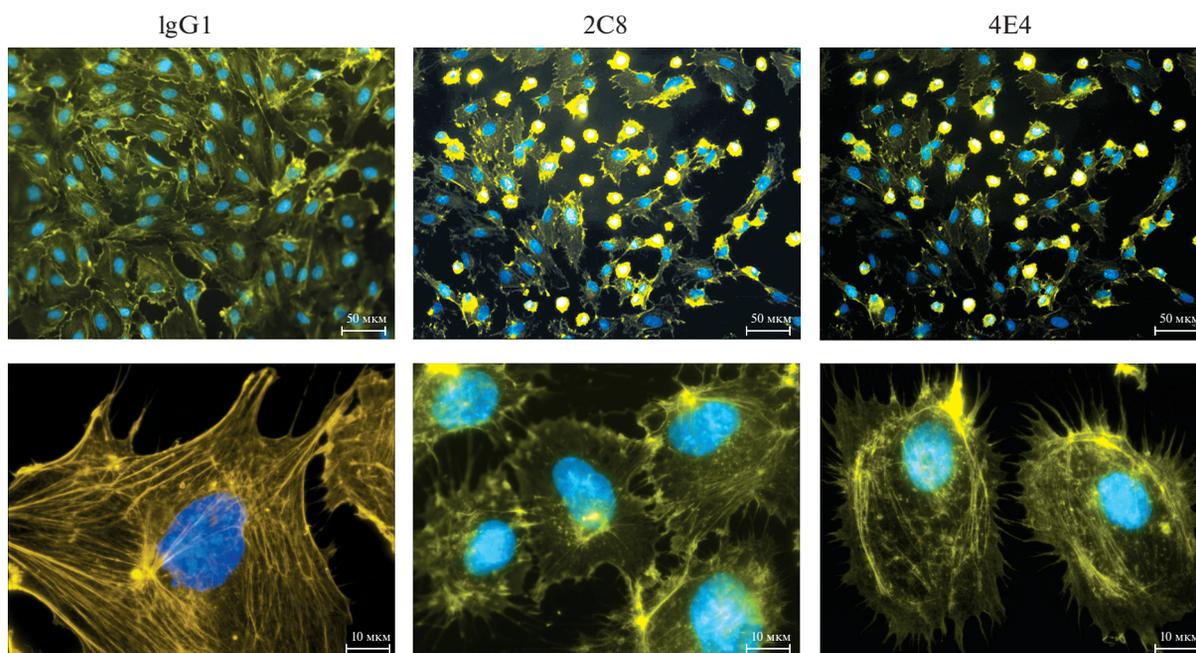
**Рис. 5.** Влияние МКАТ к эндоглину на пролиферацию клеток эндотелия HUVEC, культивируемых в условиях нормоксии (а–в) и гипоксии (г) в присутствии ростовых факторов TGF-β1 (б), VMP-9 (в) или без них (а, г). Количество клеток оценивали через 72 ч после начала эксперимента с помощью МТТ-теста. Данные нормализованы относительно среднего значения изотипического контроля. Вертикальными отрезками обозначены 95%-ные доверительные интервалы.

В качестве модели ангиогенеза в условиях клеточной культуры использовали тест формирования капилляроподобных структур (трубок) на матрикеле. В присутствии МКАТ 2С8 или 4Е4 клетки HUVEC

формировали трубки на поверхности матрикеля, при этом число, длина трубок и степень покрытия трубками субстрата не отличались от контроля (рис. 10а–в). Снижение числа сформированных трубок в присут-



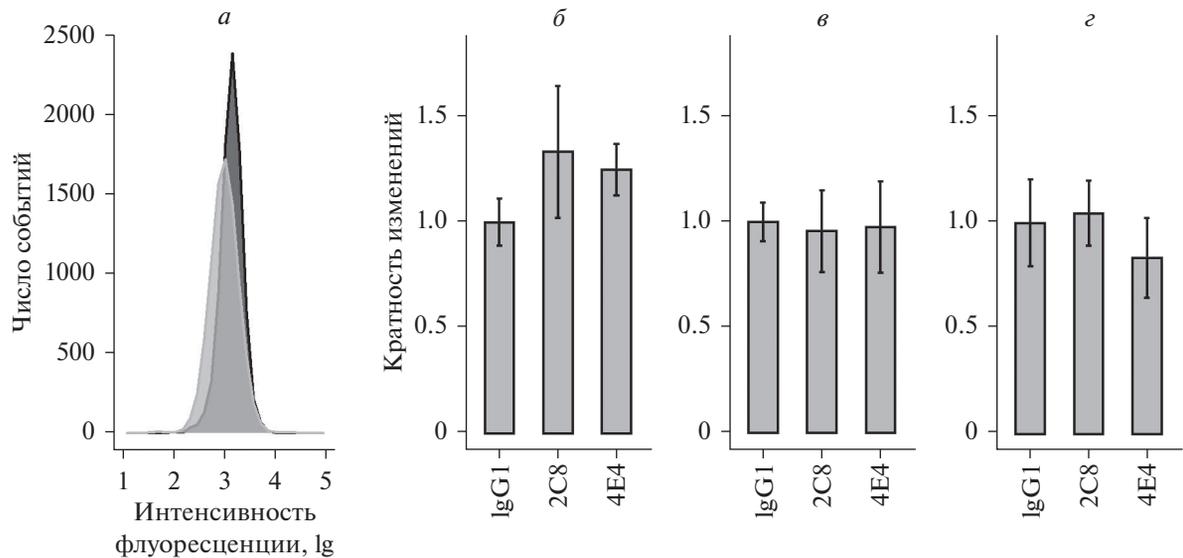
**Рис. 6.** Влияние МКАТ к эндоглину на адгезию HUVEC к твердой фазе, покрытой фибронектином, при культивировании клеток в условиях нормоксии (а–в), в том числе в присутствии ростовых факторов TGF-β1 (б) или BMP-9 (в), и в условиях гипоксии (г). Число клеток, прикрепившихся к твердой фазе, нормализовано относительно средних значений изотипического контроля. Вертикальными отрезками обозначены 95%-ные доверительные интервалы. \*\* – различия между группами достоверны для  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ .



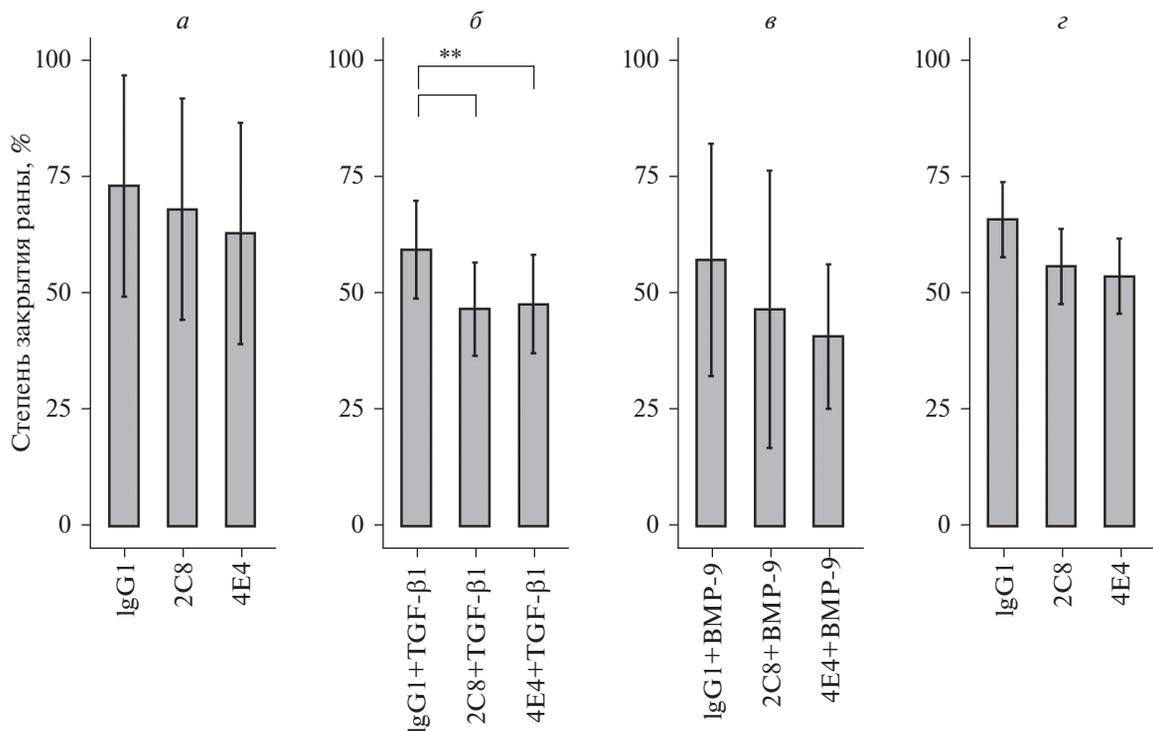
**Рис. 7.** Изменения в организации актинового цитоскелета клеток HUVEC, вызванные добавлением МКАТ 2C8 или 4E4. Актиновые филаменты окрашены TRITC-фаллоидином, ядра окрашены DAPI. Верхний ряд – об. 20×, нижний ряд – об. 100×.

ствии антител наблюдали только при помещении клеток в условия гипоксии (рис. 10г), тогда как длина капилляроподобных структур не изменялась (рис. 10д). Для обоих антител был получен одинаковый результат.

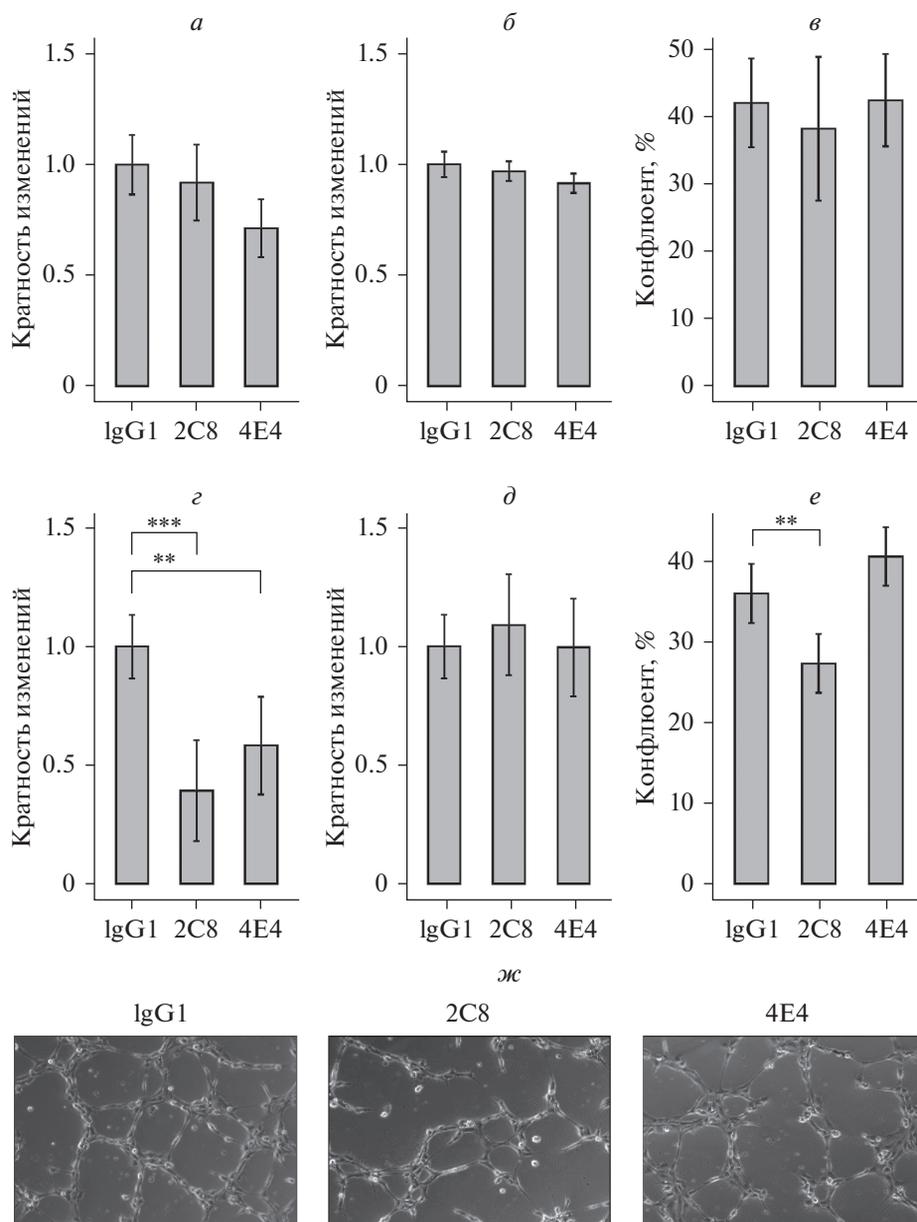
Процесс фермент-зависимого сбрасывания эндоглина с мембраны клеток эндотелия с образованием растворимого эндоглина был исследован в условиях нормоксии и при снижении содержания кислорода в газовой фазе. Присутствие МКАТ 2C8 приводило к



**Рис. 8.** Влияние МКАТ к эндоглину на адгезию клеток эндотелия HUVEC к монослою МСК в условиях гипоксии. *a* – Экспрессия эндоглина клетками HUVEC (черная гистограмма) и МСК (серая гистограмма). Эксперименты проводили в трех вариантах: перед сокультивированием клеток МКАТ добавляли только к МСК (*б*), к МСК и HUVEC (*в*), только к клеткам эндотелия HUVEC (*г*). Количество прикрепившихся к монослою МСК клеток эндотелия нормализовано относительно изотипического контроля. Вертикальными отрезками обозначены 95%-ные доверительные интервалы.



**Рис. 9.** Влияние антител против эндоглина на миграцию клеток эндотелия HUVEC в присутствии ростовых факторов TGF-β1 (*б*) или BMP-9 (*в*) при нормоксии (*a*, *б*, *в*) и при гипоксии (*г*). Вертикальными отрезками обозначены 95%-ные доверительные интервалы. \*\* – достоверные различия между группами,  $p < 0.01$ .



**Рис. 10.** Формирование капилляроподобных структур клетками эндотелия HUVEC, культивируемыми на матрикеле в присутствии МКАТ к эндоглину в условиях нормоксии (а–в) или гипоксии (з–ж). Определяли число капилляроподобных структур (а, з), длину трубок (б, д) и конфлюент в поле зрения (в, е). Капилляроподобные структуры фотографировали при фазово-контрастной настройке микроскопа (ж). Об. 10×. Вертикальными отрезками обозначены 95%-ные доверительные интервалы. \*\* – достоверные различия между группами,  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ .

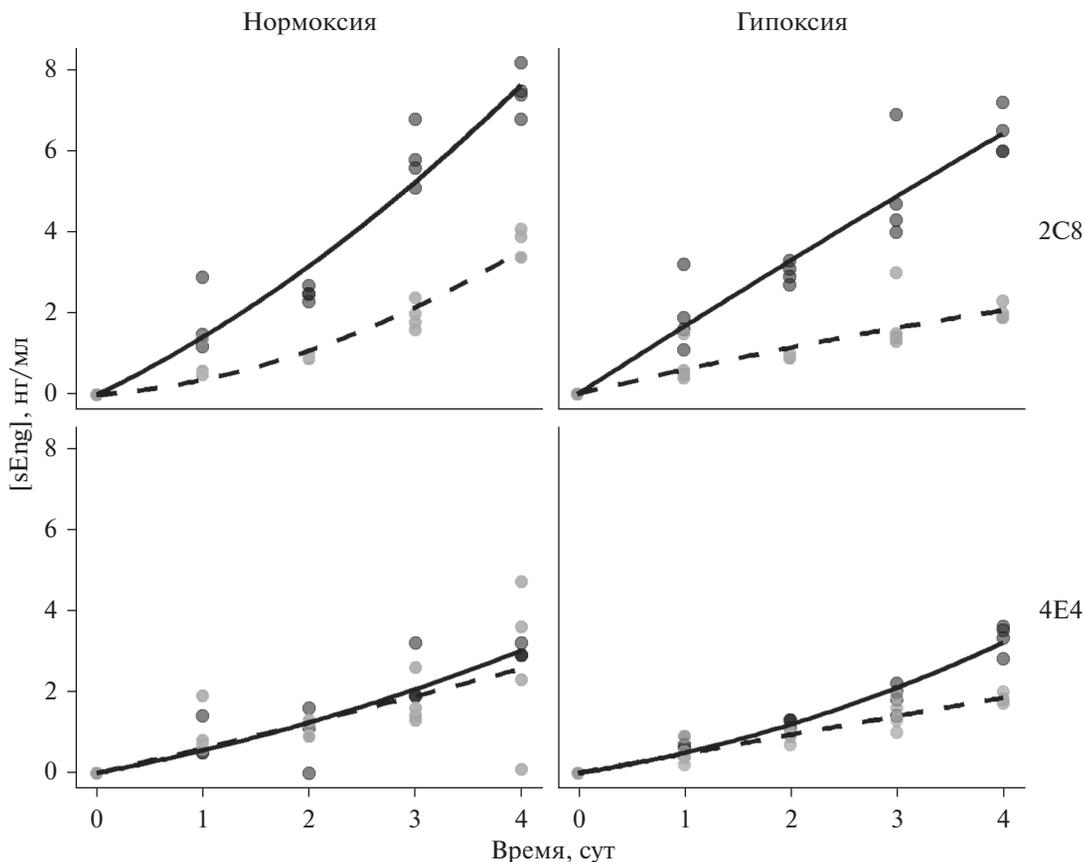
увеличению концентрации эндоглина в ростовой среде клеток HUVEC с 2 нг/мл до 8 нг/мл (рис. 11а). Этот эффект наблюдали как при пониженном, так и при нормальном содержании кислорода в газовой фазе (рис. 11а, б). МКАТ 4Е4 не оказывало влияния на образование растворимого эндоглина (рис. 11а, б).

**ОБСУЖДЕНИЕ**

В работе проведено сравнение свойств и функциональных характеристик клеток двух эндотелиаль-

ных линий, HUVEC и EA.hy926, в ответ на присутствие антител против эндоглина 2С8 и 4Е4.

Культивирование клеток HUVEC с анти-эндоглиновыми антителами приводило к уменьшению адгезии клеток к внеклеточному матриксу и замедлению их миграции при условии одновременного присутствия в среде ростового фактора TGF-β1. Влияние антител на формирование капилляроподобных трубок клетками HUVEC проявлялось только в условиях гипоксии. Таким образом, эффекты действия антиэндоглиновых МКАТ на свойства кле-



**Рис. 11.** Влияние МКАТ на накопление растворимой формы эндоглина в ростовой среде клеток HUVEC, культивируемых в нормоксических или гипоксических условиях. Сплошной линией обозначены образцы с добавлением антител, пунктирной линией обозначен изотипический контроль (IgG1).

ток эндотелия HUVEC проявлялись либо в условиях нормоксии, но при стимуляции клеток ростовым фактором TGF- $\beta$ 1, либо в условиях пониженного содержания кислорода.

Функции TGF- $\beta$ 1 в отношении эндотелия многообразны. В условиях нормоксии этот ростовой фактор связывается с рецепторным комплексом ALK5/TGF- $\beta$ RII и активирует сигнальный путь Smad 2/3, который поддерживает состояние покоя эндотелия (Goumans et al., 2009). На последних этапах ангиогенеза TGF- $\beta$ 1 тормозит пролиферацию и миграцию клеток эндотелия и вносит вклад в стабилизацию стенки вновь образованного сосуда (Goumans et al., 2009). Эндоглин является корецептором рецепторного комплекса, распознающего и связывающего TGF- $\beta$ 1 на клетках эндотелия. Связывание МКАТ 2C8 с эндоглином в присутствии TGF- $\beta$ 1 приводило к ослаблению адгезии к внеклеточному матриксу (фибронектину) и замедлению миграции клеток HUVEC. Аналогичный феномен торможения миграционной активности эндотелия анти-эндоглиновыми антителами в присутствии TGF- $\beta$ 1 был показан нами ранее на клетках постоянной линии EA.hy296 (Столбовая и др., 2019). Ранее было пока-

зано, что добавление TGF- $\beta$ 1 к клеткам EA.hy926, у которых с помощью антисмысловой последовательности (сайленсинг) снижена экспрессия гена эндоглина, приводило к значительному снижению миграционной активности клеток (Warrington et al., 2005).

В условиях пониженной концентрации кислорода в тканях усиливается ангиогенез (López-Novoa, Bernabeu, 2010). В условиях гипоксии происходит одновременное повышение экспрессии эндоглина за счет активации транскрипционного фактора HIF1 (Sánchez-Elsner et al., 2002) и киназы ALK1 (Tian et al., 2010). ALK1 встраивается в рецепторный комплекс TGF- $\beta$  вместо ALK5 и активирует сигнальный путь Smad 1/5/8, который приводит к активации эндотелиальной клетки: усилению пролиферации, ослаблению адгезии и увеличению миграции (Tian et al., 2010). Формирование капиллярноподобных структур на матрикеле моделирует одновременно несколько процессов, происходящих во время ангиогенеза. Это адгезия клеток к матрикелю, который по составу напоминает базальную мембрану (в состав матрикеля входит ламинин), межклеточная адгезия и направленная миграция. Наблюдавшееся нами снижение числа трубок, сформированных на

матригеле в присутствии МКАТ 2С8, может свидетельствовать о том, что связывание антител с эндоглином препятствует активации клеток эндотелия, ослабляя их адгезию и миграцию.

Сходные результаты были описаны при использовании химерных антител к эндоглину TRC105 (Liu et al., 2014). Так, антитела TRC105 в концентрации 100 мкг/мл в тесте заживления раны снижали миграционную активность клеток HUVEC. Однако в другом исследовании те же антитела TRC105 в концентрации 2 мкг/мл демонстрировали увеличение миграционной активности в 1.4–1.5 раза (Kumar et al., 2014). Возможная причина расхождения результатов связана с использованной концентрацией антител или разным дизайном экспериментов. Антитела TRC105 также способны ингибировать образование капилляроподобных структур клетками HUVEC на матригеле. Как полагают авторы, этот эффект проявляется за счет ингибирования взаимодействия эндоглина с BMP-9 (Nolan-Stevaux et al., 2012).

Финальной стадией ангиогенеза является формирование контактов с другими типами клеток, стабилизирующих стенки сосудов. МСК способны взаимодействовать с эндотелиальными клетками и усиливать или ингибировать ангиогенез (Nassiri, Rahbarghazi, 2014). Имеются данные о том, что МСК способны дифференцироваться в гладкомышечные клетки сосудов и перicyты (Nassiri, Rahbarghazi, 2014). Однако в нашем исследовании сокультивирование МСК с клетками HUVEC, которое моделировало взаимодействие эндотелиоцитов с мезенхимными клетками, не выявило значимого влияния антиэндоглиновых МКАТ 2С8 и 4Е4 на межклеточную адгезию.

Эндоглин выполняет адгезионные функции независимо от TGF- $\beta$ -сигналинга. Помимо непосредственного связывания с интегринами через присутствующий в его составе RGD-триплет, эндоглин способен влиять на организацию актиновых филаментов в эндотелиальной клетке посредством взаимодействия с белками зиксином и ZRP-1 (Conley et al., 2004; Sanz-Rodriguez et al., 2004). Экспрессия зиксина связана с распластыванием клеток на субстрате. Показано, что присутствие эндоглина в клетках вызывает перераспределение белка ZRP-1, который уходит из фокальных контактов и локализуется вдоль актиновых стресс-фибрилл (Sanz-Rodriguez et al., 2004).

Связывание МКАТ 2С8 и 4Е4 с эндоглином на поверхности клеток HUVEC приводило к их сжатию в процессе адгезии, что может косвенно свидетельствовать о реорганизации актинового цитоскелета.

В организме эндоглин присутствует не только в мембранной, но и в растворимой форме. Последняя обладает антиангиогенными свойствами и образуется под действием матриксной металлопротеазы MMP-14 (López-Novoa, Bernabeu, 2010). Ранее было показано, что антитела TRC105 в концентрации 0.1–

0.2 мкг/мл вызывают повышение уровня растворимого эндоглина в среде культивирования клеток HUVEC в 2 раза (Kumar et al., 2014; Liu et al., 2014). Описанный эффект авторы связывали с индуцированной металлопротеазой MMP-14, которая осуществляет протеолитическое отщепление эндоглина (Kumar et al., 2014). Одни из исследованных нами антител, 2С8, также вызвали двукратное увеличение концентрации растворимого эндоглина в культуральной среде клеток HUVEC. Существенно отметить, что противоположный результат был получен при добавлении МКАТ 2С8 к клеткам EA.hy926: концентрация растворимого эндоглина при этом снижалась (Столбовая и др., 2019). Возможно, что наблюдаемое различие связано с разным уровнем экспрессии матриксных металлопротеаз в двух клеточных культурах эндотелия (рис. 2б, в).

Сопоставление эффектов антиэндоглиновых МКАТ, полученных нами на эндотелиальных клетках HUVEC и клеточной линии EA.hy926, представлены в табл. 4.

Как следует из данных, представленных в табл. 4, многие эффекты антиэндоглиновых антител на клетки эндотелия воспроизводились и на культурах HUVEC, и на постоянной клеточной линии EA.hy926. Основное отличие состояло в действии МКАТ 2С8 на шеддинг эндоглина. Связываясь с рецептором на клетках HUVEC, антитела усиливали отщепление эндоглина с мембраны, тогда как на клетках линии EA.hy926 происходило угнетение шеддинга.

В настоящей работе было проведено сравнение культур клеток HUVEC и постоянной линии EA.hy926 в качестве моделей для исследования воздействия различных препаратов на эндотелий *in vitro*. Сравнительные характеристики этих клеточных культур периодически появляются в научных публикациях (Mutin et al., 1997; Bouis et al., 2001), однако известно, что постоянные клеточные линии при длительном культивировании эволюционируют и меняют свойства. Обе клеточные модели эндотелия, культивируемые в нашей лаборатории, обладали морфологическими, фенотипическими и функциональными признаками, характерными для дифференцированных эндотелиальных клеток. Одним из главных маркеров эндотелиальных клеток является фактор фон Виллебранда (VWF). Этот фактор высоко экспрессирован в клетках HUVEC. При создании линии клеток эндотелия EA.hy926 авторы (Edgell et al., 1983) ставили одной из задач сохранение клетками экспрессии VWF. По данным ряда публикаций (Jaffe et al., 1973; Edgell et al., 1983; 1990; Unger et al., 2002; Heng et al., 2011) клетки EA.hy926, так же как и HUVEC, экспрессируют этот фактор. В клетках линии EA.hy926, использованных в нашем исследовании, уровень экспрессии гена VWF был значительно ниже, чем в клетках HUVEC, и снижался в процессе

**Таблица 4.** Влияние МКАТ 2С8 на функциональные характеристики клеток эндотелия HUVEC и EA.hy926

Функциональная характеристика	Критерий или метод оценки	Условия культивирования	Клетки	
			HUVEC	EA.hy926 <sup>a</sup>
Пролиферация	МТТ-тест или окраска кристаллическим фиолетовым	Нормоксия	Нет эффекта	Снижение
		Нормоксия + TGF- $\beta$ 1	Нет эффекта	Нет эффекта
		Гипоксия	Нет эффекта	— <sup>б</sup>
Адгезия к внеклеточному матриксу	Прикрепление клеток к фибронектину	Нормоксия	Нет эффекта	—
		Нормоксия + TGF- $\beta$ 1	Снижение	—
		Гипоксия	Снижение	—
Межклеточная адгезия	Сокультивирование с МСК	Гипоксия	Нет эффекта	—
Миграция	Заживление раны <i>in vitro</i>	Нормоксия	Нет эффекта	Нет эффекта
		Нормоксия + TGF- $\beta$ 1	Замедление	Замедление
		Гипоксия	Нет эффекта	—
Ангиогенез <i>in vitro</i>	Формирование трубок на матрикеле	Нормоксия	Нет эффекта	—
		Гипоксия	Снижение	—
Шеддинг эндоглина с мембраны клеток	Определение методом ИФА растворимого эндоглина в культуральной среде	Нормоксия	Усиление	Снижение
		Гипоксия	Усиление	—

a — данные о функциональных характеристиках клеток EA.hy926, культивируемых с антителами 2С8, взяты из работы Столбовой с соавторами (2019); б — нет данных.

длительного культивирования, несмотря на то, что линию постоянно вели в селективной среде, содержащей аминоптерин, тимидин и гипоксантин. В то же время активность генов ряда ростовых факторов, индукторов ангиогенеза, а также эндоглина сохранялась в клетках EA.hy926 на протяжении длительного культивирования.

Сравнение фенотипических характеристик клеток HUVEC и EA.hy926 показало, что обе клеточные линии несут на поверхности одинаковый набор адгезионных маркеров, за исключением CD34. Тем не менее, плотность молекул, поддерживающих целостность клеточного монослоя (CD31, CD144, CD146) и взаимодействующих с экстраклеточным матриксом (CD49e), оказалась выше на мембране клеток HUVEC. Эндоглин имели более 95% клеток в обеих клеточных культурах, но плотность молекул CD105 была немного выше на клетках HUVEC. Индивидуальные маркеры активированного эндотелия CD62E и CD106 отсутствовали на клетках обеих линий, за исключением маркера CD54, который был представлен на поверхности всей популяции клеток HUVEC. Полученные нами результаты о фенотипических характеристиках эндотелиальных клеточных культур совпадали с ранее известными характеристиками этих клеточных культур (Mutin et al., 1997).

Таким образом, на клетках первичной культуры эндотелия HUVEC и постоянной клеточной линии эндотелия EA.hy926 моноклональные антитела 2С8 и 4Е4, связывающие эндоглин на мембране, меняют функциональные свойства клеток эндотелия, культивируемых в присутствии TGF- $\beta$ 1 или в условиях гипоксии.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства Здравоохранения РФ (Госзадание №АААА-А18-118042390170-8 — “Разработка на основе моноклональных антител против эндоглина (CD105) носителей изотопных меток для визуализации сосудистой сети солидных новообразований”).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все образцы были получены при информированном согласии от пациентов и доноров. Процедуры проводили в соответствии с нормативными требованиями научно-исследовательского этического комитета ФГБУ “РНЦРХТ им. акад. А.М. Гранова” (Санкт-Петербург, Россия).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

## ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

А.Ю. Столбовая, И.В. Смирнов, М.П. Самойлович: идея работы, ее планирование, проведение экспериментов, обработка результатов. А.Ю. Столбовая, И.В. Смирнов, А.А. Пиневиц, М.П. Самойлович: написание текста, подготовка иллюстраций. А.Ю. Столбовая, А.А. Пиневиц, И.Ю. Крутецкая, Л.А. Терехина, К.Л. Маркова, А.Б. Малашичева: культивирование клеток, приготовление препаратов для микроскопических исследований. А.А. Пиневиц: проточная цитофлуориметрия. А.Ю. Столбовая, И.В. Смирнов: иммуоферментный анализ. Н.Л. Вартамян: выделение РНК и проведение ПЦР. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пиневиц А.А., Вартамян Н.Л., Терехина Л.А., Крутецкая И.Ю., Шашкова О.А., Смирнов И.В., Самойлович М.П.* 2020. Экспрессия и обновление эндоглина на мембране мезенхимных стволовых клеток и клеток эндотелия. Цитология. Т. 62. № 8. С. 542. (*Pinevich A.A., Vartanyan N.L., Terekhina L.A., Krutetskaya I.Y., Shashkova O.A., Smirnov I.V., Samoylovich M.P.* 2021. Endoglin expression and surface renewal in mesenchymal stem cells and endothelial cells. *Cell Tiss. Biol.* V. 15. № 2. P. 107).
- Пиневиц А.А., Самойлович М.П., Шашкова О.А., Вартамян Н.Л., Польсалов В.Н., Киселева Л.Н., Карташев А.В., Айзенштадт А.А., Климович В.Б.* 2014. Характеристика мезенхимальных стромальных клеток при раке молочной железы. Клеточные технологии в биологии и медицине. № 2. С. 84. (*Pinevich A.A., Samoilovich M.P., Shashkova O.A., Vartanyan N.L., Polysalov V.N., Kiseleva L.N., Kartashev A.V., Aizenshtadt A.A., Klimovich V.B.* 2014. Characteristics of mesenchymal stromal cells isolated from patients with breast cancer. *Cell Technologies in Biology and Medicine.* № 2. P. 666).
- Смирнов И.В., Грязева И.В., Самойлович М.П., Терехина Л.А., Пиневиц А.А., Крылова А.А., Крутецкая И.Ю., Никольский Н.Н., Климович В.Б.* 2015. Панель моноклональных антител против эндоглина человека: получение и характеристика. Цитология. Т. 57. № 7. С. 499. (*Smirnov I.V., Gryazeva I.V., Samoilovich M.P., Terekhina L.A., Pinevich A.A., Krylova A.A., Krutetskaya I.Yu., Nikolsky N.N., Klimovich V.B.* 2015. Production and characterization of the panel of monoclonal antibodies against human endoglin. *Cell Tiss. Biol.* V. 9. № 6. P. 473).
- Столбовая А.Ю., Смирнов И.В., Пиневиц А.А., Берлина М.А., Козырева А.Р., Шашкова О.А., Соколов Д.И., Сельков С.А., Самойлович М.П.* 2019. Влияние моноклональных антител к эндоглину человека на функциональные характеристики клеток эндотелия EA.hy926. Цитология. Т. 61. № 6. С. 439. (*Stolbovaya A.Yu., Smirnov I.V., Pinevich A.A., Berlina M.A., Kozyreva A.R., Shashkova O.A., Sokolov D.I., Selkov S.A., Samoylovich M.P.* 2020. Influence of monoclonal antibodies against human endoglin on the functional characteristics of EA.hy926 endothelial cells. *Cell Tiss. Biol.* V. 14. № 1. P. 1).
- Banerjee S., Dhara S.K., Bacanamwo M.* 2012. Endoglin is a novel endothelial cell specification gene. *Stem Cell Res.* V. 8. P. 85.
- Barbara N.P., Wrana J. L., Letarte M.* 1999. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J. Biol. Chem.* V. 274. P. 584.
- Bouïs D., Hospers G.A., Meijer C., Molema G., Mulder N.H.* 2001. Endothelium *in vitro*: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis.* V. 4. P. 91.
- Bretz F., Hothorn T., Westfall P.* 2011. Multiple comparisons using R. Taylor and Francis Group. 193 pp.
- Catty D.* 1989. Antibodies: A practical approach. Volume 2. Oxford: Oxford University Press. 259 pp.
- Conley B.A., Koleva R., Smith J.D., Kacer D., Zhang D., Bernabeu C., Vary C.P.H.* 2004. Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J. Biol. Chem.* V. 279. P. 27440.
- Edgell C.J., Haizlip J.E., Bagnell C.R., Packenham J.P., Harrison P., Wilbourn B., Madden V.J.* 1990. Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA.hy926. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* V. 26. P. 1167.
- Edgell C.J., McDonald C.C., Graham J.B.* 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 80. P. 3734.
- Gordon M.S., Robert F., Matei D., Mendelson D.S., Goldman J.W., Chiorean E.G., Strother R.M., Seon B.K., Figg W.D., Peer C.D., Alvarez D., Adams B.J., Theuer C.P., Rosen L.S.* 2014. An open-label phase Ib dose-escalation study of TRC105 (anti-endoglin antibody) with bevacizumab in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* V. 20. P. 5918.
- Goumans M.J., Liu Z., ten Dijke P.* 2009. TGF- $\beta$  signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res.* V. 19. P. 116.
- Goumans M.J., Valdimarsdottir G., Itoh S., Rosendahl A., Sideras P., ten Dijke P.* 2002. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* V. 21. P. 1743.
- Heng B.C., Bezerra P.P., Preiser P.R., Alex Law S.K., Xia Y., Boey F., Venkatraman S.S.* 2011. Effect of cell-seeding density on the proliferation and gene expression profile of human umbilical vein endothelial cells within *ex vivo* culture. *Cytotherapy.* V. 13. P. 606.
- Hothorn T., Bretz F., Westfall P., Heiberger R.M.* 2008 multcomp: Simultaneous inference in general parametric models. <https://cran.r-project.org/web/packages/multcomp/index.html>
- Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R.* 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* V. 52. P. 2745.
- Kopczyńska E., Makarewicz R.* 2012. Endoglin – a marker of vascular endothelial cell proliferation in cancer. *Contemp. Oncol. (Pozn).* V. 16. P. 68.

- Kumar S., Pan C.C., Bloodworth J.C., Nixon A.B., Theuer C., Hoyt D.G., Lee N.Y. 2014. Antibody-directed coupling of endoglin and MMP-14 is a key mechanism for endoglin shedding and deregulation of TGF- $\beta$  signaling. *Oncogene*. V. 33. P. 3970.
- Liu Y., Tian H., Blobel G.C., Theuer C.P., Hurwitz H.I., Nixon A.B. 2014. Effects of the combination of TRC105 and bevacizumab on endothelial cell biology. *Invest. New Drugs*. V. 32. P. 851.
- López-Novoa J.M., Bernabeu C. 2010. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* V. 299. P. H959.
- Mutin M., Dignat-George F., Sampol J. 1997. Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules. *Tissue Antigens*. V. 50. P. 449.
- Nassiri S.M., Rahbarghazi R. 2014. Interactions of mesenchymal stem cells with endothelial cells. *Stem Cells Dev.* V. 23. P. 319.
- Nolan-Stevaux O., Zhong W., Culp S., Shaffer K., Hoover J., Wickramasinghe D., Ruefli-Brasse A. 2012. Endoglin requirement for BMP9 signaling in endothelial cells reveals new mechanism of action for selective anti-endoglin antibodies. *PLoS One*. V. 7. P. e50920.
- Quinn G., Keough M. 2002. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press. 557 pp.
- Rokhlin O.W., Cohen M.B., Kubagawa H., Letarte M., Coope M.D. 1995. Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. *J. Immunol.* V. 154. P. 4456.
- Rosen L.S., Gordon M.S., Robert F., Matei D.E. 2014. Endoglin for targeted cancer treatment. *Curr. Oncol. Rep.* V. 16. P. 365.
- Rossi E., López-Novoa J.M., Bernabeu C. 2015. Endoglin involvement in integrin-mediated cell adhesion as a putative pathogenic mechanism in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 (HHT1). *Front. Genet.* V. 5. P. 1.
- Rossi E., Pericacho M., Bachelot-Loza C., Pidad D., Gaussem P., Poirault-Chassac S., Blanco F.J., Langa C., González-Manchyn C., López-Novoa J.M., Smadja D.M., Bernabeu C. 2018. Human endoglin as a potential new partner involved in platelet-endothelium interactions. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 75. P. 1269.
- Sánchez-Elsner T., Botella L.M., Velasco B., Langa C., Bernabeu C. 2002. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor- $\beta$  pathways. *J. Biol. Chem.* V. 277. P. 43799.
- Sanz-Rodríguez F., Guerrero-Esteo M., Botella L.M., Banville D., Vary C.P.H., Bernabeu C. 2004. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J. Biol. Chem.* V. 279. P. 32858.
- Sugden W.W., Meissner R., Aegerter-Wilmsen T., Tsaryk R., Leonard E.V., Bussmann J., Hamm M.J., Herzog W., Jin Y., Jakobsson L., Denz C., Siekmann A.F. 2017. Endoglin controls blood vessel diameter through endothelial cell shape changes in response to haemodynamic cues. *Nat. Cell Biol.* V. 19. P. 653.
- Tian H., Ketova T., Hardy D., Xu X., Gao X., Zijlstra A., Blobel G.C. 2017. Endoglin mediates vascular maturation by promoting vascular smooth muscle cell migration and spreading. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* V. 37. P. 1115.
- Tian H., Myhre K., Golzio C., Katsanis N., Blobel G.C. 2012. Endoglin mediates fibronectin/ $\alpha 5 \beta 1$  integrin and TGF- $\beta$  pathway crosstalk in endothelial cells. *EMBO J.* V. 31. P. 3885.
- Tian F., Zhou A.X., Smits A.M., Larsson E., Goumans M.J., Heldin C.H., Borén J., Akyürek L.M. 2010. Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 392. P. 283.
- Unger R.E., Krump-Konvalinkova V., Peters K., Kirkpatrick J.C. 2002. *In vitro* expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvasc. Res.* V. 64. P. 384.
- Warrington K., Hillarby M.C., Li C., Letarte M., Kumar S. 2005. Functional role of CD105 in TGF $\beta$ -1 signalling in murine and human endothelial cells. *Anticancer Res.* V. 25. P. 1851.
- Wickham H. 2016. ggplot2: elegant graphics for data analysis. 253 pp.
- Zuur A.F., Ieno E.N., Walker N., Saveliev A.A., Smith G.M. 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R. Springer. 574 pp.

## Comparative Analysis of Endoglin Antibodies Effect on the Functional Characteristics of Endothelial Cells HUVEC and EA.hy926

A. Y. Stolbovaya<sup>a, b, \*</sup>, I. V. Smirnov<sup>a</sup>, A. A. Pinevich<sup>a, c</sup>, N. L. Vartanyan<sup>a</sup>, I. Y. Krutetskaya<sup>a</sup>, L. A. Terekhina<sup>a</sup>, K. L. Markova<sup>d</sup>, A. B. Malashicheva<sup>b</sup>, and M. P. Samoilovich<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup> Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, 197758 Russia

<sup>b</sup> Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, 197341 Russia

<sup>c</sup> Saint Petersburg State University, Department of Cytology and Histology, Saint Petersburg, 199034 Russia

<sup>d</sup> The Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, 199034 Russia

\*e-mail: anastasia.stolbovaya@gmail.com

Endoglin, a co-receptor of TGF $\beta$ -family growth factors, is a marker of endothelial cells. In our previous work we have demonstrated that monoclonal antibodies (MABs) against endoglin can change the functional properties of en-

endothelial cells EA.hy926. The aim of the present work was to study the effect of the same antibodies against endoglin on HUVEC endothelial cells, as well as to compare the data obtained for HUVEC and EA.hy926 cells. Comparison of *in vitro* models based on the permanent EA.hy926 endothelial cells and primary HUVEC cells revealed, along with common morpho-functional properties, a number of dissimilarities in adhesion molecules expression level and endothelial differentiation genes activity. Anti-endoglin MABs 2C8 and 4E4 were shown to inhibit HUVEC cell migration, reduce their adhesion to solid substrate, alter the arrangement of actin microfilaments, and impede the formation of capillary-like structures. These effects were revealed only in the presence of TGF- $\beta$ 1 in the culture medium or under hypoxia. Supplementation of the growth medium with MAB 2C8 promoted endoglin shedding from HUVEC cells membrane both in hypoxia and normoxia. Several impacts of anti-endoglin MABs on HUVEC cultures were similar to those detected on EA.hy926 cells. However MAB 2C8 influenced endoglin shedding oppositely in HUVEC and EA.hy926 cells.

**Keywords:** endoglin, endothelial cells, EA.hy926, HUVEC, monoclonal antibodies

УДК 57.085.23;616-006.6

## ОРГАНОИДНЫЕ И ПЕРВИЧНЫЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ КУЛЬТУРЫ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПОКАЗЫВАЮТ КЛЮЧЕВУЮ РОЛЬ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМНОГО ПЕРЕХОДА В ФОРМИРОВАНИИ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

© 2021 г. В. М. Рябов<sup>1</sup>, А. О. Георгиева<sup>2</sup>, М. А. Воскресенский<sup>3</sup>, Б. К. Комяков<sup>3</sup>, О. В. Рогоза<sup>4</sup>, Р. В. Грозов<sup>4</sup>, Я. Г. Муразов<sup>5</sup>, Д. Г. Прохоров<sup>6</sup>, Б. В. Попов<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

<sup>2</sup>Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101 Россия

<sup>3</sup>Городская многопрофильная больница № 2 МЗ РФ, Санкт-Петербург, 194354 Россия

<sup>4</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-Петербург, 197341 Россия

<sup>5</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова МЗ РФ, Санкт-Петербург, 197758 Россия

<sup>6</sup>Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. А.М. Гранова МЗ РФ, Санкт-Петербург, 197758 России

\*E-mail: borisvp478@gmail.com

Поступила в редакцию 14.04.2021 г.

После доработки 26.04.2021 г.

Принята к публикации 28.04.2021 г.

Предстательная железа (ПЖ) представляет собой небольшой орган в мужской репродуктивной системе, который в настоящее время находится в фокусе биомедицинских исследований благодаря лидирующему положению в заболеваемости и смертности от тканеспецифического рака (РПЖ). Эпителий ПЖ, который подвергается раковой трансформации, формируется и функционирует с помощью андрогенов. Вначале заболевания клетки эпителия продуцируют андрогенный рецептор (AR) и проявляют чувствительность к андроген-депривационной терапии. Однако такая терапия неизбежно приводит к переходу болезни в кастрационно-резистентную форму (КР-РПЖ), проявляющуюся в метастазировании и быстрой смертности. При КР-РПЖ клетки эпителия ПЖ изменяют свой фенотип, что может быть связано с мутацией AR и потерей чувствительности к специфической терапии. Механизм фенотипической трансформации эпителия ПЖ может быть скрыт в особенностях взаимодействия и формирования стромальных и эпителиальных клеток, которые проявляются в ходе образования первичных культур. Задача настоящей работы заключалась в изучении формирования стромальных клеток ПЖ человека в первичных стромальных и органоидных культурах. В результате работы мы нашли, что в отличие от быстрого появления и формирования гомогенной популяции мезенхимных клеток в первичных стромальных культурах большинства тканей, стромальные клеточные культуры ПЖ человека формируются вначале из эпителиальных клеток, которые появляются на второй неделе культивирования и продуцируют цитокератины (ЦК). Только к концу 4-й нед. культивирования происходит формирование гомогенной популяции мезенхимных клеток, продуцирующих виментин, чему сопутствует исчезновение эпителиальных клеток. При этом некоторые эпителиальные клетки продуцируют одновременно ЦК и виментин. В органоидных культурах ПЖ часто происходит сопутствующий рост на культуральном пластике эпителиальных, но не мезенхимных клеток. При культивировании эпителиальных клеток, возникших из органоидных культур, они, как и клетки первичного эпителия, обнаруживают способность к спонтанной трансформации в мезенхимные клетки и продуцируют одновременно ЦК и виментин. Полученные нами данные дают возможность предположить, что в первичных и органоидных культурах ПЖ стромальные клетки могут формироваться благодаря эпителиально-мезенхимному переходу (ЭМП). Склонность эпителия ПЖ к спонтанному ЭМП может вносить вклад в механизм высокой чувствительности ткани ПЖ к злокачественной трансформации и метастазированию, а понимание этого механизма может способствовать выработке эффективной противоопухолевой терапии РПЖ.

**Ключевые слова:** органоидные, первичные стромальные и эпителиальные культуры предстательной железы человека, эпителиально-мезенхимный переход, рак предстательной железы

DOI: 10.31857/S0041377121040088

Предстательная железа (ПЖ) представляет собой небольшой вспомогательный орган в мужской репродуктивной системе, который в последнее десятилетие переместился в центр внимания биологов и врачей из-за ведущей роли в заболеваемости и смертности от рака предстательной железы (РПЖ) (Siegel et al., 2018). Оказалось, что ПЖ значительно более чувствительна к онкогенной трансформации, чем другие половые органы, РПЖ диагностируется в течение жизни у каждого седьмого лица мужского пола (Siegel et al., 2016). ПЖ является железистым органом, развитие и функции которого регулируются действием андрогенов на тканеспецифические стромальные и эпителиальные клетки (Prins, Putz, 2008). Стромальные клетки в ПЖ, в основном, представляют собой гладкомышечные клетки, их число дважды превышает число эпителиальных клеток, что связано с насосной функцией органа, периодически выбрасывающего секретлируемую жидкость (Bartsch, Rohr, 1980).

Выделяют два основных типа эпителиальных клеток ПЖ: базальные и люминальные, различающиеся между собой по маркерам. Базальные клетки расположены на базальной мембране и формируют базальный слой эпителиальных структур ПЖ. Эти клетки продуцируют цитokerатины (ЦК) 5, 14 (Brawer et al., 1985) и транскрипционный фактор p63 из семейства p53 (Signerotti et al., 2000). Основным типом эпителиальных клеток ПЖ являются люминальные клетки, которые экспрессируют андрогенный рецептор (AR), низкомолекулярные ЦК8 и ЦК18 (Abate-Shen, Shen, 2000). В процессе дифференцировки базальные клетки превращаются в люминальные. Маленькая популяция базальных клеток ПЖ была идентифицирована в качестве стволовых (СК) у человека и мышей. Эти клетки экспрессируют TROP2 (tumor associated calcium signal transducer 2), p63, CD133 (Goldstein et al., 2008; Trerotola et al., 2010).

РПЖ, как и рак в других органах, возникает из опухолевых СК (ОСК), формирующих небольшую популяцию клеток опухолевой ткани, которая, тем не менее, генерирует ее основные свойства: прогрессию, инвазию, метастазирование и устойчивость к противоопухолевой терапии (Bao et al., 2006; Li et al., 2008). Клетки-предшественники РПЖ (cells of origin) — это клетки в пределах опухолевой ткани, которые служат мишенями раковой трансформации (Visvader, 2011). Такие клетки отличаются от ОСК, вклю-

чаяя черта которых — регенерация опухоли (Clevers, 2011).

Клетками-мишенями при РПЖ могут быть как базальные, так и люминальные клетки, но фенотипически клетки РПЖ являются люминальными и несут AR (Xin, 2013). Лечение первичного РПЖ основано на андроген-депривационной терапии, направленной против раковых клеток, несущих AR. Такая терапия является успешной в течение первых 16–20 мес., но затем РПЖ неизбежно переходит в прогрессирующую метастатическую форму, так называемый кастрационно-резистентный РПЖ (КР-РПЖ), устойчивый к антиандрогенной терапии (Fizazi et al., 2019; Elbadawy et al., 2020). Механизм возникновения КР-РПЖ и поиск его эффективной терапии являются актуальными биомедицинскими задачами, которые могут быть решены с помощью современных преclinical моделей.

В настоящее время существует две эффективные преclinical модели РПЖ: КТ-РПЖ — ксено-трансплантаты опухоли человека иммунодефицитным мышам (patient derived xenografts, PDX) и ОК-РПЖ — органоидные культуры РПЖ человека (patient derived organoids, PDO) (Bleijs et al., 2019). В обеих моделях клетки опухоли человека сохраняют в течение длительного времени свои молекулярно-генетические свойства, но технология ОК-РПЖ не ограничена необходимостью использования иммунодефицитных линий мышей. ОК-РПЖ, в отличие от КТ-РПЖ, могут быть использованы для быстрого скрининга лекарств с целью выработки персонализированной терапии. Технология ОК-РПЖ была разработана в последнее десятилетие, ее применение основано на получении 3D-культуры клеток, которые возникают из СК и поддерживают все свойства материнской ткани (Sato et al., 2009). ОК могут формироваться как из нормальной, так и из опухолевой ткани (Sato et al., 2011). Первые публикации об этих культурах (ОК-ПЖ) появились в 2014 г. (Karthaus et al., 2014; Gao et al., 2014). ОК-ПЖ могут быть получены из нормальных или опухолевых эпителиальных клеток, они поддерживают, по крайней мере в течение года, все свойства исходной ткани при оценке ее молекулярного, гистологического, тканевого, и генетического профилей. Используя ОК-РПЖ, уже удалось моделировать редкие фенотипы РПЖ (Puca et al., 2018).

Механизм высокой чувствительности к злокачественной трансформации и формирование клеток-предшественников РПЖ может быть скрыт в особенностях взаимодействия и формирования стромальных и эпителиальных клеток ПЖ, которые проявляются в ходе образования первичных культур, включая ОК-ПЖ.

Цель настоящей работы заключалась в получении первичных стромальных, эпителиальных и органоидных культур (ОК) из тканей ПЖ человека и мар-

**Принятые сокращения:** БСА — бычий сывороточный альбумин; КР-РПЖ — кастрационно-резистентный рак предстательной железы; КТ — комнатная температура; ОК — органоидная культура; ОК-РПЖ — органоидные культуры РПЖ человека; ОСК — опухолевые стволовые клетки; ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ПЖ — предстательная железа; РПЖ — рак предстательной железы; СК — стволовые клетки; ЦК — цитокератины; ЭМП — эпителиально-мезенхимный переход; AR — андрогенный рецептор.

керный анализ ОК-ПЖ, полученных из опухолевой и нормальной ткани ПЖ.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Пробы ткани предстательной железы.** Образцы ткани предстательной железы получали от пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии по поводу РПЖ в урологическом отделении 2-й городской клинической больницы г. Санкт-Петербурга в соответствии с протоколом этического комитета этой больницы. Пробы ткани ПЖ весом около 100 мг, содержащие опухолевый узел и нормальную ткань того же слоя, помещали в пробирки с 5 мл стерильного физиологического раствора, содержащего 50 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия). Каждую из двух проб разделяли острыми ножницами на три части, одну из которых фиксировали в 10 мл 4%-ного параформальдегида (Sigma, США) в фосфатном буфере (рН 7.4) для последующей гистологической обработки. Вторая проба предназначалась для экстрагирования тотальной РНК и общеклеточного белка. Третью часть обрабатывали коллагеназой для приготовления клеточной суспензии, которую использовали в дальнейшем для получения органоидных, стромальных и эпителиальных культур.

**Получение первичных стромальных и эпителиальных клеточных культур из образцов тканей ПЖ.** Пробы ткани ПЖ, предназначенные для получения клеточных культур, помещали в чашки Петри (10 см) в 10 мл стерильного фосфатного буфера (PBS), разрезали стерильными ножницами на кусочки размером 1 мм, переносили в конические пластиковые пробирки (15 мл; ТТР, Новосибирск, Россия), и подвергали ферментативной обработке в 1 мл раствора, содержащего 5 мг коллагеназы II типа (Life Technologies, США) в 1 мл среды adDMEM/F12 (advanced), содержащей 50 мкг/мл пенициллина и стрептомицина, 10 мМ NEPEP и 1-кратный GlutaMAX (adDMEM/F12+++; Life Technologies, США), добавляли ингибитор Rho-киназы Y-27632 (Abmole Bioscience, США) до конечной концентрации 10 мкМ и дегидротестостерон (Sigma, США) до конечной концентрации 1 нМ (Drost et al., 2016). Пробирки инкубировали на ротационном шейкере (PST-60 HL-4; Биосан, Латвия) в течение 18 ч при 37°C и 230 гpm. Затем суспензии центрифугировали при 250 g 5 мин, клеточные осадки отмывали в 5 мл среды adDMEM/F12, фильтровали через нейлоновые сито с порами 70 мкм (Corning, США), осаждали при 250 g 5 мин, осадок ресуспендировали в 1 мл раствора TрупLE Express (Life Technologies, США) в течение 1 ч на ротационном шейкере (PST-60 HL-4; Биосан, Латвия) при 37°C и 230 гpm. Затем к суспензии добавляли 5 мл среды adDMEM/F12, клетки осаждали центрифугированием при 250 g 5 мин, осадок ресуспендировали в 500 мкл среды adDMEM/F12+++ для подсчета числа клеток 5 мкл клеточной суспензии смешивали с 45 мкл 1%-ной уксусной кислоты и

50 мкл 2%-ного трипанового синего (Биолот, Россия). Клетки считали в камере Горяева.

Для получения первичных стромальных культур,  $2 \times 10^4$  клеток из клеточной суспензии добавляли в 4 мл специальной среды SCBM (Lonza, Швейцария) для стромальных клеток ПЖ человека и наносили в культуральные 60 мм чашки (ТТР, Новосибирск, Россия). Для получения эпителиальных клеточных культур,  $2 \times 10^4$  клеток ПЖ, полученных после обработки проб коллагеназой, ресуспендировали в 4 мл специальной среды PrEBM для эпителиальных клеток ПЖ человека (Lonza, Швейцария) и наносили на 60 мм культуральные чашки, предварительно покрытые коллагеном (Биолот, Россия). Имиджи стромальных, эпителиальных и органоидных культур получали без пересева клеток на 1–4-ой нед. культивирования с помощью микроскопа Axiovert 200M (Германия) и камеры DFC420 (Leica, Германия) в режиме проходящего света или фазового контраста. Использовали объектив 20×/0.5, размер снимка составлял 1728 × 1296 пикселей.

**Получение, культивирование и пассирование ОК из опухолевой и нормальной ткани ПЖ.** Клетки ( $1 \times 10^5$ ) суспензии ПЖ, полученные после обработки проб коллагеназой, ресуспендировали на льду в 20 мкл среды adDMEM/F12+++ , смешивали со 140 мкл предварительно расплавленного на льду матригеля (BD, США) и при комнатной температуре (КТ) наносили по 40 мкл в 4 лунки 24-луночной культуральной пластины (Corning, США), предварительно подогретой в течение ночи в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C. После нанесения матригеля пластину переворачивали и помещали на 15 мин в CO<sub>2</sub>-инкубатор.

Затем в каждую лунку добавляли по 500 мкл специальной среды для культивирования органоидов ПЖ следующего состава: 1.0 мл B27 (Life Technologies, США), 500 мкл 1 М никотинамида в PBS (Sigma, США), 125.0 мкл 500 мМ N-ацетилцистеина (Sigma, США), 0.5 мкл раствора EGF (0.5 мг/мл в PBS + 0.1% БСА) (PeproTech, США), 5 мкл 5 мМ A83-01 в DMSO (Tocris Bioscience, США), 50 мкл Noggin (100 мкг/мл в PBS + 0.1% БСА) (PeproTech, США), 50 мкл раствора R-spondin 1 (500 мкг/мл в PBS + 0.1% БСА) (R&D Systems, США), 50 мкл 1 мкМ дегидротестостерона в этаноле (Sigma, США), 5 мкл раствора FGF2 (50 мкг/мл в PBS + 0.1% БСА) (PeproTech, США), 5 мкл раствора FGF10 (0.1 мг/мл в PBS + 0.1% БСА) (PeproTech, США), 5 мкл 10 мМ простагландин Е2 в DMSO (Tocris Bioscience, США), 16.7 мкл 30 мМ SB202190 в DMSO (Sigma, США) и до 50 мл adDMEM/F12+++ (Life Technologies, США).

**Пассирование органоидов.** К культуральной среде в начале культивирования органоидов добавляли 5 мкл 100 мМ реактива Y-27632 (Abmole Bioscience, США) (Drost et al., 2016). Через 14 сут ресуспендировали органоиды из 1 лунки 24-луночной пластины в собственной культуральной среде и переносили в

15 мл-пластиковые пробирку, осаждали 5 мин центрифугированием при 250 g, осадок ресуспендировали в 1 мл TrypLE с 10 мкМ Y-27632, пробирку помещали на 5 мин на орбитальный шейкер при температуре 37°C. Инактивировали TrypLE путем добавления среды adDMEM/F12+/+/, содержащей 5% ФБС, центрифугировали при 200 g 5 мин, удаляли супернатант, ресуспендировали клеточный осадок в 80 мкл матригеля, и помещали 40 мкл матригеля с клетками в центр лунки 24-луночной пластины. Переносили пластину на 15 мин в перевернутом состоянии в CO<sub>2</sub> инкубатор, добавляли в лунки 500 мкл среды для органоидов, содержащей 10 мкМ ингибитора Rho-киназы Y-27632, среду меняли на свежую каждые 2–3 сут (Drost et al., 2016).

**Окраска срезов ткани ПЖ гематоксилин/эозином.** Пробы тканей фиксировали в 4%-ном забуференном параформальдегиде (pH 7.4) в течение 40–48 ч, промывали проточной водой, дегидратировали изопропанолом и заливали парафином. Парафиновые срезы ткани толщиной 2.5 мкм депарафинировали ксилолом, регидратировали изопропанолом и окрашивали общепринятым способом гематоксилин/эозином. После дегидратации и осветления в ксилOLE окрашенные срезы заключали в среду для микроскопии.

**Извлечение тотальной РНК из проб ткани ПЖ пациентов и производных ОК, а также синтез кДНК.** Пробы ткани ПЖ размером 2 × 2 мм помещали в стальную ступку, охлаждали жидким азотом и растирали пестиком. Полученный порошок переносили в отдельную пробирку и добавляли 1 мл Тризола (Invitrogen, США), оставляли на льду на 5 мин. Затем в каждую пробирку добавляли по 200 мкл охлажденного хлороформа и суспензию перемешивали на вортексе. После этого пробирки ставили в лед на 3 мин, центрифугировали 15 мин при 4°C и 13000 g, верхнюю фазу супернатанта переносили в новые пробирки и добавляли 500 мкл изопропанола (Sigma, США). Инкубировали на льду 10 мин, затем центрифугировали 10 мин при 4°C и 13000 g, удаляли супернатант, добавляли по 1 мл 70%-ного этанола, центрифугировали 5 мин при 4°C и 7600 g. Полностью удаляли супернатант, осадок сушили при КТ 10 мин, растворяли в 32 мкл безнуклеазной воды (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали 15 мин при 57.5°C. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Тотальную РНК выделяли из ОК-ПЖ на 3-м пассаже. Для получения РНК удаляли культуральную среду из 4 лунок 24-луночных пластин, в которых росли ОК. Матригель ресуспендировали в каждой лунке пипетированием в 1 мл PBS, собирали суспензии в пробирку 15 мл, центрифугировали 5 мин при 300 g. К осадку добавляли 750 мкл Тризола (Invitrogen, США) и пипетировали 10 раз до полного растворения осадка. Пробирки оставляли на льду на 5 мин,

затем в каждую пробирку добавляли 150 мкл охлажденного хлороформа, перемешивали на вортексе и оставляли на льду на 5 мин, центрифугировали 15 мин при 4°C и 13000 g. После центрифугирования верхнюю фазу супернатанта переносили в новые пробирки и добавляли 500 мкл изопропанола (Sigma, США), инкубировали на льду 10 мин, центрифугировали 10 мин при 4°C и 13000 g, удаляли супернатант, к осадку добавляли 1 мл 70%-ного этилового спирта, снова центрифугировали 5 мин при 4°C и 7600 g. Полностью удаляли супернатант, осадок сушили при КТ 10 мин, растворяли в 32 мкл безнуклеазной воды (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали 15 мин при 57.5°C. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Для синтеза кДНК 2 мкг РНК смешивали с 1 мкл праймера олиго-дТ18 (Алкор Био, Россия), объем смеси доводили до 11 мкл и инкубировали при 70°C 10 мин, охлаждали, добавляли 2 мкл буфера для обратной транскриптазы (SibEnzyme, Россия), 2 мкл 10 мМ смеси дНТФ (Beagle, Россия), 0.5 мкл ингибитора рибонуклеаз RiboLock (Thermo Scientific, США) и инкубировали 1 ч при 37°C. Реакцию останавливали нагреванием до 70°C 10 мин.

**Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).** Смесь реагентов для проведения ПЦР включала: 1 мкл 10 мМ смеси дНТФ (Beagle, Россия), 2.5 мкл 10-кратного буфера для Taq-полимеразы (Алкор Био, Россия), 2.5 мкл 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мкМ прямого и обратного праймеров (Алкор Био, Россия), 2 мкл ДНК, 0.25 мкл Taq-полимеразы (Алкор Био, Россия) и воду до 25 мкл общего объема реакционной смеси. Смесь готовили при температуре тающего льда. Амплификацию проводили на термоциклере Bio-Rad T100 (США) при следующем температурном режиме: иницирующее плавление – 1 мин, 94°C; плавление – 15 с, 94°C; отжиг – 30 с, 58°C; элонгация – 30 с, 72°C (40 циклов); плато – 10 мин, 72°C. Для праймеров к гену *ЦК5* температура отжига была 60°C. Продукты ПЦР-амплификации подвергали электрофорезу в 2%-ном агарозном геле с бромистым этидием, размер отдельных ампликонов в агарозном геле определяли при сравнении их подвижности с маркерами 100 пар оснований (п. о.) (Invitrogen, США) на имиджах, полученных с помощью Bio-Rad ChemiDoc XRS+ (США) (табл. 1).

**Иммунофлюоресцентное окрашивание.** Покровные стекла с клетками, распластанными при росте в культуре, переносили в чашки 35 мм, однократно отмывали PBS 5 мин, фиксировали 4%-ным параформальдегидом 15 мин, затем 70%-ным этиловым спиртом в течение ночи при 4°C, обрабатывали 0.2%-ным Тритоном Х-100 10 мин, промывали PBS 2 раза по 5 мин. Сайты неспецифического связывания антител блокировали 1 ч раствором, содержащим 3% БСА и 0.1% Твина 20. Затем на клетки наносили специфические антитела (разведение в 50–200 раз) в

**Таблица 1.** Праймеры, использованные для амплификации ряда маркеров в ткани ПЖ и производных органоидных культурах

Ген	Праймер прямой (5'–3')	Праймер обратный (5'–3')	Размер ампликона, п. о.
<i>ЦК5</i>	AAGCTGCTGGAGGGCGAGGAATG	CGGGAGGAGGAGGTGGTGGAGAC	341
<i>TP63</i>	TCCTCAGGGAGCTGTTATCC	ATTACGGGCTCAGCTCATGG	101
<i>ЦК18</i>	TGGTCACCACACAGTCTGCT	CCAAGGCATCACCAAGATTA	348
<i>AR 1</i>	AAGACGCTTCTACCAGCTCACCAA	TCCCAGAAAGGATCTTCGCACTT	170
<i>AMACR</i>	TGGCCACGATATCAACTATTTGG	ACTCAATTTCTGAGTTTTCCACAGAA	247
<i>GAPDH</i>	CCATCTTCCAGGAGCGAGA	GGCAGTGATGGCATGGACTGT	326

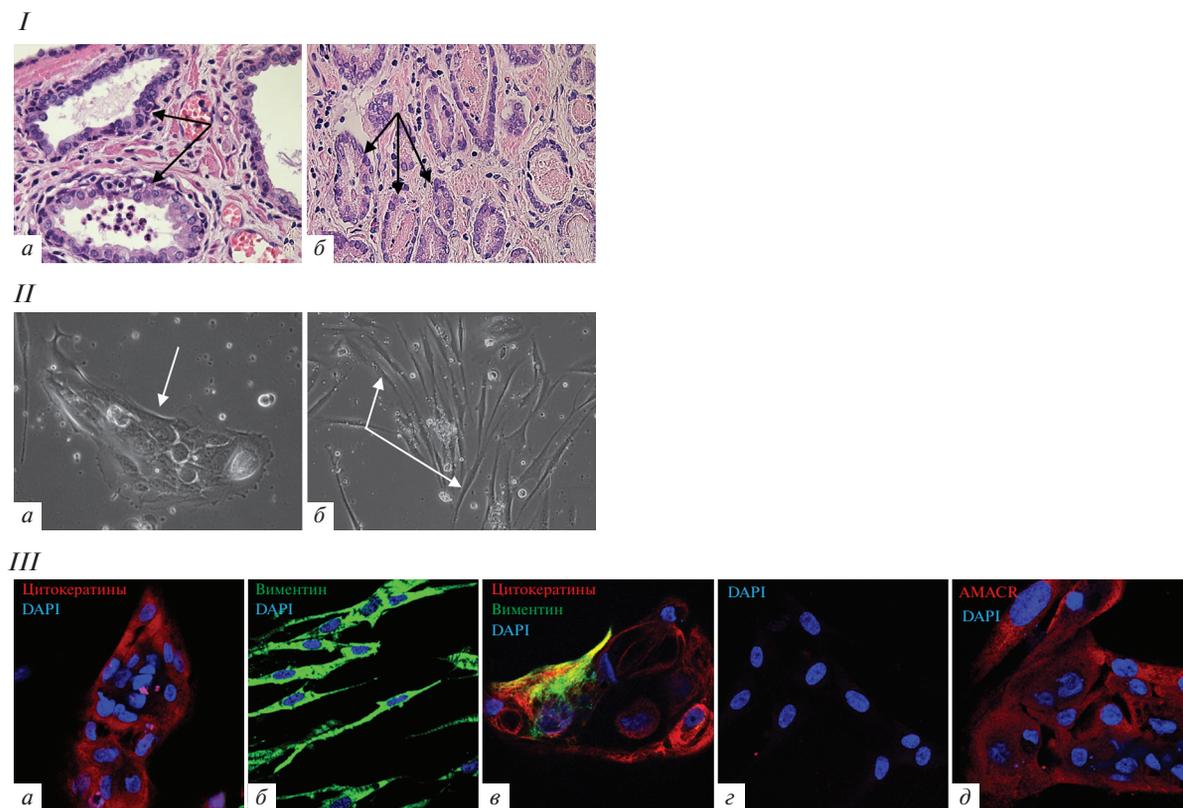
блокирующем растворе на 1 ч при КТ. В случае окраски препарата с помощью двух разных первых антител (например, против ЦК и виментина) сначала наносили кроличьи антитела к цитокератинам на 2 ч при КТ, промывали 3 раза по 5 мин PBS, и наносили мышинные антитела против виментина на 2 ч при КТ. Затем стекла промывали 3 раза по 5 мин PBS и наносили смесь вторых антител против IgG кролика, конъюгированных с Cy5, и против IgG мыши, конъюгированных с Cy3 на 1 ч при КТ. Затем стекла с клетками отмывали 3 раза по 5 мин PBS и заключали в среду Anti-Fade (BioRad, США), уменьшающую неспецифическую флуоресценцию и содержащую краситель DAPI для окраски ДНК. Иммунофлуоресцентные изображения получали на сканирующем микроскопе Leica (Carl Zeiss, Германия), используя лазеры с длиной волны 405, 543 и 633 нм и объектив 63×.

**Антитела.** Для иммунофлуоресценции были использованы следующие антитела: кроличьи анти-ПанЦК (Thermo Fisher Scientific, США), мышинные анти-виментин (Sigma, США), мышинные моноклональные антитела против AMACR были получены самостоятельно (Popov et al., 2018). Антитела козы против IgG (H+L) мыши, конъюгированные с цианиновым красителем Cy3 и антитела козы против IgG кролика, конъюгированные с Cy5 (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, США) служили в качестве вторых антител для иммунофлуоресценции. Для иммуноблота использовали анти-кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP; Cell Signaling, США) и анти-мышинные антитела, конъюгированные с HRP (BioRad, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Морфологические изменения ткани ПЖ у пациентов с РПЖ.** Образцы ткани ПЖ, взятые из опухоли и окружающей ее нормальной ткани в ходе оперативного вмешательства, были подвергнуты гистологическому анализу после фиксации и окраски гематоксилин/эозином с последующей микроскопией в проходящем свете. В нормальной ткани ПЖ при микроскопии выявляли альвеолярно-трубчатые эпителиальные железы в продольном и поперечном сечении, разделенные прослойками соединительной ткани (рис. 1I, a). В опухолевых образцах обращала на себя внимание гиперплазия железистой ткани ПЖ, проявляющаяся в значительном увеличении числа мелких и средних желез с небольшими внутренними просветами и узкими прослойками разделяющей их соединительной ткани (рис. 1I, b). В опухолевой ткани структура желез была нарушена, базальный слой клеток практически отсутствовал, клетки люминального слоя теряли столбчатую форму (рис. 1I, b).

**Характеристика первичных клеточных культур, полученных из ткани ПЖ.** Первичные культуры из нормальной или опухолевой ткани ПЖ человека, растущие в специальной среде SCBM (Lonza, Швейцария) для стромальных клеток ПЖ, начинали формироваться на второй неделе культивирования и были представлены эпителиальными клетками. Такие клетки имели полигональную форму, тесно контактировали друг с другом и формировали кластеры, увеличивающиеся в размерах по мере роста (рис. 1II, a). На третьей неделе культивирования мы наблюдали появление в первичных культурах веретенообразных фибробласто-подобных клеток, растущих раздельно (рис. 1II, б), и постепенно формирующих клоны, размер которых увеличивался в процессе культивирования, пока популяция стромальных клеток не

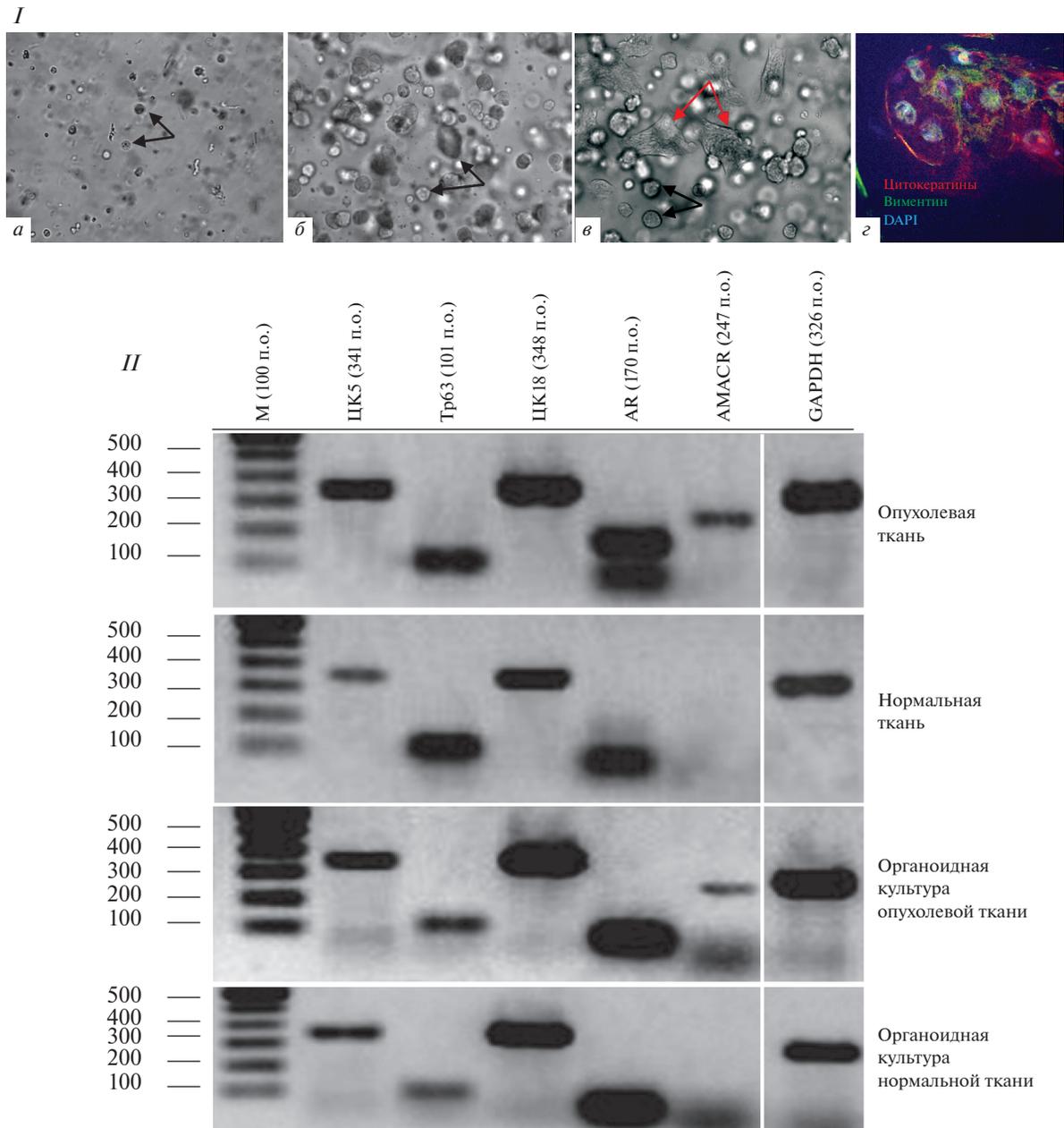


**Рис. 1.** Функционально различные маркеры в опухолевой и нормальной ткани предстательной железы (ПЖ) у пациентов с раком ПЖ. *I* – Гистологические препараты участков нормальной (*a*) и опухолевой (*б*) ткани ПЖ; окраска гематоксилин-эозином; *стрелками* показаны эпителиальные структуры ПЖ; имиджи получены на микроскопе Axiovert 200M (Германия), камера DFC420 (Leica, Германия) в режиме проходящего света, размер снимка 1728 × 1296 пикселей, об. 20×. *II* – Эпителиальные (*a*) и стромальные (*б*) клетки в первичных стромальных культурах ПЖ; *стрелками* показаны эпителиальные (*a*) и стромальные (*б*) клетки, имиджи получены на том же микроскопе в режиме фазового контраста, размер снимка 1728 × 1296 пикселей, об. 20×. *III* – Маркеры в первичных стромальных культурах ПЖ; показаны совмещенные изображения, полученные при окраске специфическими антителами к цитокератинам (ПанЦК, *a*), виментину (*б*), к цитокератинам и виментину (*в*), к AMACR в стромальной культуре из нормальной (*г*) и опухолевой (*д*) ткани; ядра окрашены DAPI (синий цвет); иммунофлюоресцентные изображения получали на сканирующем конфокальном микроскопе Leica (Carl Zeiss, Германия), лазеры с длиной волны 405, 543 и 633 нм, размер снимка 1024 × 1024 пикселей, объектив 63×.

становилась гомогенной, что совпадало с уменьшением количества и постепенным полным исчезновением эпителиальных клеток.

**Маркерная характеристика клеток в первичных стромальных культурах ткани ПЖ человека.** Клетки первичных культур ПЖ были окрашены с помощью антител к эпителиальным, стромальным маркерам, и маркеру РПЖ AMACR. В качестве эпителиальных маркеров мы использовали ЦК, которые выявляются антителами, распознающими один и тот же эпигенотип в нескольких ЦК (ПанЦК), а в качестве стромального маркера – виментин. Полигональные плотно прилегающие друг к другу клетки, формирующие кластеры в начале культивирования клеточной суспензии из ткани ПЖ, окрашивались антителами к ПанЦК (рис. 1*III, a*). Фибробласто-подобные

клетки, растущие отдельно и постепенно становящиеся доминантной популяцией в стромальных культурах ПЖ, окрашивались на виментин (рис. 1*III, б*). Вместе с тем, при одновременной окраске антителам к ПанЦК и виментину в первичных культурах через 2–3 нед. культивирования выявлялись клетки, которые продуцировали как ЦК, так и виментин (рис. 1*III, в*). С целью идентификации клеток, происходящих из опухолевой ткани ПЖ, мы красили первичные культуры антителами к AMACR. Этот маркер отсутствовал в эпителиальных клетках первичных культур ПЖ, происходящих из нормальной ткани ПЖ (рис. 1*III, г*), но ясно определялся в эпителиальных клетках первичных культур, происходящих из опухолевой ткани (рис. 1*III, д*).



**Рис. 2.** Маркерная характеристика органоидных культур (ОК), производных нормальной ткани ПЖ (*I*), нормальной и опухолевой тканей ПЖ (*II*). *I*: Культивирование в течение 7 сут (*a*) и 14 сут (*б–в*); черными стрелками отмечены органоиды, красными стрелками – эпителиальные клетки; имиджи получены на том же микроскопе, что и на рис. 1*a–в* в режиме проходящего света, об. 20×; *г* – иммунофлуоресценция цитокератинов (красный цвет) и виментина (зеленый цвет) в эпителиальных клетках, происходящих из ОК-ПЖ при окраске специфическими антителами; ядра окрашены DAPI (синий цвет); имиджи получали на сканирующем микроскопе Leica (Carl Zeiss, Германия), лазеры с длиной волны 405, 543 и 633 нм, об. 63×. *II* – Электрофоретические имиджи продуктов ОТ-ПЦР-амплификации – маркеров базального (ЦК5, р63) и люминального (ЦК18, AR) эпителия, а также AMACR в нормальной и опухолевой тканях ПЖ и в производных ОК. Маркерный белок сравнения (M) – 100 пар оснований (100 п. о.).

**ОК нормальной и опухолевой ткани ПЖ.** Органоиды в 3D-культурах ПЖ появлялись уже на 3-и сут культивирования, их количество в матрикеле значительно возрастало к 7-м сут культивирования (рис. 2*I, a*), а к 14-м сут размер и число органоидов возрастало в еще

большой степени (рис. 2*I, б*) и они подвергались пассированию 1 : 4 в том же формате.

В некоторых ОК выявлялся рост эпителиальных клеток (рис. 2*I, в*). Такие клетки, как и первичный эпителий в стромальных культурах, были позитивны

при окраске антителами к ПанЦК в случае переноса в чашки Петри 60 мм и пассирования. При пассировании с последующей окраской таких клеточных культур антителами к ПанЦК и виментину в иммунофлюоресценции выявлялась продукция ЦК и виментина в одних и тех же клетках (рис. 2I, з).

**Маркерная характеристика тканей и ОК-ПЖ с помощью ОТ-ПЦР.** С целью подтверждения идентичности нормальной, опухолевой ткани ПЖ и производных ОК, мы оценивали экспрессию генов маркеров базального (ЦК5, p63) и люминального (ЦК18, AR) эпителия ПЖ, а также маркера РПЖ гена *AMACR*, а в качестве контроля – гена *GAPDH* путем ОТ-ПЦР. В пробах тканей ПЖ, полученных от 10 пациентов, и производных органоидах всегда выявляли в одних и тех же культурах маркеры базальных и люминальных эпителиальных клеток ПЖ. Это в равной степени касалось органоидов, происходящих из нормальной и опухолевой тканей. В опухолевой ткани и производных органоидах присутствовал *AMACR*, который отсутствовал в нормальной ткани ПЖ и производных органоидах (рис. 2II).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы нашли, что в отличие от быстрого появления и формирования гомогенной популяции мезенхимных клеток в первичных стромальных культурах большинства тканей, например, костного мозга, жировой ткани, эндометрия, тканей сердца, мочевого пузыря и других (Popov et al., 2007; Musina et al., 2008; Meirrelles, Nardi, 2009; Zhidkova et al., 2013; Mikheeva et al., 2018), стромальные клеточные культуры ПЖ человека имеют другие свойства. В стромальных культурах ПЖ клетки появляются на 2-ой нед. культивирования и представляют собой эпителиальные клетки, продуцирующие ЦК. Только к концу 4-ой нед. культивирования происходит формирование гомогенной популяции мезенхимных клеток, продуцирующих виментин, чему сопутствует исчезновение эпителиальных клеток.

Наши наблюдения подтверждаются публикациям исследователей из других лабораторий, в которых было отмечено, что эксплантаты ПЖ человека вначале формируют клетки с эпителиальной морфологией, тогда как стромальные клетки в культуре появляются после 21-суточного культивирования (Janssen et al., 2000). В публикации из другой лаборатории, в которой авторы использовали суспензию клеток ПЖ, клетки первичной культуры вначале показывали наличие эпителиальных маркеров и только на 5-ом пассаже становились гомогенно-подобными фибробластными клетками, продуцирующими виментин (Gravina et al., 2013). Быстрое формирование гомогенной популяции мезенхимных клеток в первичных стромальных культурах большинства тканей, вероятно, связано с их происхождением из первичной мезенхимы, а не из тканеспецифических СК (Sági et al., 2012). И наоборот, отставание формирования мезенхимных

клеток в первичных культурах ПЖ от мезенхимных клеток из большинства органов, возможно, свидетельствует об их происхождении из другого источника, например, из эпителиальных клеток ПЖ, которые формируются в начале культивирования в первичных культурах ПЖ. Результаты нашей работы предполагают, что смена эпителиального профиля клеток на мезенхимный в первичных культурах ПЖ человека может происходить вследствие эпителиально-мезенхимного перехода (ЭМП).

Такое предположение подтверждается наблюдением, что в первичных стромальных культурах ПЖ человека формируются клетки, которые одновременно продуцируют как эпителиальные маркеры (ЦК), так и стромальный маркер – виментин. Такое наблюдение подтверждается и результатами культивирования органоидов ПЖ, происходящих из тканеспецифических СК. Органоиды ПЖ в ходе культивирования часто показывают сопутствующий рост эпителиальных клеток, но никогда не формируют стромальные клетки. Однако последующее культивирование эпителия, полученного из органоидных культур ПЖ, выявляет (с помощью иммунофлюоресценции) в отдельных клетках продукцию цитоцератинов и виментина (рис. 2I, з), как это наблюдается в первичных культурах ПЖ (рис. 1III, в).

Известно, что ЭМП и обратный мезенхимно-эпителиальный переход (МЭП) относятся к физиологическим процессам, которые организм использует в ходе развития, регенерации, регуляции свойств СК. ЭМП также вовлечен в формирование фиброза, воспаления, инвазии и метастазирования (Zhang, Weinberg, 2018). С другой стороны, известно, что способность к инвазии и метастазированию существенно различается в различных тканях, что может быть связано с особенностями сигнальных путей и мезенхимно-эпителиальными взаимодействиями, регулирующими рост эпителия (Grant, Kurpianou, 2013). Склонность эпителия ПЖ к злокачественной трансформации и развитию КР-РПЖ могут быть основаны на особенностях сигнальной регуляции, которая осуществляется андрогенами. Андроген-депривационная терапия РПЖ неизбежно завершается мутациями рецептора AR и восстановлением андрогенного сигналинга по коллатеральным путям или репрограммированием клеток первичного РПЖ и возникновением КР-РПЖ, который устойчив к андроген-депривационной терапии. Последующее изучение механизма ЭМП в клетках ПЖ позволит понять механизм их чувствительности к раковой трансформации и выработать эффективные способы его терапии.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам Коллективного центра микроскопии Института цитологии РАН за помощь в оценке иммунофлюоресцентного окрашивания клеток.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках бюджетной темы Института цитологии РАН № 0124-2019-0004 и поддержана внутренним грантом Института цитологии РАН.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Образцы ткани предстательной железы (ПЖ) получали от пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии по поводу рака ПЖ в урологическом отделении 2-й городской клинической больницы г. Санкт-Петербурга в соответствии с протоколом этического комитета этой больницы и информированного согласия пациентов. Экспериментов с участием животных авторы не проводили.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abate-Shen C., Shen M.M.* 2000. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* V. 14. P. 2410.
- Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N.* 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* V. 444. P. 756.
- Bartsch G., Rohr H.P.* 1980. Comparative light and electron microscopic study of the human, dog and rat prostate. An approach to an experimental model for human benign prostatic hyperplasia (light and electron microscopic analysis) — a review. *Urol. Int.* V. 35. P. 91.
- Bleijs M. van de Wetering M., Clevers H., Drost J.* 2019. Xenograft and organoid model systems in cancer research. *EMBO J.* V. 38. P. e101654. <https://doi.org/10.15252/emboj.2019101654>
- Brawer M.K., Peehl D.M., Stamey T.A., Bostwick D.G.* 1985. Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate. *Cancer Res.* V. 45. P. 3663.
- Clevers H.* 2011. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat. Med.* V. 17. P. 313.
- Drost J., Karthaus W.R., Gao D., Driehuis E., Sawyers C.L., Chen Y., Clevers H.* 2016. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat. Protoc.* V. 11. P. 347.
- Elbadawy M., Abugomaa A., Yamawaki H., Usui T., Sasaki K.* 2020. Development of Prostate Cancer Organoid Culture Models in Basic Medicine and Translational Research. *Cancers (Basel).* V. 12. P. 777.
- Fizazi K., Tran N., Fein L., Matsubara N., Rodriguez-Antolin A., Alekseev B.Y., Özgüroğlu M., Ye D., Feyerabend S., Protheroe A., Sulur G., Luna Y., Li S., Mundle S., Chi K.N.* 2019. Abiraterone acetate plus prednisone in patients with newly diagnosed high-risk metastatic castration-sensitive prostate cancer (LATITUDE): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* V. 20. P. 686.
- Gao D., Vela I., Sboner A., Iaquina P.J., Karthaus W.R., Gopalan A., Dowling C., Wanjala J.N., Undvall E.A., Arora V.K., Wongvipat J., Kossai M., Ramazanoglu S., Barboza L.P., Di W., Cao Z., Zhang Q.F., Sirota I., Ran L., MacDonald T.Y., Beltran H., Mosquera J.M., Touijer K.A., Scardino P.T., Laudone V.P., Curtis K.R., Rathkopf D.E., Morris M.J., Danila D.C., Slovin S.F., Solomon S.B., Eastham J.A., Chi P., Carver B., Rubin M.A., Scher H.I., Clevers H., Sawyers C.L., Chen Y.* 2014. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell.* V. 159. P. 176.
- Goldstein A.S., Lawson D.A., Cheng D., Sun W., Garraway I.P., Witte O.N.* 2008. Trop2 identifies a subpopulation of murine and human prostate basal cells with stem cell characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 105. P. 20882.
- Grant C.M., Kyprianou N.* 2013. Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression. *Transl. Androl. Urol.* V. 2. P. 202.
- Gravina G.L., Mancini A., Ranieri G., Di Pasquale B., Marampon F., Di Clemente L., Ricevuto E., Festuccia C.* 2013. Phenotypic characterization of human prostatic stromal cells in primary cultures derived from human tissue samples. *Int. J. Oncol.* V. 42. P. 2116.
- Janssen M., Albrecht M., Möschler O., Renneberg H., Fritz B., Aumüller G., Konrad L.* 2000. Cell lineage characteristics of human prostatic stromal cells cultured in vitro. *Prostate.* V. 43. P. 20.
- Karthaus W.R., Iaquina P.J., Drost J., Gracanin A., van Boxtel R., Wongvipat J., Dowling C.M., Gao D., Begthel H., Sachs N., Vries R.G.J., Cuppen E., Chen Y., Sawyers C.L., Clevers H.C.* 2014. Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell.* V. 159. P. 163.
- Li X., Lewis M.T., Huang J., Gutierrez C., Osborne C.K., Wu M.F., Hilsenbeck S.G., Pavlick A., Zhang X., Chamness G.C., Wong H., Rosen J., Chang J.C.* 2008. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J. Natl. Cancer. Inst.* V. 100. P. 672.
- Meirelles L. da S., Nardi N.B.* 2009. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci-Landmark.* V. 14. P. 4281.
- Mikheeva N.F., Butylin P.A., Zaritskii A.Yu., Popov B.V.* 2018. A Decrease in the Proliferative Activity of Human Mesenchymal Stem Cells during Long-Term Cultivation is Not Connected with Change in Their Migration Properties. *Cell and Tissue Biology.* V. 12. P. 197.
- Musina R.A., Belyavski A.V., Tarusova O.V., Solovyova E.V., Sukhikh G.T.* 2008. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. *Bull. Exp. Biol. Med.* V. 145. P. 539.
- Popov B.V., Serikov V.B., Petrov N.S., Izusova T.V., Gupta N., Matthay M.A.* 2007. Lung epithelial cells induce endodermal differentiation in mouse mesenchymal bone marrow stem cells by paracrine mechanism. *Tissue Eng.* V. 13. P. 2441.
- Popov B.V., Sutula G.I., Petrov N.S., Yang X.J.* 2018. Preparation and characterization of the antibody recognizing AMACR inside its catalytic center. *Int. J. Oncol.* V. 52. P. 547.

- Prins G.S., Putz O. 2008. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*. V. 76. P. 641.
- Puca L., Bareja R., Prandi D., Shaw R., Benelli M., Karthaus W.R., Hess J., Sigouros M., Donoghue A., Kossai M., Gao D., Cyrta J., Sailer V., Vosoughi A., Pauli C., Churakova Y., Cheung C., Deonarine L.D., McNary T.J., Rosati R., Tagawa S.T., Nanus D.M., Mosquera J.M., Sawyers C.L., Chen Y., Inghirami G., Rao R.A., Grandori C., Elemento O., Sboner A., Demichelis F., Rubin M.A., Beltran H. 2018. Patient derived organoids to model rare prostate cancer phenotypes. *Nat. Commun*. V. 9. P. 2404.
- Sági B., Maraghechi P., Urbán V.S., Hegyi B., Szigeti A., Fajka-Boja R., Kudlik G., Németh K., Monostori E., Góczy E., Uher F. 2012. Positional identity of murine mesenchymal stem cells resident in different organs is determined in the postsegmentation mesoderm. *Stem Cells Dev*. V. 21. P. 814.
- Sato T., Stange D.E., Ferrante M., Vries R.G., Van Es J.H., Van den Brink S., Van Houdt W.J., Pronk A., Van Gorp J., Siersema P.D., Clevers H. 2011. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. V. 141. P. 1762.
- Sato T., Vries R.G., Snippert H.J., van de Wetering M., Barker N., Stange D.E., van Es J.H., Abo A., Kujala P., Peters P.J., Clevers H. 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. V. 459. P. 262.
- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. 2016. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J. Clin*. V. 66. P. 7.
- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. 2018. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin*. V. 68. P. 7.
- Signoretti S., Waltregny D., Dilks J., Isaac B., Lin D., Garraway L., Yang A., Montironi R., McKeon F., Loda M. 2000. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am. J. Pathol*. V. 157. P. 1769.
- Trerotola M., Rathore S., Goel H.L., Li J., Alberti S., Piantelli M., Adams D., Jiang Z., Languino L.R. 2010. CD133, Trop-2 and alpha2beta1 integrin surface receptors as markers of putative human prostate cancer stem cells. *Am. J. Transl. Res*. V. 2. P. 135.
- Visvader J.E. 2011. Cells of origin in cancer. *Nature*. V. 469. P. 314.
- Xin L. 2013. Cells of origin for cancer: An updated view from prostate cancer. *Oncogene*. V. 32. P. 3655.
- Zhang Y., Weinberg R.A. 2018. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Front Med*. V. 12. P. 361.
- Zhidkova O.V., Petrov N.S., Popov B.V. 2013. Production and characteristics of the growth and marker properties of mesenchymal stem cells of urinary bladder. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol*. V. 49. P. 67.

## Organoid and Primary Epithelial Cell Cultures from Human Prostate Show the Key Role of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in the Formation of the Tissue Specific Stromal Cells

V. M. Ryabov<sup>a</sup>, A. O. Georgieva<sup>b</sup>, M. A. Voskresenskiy<sup>c</sup>, B. K. Komyakov<sup>c</sup>, O. V. Rogoza<sup>d</sup>, R. V. Grozov<sup>d</sup>, Ya. G. Murazov<sup>e</sup>, D. G. Prokhorov<sup>f</sup>, and B. V. Popov<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

<sup>b</sup>ITMO University, St. Petersburg, 197101 Russia

<sup>c</sup>Second City Hospital, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 194354 Russia

<sup>d</sup>Almazov National Medical Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 197341 Russia

<sup>e</sup>Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 197758 Russia

<sup>f</sup>Granov Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 197758 Russia

\*e-mail: borisvp478@gmail.com

The prostate gland is a small organ in the male reproductive system that is currently under focus of biomedical research due to its leading position in morbidity and mortality from tissue-specific cancer (PC). The epithelium of the prostate gland, which undergoes cancerous transformation, is formed and functions under control of androgens, at the beginning of the disease, prostate epithelium produce the androgen receptor (AR) and is sensitive to androgen-deprivation therapy. However, such therapy inevitably leads to the transition of the disease to the castrate-resistant prostate cancer (CRPC), which is manifested in metastasis and rapid mortality. In CRPC, prostate epithelial cells change their phenotypes, that may be based on mutations of the androgen receptor (AR), and underlies the loss of sensitivity to specific therapy. The mechanism of phenotypic transformation of the prostate epithelium can be hidden in the features of the formation and interaction of stromal and epithelial cells, which are manifested during the formation of primary cultures. In this work, we found that, in contrast to the rapid appearance and formation of a homogeneous population of mesenchymal cells in primary stromal cultures of most tissues, human prostate cell cultures are formed initially from epithelial cells that appear at the 2nd week of cultivation and produce cytokeratins. The formation of a homogeneous population of mesenchymal cells producing vimentin occurs only by the end of 4th week of cultivation and is accompanied by disappearance of epithelial cells. Under epithelial to mesenchymal transition, some epithelial cells simultaneously produce cytokeratins and vimentin. In organoid cultures of the prostate, there is often a concomitant growth on cultural plastic the epithelial but not mesenchymal cells. During pas-

saging of epithelial cells derived from the organoid cultures, they, like the cells of the primary prostate epithelium, show the ability to spontaneous transformation into mesenchymal cells and simultaneously produce cytokeratins and vimentin. Our data suggest, that in primary prostate stromal cultures initially form the epithelial cells. The organoid cultures of prostate can also produce epithelial but not stromal cells. The prostate stromal cells can arise from primary prostate epithelial or organoid cultures, presumably, due to spontaneous epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). The tendency to EMT in prostate cells may contribute to the mechanism of high sensitivity of prostate tissue to malignant transformation. Understanding this mechanism will contribute to the development of effective anticancer therapy of PC.

**Keywords:** organoid, primary stromal and epithelial cultures of human prostate, epithelial-to-mesenchymal transition, prostate cancer

УДК 576.3

## ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ *BBC3/PUMA* и *PMAIP1/Noxa* ПРИ ИОНИЗИРУЮЩЕМ ИЗЛУЧЕНИИ: РОЛЬ p53

© 2021 г. О. А. Кучур<sup>1</sup>\*, П. Д. Кучур<sup>1</sup>, Д. О. Кузьмина<sup>1</sup>, А. В. Завирский<sup>2</sup>, А. А. Штиль<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Химико-биологический кластер Санкт-Петербургского национального исследовательского университета информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, 197101 Россия

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, 194044 Россия

<sup>3</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, 115478 Россия

\*E-mail: kuchur@scamt-itmo.ru

Поступила в редакцию 02.04.2021 г.

После доработки 14.04.2021 г.

Принята к публикации 15.04.2021 г.

Транскрипционный фактор p53 – важнейший сенсор ионизирующего излучения. Среди многочисленных эффекторов p53 – гены *BBC3* и *PMAIP1*, кодирующие проапоптотические белки PUMA и Noxa соответственно, а также ингибитор клеточного цикла *CDKN1A/p21*. Эффективность лучевого воздействия – гибель клеток или выживание – определяется балансом механизмов, регулируемых этими белками. В настоящей работе на изогенных линиях опухолевых клеток человека (карцинома кишки HCT116 и сублиния HCT116p53KO с нефункционирующим p53) установлена преимущественная роль *BBC3/PUMA* и *CDKN1A/p21* по сравнению с *PMAIP1/Noxa* в p53-опосредованных ответах на действие терапевтических доз  $\gamma$ -излучения. Биоинформатический анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей выявил существенные различия предположительных мотивов связывания p53 в структуре генов *BBC3* и *PMAIP1*. Полученные результаты важны для разработки таргетных воздействий, позволяющих сохранить p53-зависимую активацию проапоптотических генов при ограничении блокирования клеточного цикла в облученных опухолевых клетках.

**Ключевые слова:** p53, PUMA, Noxa, p21, ионизирующее излучение, опухолевые клетки, радиочувствительность, гибель клеток

**DOI:** 10.31857/S0041377121040039

Более полувека лучевая терапия сохраняет важнейшее место в лечении больных злокачественными новообразованиями. Проблемой, ограничивающей эффективность ионизирующего излучения, остается радиоустойчивость опухолей – долговременное выживание клеток, переживших однократное воздействие. Требуется идентификация молекулярных механизмов, определяющих выживание и гибель облученных клеток.

Многочисленными исследованиями доказана ключевая роль повреждений ДНК и активации транскрипционного фактора p53 (кодируется геном *Trp53*) – одного из ранних событий, определяющих жизнеспособность облученных клеток (Gajjar et al, 2012; Maréchal, Zou, 2013; Speidel, 2015). Каскады молекулярных событий, опосредованные p53, могут индуцировать апоптоз. Среди эффекторов p53-зави-

симого апоптоза существенное значение имеют белки PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis) и Noxa (от лат. “повреждение”). PUMA образует комплекс с анти-апоптотическими белками семейства Bcl-2: Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-w и Bfl-1/A1. В результате комплексообразования остаются свободными проапоптотические белки Bax и Bak, опосредующие гибель клеток в ответ на повреждающие воздействия (Nakano, Vousden, 2001). Noxa также образует комплексы с белками семейства Bcl-2, но партнеров у Noxa меньше: Mcl-1, Bfl-1/A1; к последнему белку аффинность Noxa мала (Chen et al., 2005; Ploner et al., 2008). Гены *BBC3* (PUMA) и *PMAIP1* (Noxa) – транскрипционные мишени p53 (Hemann, Lowe, 2006). Нокаут *Trp53*, *BBC3* или *PMAIP1* приводит к ограничению апоптоза и становлению радиоустойчивости в клетках различного видового и тканевого происхождения (Vavrova, Rezacova, 2014), а также в моделях *in vivo* (Leibowitz, 2011).

Наряду с индукцией гибели, активация p53 в облученных клетках может индуцировать белок p21 (кодируется геном *CDKN1A*) – ингибитор нескольких циклин-зависимых киназ. Это приводит к бло-

**Принятые сокращения:** *BBC3* – Bcl-2-связывающий компонент 3; *CDKN1A* – циклин-зависимая киназа 1A; *PMAIP1* – форбол-12-миристан-13-ацетат-индуцируемый белок 1; PUMA – p53-регулируемый (up-regulated) модулятор апоптоза.

кированию прохождения фазы  $G_1$  клеточного цикла, после чего клетки получают возможность репарировать повреждения в контрольной точке (Kreis, 2014). Зависимая от p53 регуляция баланса выживания–гибель в ответ на облучение оказывается двоякой: клетки с функционирующим p53 задерживаются в фазе  $G_1$  и могут избежать гибели, а p53-негативные клетки такой возможности не имеют, проходят контрольную границу фаз клеточного цикла  $G_1/S$  с невосстановленными повреждениями, продолжают продвигаться по циклу и погибают (“митотическая катастрофа”) (Broude, 2008).

В настоящей работе исследована роль p53 в регуляции генов *BCC3*, *PMAIP1* и *CDKN1A*. Для решения поставленной задачи использованы изогенные линии клеток человека, отличающиеся статусом p53: исходным или генетически инактивированным.

По результатам экспериментов и биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей установлены существенные различия молекулярных механизмов ответа клеток на облучение и неодинаковую роль p53 в регуляции отдельных генов. В облученных p53-положительных клетках преобладают p53-зависимая активация генов *BCC3* и *CDKN1A*, что сопровождается увеличением количества белков PUMA и p21. Напротив, активация гена *PMAIP1* и прирост белка Noxa не выявлены. Для усиления гибели клеток с интактным p53 требуется дополнительная активация *PMAIP1* и (или) ограничение индукции *CDKN1A*. В клетках с нефункционирующим p53 гены *BCC3*, *PMAIP1* и *CDKN1A* лучевыми воздействиями не регулируются.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Реагенты и клетки.** Использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich, кроме особо оговоренных случаев. Линию клеток карциномы толстой кишки человека HCT116 с исходным p53 (American Type Culture Collection, США) и изогенную сублинию HCT116p53KO (получена в лаборатории В. Vogelstein, университет Джонса Хопкинса, Балтимор, США (Bunz et al., 1998); предоставлена авторам доктором Б. П. Копниным), в которой рамка считывания гена *p53* удалена в результате гомологической рекомбинации, культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла, содержащей 2 мМ *L*-глутамин (Биолот, Россия), 5% сыворотки эмбриона теленка (HyClone, США) и 50 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия) при 37°C, 5%  $CO_2$ . В экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста, культивируемые не более 15 пассажей.

**Воздействие ионизирующим излучением.** Клетки рассеивали во флаконы с площадью поверхности 25 см<sup>2</sup> (Erpendorf, Германия) за 24–48 ч до экспериментов и облучали  $\gamma$ -фотонами на аппарате РУМ-17 (Мосрентген, Россия). Разовые дозы 4 Гр и 10 Гр сопоставимы с используемыми в клинике. Параметры

облучения: напряжение на трубке 180 кВ, ток 10 мА, фокусное расстояние 50 см, фильтр 1 мм Al; 0.5 мм Cu, мощность дозы 0.32 Гр/мин. Для валидации значений использовали дозиметрический контроль (дозиметр ИД-11, Россия).

**Анализ экспрессии генов *p53*, *p21*, *BCC3* (PUMA) и *PMAIP1* (Noxa).** После облучения клетки культивировали 3–24 ч при 37°C, 5%  $CO_2$  и лизировали реагентом Extract RNA (Евроген, Россия). Экстракцию тотальной РНК и обратную транскрипцию (ревертаза MMLV) проводили согласно инструкции производителя. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в реальном времени (qPCRmix-HS SYBR; Евроген). Нуклеотидные последовательности праймеров: для *Trp53* прямой 5'-GAGCTGAATGAGGCCTTGGA-3' и обратный 5'-CTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTT-3'; для *p21* прямой 5'-AGTCAGTTCCTTGTGGAGCC-3' и обратный 5'-CATTAGCGCATCACAGTCGC-3'; для *PUMA* прямой 5'-ACAGTATCTTACAGGCTGGG-3' и обратный 5'-CAGACTGTGAATCCTGTGCT-3'; для *Noxa* прямой 5'-CCAGCCGCCAGTCTAATCA-3' и обратный 5'-GTGCCCTTGGAAACGGAAGA-3'. Для соотношения сигналов (нормализации) использовали кДНК *GAPDH*; праймеры для *GAPDH*: прямой 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAGCG-3' и обратный 5'-AGAGATGATGACCCTTTTGGC-3'.

**Иммуноблотинг.** Необлученные (контроль) и облученные клетки лизировали в буфере, содержащем 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 50 мМ Tris pH 8.0 с добавлением фенолметилсульфонилфторида и смеси ингибиторов протеиназ. Концентрацию общего белка в лизатах определяли методом Брэдфорда (Bradford, 1976). Электрофоретическое разделение белков проводили в 12%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия при напряжении 120–140 мВ. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (GE Healthcare Amersham, США; 250 мА, 1.5 ч). Использовали первичные антитела (Cell Signaling, США) к p53, p21, PUMA и Noxa (разведения 1 : 1000). В качестве контроля использовали антитела к  $\beta$ -актину в разведении 1 : 2000. Для хемилюминесцентной визуализации белков использовали вторичные антитела к IgG мыши или кролика (Amersham, США), конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 5000–1 : 10000). Визуализацию проводили в растворе ECL и документировали с помощью системы ChemiDoc Touch (BioRad, США). Денситометрию проводили в программе ImageJ, инструментом Grey Mean Value Calculation.

**Биоинформатический анализ.** Исследовали предполагаемые нуклеотидные последовательности, содержащие мотивы связывания транскрипционного фактора p53 с промоторными областями генов *BCC3*/PUMA и *PMAIP1*/Noxa. В качестве входных данных программы принимали нуклеотидные последовательности генов: *BCC3* (ENSG00000105327) и *PMAIP1* (уникальный идентификатор ENSG00000141682) из раздела Sequence сайта ensembl.

Размер промоторов (600 нуклеотидов) соответствовал стандарту. Достоверность нуклеотидных последовательностей промоторных областей подтверждали проверкой соответствующих областей в базе GenomeBrowser (<https://www.ensembl.org/index.html>).

Поиск мотивов осуществляли с помощью программы FIMO (find individual motif occurrences) из набора инструментов MEME (Grant et al., 2011) с опорой на базу данных HOCOMOCOv11\_full\_HUMAN\_mono\_meme\_format. На начальном этапе в качестве исходных были заданы последовательности только промоторных областей генов *BBC3* и *PMAIP1*. Затем поиск мотивов осуществляли по всему гену, включая экзоны и интроны. Полученные мотивы дополнительно проанализированы инструментами MATCH (Kel et al., 2003) и PROMO (Farré et al., 2003). У мотивов, предсказанных PROMO, вероятность несовпадения 5%. Мотивы, идентифицированные программой MATCH, обнаружены при следующих параметрах анализа: поиск по базам данных мотивов, обладающих специфичностью для клеточного цикла позвоночных. Из предсказанных последовательностей отобраны мотивы, имеющие сходство не менее 0.95 с мотивами из баз. Далее использовали программы FIMO MEME для идентификации мотивов потенциальных транскрипционных факторов, связывающихся с промоторными областями генов. Дополнительно предсказаны мотивы связывания p53 с полноразмерными генами *BBC3* и *PMAIP1*.

**Статистическая обработка.** Данные ПЦР (3 повтора экспериментов) обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel 2016. Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. Достоверность различий определялась однофакторным тестом ANOVA при  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Экспрессия генов *Trp53*, *CDK1NA*, *BBC3* и *PMAIP1* в зависимости от дозы облучения и статуса p53.** Анализ мРНК с помощью ПЦР в реальном времени показал, что активация *Trp53* в клетках НСТ116 происходит в первые часы после облучения и достигает максимума через 12 ч (усиление приблизительно в 9 раз при облучении 4 Гр и в 13 раз в ответ на 10 Гр по сравнению с необлученными клетками). Через 24 ч после облучения экспрессия *Trp53* несколько снижалась: приблизительно в 7 (4 Гр) и 9 раз (10 Гр) (рис. 1а). В сублинии НСТ116р53КО (с нокаутированным p53) незначительный специфический сигнал определялся на 32–34 циклах (данные не представлены).

Ген *CDK1NA*, кодирующий белок p21, играет важнейшую роль в ответе клеток на повреждения ДНК, в том числе при ионизирующем излучении (Huerta et al., 2013). Этот ген – транскрипционная мишень p53. Характер активации *CDK1NA* в облученных клетках схож с таковым для *Trp53*: максимум достигается к

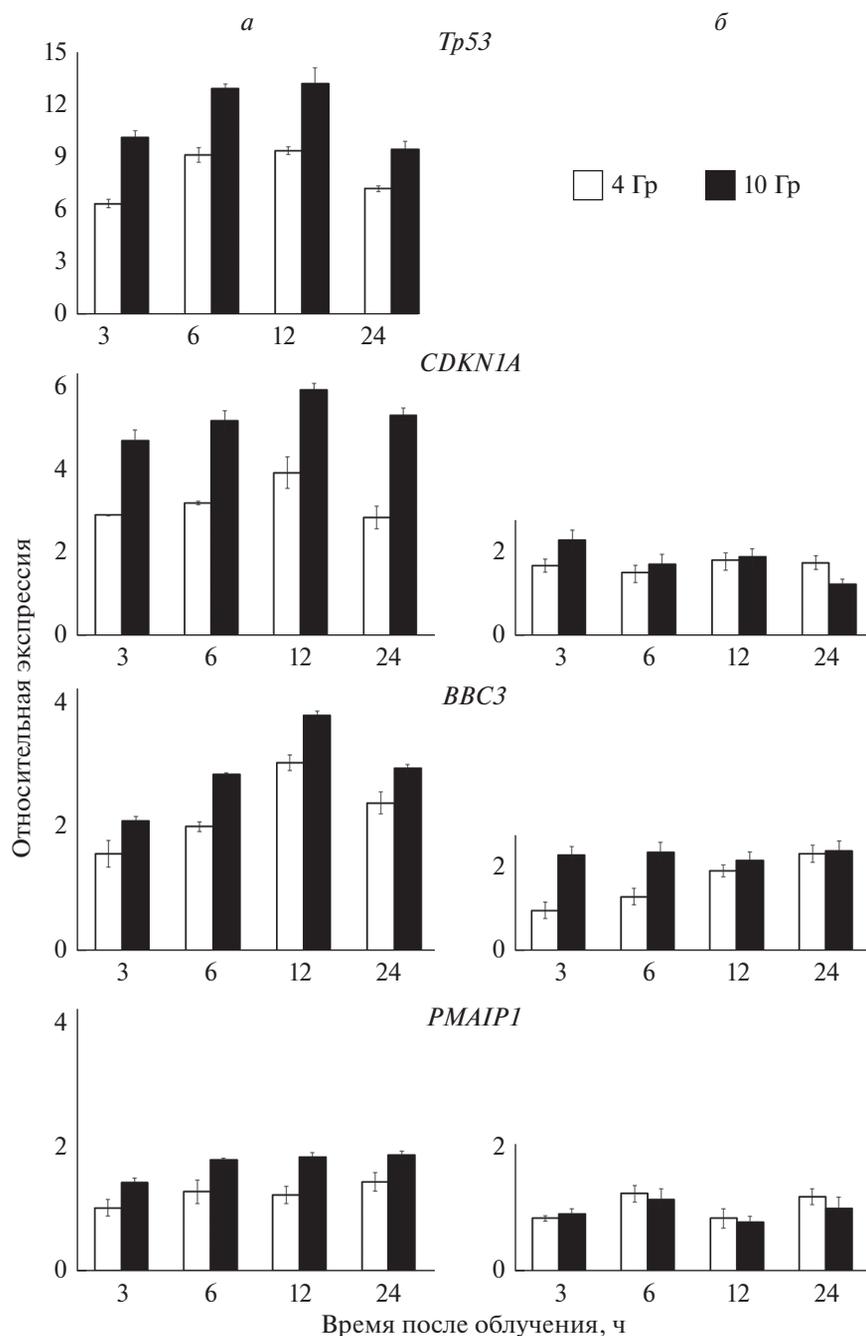
12 ч (рис. 1а). В это время увеличение мРНК *CDK1NA* достигает 4–6 раз. К 24 ч мРНК *CDK1NA* снижалась на ~20% от контрольных значений. Напротив, в сублинии с нефункционирующим p53 *CDK1NA* слабо отвечал на облучение (рис. 1б).

Регуляция экспрессии генов семейства *Bcl-2* – *BBC3* (PUMA) и *PMAIP1* (Noxa) – опосредована фактором p53 (Kim et al., 2019). В ответ на облучение клеток НСТ116 относительное количество мРНК *BBC3* увеличивалось одновременно с повышением мРНК *Trp53*, достигая 3–4-кратного подъема к 12 ч. К 24 ч мРНК *BBC3* снижалась, однако превышала контрольные значения в ~2–3 раза (рис. 1а). Ген *BBC3* практически не экспрессируется в сублинии НСТ116р53КО; в облученных клетках уровень мРНК *BBC3* превышал контрольный не более, чем в 1.5 раза (рис. 1б). Низкий базальный уровень экспрессии *BBC3* в сублинии НСТ116р53КО можно объяснить p53-независимыми механизмами (Fernandez-Zapico et al., 2011; Valentino, 2013).

Индукция гена *PMAIP1* в клетках выражена слабее, чем индукция *BBC3*. В линии НСТ116 *PMAIP1* практически не отвечает на облучение в дозе 4 Гр; даже при действии дозы 10 Гр активация этого гена не превышает 2-кратный уровень. В сублинии НСТ116р53КО зависимости относительного содержания мРНК *PMAIP1* от времени и дозы не наблюдается (рис. 1а, б). Таким образом, гены *Trp53*, *CDK1NA* и *BBC3* следует считать p53-зависимыми сенсорами ответа клеток на ионизирующее излучение, тогда как ген *PMAIP1* рефрактерен даже для “сверхсильного” (10 Гр) стимула.

**Влияние облучения и статуса гена *Trp53* на индукцию белков p53, p21, PUMA и Noxa.** Как соотносятся уровни мРНК исследуемых генов с количествами соответствующих белков в ответ на облучение клеток с различным статусом p53? Результаты иммуноблотинга через 3–24 ч после облучения клеток НСТ116 и НСТ116р53КО (4 Гр и 10 Гр) показаны на рис. 2. Белок p53 активируется дозозависимым образом в первые 3–6 ч, достигает максимума, превышающего контроль в ~3 и ~6 раз для дозы 4 и 10 Гр соответственно, после чего снижается до 3-часовых значений (по результатам денситометрии полос иммуноблота). Изменения p21 схожи с таковыми для p53; выраженность прироста p21 значительно ниже (в ~2–3 раза даже для дозы 10 Гр), однако и через 24 ч количество p21 остается повышенным. В сублинии НСТ116р53КО p53 не определяется; уровень p21 в ответ на облучение практически не изменяется.

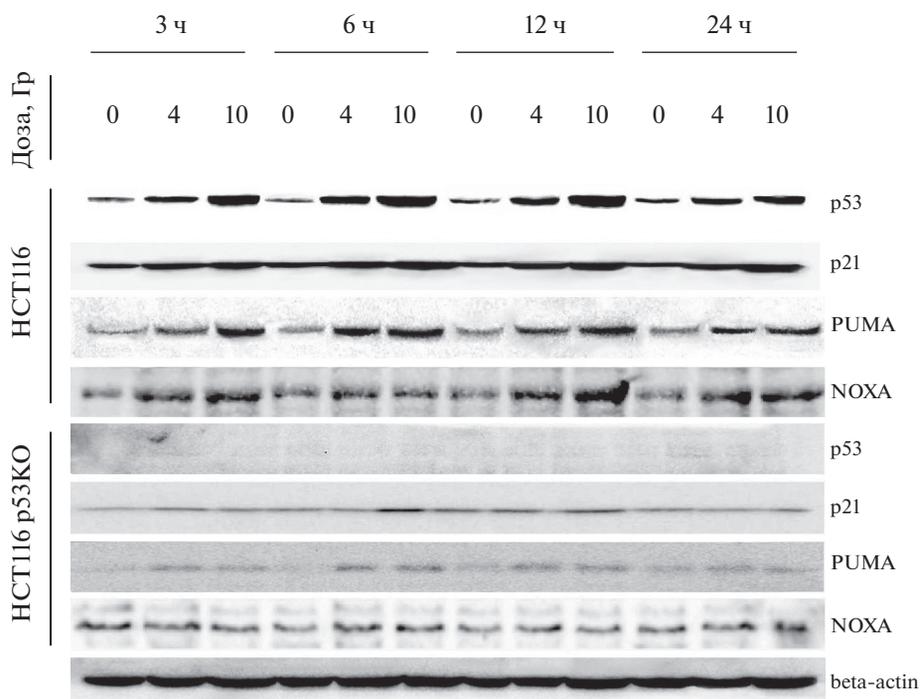
Количество белка PUMA в облученных клетках НСТ116 изменяется в соответствии с нарастанием p53; важно, что PUMA нарастает уже в первые часы после облучения. В сублинии НСТ116р53КО выявлены лишь следовые количества PUMA. Наконец, количество Noxa не зависело от доз облучения и статуса p53 (рис. 2).



**Рис. 1.** Изменения во времени экспрессии генов *Trp53*, *CDKN1A*, *BCC3* и *PMAIP1* в ответ на облучение в дозе 4 Гр (белые столбцы) и 10 Гр (черные столбцы) в клетках исходной линии НСТ116 (а) и сублинии НСТ116р53КО с инактивированным р53 (б). По горизонтали – время, ч. Контроль – необлученные клетки (экспрессия принята за 1). Представлены средние значения из 3-х экспериментов и доверительные интервалы (вертикальные отрезки). Для нормализации использовали транскрипты гена *GAPDH*. Во всех группах отличия от контроля достоверны при  $p \leq 0.05$  (однофакторный ANOVA).

**Биоинформатический анализ регуляции *BCC3* и *PMAIP1*.** В начале поиска нуклеотидных последовательностей, несущих мотивы узнавания р53, мы предположили, что этот транскрипционный фактор связывается с промоторными областями генов *PUMA* и *Noxa*. Поэтому на первом этапе анализа рассмотрены только последовательности этих промоторов.

**Оценка вхождений мотивов связывания р53.** Поиск вхождений мотивов связывания р53 с *PMAIP1* и *BCC3* (с помощью FIMO) предсказал пять последовательностей P53\_HUMAN.H11MO.1.A в промоторной области *PMAIP1* (табл. 1) и отсутствие таковых в промоторе *BCC3*. Согласно принятым стандартам, достоверными можно считать мотивы с  $p$ -value  $\leq 0.05$



**Рис. 2.** Количество белков p53, p21, PUMA и Noxa в клетках HCT116 и HCT116p53KO после облучения в дозе 4 и 10 Гр. Иммуноблотинг. Вверху указано время после облучения, ч. В качестве контроля нанесения белков на гель использовали  $\beta$ -актин.

и  $q$ -value  $\leq 0.05$ , т.е. вероятность ложноположительного вхождения мотива справедлива для 5% случаев. Чем меньше величины  $p$ -value и  $q$ -value, тем выше достоверность предсказанного мотива. Обнаружено 3 мотива, удовлетворяющих статистическим оценкам вероятности (обозначены символами А, Б, В; табл. 1). Анализ МАТСН выявил один мотив узнавания p53 в промоторе *PMAIP1* и отсутствие мотивов в промоторе *BBC3*. Обнаруженный мотив ggGCAG-Gtcg гена *PMAIP1* совпадает с мотивом CGACCTG-CCCGGACACGCTC, предсказанным программой FIMO, с учетом направления цепи ДНК.

Поскольку мотивы связывания p53 с промотором *BBC3* не выявлены, на следующем этапе нами учтены полноразмерные последовательности генов: промоторные области, все интроны и экзоны. В табл. 2

приведены мотивы, статистические показатели вхождения которых удовлетворяют диапазонам  $q$ -value  $\leq 0.05$  и  $p$ -value  $\leq 0.05$ . Из табл. 1 и 2 видно, что некоторые мотивы, предсказанные для промоторной области *PMAIP1*, оказались ложноположительными и повысили значение  $q$ -value на более длинном протяжении гена. Таким образом, достоверно предсказано наличие только одного мотива (А) связывания p53 в гене *PMAIP1*, и этот мотив А локализуется в промоторе (табл. 2).

Для гена *BBC3* связывание p53 с промотором не предсказано, но найдены два мотива в экзоне 1 (табл. 2, мотивы Б и В) и по одному в интронах 1 (табл. 2, мотив Г) и 2 (табл. 2, мотив Д). Результаты анализа МАТСН выявили мотив узнавания p53 aggcATGTcc в области экзона 1 гена *BBC3* и совпадение

**Таблица 1.** Статистические показатели мотивов p53 (А–Д), предсказанных программой FIMO для промоторной области гена *PMAIP1*

Мотив (символ)	Последовательность предсказанного мотива	Направление цепи	$p$ -Value	$q$ -Value
А	CGACCTGCCCCGGACACGCTC	3'–5'	2.4e-06	0.0026
Б	GAGCGTGTCCGGGCAGGTCG	5'–3'	2.7e-05	0.0147
В	AGACTTGGGTAAACAAGCCC	3'–5'	6.19e-05	0.0225
Г	AAACAAGCCCAGA	3'–5'	6.51e-05	0.0504
Д	GAGCGTGTCCGGG	5'–3'	9.17e-05	0.0504

Примечание. А, Б, В – статистически значимые области.

**Таблица 2.** Статистические показатели мотивов *p53* (А–Д), предсказанных FIMO для полноразмерных генов *PMAIP1* и *BBC3*

Ген <i>PMAIP1</i>				
Мотив (символ)	Последовательность предсказанного мотива	Направление цепи	<i>p</i> -Value	<i>q</i> -Value
А	CGACCTGCCCGGACACGCTC	3'–5'	2.4e-06	0.0264
Ген <i>BBC3</i>				
Б	GGACATGCCTGGG	3'–5'	8.55e-09	0.000214
В	GGGTCTGCCAGGCATGTCC	5'–3'	3.09e-08	0.000772
Г	CTGCAAGTCCTGACTTGTCC	5'–3'	6.42e-07	0.00801
Д	GGGCATGTTTGGG	5'–3'	2.91e-06	0.0364

этого мотива с последовательностью GGGTCTGCCAGGCATGTCC, указанной FIMO. Также MATCH выявил мотив tgaCTTGTcc, совпадающий с CTGCAAGTCCTGACTTGTCC в интроне 1 и мотив gggCGTGTct в интроне 2, не совпадающий с результатами FIMO.

Таким образом, программы FIMO и MATCH подтвердили вхождение двух мотивов *p53* в экзоне 1 и одного мотива в интроне 1 гена *BBC3*. Поскольку эти мотивы найдены в противоположных цепях ДНК, при конвертировании GGACATGCCTGGG в (+)-направление обнаруживается полное совпадение со 2-м найденным мотивом GGGTCTGCCAGGCATGTCC в экзоне 1. Следовательно, интрон 1 – место предпочтительного связывания *p53* с геном *BBC3*.

Итак, в гене *BBC3* (PUMA) сайт связывания *p53* находится в экзоне 1. Напротив, *p53* предположительно связывается с промотором *PMAIP1* (Noxa). Различия в предсказанных сайтах связывания *p53* не объясняют различий ответа каждого гена: при облучении в дозе 4 Гр активируется только ген *BBC3* и накапливается белок PUMA (рис. 1, 2), а ген *PMAIP1* индуцируется слабо и лишь при интенсивном воздействии (10 Гр). Требуется расширить анализ структуры обоих генов для выявления мотивов связывания других транскрипционных факторов.

Для предсказания мотивов связывания транскрипционных факторов с исследуемыми генами взяты последовательности их промоторов и экзона 1. Причина выбора таких районов – предсказанные мотивы связывания *p53* в промоторе гена *PMAIP1* и в экзоне 1 гена *BBC3* (см. выше). Учитывались мотивы всех факторов с достоверностью предсказания (*p*-value и *q*-value) выше, чем для *p53*. При обнаружении нескольких мотивов одного фактора в таблицу вносили мотив с наименьшими значениями *p*-value и *q*-value. (табл. 3).

Предыдущие исследования (Ploner et al., 2008; Kuribayashi et al., 2011) и наши результаты указывают на второстепенную (в отличие от PUMA) роль Noxa в ответе клеток на ионизирующее излучение. Дей-

ствительно, ген *PMAIP1* активируется только при сильном (10 Гр) *p53*-активирующем воздействии; уровень активации невелик по сравнению с таковым у гена *BBC3*. Биоинформатический анализ указал на особенности, важные для интерпретации экспериментальных данных о дифференциальной роли *p53* в регуляции *BBC3* и *PMAIP1*. Требуется иммунопреципитация хроматина для суждения о функциональной значимости того или иного предсказанного мотива для транскрипционных ответов при облучении. Отметим, что возможных сайтов связывания *p53* в гене *BBC3* в 4 раза больше, чем в гене *PMAIP1* (табл.2); можно предположить более высокую значимость *p53*-опосредованной регуляции *BBC3*. Выявлены различия в локализации сайтов связывания *p53*: у *BBC3* экзоны, у *PMAIP1* – промотор.

Исходя из предсказанных мотивов (табл. 3), количество транскрипционных факторов, связывающихся с промотором гена *PMAIP1*, намного превышает число таковых для промотора и экзона 1 гена *BBC3*. Это может означать, что регуляция экспрессии *PMAIP1* и, следовательно, содержание белка Noxa осуществляются многочисленными механизмами, зависимыми и независимыми от *p53*. На рис. 3 представлены предсказанные мотивы связывания транскрипционных факторов в области промотора и экзона 1 гена *PMAIP1*.

На клетках линии эмбриональных фибробластов мыши MEF и в модели *in vivo* показано, что белок PATZ1, имеющий сайт связывания с *PMAIP1*, способен конкурировать с *p53* за связывание с ДНК и ингибировать функции *p53* при повреждении ДНК (Fedele et al., 2005). Представители семейства транскрипционных белков SP/KLF, в частности KLF4, ингибируют *p53*-зависимую регуляцию гена *p53* (Rowland et al., 2014). KLF5 связывается с *p53*, отменяя *p53*-зависимое подавление гена сурвивина; это способствует выживанию клеток острого лимфобластного лейкоза (Zhu et al., 2006). Таким образом, неэффективность *p53*-активирующего стимула может быть обусловлена взаимодействием *p53* с белком (белками) семейства KLF. Рефрактерность гена

Таблица 3. Статистические показатели мотивов узнавания транскрипционных факторов, предсказанных FIMO

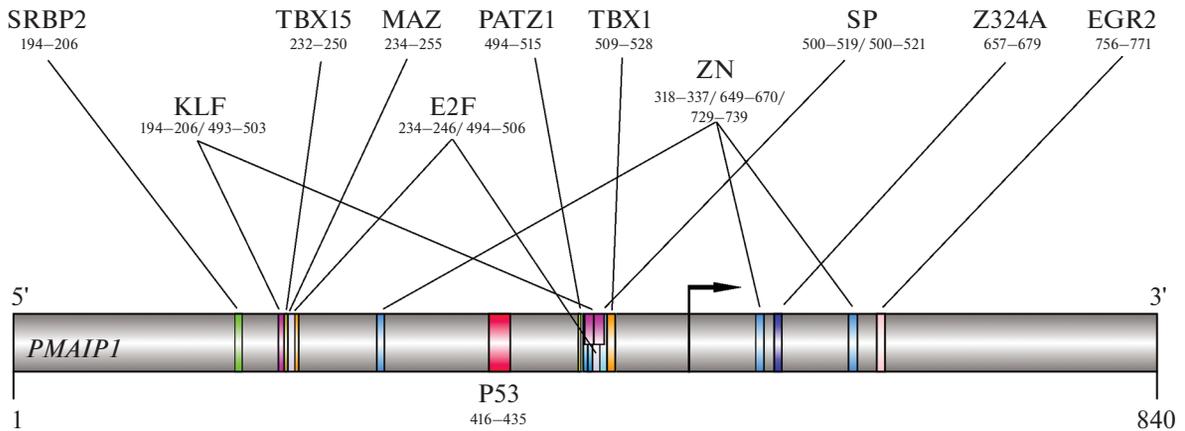
Ген <i>PMAIP1</i>				
Факторы/семейства	Паттерн	Мотив 5'–3'	p-Value	q-Value
Sp/KLF	SP1	GCGGGGCGGGGACAGGGGCGGG	8.3e-10	3.82e-07
	SP4	GGGACAGGGGCGGGGACAGG	4.39e-09	5.73e-06
	KLF15	GGGGCGGGGACAGGGGCGG	5.11e-09	3.17e-06
	SP2	GGGACAGGGGCGGGGACAGGGG	6.18e-09	4.26e-06
	SP3	GGACAGGGGCGGGCCGGGCG	3.32e-08	1.7e-05
	KLF16	CTGGGAGTGGCGGGAGGGG	1.08e-07	0.000123
	KLF3	GGACAGGGGCGGGGACAGG	2.85e-07	0.000352
	KLF6	ACAGGGGCGGGGACAGGGG	3.18e-07	0.000237
	KLF12	CGGGGCGGGGA	1.15e-06	0.000857
	KLF1	GGGGCGGGGACAGG	1.77e-06	0.00125
	PATZ1	PATZ1	GGGGCGGGGACAGGGGCGGGGA	4.81e-09
Белки “цинковых пальцев”	ZN467	GGGGCGGGGACAGGGGCGGGGA	8.23e-08	9.87e-05
	ZN143	GGGATGCTGGGATCGGGTGTCC	6.52e-07	0.000923
	ZN341	CGGGGACAGGGGCGGGGACAGG	7.21e-07	0.000767
	ZF64A	AGAGCCCGGGAACCTC	7.62e-07	0.00067
	ZN770	TGGAGGCTGAG	7.94e-07	0.00105
	ZN263	GGGAGGAGAAGGGGGTCTGGC	8.95e-07	0.00113
TBX	TBX1	GCGGGGACAGGGGCGGGCCG	1.47e-07	0.000164
	TBX15	TGGGAGTGGCGGGAGGGGA	6.77e-07	0.000692
MAZ	MAZ	GGAGCTGGGAGTGGCGGGAGGG	1.66e-07	0.000116
Z324A	Z324A	GATCCCAGCATCCCTGCCTGCAG	3.3e-07	0.000398
EGR	EGR2	GCTGAGTGGGCGGGCGG	4.19e-07	0.000542
	EGR1	AGCTGAGTGGGCGGGCGG	8.81e-07	0.00124
E2F	E2F7	GGGGCGGGGACAG	5.08e-07	0.000349
	E2F6	GTGGCGGGAGGGG	6.47e-07	0.000784
	E2F1	GAGTGGCGGGAGGG	1.34e-06	0.00148
SRBP2	SRBP2	GGGTGGGGAGAGA	1.24e-06	0.00145
p53	P53	CGACCTGCCCGGACACGCTC	2.4e-06	0.00362
Ген <i>BBC3</i>				
ZN770	ZN770	GGGAGGCTGAGGCAGAAGACTT	1.3e-09	1.86e-06
p53	P53	GGACATGCCTGGG	8.55e-09	1.39e-05

*PMAIP1* к p53-активирующим стимулам (например, ионизирующему излучению) может быть обусловлена тем, что среди белков семейства KLF немало репрессоров транскрипции, а промотор *PMAIP1* богат сайтами связывания KLF/SP (табл. 3). Предположение о механизме трансрепрессии в регуляции p53-зависимых ответов согласуется со следующими данными: в линии эпителия молочной железы MCF10A Мус-ассоциированный белок MAZ (из семейства “цинковых пальцев”) связывался с регуляторной областью p53 и ингибировал этот ген (Lee et al., 2016). Протеинкиназа Akt отменяла ингибирующий эффект MAZ, что указывает на возможности эпигенетической реактивации p53.

Можно ли активировать экспрессию *PMAIP1* для усиления гибели p53-положительных клеток в ответ на стресс, в частности при комбинации с терапевти-

ческими дозами ионизирующего излучения? В экспериментах с тепловым шоком в клетках меланомы (Davis et al., 2015) производное хинона – аурин – ингибировало белок теплового шока Hsp90α. Это сопровождалось падением мембранного потенциала митохондрий, индукцией массивного окислительного стресса, истощением глутатиона и активацией Noxa с последующей апоптотической гибелью. Такой подход не представляется перспективным для практического использования из-за отсутствия специфичности к *PMAIP1/Noxa* как внутриклеточной мишени.

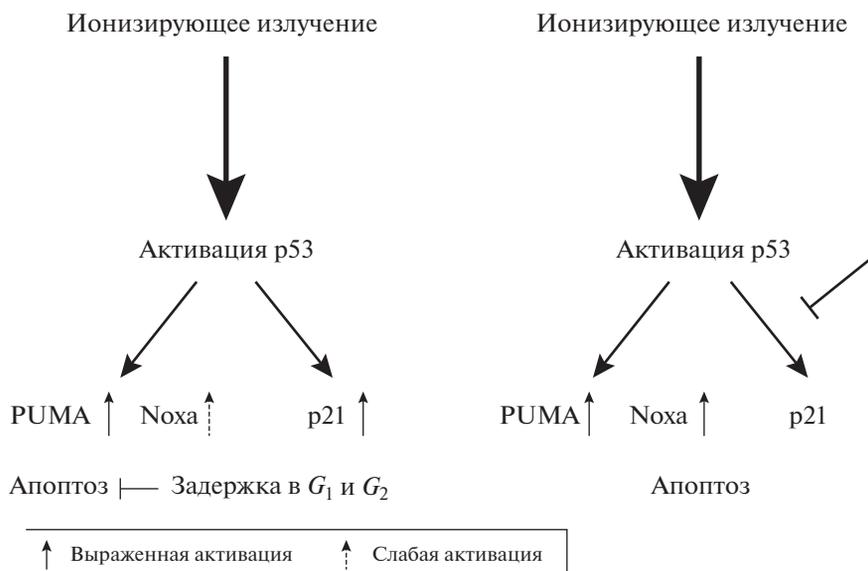
Эярестатин I (Eeyarestatin I; EerI) блокирует деградацию белков при стрессе эндоплазматического ретикулума. В ответ на действие EerI в клетках накапливаются транскрипционные факторы семейства CREB/ATF, связывающиеся с промотором



**Рис. 3.** Сайты связывания транскрипционных регуляторов с промоторной областью и экзоном 1 гена *PMAIP1* (Noxa). Указаны индивидуальные белки или семейства, а также положения предсказанных мотивов их связывания с ДНК. Стрелка – сайт инициации транскрипции. Размеры последовательностей взяты из раздела Sequence базы данных Ensembl.

*PMAIP1*. Наряду с этим блокируется убиквитинирование гистона H2A – репрессора *PMAIP1*. В результате дерепрессия *PMAIP1* и накопление Noxa обуславливают апоптоз (Wang et al., 2009). Однако для гибели клеток при стрессе эндоплазматического ретикулума p53 не обязателен (Nikiforov et al., 2007). Комбинирование такого вида стресса с облучением предусматривает вовлечение p53-независимых механизмов, что терапевтически оправдано. Вместе с тем, для гибели p53-позитивных клеток целесообразно использовать активацию этого важнейшего проапоптотического механизма (а при лучевом воз-

действии такая активация – одно из главных событий) и уменьшение p53-зависимых ответов, позволяющих клеткам пережить воздействие. К таким ограничивающим механизмам относится p53/p21-зависимая задержка клеточного цикла. Правомерно предположить, что селективная инактивация p21 (препятствие транскрипции гена *CDKN1A* или прицельная деградация белка с применением технологии PROTAC (Paiva, Crews, 2019)) позволят сохранять проапоптотические эффекты p53 и предотвращать блокирование клеточного цикла, что повысит



**Рис. 4.** P53-зависимые ответы на лучевое воздействие: возможности усиления гибели клеток. Слева: активация p53 в ответ на облучение индуцирует разнонаправленные p53-зависимые механизмы (примеры: PUMA и p21). Гибель клеток лимитирована невысокой активацией других проапоптотических механизмов (пример: Noxa) и задержкой клеточного цикла. Справа: стратегия интенсификации апоптоза облученных клеток: реактивация проапоптотических генов (Noxa) и (или) предотвращение активации ингибитора клеточного цикла p21.

чувствительность p53-положительных клеток к лучевым воздействиям.

На рис. 4 представлены возможности использования p53-зависимой регуляции для повышения эффективности облучения опухолевых клеток.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-34-90046).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит каких-либо исследований с использованием животных или людей в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bradford M.M.* 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* V. 72. P. 248.
- Broude E.V., Loncarek J., Wada I., Cole K., Hanko C., Roninson I.B., Swift M.* 2008. Mitotic catastrophe in cancer therapy. *Beyond Apoptosis: Cellular outcomes of cancer therapy.* N.Y.: Informa Healthcare. P. 307.
- Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Waldman T., Zhou S., Brown J.P., Vogelstein B.* 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science.* V. 282. P. 1497.
- Chen L., Willis S.N., Wei A., Smith B.J., Fletcher J.I., Hinds M.G., Huang D.C.* 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell.* V. 17. P. 393.
- Davis A.L., Qiao S., Lesson J.L., De La Vega M.R., Park S.L., Seanez C.M., Wondrak G.T.* 2015. The quinone methide aurin is a heat shock response inducer that causes proteotoxic stress and Noxa-dependent apoptosis in malignant melanoma cells. *J. Biol. Chem.* V. 290. P. 1623.
- Farré D., Roset R., Huerta M., Adsuará J.E., Roselló L., Albà M.M., Messegue X.* 2003. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res.* V. 31. P. 3651.
- Fedele M., Crescenzi E., Cerchia L.* 2017. The POZ/BTB and AT-hook containing zinc finger 1 (PATZ1) transcription regulator: physiological functions and disease involvement. *Int. J. Mol. Sci.* V. 18. P. 2524.
- Fernandez-Zapico M.E., Lomberk G.A., Tsuji S., DeMars C.J., Bardsley M.R., Lin Y.H., Urrutia R.* 2011. A functional family-wide screening of SP/KLF proteins identifies a subset of suppressors of KRAS-mediated cell growth. *Biochem. J.* V. 435. P. 529.
- Gajjar M., Candeias M.M., Malbert-Colas L., Mazars A., Fujita J., Olivares-Illana V., Fahraeus R.* 2012. The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls Mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following DNA damage. *Cancer Cell.* V. 21. P. 25.
- Grant C.E., Bailey T.L., Noble W.S.* 2011. FIMO: Scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics.* V. 27. P. 1017.
- Hemann M.T., Lowe S.W.* 2006. The p53-BCL-2 connection. *Cell Death Differ.* V. 13. P. 1256.
- Huerta S., Gao X., Dineen S., Kapur P., Saha D., Meyer J.* 2013. Role of p53, Bax, p21, and DNA-PKcs in radiation sensitivity of HCT-116 cells and xenografts. *Surgery.* V. 154. P. 143.
- Kel A.E., Gossling E., Reuter I., Cheremushkin E., Kel-Margoulis O.V., Wingender E.* 2003. MATCHM: a tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* V. 31. P. 3576.
- Kim W., Lee S., Seo D., Kim D., Kim K., Kim E., Youn B.* 2019. Cellular stress responses in radiotherapy. *Cells.* V. 8. P. 1105.
- Kreis N.N., Sanhaji M., Rieger M.A., Louwen F., Yuan J.* 2014. p21Waf1/Cip1 deficiency causes multiple mitotic defects in tumor cells. *Oncogene.* V. 33. P. 5716.
- Kuribayashi K., Finnberg N.K., Jeffers J.R., Zambetti G.P., El-Deiry W.S.* 2011. The relative contribution of pro-apoptotic p53-target genes in the triggering of apoptosis following DNA damage *in vitro* and *in vivo*. *Cell Cycle.* V. 10. P. 2380.
- Lee W.P., Lan K.H., Li C.P., Chao Y., Lin H.C., Lee S.D.* 2016. Akt phosphorylates myc-associated zinc finger protein (MAZ), releases P-MAZ from the p53 promoter, and activates p53 transcription. *Cancer Lett.* V. 375. P. 9.
- Leibowitz B.J., Qiu W., Liu H., Cheng T., Zhang L., Yu J.* 2011. Uncoupling p53 functions in radiation-induced intestinal damage via PUMA and p21. *Mol. Cancer Res.* V. 9. P. 616.
- Maréchal A., Zou L.* 2013. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>
- Nakano K., Vousden K.H.* 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell.* V. 7. P. 683.
- Nikiforov M.A., Riblett M., Tang W.H., Gratchouk V., Zhuang D., Fernandez Y., Soengas M.S.* 2007. Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *PNAS.* V. 104. P. 19488.
- Paiva S.L., Crews C.M.* 2019. Targeted protein degradation: Elements of PROTAC design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* V. 50. P. 111.
- Ploner C., Kofler R., Villunger A.* 2008. Noxa: At the tip of the balance between life and death. *Oncogene.* V. 27. P. 84.
- Rowland B.D., Bernards R., Peeper D.S.* 2005. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat. Cell. Biol.* V. 7. P. 1074.
- Speidel D.* 2015. The role of DNA damage responses in p53 biology. *Arch. Toxicol.* V. 89. P. 501.
- Valentino T., Palmieri D., Vitiello M., Pierantoni G.M., Fusco A., Fedele M.* 2013. PATZ1 interacts with p53 and regulates expression of p53-target genes enhancing apoptosis or cell

- survival based on the cellular context. *Cell Death Dis.* V. 4. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.500>
- Vavrova J., Rezacova M. 2014. Importance of proapoptotic protein PUMA in cell radioresistance. *Folia Biol.* V. 60. P. 53.
- Wang Q., Mora-Jensen H., Weniger M.A., Perez-Galan P., Wolford C., Hai T., Ye Y. 2009. ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. *PNAS.* V. 106. P. 2200.
- Zhu N., Gu L., Findley H. W., Chen C., Dong J. T., Yang L., Zhou M. 2006. KLF5 Interacts with p53 in regulating survivin expression in acute lymphoblastic leukemia. *J. Biol. Chem.* V. 281. P. 14711.

## Differential Regulation of *BBC3*/PUMA and *PMAIP1*/Noxa by Ionizing Radiation: A Role for p53

O. A. Kuchur<sup>a, \*</sup>, P. D. Kuchur<sup>a</sup>, D. O. Kuzmina<sup>a</sup>, A. V. Zavirsky<sup>b</sup>, and A. A. Shtila<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup>Chemistry and Biology Cluster, ITMO University, Saint-Petersburg, 197101 Russia

<sup>b</sup>Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg, 194044 Russia

<sup>c</sup>Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478 Russia

\*e-mail: kuchur@scamt-itmo.ru

The transcriptional factor p53 is a key sensor of ionizing radiation. A plethora of p53 regulated genes include *BBC3* and *PMAIP1* that encode the pro-apoptotic proteins PUMA and Noxa, respectively, as well as the cell cycle inhibitor *CDKN1A*/p21. The balance of these mechanisms is decisive for the fate of irradiated cells. Using the human colon carcinoma cell line HCT116 (wild type p53) and its isogenic subline HCT116p53KO (non-functional p53) we here demonstrate that therapeutic doses of  $\gamma$ -irradiation predominantly induced *BBC3*/PUMA and *CDKN1A*/p21 but not *PMAIP1*/Noxa in a p53-dependent manner. A bioinformatics analysis of the full-length genome sequences identified a striking difference between the predicted p53 binding motifs in the *BBC3* and *PMAIP1* genes. Our results are applicable for the design of targeted tools aimed at p53-dependent activation of pro-apoptotic genes along with the limitation of the cell cycle arrest in irradiated tumor cells.

**Keywords:** p53, PUMA, Noxa, p21, ionizing radiation, tumor cells, radiosensitivity, cell death

УДК 616.8–009.15:591.5

## ВАЛЬПРОЕВАЯ КИСЛОТА ПОВЫШАЕТ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ BDNF, GDNF И ИХ РЕЦЕПТОРЫ, В ЭМБРИОНАЛЬНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ И ИНДУЦИРУЕТ СТЕРЕОТИПНОЕ ПОВЕДЕНИЕ

© 2021 г. А. А. Семёнова<sup>1, \*</sup>, Е. В. Харитонова<sup>1</sup>, Е. Д. Хилажева<sup>1</sup>, А. Б. Салмина<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, 660022 Россия

<sup>2</sup>Отдел исследований мозга, Научный центр неврологии, Москва, 125367 Россия

\*E-mail: alina\_shamsutdin@mail.ru

Поступила в редакцию 08.03.2021 г.

После доработки 17.03.2021 г.

Принята к публикации 18.03.2021 г.

Модель с пренатальным введением вальпроевой кислоты является наиболее распространенной для изучения механизмов развития аутизма на экспериментальных животных. Мы показали, что введение беременным самкам мышей вальпроевой кислоты повышает уровень экспрессии генов, кодирующих нейротрофические факторы BDNF, GDNF и их рецепторы, в эмбриональном мозге. В то же время, взрослые мыши с пренатальным введением вальпроевой кислоты характеризуются усилением выраженности стереотипного поведения, что является одним из признаков аутистически-подобного поведения. Мы предполагаем, что гиперэкспрессия нейротрофических факторов во время эмбрионального периода может стимулировать развитие аномального мозга, приводящее к изменениям в поведенческих характеристиках.

**Ключевые слова:** вальпроевая кислота, аутизм, мышцы, нейротрофические факторы

**DOI:** 10.31857/S004137712104009X

В последнее время все большее распространение в мире приобретают расстройства аутистического спектра (РАС). Аутизм представляет собой совокупность разнородных состояний развития центральной нервной системы, характеризующихся ранними трудностями в социальном общении и наличием стереотипных ограниченных форм поведения. Причины развития аутизма остаются неизученными, однако известно, что данное заболевание связано с нарушением развития мозга, в том числе процессов нормального нейрогенеза, дифференциации, миграции нервных клеток и удаления избыточных связей и нейронов (Chomiak, Hu, 2012; Chen et al., 2020).

Развитие мозга невозможно без влияния нейротрофических факторов — белковых молекул, выделяющихся в эмбриональном и постнатальном мозге в больших количествах и регулирующих рост и развитие нейронов, синаптогенез и направленную миграцию. Было показано, что уровень mPNC и белка нейротрофического фактора мозга BDNF в эмбриональном мозге увеличивался через 1, 2, 3 и 6 ч после введения вальпроевой кислоты беременным самкам мышей и возвращался к норме через 12 ч (Almeida et al.,

2014; Hara et al., 2017). В то же время другой белок — глиальный нейротрофический фактор GDNF — не был исследован в этом отношении, однако было показано увеличение его уровня в гиппокампе крыс, получавших вальпроат (Varela et al., 2015). Модель с пренатальным введением вальпроевой кислоты грызунам и приматам является общепринятой для изучения патогенеза аутизма и методов его коррекции (Семёнова и др., 2020; Yamaguchi et al., 2017; Zhao et al., 2019). Логично предполагать, что в модели вальпроат-индуцированного аутизма у грызунов введение вальпроевой кислоты беременным самкам приводит к значительному повышению уровня нейротрофических факторов в эмбриональном мозге, что вызывает нарушения развития мозга и индуцирует аутистически-подобное поведение у мышей. Вместе с тем, нельзя не рассматривать другие молекулярные механизмы действия вальпроата, например, ингибирование гистоновых деацетилаз, дисбаланс возбуждения и торможения, нейровоспаление и окислительный стресс (Fujiki et al., 2013; Named et al., 2018).

Гиперактивность сигнальной трансдукции, опосредованной влиянием нейротрофических факторов, во время эмбрионального развития может стать причиной аномального увеличения массы мозга, появления очагов судорожной активности и развития aberrантного поведения, характерного для РАС (Tsai, 2005). В то же время, вальпроевая кислота по-

**Принятые сокращения:** ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; РАС — расстройства аутистического спектра; BDNF — нейротрофический фактор мозга; GDNF — глиальный нейротрофический фактор.

прежнему широко применяется для лечения эпилепсии у людей (Tomson et al., 2015; Шнайдер, Дмитренко, 2016; Yang et al., 2020), причем использование данного препарата во время беременности связано с повышенным риском врожденных пороков развития, включая дефекты нервной трубки, когнитивный дефицит, проявления РАС (Moore et al., 2000). Мы предполагаем, что патологически измененная экспрессия нейротрофических факторов может вносить вклад в терапевтические эффекты вальпроевой кислоты во взрослом мозге, однако приводит к нарушениям развития эмбрионального мозга.

Известно, что кроме дефицита социального поведения пациенты с аутизмом часто характеризуются проявлением стереотипного поведения – склонностью к осуществлению однообразных повторяющихся действий и ритуалов (Лушекина, Стрелец, 2014). Исходя из вышесказанного, целью нашей работы являлось исследование влияния вальпроевой кислоты на уровень мРНК нейротрофических факторов BDNF, GDNF и экспрессию их рецепторов в эмбриональном мозге мышей, а также оценка стереотипного поведения взрослых мышей, подвергшихся пренатальному воздействию вальпроата.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

### Воспроизведение вальпроатной модели аутизма.

Эксперименты были проведены на мышах инбредной линии C57BL/6. Внутривентрикулярное введение вальпроевой кислоты (Sigma-Aldrich, США) в дозе 500 мг/кг проводили беременным самкам на 13 день гестации (время закрытия нервной трубки и формирования ствола мозга). Беременным самкам контрольной группы вводили соответствующий объем PBS.

**ПЦР в реальном времени.** Образцы эмбрионального мозга были взяты через 3 и 6 ч после введения вальпроевой кислоты. Выделение тотальной РНК из образцов осуществляли с помощью набора реагентов “РНК-Экстран” (Синтол, Россия) по стандартному протоколу фирмы-изготовителя. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реагентов “MMLV RT kit” (Евроген, Россия) при 40°C в течение 1 ч. Полученную кДНК использовали для проведения ОТ-ПЦР в режиме реального времени с помощью набора qPCRmix-HS (Евроген, Россия). Также использовали наборы праймеров и флуоресцентно-меченных ДНК-зондов для определения количества фрагментов кДНК генов, кодирующих нейротрофические факторы BDNF, GDNF и их рецепторы TrkB, p75, GFR- $\alpha$ 1, а также референсных генов *GAPDH* и *ACTB* (ДНК-Синтез, Россия). Для проведения ПЦР использовали амплификатор LightCycler 96 (Roche, США), относительный количественный анализ экспрессии генов проводили с помощью программного обеспечения LightCycler 96 Software.

**Поведенческое тестирование.** У другой части потомства с пренатальным введением вальпроевой кислоты исследовали поведение в возрасте 3 месяцев в тесте “аутогруминг”. Мыши естественно поглаживают, почесывают и облизывают свою голову и тело с помощью передних лап (аутогруминг), однако гипертрофированный аутогруминг можно рассматривать как стереотипное поведение (Maraz et al., 2017). Мышь помещали в пустую чистую клетку без подстилки, после 10 мин привыкания фиксировали общее время аутогруминга в течение 10 мин.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента для нормально распределенных выборок и методов непараметрической статистики (критерий Манна–Уитни) для выборок с ненормальным распределением. Результаты представлены в виде  $M \pm SD$  ( $\sigma$ ), где  $M$  – среднее значение,  $\sigma$  – стандартное отклонение. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

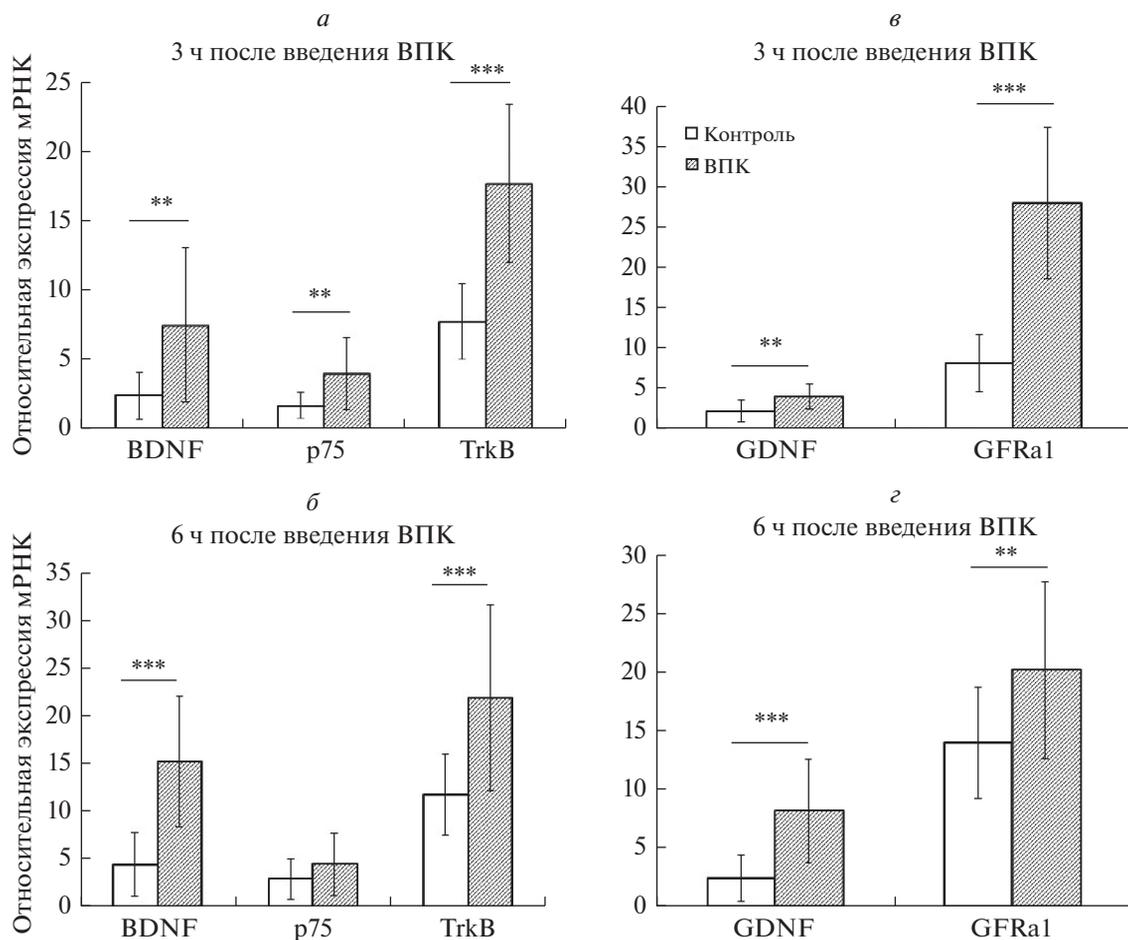
Введение вальпроевой кислоты беременным самкам (13 день гестации) стимулировало повышение экспрессии мРНК, кодирующих нейротрофический фактор BDNF и его рецепторы p75 и TrkB, в мозге эмбрионов как через 3 ч (рис. 1а), так и через 6 ч (рис. 1б). Повышение экспрессии мРНК глиального нейротрофического фактора GDNF и его рецептора GFR- $\alpha$ 1 также повышалось через 3 (рис. 1в) и 6 ч (рис. 1г) в экспериментальной группе по сравнению с контрольной группой.

Мыши, родившиеся после пренатального воздействия вальпроевой кислоты, демонстрировали более продолжительный аутогруминг, чем мыши контрольной группы. В экспериментальной группе среднее значение времени аутогруминга составило  $28.6 \pm 8.2$  с, тогда как в контрольной группе –  $41.7 \pm 16.8$  с ( $p < 0.05$ ) (рис. 2). Таким образом, полученные данные позволяют говорить об увеличении выраженности стереотипного поведения у мышей с фетальным вальпроатным синдромом.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В наших экспериментах мы показали, что введение вальпроевой кислоты беременной самки мыши вызывает значительное (в 2–3 раза) повышение экспрессии генов, кодирующих нейротрофические факторы BDNF, GDNF и их рецепторы, в мозге эмбрионов через 3 и 6 ч. В то же время, у взрослых мышей, подвергшихся пренатальному воздействию вальпроевой кислоты, наблюдается усиление выраженности стереотипного поведения, что является одним из признаков РАС.

С одной стороны, повышение уровня нейротрофических факторов в пренатальный период может стимулировать эктопический нейрогенез и нейритогенез, приводя к увеличению размеров мозга и раз-

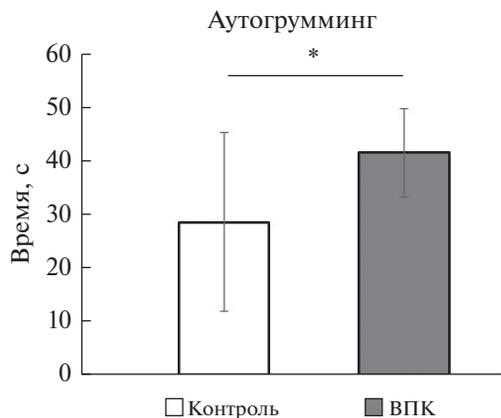


**Рис. 1.** Экспрессия мРНК генов, кодирующих BDNF и его рецепторы p75 и TrkB (а, б), а так же GDNF и его рецепторы GFR- $\alpha$ 1 (в, г), в эмбриональном мозге мышей спустя 3 ч (а, в) и 6 ч (б, г) после введения беременной самке вальпроевой кислоты (ВПК) или PBS (контроль). Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 11-17$ ), \*\* – различия между группами достоверны для  $p < 0.01$ , \*\*\* – для  $p < 0.001$ .

витию aberrantного поведения у потомства, с другой стороны, повреждающее действие вальпроевой кислоты может опосредоваться другими механизмами, а возрастание уровня нейротрофических факторов можно рассматривать как маркер нарушений развития эмбрионального мозга мышей. Другими словами, уровень нейротрофических факторов компенсаторно повышается в ответ на какие-либо повреждающие влияния вальпроевой кислоты. Точный механизм действия вальпроатов на мозг эмбрионов, приводящий к развитию аутизма, не определен, однако, к таким эффектам можно отнести эпигенетические изменения (Fujiki et al., 2013), окислительный стресс и нейровоспаление (Defoort et al., 2006; Tung, Winn, 2011), дисбаланс нейромедиаторов и эксайтотоксичность глутамата (Hamed et al., 2018).

Один из наиболее вероятных эпигенетических механизмов, посредством которого вальпроевая кислота может проявлять свою тератогенную активность – это неселективное ингибирование гистоновых деацетилаз (Menegola et al., 2005; Fujiki et al.,

2013). В регуляции экспрессии генов играют роль модификации гистонов, такие как метилирование, фосфорилирование и ацетилирование. Последний процесс регулируется двумя классами ферментов: гистонацетилтрансферазами, которые катализируют реакции присоединения ацетильных групп к остаткам лизина у гистонов, и гистоновыми деацетилазами, которые впоследствии удаляют эти группы. Так как в результате ацетилирования положительный заряд гистонов снижается, а ДНК заряжена отрицательно, то хроматин становится менее компактным. Это приводит к повышению уровня транскрипции генов. Гистоновые деацетилазы удаляют ацетильную группу с молекул гистонов, что приводит к более компактному накручиванию ДНК на гистоны, в результате чего активность транскрипции подавляется. Вальпроевая кислота, являясь ингибитором гистоновых деацетилаз, повышает степень ацетилирования гистонов и, следовательно, может одновременно усиливать экспрессию различных генов. Ранее было показано, что пренатальное введение



**Рис. 2.** Длительность аутогруминга у мышей группы “контроль” и группы “ВПК” (вальпроевая кислота). Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 10$ ), \* – различия между группами достоверны для  $p < 0.05$ .

вальпроевой кислоты беременным самкам мышей приводило к временному (до 24 ч) гиперацетилированию гистонов в эмбриональном мозге, что сопровождалось усилением апоптоза в коре мозга эмбрионов (Kataoka et al., 2013). В культуре астроцитов вальпроевая кислота стимулировала повышение экспрессии генов, кодирующих нейротрофические факторы BDNF и GDNF (Wu et al., 2009). Обработка вальпроевой кислотой культур нейронов коры крыс приводила к увеличению экспрессии мРНК и белка BDNF, что сопровождалось ростом нейритов (Yasuda et al., 2009; Hasan et al., 2013). Подобным образом обработка вальпроевой кислотой культур клеток глиомы приводила к повышению уровня мРНК BDNF и GDNF (Castro et al., 2005), а также мРНК и белка BDNF в развивающихся кортикальных нейронах (Ko et al., 2019). Примечательно, что обработка клеток эпидермального нервного гребня вальпроевой кислотой усиливала транскрипцию генов, кодирующих BDNF, GDNF и VEGF, не влияя на транскрипты нейротрофинов NGF и NT3 (Pandamooz et al., 2019); стоит обратить внимание, что повышенная экспрессия генов наблюдалась даже на 7 сут после однократной обработки вальпроатом.

Таким образом, гиперэкспрессия нейротрофических факторов, вызванная вальпроевой кислотой, в критический период развития мозга может активировать процессы, приводящие к формированию аномального мозга. Одно из таких нарушений – это стимуляция чрезмерной пролиферации нейронов и увеличения числа нейритов. Так, было продемонстрировано, что однократное воздействие вальпроевой кислоты на 12 день эмбрионального развития (E12) приводило к снижению массы эмбрионального мозга до E18, однако на 2 и 7 день постнатального развития масса мозга крыс значительно возрастала (Go et al., 2012). Эта мегацефалия сопровождалась

повышением количества нейритов и усиленной пролиферацией нейронов. В культурах кортикальных нейронов крысы вальпроевая кислота стимулировала увеличение плотности нейритов, что также сопровождалось повышением уровня ацетилирования гистонов H3 и белка BDNF (Hasan et al., 2013). По-видимому, стимулируемые вальпроевой кислотой нейрогенез и нейритогенез вносят вклад в чрезмерный рост мозга, наблюдаемый при РАС (Courchesne et al., 2011; Ecker et al., 2012). Конкретные молекулярные механизмы нарушения нейрогенеза и нейритогенеза при вальпроат-индуцированном аутизме нуждаются в дальнейшем изучении, что позволит идентифицировать молекулы-мишени для патогенетически обоснованной коррекции РАС.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке внутривузовского гранта КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (грант № 2.4) на базе ЦКП “Молекулярные и клеточные технологии”.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных проведены в соответствии с общепринятыми этическими международными нормами с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС) и требованиями приказа Минздрава России № 267 от 19.06.2003 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Луцкекина Е.А., Стрелец В.В. 2014. Расстройста аутистического спектра. Обзор современных экспериментальных исследований. Журн. высш. нерв. деят. Т. 64. № 6. С. 585. (Luschekina E. A., Strelets V. B. 2014. Autism spectrum disorder. Contemporary experimental researches review. Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova V. 64. № 6. P. 585.)
- Семёнова А.А., Лопатина О.Л., Салмина А.Б. 2020. Модели аутизма и методики оценки аутистически-подобного поведения у животных. Журн. высш. нерв. деят. Т. 70. № 2. С. 147. (Semenova A.A., Lopatina O.L., Salmina A.B. 2020. Autism models and assessment techniques for autistic-like behavior in animals. Neuroscience and behavioral physiology (Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova) V. 50. P. 1024.)
- Шнайдер Н.А., Дмитренко Д.В. 2016. Хроническая интоксикация вальпроевой кислотой в эпилептологии: диагностика и лечение. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. Т. 8. № 2. С. 94. (Shneider N.A., Dmitrenko D.V. 2016. Nevrologia, Neiropsikhiatriya, Psikhosomatika. V. 8. № 2. P. 94.)

- Almeida L.E., Roby C.D., Krueger B.K.* 2014. Increased BDNF expression in fetal brain in the valproic acid model of autism. *Mol. Cell Neurosci.* V. 59. P. 57.
- Castro L.M., Gallant M., Niles L.P.* 2005. Novel targets for valproic acid: up-regulation of melatonin receptors and neurotrophic factors in C6 glioma cells. *J. Neurochem.* V. 95. P. 1227.
- Chen O., Tahmazian I., Ferrara H.J., Hu B., Chomiak T.* 2020. The early overgrowth theory of autism spectrum disorder: Insight into convergent mechanisms from valproic acid exposure and translational models. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* V. 173. P. 275.
- Chomiak T., Hu B.* 2013. Alterations of neocortical development and maturation in autism: insight from valproic acid exposure and animal models of autism. *Neurotoxicol. Teratol.* V. 36. P. 57.
- Courchesne E., Mouton P.R., Calhoun M.E., Semendeferi K., Ahrens-Barbeau C., Hallet M.J., Barnes C.C., Pierce K.* 2011. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA.* V. 306. P. 2001.
- Defoort E.N., Kim P.M., Winn L.M.* 2006. Valproic acid increases conservative homologous recombination frequency and reactive oxygen species formation: a potential mechanism for valproic acid-induced neural tube defects. *Mol. Pharmacol.* V. 69. P. 1304.
- Ecker C., Suckling J., Deoni S.C., Lombardo M.V., Bullmore E.T., Baron-Cohen S., Catani M., Jezzard P., Barnes A., Bailey A.J., Williams S.C., Murphy D.G. MRC AIMS Consortium.* 2012. Brain anatomy and its relationship to behavior in adults with autism spectrum disorder: a multicenter magnetic resonance imaging study. *Arch. Gen. Psychiatry.* V. 69. P. 195.
- Fujiki R., Sato A., Fujitani M., Yamashita T.* 2013. A proapoptotic effect of valproic acid on progenitors of embryonic stem cell-derived glutamatergic neurons. *Cell Death Dis.* V. 4. e677.
- Go H.S., Kim K.C., Choi C.S., Jeon S.J., Kwon K.J., Han S.H., Lee J., Cheong J.H., Ryu J.H., Kim C.H., Ko K.H., Shin C.Y.* 2012. Prenatal exposure to valproic acid increases the neural progenitor cell pool and induces macrocephaly in rat brain via a mechanism involving the GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway. *Neuropharmacology.* V. 63. P. 1028.
- Hamed N.O., Al-Ayadhi L., Osman M.A., Elkhawad A.O., Qasem H., Al-Marshoud M., Merghani N.M., El-Ansary A.* 2018. Understanding the roles of glutamine synthetase, glutaminase, and glutamate decarboxylase autoantibodies in imbalanced excitatory/inhibitory neurotransmission as etiological mechanisms of autism. *Psychiatry Clin. Neurosci.* V. 72. P. 362.
- Hara Y., Ago Y., Takano E., Hasebe S., Nakazawa T., Hashimoto H., Matsuda T., Takuma K.* 2017. Prenatal exposure to valproic acid increases miR-132 levels in the mouse embryonic brain. *Mol. Autism.* V. 8. P. 33.
- Hasan M.R., Kim J.H., Kim Y.J., Kwon K.J., Shin C.Y., Kim H.Y., Han S.H., Choi D.H., Lee J.* 2013. Effect of HDAC inhibitors on neuroprotection and neurite outgrowth in primary rat cortical neurons following ischemic insult. *Neurochem. Res.* V. 38. P. 1921.
- Kataoka S., Takuma K., Hara Y., Maeda Y., Ago Y., Matsuda T.* 2013. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* V. 16. P. 91.
- Ko H.M., Jin Y., Park H.H., Lee J.H., Jung S.H., Choi S.Y., Lee S.H., Shin C.Y.* 2018. Dual mechanisms for the regulation of brain-derived neurotrophic factor by valproic acid in neural progenitor cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* V. 22. P. 679.
- Maraz A., Hende B., Urbán R., Demetrovics Z.* 2017. Pathological grooming: Evidence for a single factor behind trichotillomania, skin picking and nail biting. *PLoS One.* V. 12. e0183806.
- Menegola E., Di Renzo F., Broccia M.L., Prudenziati M., Minucci S., Massa V., Giavini E.* 2005. Inhibition of histone deacetylase activity on specific embryonic tissues as a new mechanism for teratogenicity. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* V. 74. P. 392.
- Moore S.J., Turnpenny P., Quinn A., Glover S., Lloyd D.J., Montgomery T., Dean J.C.* 2000. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *J. Med. Genet.* V. 37. P. 489.
- Pandamooz S., Salehi M.S., Safari A., Azarpira N., Heravi M., Ahmadiani A., Dargahi L.* 2019. Enhancing the expression of neurotrophic factors in epidermal neural crest stem cells by valproic acid: A potential candidate for combinatorial treatment. *Neurosci. Lett.* V. 704. P. 8.
- Tomson T., Battino D., Perucca E.* 2016. Valproic acid after five decades of use in epilepsy: time to reconsider the indications of a time-honoured drug. *Lancet Neurol.* V. 15. P. 210.
- Tsai S.J.* 2005. Is autism caused by early hyperactivity of brain-derived neurotrophic factor? *Med. Hypotheses.* V. 65. P. 79.
- Tung E.W., Winn L.M.* 2011. Valproic acid increases formation of reactive oxygen species and induces apoptosis in postimplantation embryos: a role for oxidative stress in valproic acid-induced neural tube defects. *Mol. Pharmacol.* V. 80. P. 979.
- Varela R.B., Valvassori S.S., Lopes-Borges J., Mariot E., Dal-Pont G.C., Amboni R.T., Bianchini G., Quevedo J.* 2015. Sodium butyrate and mood stabilizers block ouabain-induced hyperlocomotion and increase BDNF, NGF and GDNF levels in brain of Wistar rats. *J. Psychiatr. Res.* Vol. 61. P. 114.
- Wu X., Chen P.S., Dallas S., Wilson B., Block M.L., Wang C.C., Kinyamu H., Lu N., Gao X., Leng Y., Chuang D.M., Zhang W., Lu R.B., Hong J.S.* 2008. Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* Vol. 11. P. 1123.
- Yamaguchi H., Hara Y., Ago Y., Takano E., Hasebe S., Nakazawa T., Hashimoto H., Matsuda T., Takuma K.* 2017. Environmental enrichment attenuates behavioral abnormalities in valproic acid-exposed autism model mice. *Behav. Brain Res.* V. 333. P. 67.
- Yang X., Wang P., Pan J., Wang C., Luo J., Ma H.* 2020. Valproic acid concentration and biochemical indexes in epilepsy outpatients during monotherapy or combination therapy. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* V. 45. P. 782.
- Yasuda S., Liang M.H., Marinova Z., Yahyavi A., Chuang D.M.* 2009. The mood stabilizers lithium and valproate selectively activate the promoter IV of brain-derived neurotrophic factor in neurons. *Mol. Psychiatry.* V. 14. P. 51.
- Zhao H., Wang Q., Yan T., Zhang Y., Xu H.J., Yu H.P., Tu Z., Guo X., Jiang Y.H., Li X.J., Zhou H., Zhang Y.Q.* 2019. Maternal valproic acid exposure leads to neurogenesis defects and autism-like behaviors in non-human primates. *Transl. Psychiatry.* V. 9. P. 267.

## **Valproic Acid Increases the Level of Expression of BDNF, GDNF and Their Receptors in the Embryonic Brain of Mice and Induces the Stereotype Behavior**

**A. A. Semenova<sup>a,\*</sup>, E. V. Kharitonova<sup>a</sup>, E. D. Khilazheva<sup>a</sup>, and A. B. Salmina<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>*Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022 Russia*

<sup>b</sup>*Brain Research Department, Research Center of Neurology, Moscow, 125367 Russia*

*\*e-mail: alina\_shamsutdin@mail.ru*

The model with prenatal administration of valproic acid is the most common for studying the mechanisms of development of autism in experimental animals. We have shown that administration of valproic acid to pregnant female mice causes an increase in the expression of genes encoding the neurotrophic factors BDNF, GDNF, and their receptors in the embryonic brain. At the same time, adult mice with prenatal administration of valproic acid are characterized by increased severity of stereotyped behavior, which is one of the features of autistic-like behavior. We hypothesize that overexpression of neurotrophic factors during the embryonic period may stimulate abnormal brain development, leading to changes in behavioral characteristics.

**Keywords:** valproic acid, autism, mice, neurotrophic factors

УДК 616.36-004:[616-091.8]

## РОЛЬ СК19-ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК ПОРТАЛЬНЫХ ЗОН ПРИ ТИОАЦЕТАМИД-ИНДУЦИРОВАННОМ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ КРЫС

© 2021 г. Е. И. Лебедева\*

*Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии Витебского государственного медицинского университета, Витебск, 210009 Республика Беларусь*

\*E-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.04.2021 г.

После доработки 27.04.2021 г.

Принята к публикации 28.04.2021 г.

При заболеваниях печени инициируется сложный механизм регенерации, проявляющийся в пролиферации, дифференцировке, миграции клеток, реструктуризации стромы и ангиогенезе. К настоящему времени клеточные и молекулярно-генетические механизмы нарушения регенерации и резервные возможности восстановления печени до конца не изучены. Целью исследования явилось изучение роли СК19-позитивных клеток портальных зон при тиацетамид-индуцированном циррозе печени крыс. Установлено, что при фиброгенезе печени СК19-позитивные клетки портальных зон мигрируют по соединительнотканному септам и дифференцируются в клетки двух линий: холангиоциты, формирующие междольковые желчные протоки и проточки, и гепатоциты, формирующие зачатки новых печеночных микродолек. Выявлена морфологическая и функциональная гетерогенность популяции пролиферирующих СК19-позитивных клеток.

**Ключевые слова:** крысы, тиацетамид, цирроз печени, иммуногистохимия, цитокератин СК19, регенерация

**DOI:** 10.31857/S0041377121040052

Регенерация печени – это весьма сложный, динамичный и до конца не изученный процесс, в котором задействованы различные популяции клеток (гепатоциты, холангиоциты, клетки Ито/звездчатые клетки, эндотелиоциты, тканевые макрофаги/клетки Купфера, инфильтрирующие моноциты/макрофаги), молекулярные каскады сигнальных путей и эпигенетические механизмы (Gilgenkrantz et al., 2018; Abu Rmilah et al., 2019; Van Haele et al., 2019; Li et al., 2020). В зависимости от природы повреждающего агента, степени тяжести и места локализации повреждения печень интегрирует данные компоненты по-разному. На протяжении многих лет определение источника клеток, способствующего регенерации печени, остается фундаментальной проблемой в гепатологии (Fabris et al., 2017; Abu Rmilah et al., 2019; Lee et al., 2020).

При многих острых и хронических заболеваниях печени в области портальных зон исследователи наблюдают усиленную пролиферацию клеток. У человека этот процесс называют протокой или дуктулярной реакцией. В отношении лабораторных животных преимущественно говорят об овально-клеточной пролиферации (Gouw et al., 2011; Overi et al., 2020; Ge et al., 2020; Szucs et al., 2020).

Большинство ученых предполагают (Li et al., 2020; Overi et al., 2020; Ge et al., 2020), что протоковая реакция представляет собой пролиферацию печеночных стволовых клеток (бипотентных стволовых клеток/клеток-предшественниц печени, HPCs), способных дифференцироваться в гепатоциты и холангиоциты. В настоящее время убедительных доказательств в поддержку этой гипотезы нет. Окончательные места локализации HPCs до сих пор не установлены. Другие исследователи связывают появление протоковой реакции с активацией холангиоцитов, протоковой метаплазией зрелых гепатоцитов, дифференцировкой клеток, мигрирующих из костного мозга (Lee et al., 2014; Yanger et al., 2014; Chien et al., 2018; Tsuchiya et al., 2019).

Отсутствие специфических фенотипических маркеров для HPCs, дифференцирующихся и зрелых клеток внутрипеченочных желчевыводящих путей осложняет поиск источника происхождения протоковых клеток портальных зон. Часто в качестве маркеров HPCs исследователи используют EpCAM и SOX9, а для идентификации холангиоцитов – СК7 или СК19. Однако холангиоциты также экспрессируют маркеры EpCAM и SOX9, а HPCs – СК19. Вместе с тем для идентификации HPCs применяют и другие маркеры, такие как TROP2, Lgr5, OV6, A6, CD24, CD133, NGA2 и CXCR4. Согласно литературным

**Принятые сокращения:** HPCs – бипотентные стволовые клетки; ТАА – тиацетамид.

данном, маркер СК19 относится к цитокератинам кислого типа с низкой молекулярной массой и является ключевым фенотипическим маркером билиарных и стволовых клеток печени (Sato et al., 2019; Overi, 2020).

В последнее время возникают разногласия по поводу функции протоковых клеток портальных зон. Одни специалисты считают, что эти клетки принимают участие в регенерации печени путем дифференцировки в гепатоциты. Неизвестно, способны ли прогениторные клетки печени и холангиоциты полностью дифференцироваться в гепатоциты во время регенерации печени (Kamimoto et al., 2020; Xu et al., 2020). Выявленная корреляционная связь между фиброзом печени и протоковой реакцией дает основание предполагать, что она усиливает фиброгенез. Очевидно решение данного вопроса будет иметь важное значение при разработке антифибротических препаратов (Williams et al., 2014; Rokusz et al., 2017; Zhao et al., 2018; Sato et al., 2019).

Также назрела необходимость консенсуса в отношении терминологии не только в связи с протоковой реакцией портальных зон, но и внутрипеченочных желчных путей. Согласованность в этом вопросе до настоящего времени не достигнута. Использование общепринятых терминов ускорит процесс сопоставления полученных данных, систематизирует их и облегчит интерпретацию функций данных клеток при патологиях печени (Roskams et al., 2004; Gouw et al., 2011).

Таким образом, в отношении протоковой реакции существует ряд неразрешенных проблем, требующих проведения фундаментальных исследований. В рамках настоящей работы использовали международные термины по цитологии и гистологии (Банин, Быков, 2009), а протоковую реакцию описывали как пролиферацию клеток портальных зон. Целью исследования явилось изучение роли СК19-позитивных клеток портальных зон при тиаоацетамид-индуцированном циррозе печени крыс.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

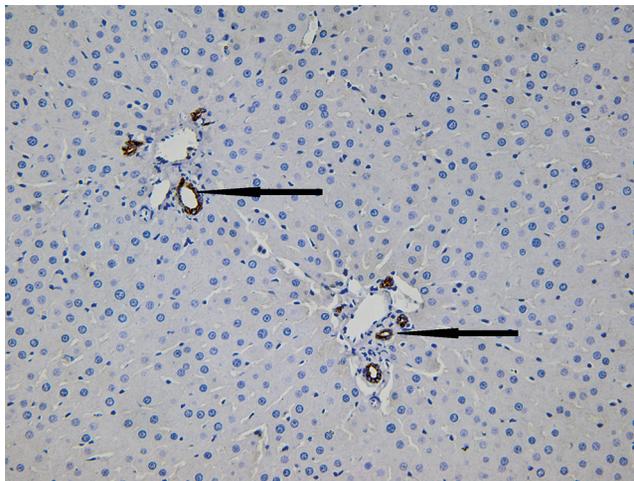
**Экспериментальное исследование** выполнено на 117 половозрелых крысах-самцах Wistar весом от 190 до 210 г. Животных содержали в пластиково-металлических клетках по 6 особей при естественном освещении со свободным доступом к корму и воде. Температура в помещении вивария поддерживалась на уровне 21–23°C, а влажность воздуха составляла около 50%. Цирроз печени у животных индуцировали свежеприготовленным раствором тиаоацетамида (ТАА), который вводили в желудок с помощью зонда в дозе 200 мг/кг массы тела животного 2 раза в неделю за 3 ч до кормления в течение 17 нед. Согласно литературным данным, у лабораторных животных ТАА вызывает поражение печени с морфологическими характеристиками, аналогичными таковым у

людей с фиброзом и циррозом печени (Muthiah et al., 2019). Животных рандомизировали на 9 групп по 12 особей в каждой (m0 – контрольная, m1 – длительность воздействия ТАА 3 нед., m2 – длительность воздействия ТАА 5 нед., m3 – длительность воздействия ТАА 7 нед., m4 – длительность воздействия ТАА 9 нед., m5 – длительность воздействия ТАА 11 нед., m6 – длительность воздействия ТАА 13 нед., m7 – длительность воздействия ТАА 15 нед., m8 – длительность воздействия ТАА 17 нед.). В ходе эксперимента погибло 9 животных.

**Гистологическое и иммуногистохимическое исследование.** После гуманного умерщвления животных декапитацией с применением гильотины в состоянии кратковременного эфирного наркоза из большей левой доли печени крыс забирали образцы материала диаметром 5–10 мм. Время препарирования одного животного не превышало 2 мин. Для проведения гистологического и иммуногистохимического исследований образцы печени помещали в 10%-ный раствор нейтрального формалина на фосфатном буфере и фиксировали в течение 24 ч. Затем проводили обработку фиксированного материала с последующей заливкой в парафин с использованием автомата для гистологической обработки ткани (STP-120, тип карусель, Thermo Fisher Scientific, Германия) и станции для заливки ткани парафином (EC350, Thermo Fisher Scientific, Германия). От каждого животного получали по одному блоку для каждого метода окраски и с помощью ротационного микротомы (HM340E, MICROM, Laborgerate GmbH, Германия) изготавливали в среднем по 3–4 среза толщиной 4 мкм и помещали их на предметные стекла. Для получения обзорных гистологических препаратов срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином, а для выявления соединительной ткани – по методу Маллори в автоматическом программируемом приборе для цитологических и гистологических исследований (HMS70, Thermo Fisher Scientific, Германия). Степень фиброза определяли согласно полуколичественной шкале Ishak K.G. (Everhart et al., 2010).

Имуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах (Коржевский, 2014) с использованием моноклональных мышинных антител СК19 (разведение 1 : 1000) в соответствии с инструкцией производителя. Для лучшей ориентации в препарате и правильной идентификации клеток, содержащих искомым антиген, срезы подкрашивали гематоксилином Майера в течение 1 мин. Для объективной интерпретации результатов для каждой исследуемой серии (группы животных) использовали положительный и отрицательный контроли. Иммуногистохимическую окраску расценивали как положительную только при отсутствии окрашивания в отрицательном контроле и, наоборот, как отрицательную при окрашивании в положительном контроле.

**Морфометрический анализ** гистологических препаратов проводили с использованием компьютер-



**Рис. 1.** Гистологический препарат печени крысы из контрольной группы. Междольковые желчные протоки отмечены *стрелками*. Иммуногистохимическое выявление СК19 и окрашивание гематоксилином Майера. Увел. об. 40×.

ных программ анализа изображений ImageScope Color и cellSens Standard. Определяли площадь, занимаемую СК19-позитивными клетками в процентах к площади изображения без учета интенсивности окраски экспрессии маркера (Guerrier et al., 2014). Измерения проводили на цифровых изображениях, полученных с помощью цифровой камеры OLYMPUS XC30 (Япония) на базе микроскопа OLYMPUS BX51 (Япония) при увеличении объектива 20×. Анализировали не менее 3 полей зрения на каждом гистологическом срезе.

**Статистический анализ.** Статистический анализ выполняли с использованием программ Statistica 10.0 фирмы StatSoft, IBM SPSS Statistics 23.0, Microsoft Office Excel. Для каждой выборки определяли нормальность частотного распределения каждого признака. Выборки не являлись малыми ( $n = 60 > 50$ ), поэтому проверку осуществляли по критерию Лиллиефорса. Анализ показал, что во всех группах (кроме группы m7) частотные распределения признака не соответствуют нормальному распределению. На основании полученных результатов анализ влияния продолжительности эксперимента (стадии фиброза) на исследуемый признак проводили с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса.

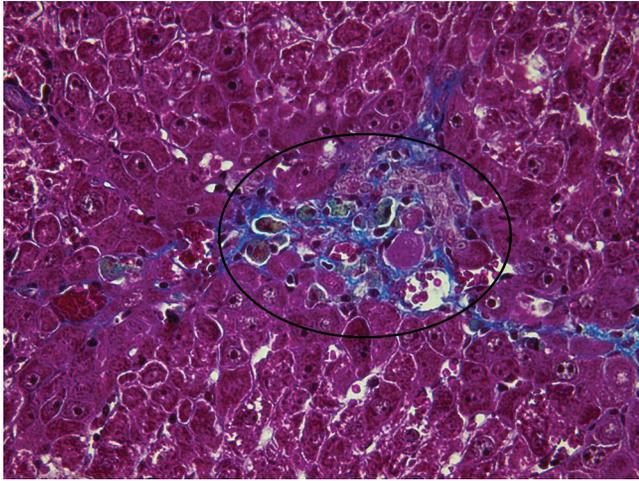
**Использованные реактивы.** Тиоацетамид (Acros Organics, Бельгия); формалин, этиловый спирт, ксилол, гематоксин Майера, эозин (Биовитрум, Россия); набор 2-step plus Poly-HRP Anti Rabbit/Mouse IgG Detection System/with DAB Solution, моноклональные мышиные антитела СК19 (номер в каталоге E-AB-70231) (Wuman Elabscience Biotechnology Incorporated Company, Китай); Retrieve-All Antigen (Unmasking System Basic, США); буфер для разведения антител (BioLegend Inc, США); Tween 20 (Glenham Life Sciences, Великобритания); PBS (Melford, Великобритания).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

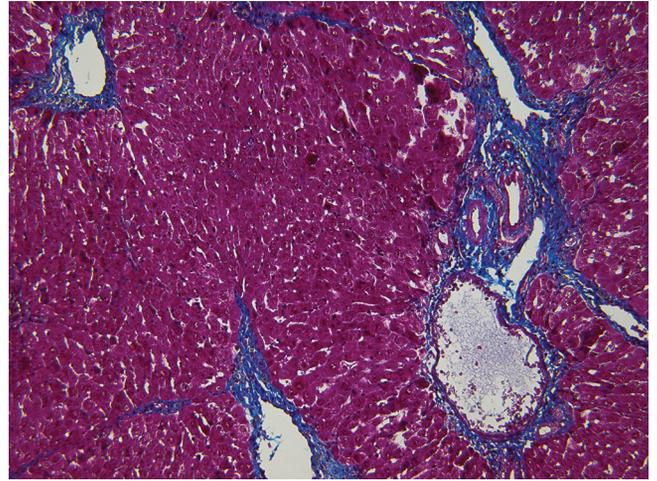
При микроскопическом изучении гистологических препаратов печени крыс контрольной группы морфология паренхимы органа соответствовала критериям нормы. В центре классической дольки четко визуализировались центральная вена, а по периферии – печеночные триады с междольковой артерией, междольковой веной и двумя–тремя междольковыми желчными протоками (рис. 1).

В холангиоцитах протоков и проточков интенсивно экспрессировался билиарный маркер цитокератин СК19. В светлых и крупных ядрах клеток протоков выявлялись гипербазофильные ядрышки. Клетки эпителия междольковых протоков имели кубическую форму, а эпителиальные клетки желчных проточков были ближе к плоской форме. Цитоплазма этих клеток была окрашена в коричневый цвет. Полученные результаты подтверждают описанную другими исследователями гетерогенность билиарного эпителия внутрипеченочных желчных путей, в том числе секреторную и пролиферативную (Glaser et al., 2009; Lee et al., 2014). Следует отметить, что вблизи протоков и проточков локализовались клетки с признаками недифференцированных. Они имели базофильные ядра, небольшой объем цитоплазмы, небольшие размеры, округлую форму и не экспрессировали маркер СК19.

При моделировании цирроза печени у всех экспериментальных крыс наблюдали постепенное нарастание деструктивных и дистрофических явлений. На начальном этапе эксперимента (через 3 нед.) выявляли: очаговые поражения гепатоцитов в виде вакуольной дистрофии с плазмоллизом и кариолизисом, перинуклеарный отек, фиброзные расширения большинства портальных зон (портальный фиброз) (рис. 2). Степень фиброза по шкале Ishak K.G. соответствовала F1.

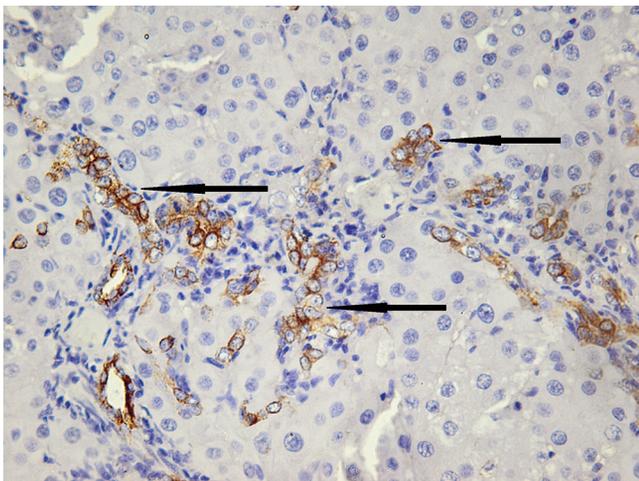


**Рис. 2.** Гистологический препарат печени крысы с индуцированным циррозом через 3 нед. после начала эксперимента. Портальная зона отмечена рамкой овальной формы. Окраска по методу Маллори. Увел. об. 60×.



**Рис. 4.** Гистологический препарат печени крысы с индуцированным циррозом через 5 нед. после начала эксперимента. Окраска по методу Маллори. Увел. об. 40×.

В портальных зонах вблизи междольковых желчных протоков и проточков концентрировались пролиферирующие крупные СК19-положительные клетки преимущественно округлой формы (рис. 3). Они имели светлое овально-округлое ядро с узким ободком примембранного гетерохроматина, преобладанием эухроматина и одним–двумя ядрышками. Местами 2–5 таких клеток были собраны в группы, местами формировали отходящие от желчных протоков и проточков тяжи в два ряда клеток без просвета. Так как клетки протоков и проточков экспрессируют маркер СК19 (Glaser et al., 2009; Ge et al., 2020), с помощью

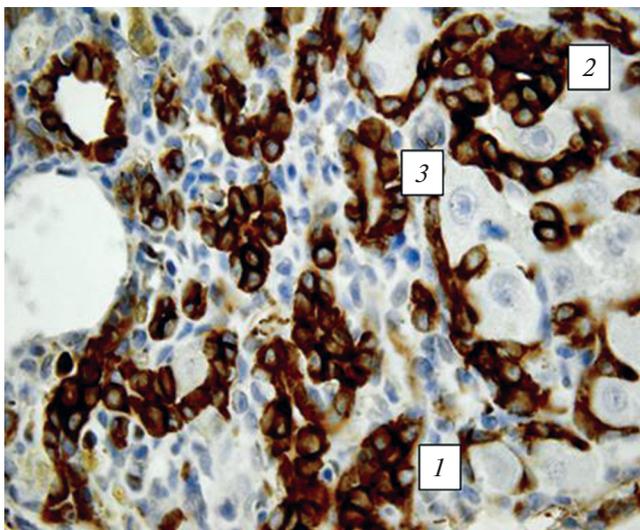


**Рис. 3.** Гистологический препарат печени крысы с индуцированным циррозом через 3 нед. после начала эксперимента. Проллиферирующие крупные СК19-положительные клетки отмечены стрелками. Иммуногистохимическое выявление СК19 и окрашивание гематоксилином Майера. Увел. об. 60×.

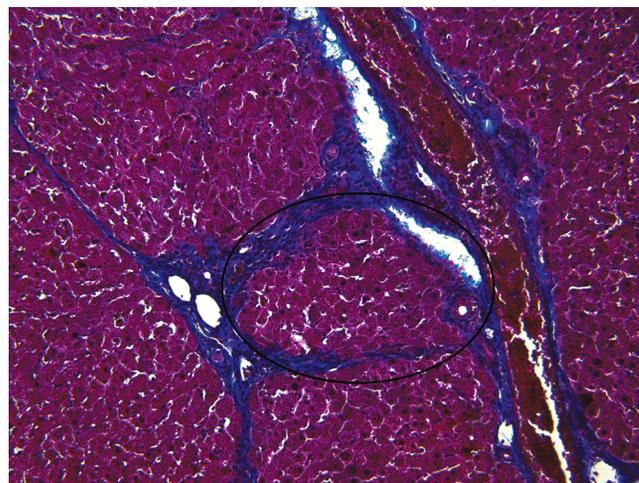
гистологических подходов невозможно определить, какая именно клеточная популяция является источником пролиферирующих СК19-положительных клеток. Нельзя исключить тот факт, что и протоки, и проточки являются родоначальниками данных клеток. По морфологическим признакам пролиферирующие СК19-положительные клетки портальных зон соответствуют клеткам, описываемым другими авторами как печеночные стволовые клетки/овальные клетки. (Roskams et al., 2004; Fabris et al., 2017; Ge et al., 2020).

Через 5–7 нед. эксперимента на гистологических препаратах печени крыс из экспериментальной группы выявили прогрессирование токсического поражения: очаги некроза гепатоцитов, нарастание отека паренхимы, портальный и мостовидный фиброз. Его степень соответствовала F2/F3 (через 5 нед., рис. 4) и F3/F4 (через 7 нед.).

В портальных зонах и в соединительнотканых септах отмечалось увеличение числа междольковых желчных протоков, проточков и пролиферирующих СК19-положительных клеток, формирующих два типа структур: тяжи и розетки с просветом и без просвета. На гистологических срезах можно было наблюдать стадии формирования междольковых желчных протоков: от округлых розеткообразных скоплений клеток без просвета и структур с намечающимся просветом до полностью сформированных протоков (рис. 5). Это свидетельствует о дифференцировке пролиферирующих СК19-положительных клеток в холангиоциты. Формирующиеся протоки практически всегда сопровождали гипербазофильные веретеновидные клетки. Местами были отчетливо видны тяжи из СК19-положительных клеток, образующиеся, по-видимому, в результате миграции этих клеток от желчных протоков и проточков портальных зон в соединительную ткань. Часто эти тяжи окружали границы намечающихся ложных печеночных долек.



**Рис. 5.** Образование новых междольковых желчных протоков в печени крысы с индуцированным циррозом через 5 нед. после начала эксперимента. 1 – скопление клеток без просвета, 2 – скопление клеток с намекающим просветом, 3 – скопление клеток со сформированным просветом. Иммуногистохимическое выявление СК19 и окрашивание гематоксилином Майера. Увел. об. 100×.

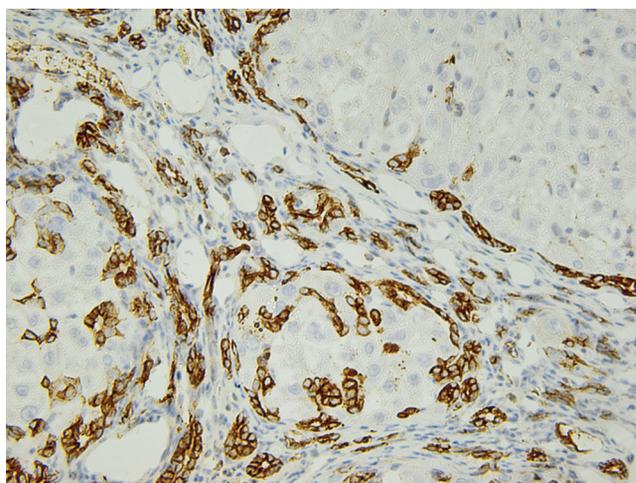


**Рис. 6.** Гистологический препарат печени крысы с индуцированным циррозом через 9 нед. после начала эксперимента. Сформированная ложная печеночная долька выделена рамкой овальной формы. Окраска по методу Маллори. Увел. об. 40×.

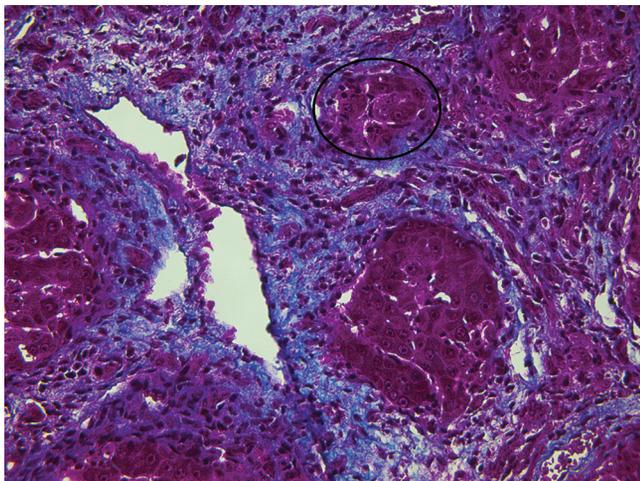
На фоне дальнейшей интоксикации животных (9–11 нед. эксперимента) в большинстве полей зрения гистологических препаратов выявляли признаки портального и мостовидного фиброза (F4/F5), очаги некроза гепатоцитов, увеличение количества желчных протоков (более двадцати поперечных сечений в одном участке гистологического препарата).

Вблизи портальных зон одновременно наблюдали два процесса: узелковой трансформации паренхимы органа с формированием единичных ложных

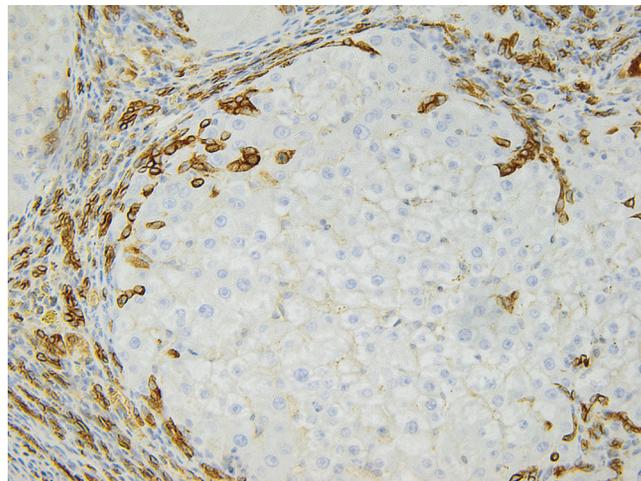
печеночных долек (рис. 6) и образование в соединительнотканых септах небольших структур из скопления СК19-позитивных клеток морфологически сходных с гепатоцитами (микродоек). Можно было наблюдать, как на периферии микроделек выстраивался слой клеток вытянутой формы с базофильным ядром, затем снаружи от него локализовался слой пролиферирующих СК19-позитивных клеток, затем ситуация повторялась. Это свидетельствует о дифференцировке пролиферирующих СК19-позитивных клеток в гепатоциты и формировании новых печеночных долек/регенерирующих долек. Тяжи и розетки из СК19-позитивных клеток наблюдали во всех препаратах и по всему срезу (рис. 7).



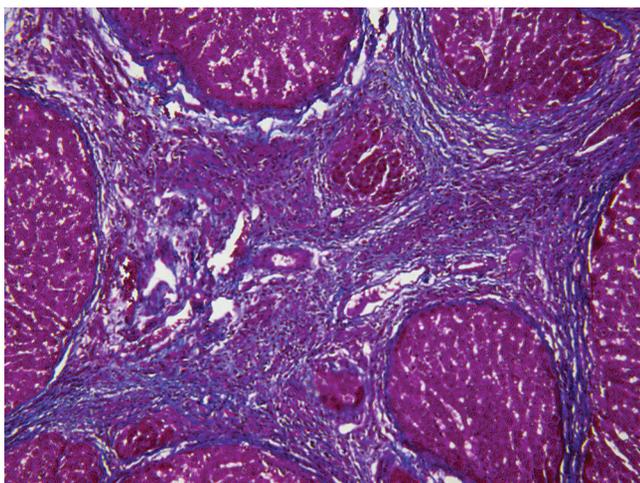
**Рис. 7.** Гистологический препарат печени крысы с индуцированным циррозом через 11 нед. после начала эксперимента. Четко визуализируются тяжи и розетки из СК19-позитивных клеток. Иммуногистохимическое выявление СК19 и окрашивание гематоксилином Майера. Увел. об. 40×.



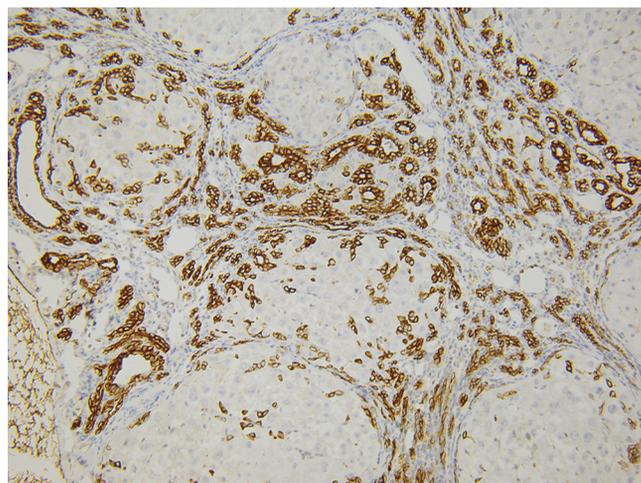
**Рис. 8.** Гистологический препарат печени крысы с индуцированным циррозом через 15 нед. после начала эксперимента. Тотальное разрастание соединительной ткани в паренхиме. Новая печеночная микродолька выделена рамкой овальной формы. Окраска по методу Маллори. Увел. об. 40×.



**Рис. 9.** Гистологический препарат печени крысы с индуцированным циррозом через 15 нед. после начала эксперимента. SK19-позитивные клетки в соединительной ткани и по периферии ложной печеночной дольки. Иммуногистохимическое выявление SK19 и окрашивание гематоксилином Майера. Увел. об. 40×.



**Рис. 10.** Гистологический препарат печени крысы с индуцированным циррозом через 15 нед. после начала эксперимента. Выраженный цирроз печени. Окраска по методу Маллори. Увел. об. 40×.

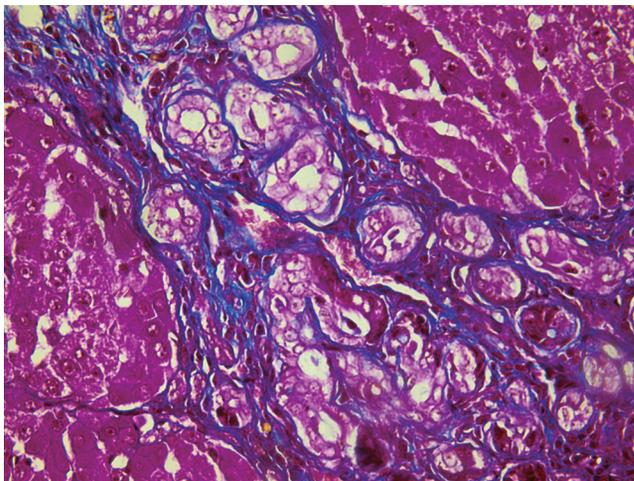


**Рис. 11.** Гистологический препарат печени крысы с индуцированным циррозом через 17 нед. после начала эксперимента. Иммуногистохимическое выявление SK19 и окрашивание гематоксилином Майера. Увел. об. 20×.

На следующем этапе эксперимента (13–15 нед.) гистологическое исследование печени крыс позволило установить тотальное поражение паренхимы в виде замещения соединительной тканью участков вакуольной дистрофии. На данном этапе отмечали выраженный цирроз с формированием многочисленных ложных печеночных долек (рис. 8). В соединительнотканых септах и портальных зонах в значительном количестве выявляли SK19-позитивные клетки, формирующие тяжи, желчные протоки и

микродольки. Часто тяжи окружали ложные печеночные дольки по периферии, местами они направлялись в центр дольки (рис. 9). В крупных очагах некроза, среди погибающих и погибших гепатоцитов отмечали большое скопление пролиферирующих SK19-позитивных клеток. Вероятно, на месте некроза данные клетки формировали новую печеночную микродольку.

К концу эксперимента (17 нед.) в печени всех экспериментальных животных наблюдали тотальный

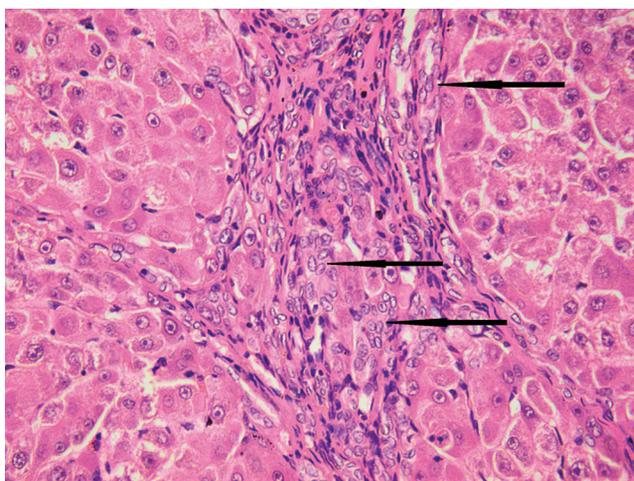


**Рис. 12.** Гистологический препарат печени крысы с индуцированным циррозом через 17 нед. после начала эксперимента. Проплиферация междольковых желчных протоков. Окраска по методу Маллори. Увел. об. 60×.

цирроз с обширными полями соединительной ткани, ограничивающей ложные печеночные дольки широкими поясами (рис. 10). В отношении пролиферирующих СК19-позитивных клеток наблюдали картину, сходную с картиной на предыдущем сроке (рис. 11). В соединительнотканых септах и портальных зонах увеличилось количество микродолек, происходила выраженная пролиферация междольковых желчных протоков (рис. 12). В портальной зоне можно было обнаружить более 30 поперечных сечений протоков. При сопоставлении гистологических препаратов, окрашенных двумя способами (иммуногистохимический, гематоксилином и эозином) было отмечено, что практически всегда на всех сроках эксперимента в соединительнотканых сеп-

тах тяжи из СК19-позитивных клеток сопровождали базофильно окрашенные клетки треугольной, крыловидной и палочковидной формы с нечетким разделением на цитоплазму и ядро (рис. 13).

На рис. 14 представлена диаграмма размаха медиан, отражающая динамику изменений площади СК19-позитивных клеток на протяжении всего эксперимента. Как видно из графиков, с процессом прогрессирования фиброгенеза печени (увеличением количества нед. эксперимента) наблюдается тенденция роста процента площади данных клеток, причем на последних двух неделях эксперимента этот показатель значительно отличается от контрольной группы.



**Рис. 13.** Гистологический препарат печени крысы с индуцированным циррозом через 17 нед. после начала эксперимента. Тяжи, образованные пролиферирующими крупными клетками, отмечены стрелкой. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. об. 60×.

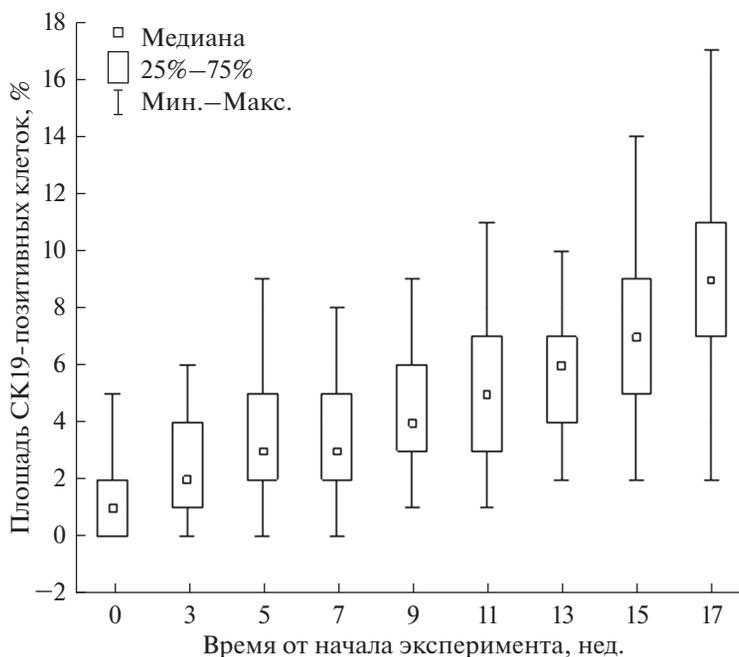


Рис. 14. Динамика изменений площади SK19-позитивных клеток. Представлена диаграмма размаха медиан.

На всех этапах эксперимента в печеночных долях среди гипертрофированных гепатоцитов выявляли единичные диффузно локализованные клетки, экспрессирующие маркер SK19. По морфологическим признакам они напоминали гепатоциты. В последнее время специалисты высказывают гипотезу о эпителиально-мезенхимальном переходе гепатоцитов в клетки желчных протоков. Показано, что при культивировании в геле коллагена I типа и в присутствии эпидермального фактора роста и фактора ро-

ста гепатоцитов зрелые гепатоциты способны дифференцироваться в клетки желчных протоков. Предполагается, что фенотипы гепатоцитов и клеток желчных протоков могут быть взаимно обратимыми (Nishikawa et al., 2005; Glaser et al., 2009; Lee et al., 2014).

Необходимо отметить, что в портальных трактах и соединительнотканых септах фиброгенез печени сопровождался выраженным неоангиогенезом, который проявлялся формированием множества мел-

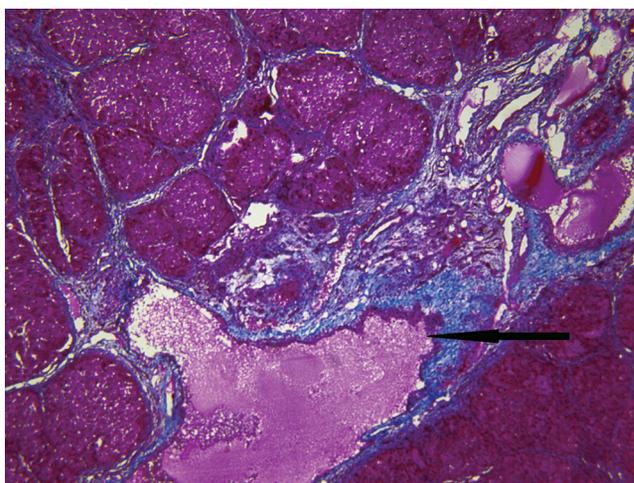


Рис. 15. Гистологический препарат печени крысы с индуцированным циррозом через 15 нед. после начала эксперимента. Гигантская междольковая вена отмечена стрелкой. Окраска по методу Маллори. Увел. об. 10×.

ких кровеносных сосудов венозного типа. Наряду с вновь образованными сосудами, в соединительнотканых септах имелись гигантские междольковые вены (рис. 15), что очевидно указывает на перестройку венозной системы портальной вены и, вероятно, формирование коллатералей и шунтов, перенаправляющих венозную кровь в обход печеночных долек.

По периферии соединительнотканых септ и в синусоидных капиллярах вблизи портальных зон выявляли СК19-позитивные клетки, отличающиеся по своей морфологии от описанных выше. Эти клетки имели вытянутую форму и нитевидное, гипербазофильное ядро. Предположительно, данные клетки являются предшественниками эндотелиоцитов и принимают участие в неоангиогенезе венозной системы воротной вены и формировании синусоидных капилляров. Задачей настоящего исследования не являлось установление связи между неоангиогенезом и пролиферирующими клетками портальных зон. Очевидно, что два процесса развиваются параллельно, нельзя исключать, что совместно и регулируются общими молекулярными механизмами.

Таким образом, выявленные пролиферирующие СК19-позитивные клетки, при тиоацетид-индуцированном фиброгенезе печени крыс являются источником междольковых желчных протоков и проточков, а также гепатоцитов, формирующих зачатки новых печеночных микродолек. При выраженном циррозе они локализовались в портальных зонах, желчных протоках, соединительнотканых септах, паренхиме микродолек и в синусоидных капиллярах. Выявлена морфологическая и функциональная гетерогенность СК19-позитивных клеток: клетки округлой формы со светлым овально-округлым ядром с узким ободком примембранного гетерохроматина, преобладанием в нем эухроматина и одним-двумя ядрышками и клетки вытянутой формы с нитевидным, гипербазофильным ядром.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований “Фундаментальные и прикладные науки – медицине” Министерства Здравоохранения Республики Беларусь, задание 2.89 “Изучить роль экспрессии генов NOTCH- и TWEAK-сигнальных путей, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток печени в норме и при ее токсическом поражении” (регистрационный номер 20190107 от 19.02.2019).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол эксперимента был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования “Ви-

тебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет” (протокол № 6 от 03.01.2019 г). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях от 18.03.1986, Директиве Совета ЕЭС от 24.11.1986 и рекомендациям FELASA Working Group Report (1994–1996).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор утверждает отсутствие конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Banin V.V., Bykov V.L. (ред.).* 2009. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов. М.: ГЭОТАР-Медиа. 272 с. (*Banin V.V., Bykov V.L. (Eds.).* 2009. International terms in human cytology and histology with an official list of Russian equivalents. M.: GEOTAR-Media. 272 p.)
- Коржевский Д.Э. (ред.).* 2014. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии. СПб.: СпецЛит. 119 с. (*Korzhevsky D.E. (ed.).* 2014. Theoretical foundations and practical application of immunohistochemistry methods. SPb.: SpechLit. 119 p.)
- Abu Rmilah A., Zhou W., Nelson E., Lin L., Amiot B., Nyberg S.L.* 2019. Understanding the marvels behind liver regeneration. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* V. 8. P. 340. <https://doi.org/10.1002/wdev.340>
- Chien C.S., Chen Y.H., Chen H.L., Wang C.P., Wu S.H., Ho S.L., Huang W.C., Yu C.H., Chang M.H.* 2018. Cells responsible for liver mass regeneration in rats with 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy injury. *J. Biomed. Sci.* V. 25. P. 39. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0441-5>
- Everhart J.E., Wright E.C., Goodman Z.D., Dienstag J.L., Hoefs J.C., Kleiner D.E., Ghany M.G., Mills A.S., Nash S.R., Govindarajan S., Rogers T.E., Greenson J.K., Brunt E.M., Bonkovsky H. L., Morishima C. et al.* 2010. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Hepatology.* V. 51. P. 585. <https://doi.org/10.1002/hep.23315>
- Fabris L., Spirli C., Cadamuro M., Fiorotto R., Strazzabosco M.* 2017. Emerging concepts in biliary repair and fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* V. 313. P. 102. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00452.2016>
- Ge J.Y., Zheng Y.W., Tsuchida T., Furuya K., Isoda H., Taniguchi H., Ohkohchi N., Oda T.* 2020. Hepatic stellate cells contribute to liver regeneration through galectins in hepatic stem cell niche. *Stem Cell Res. Ther.* V. 11. P. 425. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01942-x>
- Gilgenkrantz H., Collin de l'Hortet A.* 2018. Understanding liver regeneration: From mechanisms to regenerative medicine. *Am J. Pathol.* V. 188. P. 1316. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.03.008>

- Glaser S.S., Gaudio E., Rao A., Pierce L.M., Onori P., Franchitto A., Francis H.L., Dostal D.E., Venter J.K., DeMorrow S., Mancinelli R., Carpino G., Alvaro D., Kopriva S.E., Savage J.M., Alpini G.D. 2009. Morphological and functional heterogeneity of the mouse intrahepatic biliary epithelium. *Lab. Invest.* V. 89. P. 456.  
https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.6
- Gouw A.S.H., Clouston A.D., Theise N.D. 2011. Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology.* V. 54. P. 1853.  
https://doi.org/10.1002/hep.24613
- Guerrier M., Attili F., Alpini G., Glaser S. 2014. Prolonged administration of secretin to normal rats increases biliary proliferation and secretin-induced ductal secretory activity. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* V. 3. P. 118.  
https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.04.04
- Kamimoto K., Nakano Y., Kaneko K., Miyajima A., Itoh T. 2020. Multidimensional imaging of liver injury repair in mice reveals fundamental role of the ductular reaction. *Commun. Biol.* V. 3. P. 289.  
https://doi.org/10.1038/s42003-020-1006-1
- Lee J.Y., Hong S.H. 2020. Hematopoietic stem cells and their roles in tissue regeneration. *Int. J. Stem Cells.* V. 13. P. 1.  
https://doi.org/10.15283/ijsc19127
- Lee S.J., Park J.B., Kim K.H., Lee W.R., Kim J.Y., An H.J., Park K.K. 2014. Immunohistochemical study for the origin of ductular reaction in chronic liver disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* V. 7. P. 4076.
- Li W., Li L., Hui L. 2020. Cell plasticity in liver regeneration. *Trends Cell Biol.* V. 30. P. 329.  
https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.01.007
- Muthiah M.D., Huang D.Q., Zhou L., Jumat N.H., Choolani M., Chan J.K.Y., Wee A., Lim S.G., Dan Y.Y. 2019. A murine model demonstrating reversal of structural and functional correlates of cirrhosis with progenitor cell transplantation. *Sci. Rep.* V. 9. P. 15446.
- Nishikawa Y., Doi Y., Watanabe H., Tokairin T., Omori Y., Su M., Yoshioka T., Enomoto K. 2005. Transdifferentiation of mature rat hepatocytes into bile duct-like cells in vitro. *Am. J. Pathol.* V. 166. P. 1077.  
https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62328-0
- Overi D., Carpino G., Franchitto A., Onori P., Gaudio E. 2020. Hepatocyte injury and hepatic stem cell niche in the progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Cells.* V. 9. P. 590.  
https://doi.org/10.3390/cells9030590
- Roskams T.A., Theise N.D., Balabaud C., Bhagat G., Bhathal P.S., Bioulac-Sage P., Brunt E.M., Crawford J.M., Crosby H.A., Desmet V., Finegold M.J., Geller S.A., Gouw A.S.H., Hytioglou P., Knisely A.S. et al. 2004. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology.* V. 39. P. 1739.  
https://doi.org/10.1002/hep.20130
- Rokusz A., Veres D., Szücs A., Bugyik E., Mozes M., Paku S., Nagy P., Dezso K. 2017. Ductular reaction correlates with fibrogenesis but does not contribute to liver regeneration in experimental fibrosis models. *PLoS One.* V. 12 : e0176518.  
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176518
- Sato K., Marzioni M., Meng F., Francis H., Glaser S., Alpini G. 2019. Ductular reaction in liver diseases: pathological mechanisms and translational significances. *Hepatology.* V. 69. P. 420.  
https://doi.org/10.1002/hep.30150
- Szucs A., Paku S., Sebestyen E., Nagy P., Dezso K. 2020. Postnatal, ontogenic liver growth accomplished by biliary/oval cell proliferation and differentiation. *PLoS One.* V. 15 : e0233736.  
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233736
- Tsuchiya A., Lu W.Y. 2019. Liver stem cells: Plasticity of the liver epithelium. *World J. Gastroenterol.* V. 25. P. 1037.  
https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i9.1037
- Van Haele M., Snoeck J., Roskams T. 2019. Human liver regeneration: An etiology dependent process. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 2332.  
https://doi.org/10.3390/ijms20092332
- Williams M.J., Clouston A.D., Forbes S.J. 2014. Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion. *Gastroenterology.* V. 146. P. 349.  
https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.034
- Xu T., Lu Z., Xiao Z., Liu F., Chen Y., Wang Z., Zhu S. 2020. Myofibroblast induces hepatocyte-to-ductal metaplasia via laminin- $\alpha$ v $\beta$ 6 integrin in liver fibrosis. *Cell Death Dis.* V. 11. P. 199.  
https://doi.org/10.1038/s41419-020-2372-9
- Yanger K., Knigin D., Zong Y., Maggs L., Gu G., Akiyama H., Piskarsky E., Stanger B.Z. 2014. Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation. *Cell Stem Cell.* V. 15. P. 340.  
https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.003
- Zhao L., Westerhoff M., Pai R.K., Choi W.T., Gao Z.H., Hart J. 2018. Centrilobular ductular reaction correlates with fibrosis stage and fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *Mod. Pathol.* V. 31. P. 150.  
https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.115

## The Role of CK19-Positive Cells of the Portal Zones in Thioacetamide-Induced Cirrhosis of Rat Liver

E. I. Lebedeva\*

Department of Histology, Cytology and Embryology of the Vitebsk State Medical University, Vitebsk, 210009 Republic of Belarus

\*e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

In hepatic diseases, a complex regeneration mechanism is initiated, which is manifested in cell proliferation, differentiation, migration, stromal restructuring and angiogenesis. To date, the cellular and molecular/genetic mecha-

nisms of regeneration disorders and the reserve capacities of liver recovery are not fully understood. The purpose of the study is to examine the role of CK19-positive cells of the portal zones in thioacetamide-induced cirrhosis of rat liver. We found that the fibrogenesis of liver is accompanied by migration of CK19-positive cells of the portal zones along the connective tissue septa and their differentiation into the cells of two lines: the cholangiocytes forming the interlobular bile ducts and ductules, and the hepatocytes, which form the rudiments of new hepatic microlobules. Morphological and functional heterogeneity of these population of proliferating CK19-positive cells was identified.

**Keywords:** rats, thioacetamide, liver cirrhosis, immunohistochemistry, cytokeratin CK19, regeneration

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ФЛАВОНОИДСОДЕРЖАЩИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА КЛЕТОЧНУЮ ЛИНИЮ СНО

© 2021 г. М. Н. Курчатова<sup>1, \*</sup>, А. С. Фомин<sup>2</sup>, А. А. Широков<sup>1, 2</sup>, Н. А. Дурнова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра общей биологии, фармакогнозии и ботаники Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов, 410012 Россия

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, 410049 Россия

\*E-mail: kurchatova.marya@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.04.2021 г.

После доработки 27.04.2021 г.

Принята к публикации 30.04.2021 г.

С использованием МТТ-теста установлены изменения жизнеспособности и метаболической активности монослойной клеточной линии СНО при воздействии экстрактов бессмертника песчаного, кукурузы антоциановой формы и аврана лекарственного. Использование всех изученных экстрактов в концентрации от 50 до 250 мкг/мл приводило к увеличению количества жизнеспособных клеток (до  $86.0 \pm 8.2\%$ ) и стимулировало их метаболическую активность (до  $196.1 \pm 8.8\%$ ). Применение экстрактов в концентрации от 500 до 2000 мкг/мл приводило к уменьшению количества жизнеспособных клеток (до полной гибели клеток) и угнетению метаболической активности (до  $13.4 \pm 11.3\%$ ). Изученные растительные экстракты бессмертника песчаного, антоциановой формы кукурузы обыкновенной и аврана лекарственного проявляли различное воздействие на здоровые клетки в зависимости от применяемой концентрации.

**Ключевые слова:** клеточная линия СНО, цитотоксичность, МТТ-тест, *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, *Griatiola officinalis* L., *Zea mays* L.

DOI: 10.31857/S0041377121040040

Культуры клеток широко применяются в различных областях биологических и медицинских наук. Они являются моделью для исследования воздействия различных факторов среды: поллютантов, лекарственных препаратов и т.д. (Davis et al., 2001; Manay et al., 2018; Rosen et al., 2018; Upadhyay, Palmberg, 2018; Yong et al., 2020). Клеточные культуры играют важную роль при тестировании биологически активных веществ, позволяя не только изучить происходящие под их влиянием изменения на клеточном уровне, но и предположить общеорганизменную реакцию (Прилепский и др., 2019). Определение токсичности и цитотоксичности лекарственных препаратов, их отдельных компонентов или иных соединений, обладающих возможной биологической активностью, является неотъемлемой частью доклинических исследований (Романова, Додонова, 2016). Клеточная линия СНО (клетки яичника китайского хомячка) является наиболее изученным и стандартным объектом в фармакологии и токсикологии. Областью применения линии является генетика соматических клеток, клеточная биология, вирусология (Александрова и др., 2015; Стефанова и др., 2015). Для определения цитотоксичности лекарственных препаратов существуют различные мето-

ды: во-первых, основанные на прямом подсчете клеток и колоний, во-вторых, связанные с оценкой целостности плазматической мембраны, в-третьих, основанные на оценке синтеза ДНК, а также методы, представляющие собой определение метаболической активности клеток, включая МТТ-тест (Аникина и др., 2014; Иксанова и др., 2016). МТТ-тест является стандартным методом определения цитотоксичности веществ в скрининговых исследованиях новых соединений, фармакологических препаратов, обладает хорошей воспроизводимостью, достаточно быстрый и относительно дешевый. Метод основан на измерении оптической плотности: о цитотоксическом действии вещества на клетки говорит уменьшение оптической плотности экспериментальных проб по сравнению с контрольными пробами (Яковлев и др., 2020). Таким образом, МТТ-тест является подходящим методом для исследования цитотоксичности самых разнообразных веществ.

В настоящее время перспективно изучение биологических эффектов флавоноидов, как веществ, обладающих широким спектром действия, низкой токсичностью, небольшим количеством побочных эффектов (Куркин, 2007). Несмотря на эти преимущества, препараты, содержащие флавоноиды, до сих пор

используются недостаточно широко (Андреева, Калинин, 2000; Ефимов и др., 2004; Анисимова и др., 2010). Бессмертник песчаный, авран лекарственный и антоциановая форма кукурузы содержат флавоноиды различных классов и обладают установленной антимикробной, противовоспалительной, противотуберкулезной и др. активностью (Купчак и др., 1995; Машурчак и др., 2009; Navolokin et al., 2012; Наволокин и др., 2013; Полуконова и др., 2013). Следует отметить, что среди использованного для получения экстрактов сырья, в официальной медицине применяются только цветки бессмертника песчаного. Антоциановая форма кукурузы создана для получения природного красителя, пригодного в пищевой промышленности. Трава аврана лекарственного ядовита за счет содержания гликозидов и алкалоидов, поэтому использовалась только в народной медицине. Из трех видов лекарственных растений наиболее изучен и включен в Государственную фармакопею РФ (XIV издание) бессмертник, относительно двух других видов в настоящее время идет накопление данных о биологической активности. В этой связи необходимо отметить данные о цитотоксической и цитостатической активности экстракта аврана лекарственного в отношении линии опухолевых клеток и линии SPEV, которую чаще используют в вирусологических исследованиях (Polukonova et al., 2018). В указанном исследовании в тесте “живые—мертвые” была выявлена нелинейная зависимость между средним количеством клеток линии SPEV и значением концентрации экстракта аврана лекарственного. Для установления степени безопасности и возможного избирательного действия экстрактов бессмертника песчаного, антоциановой формы кукурузы и аврана лекарственного является целесообразным исследование их цитотоксичности на линии высокочувствительных клеток.

Цель работы: выявление и сравнительный анализ метаболической активности и выживаемости монослойной клеточной линии СНО при воздействии экстрактов бессмертника песчаного, кукурузы антоциановой формы и аврана лекарственного с помощью МТТ-теста и с помощью окрашивания Hoechst 33342 и пропидий йодидом.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

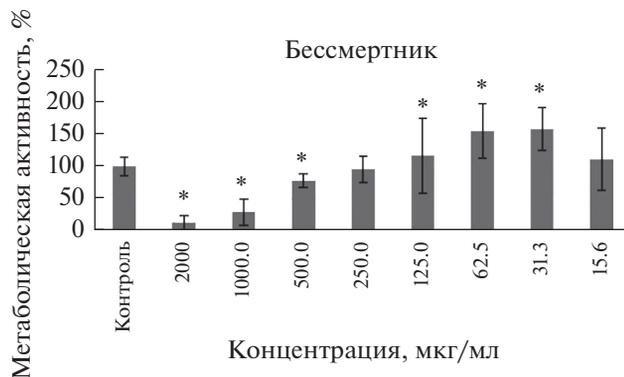
**Культивирование клеток.** В работе использованы клетки яичников китайского хомячка *Cricetulus griseus* (СНО-К1), предоставленные сотрудниками лаборатории нанобиотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (ИБФРМ РАН). Оценку цитотоксичности растительных экстрактов проводили на базе Центра коллективного пользования “СИМБИОЗ” ИБФРМ РАН. Клетки СНО-К1 (7 пассаж) культивировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в питательной среде ДЕМ, содержащей 2 мМ L-глутамин (Capricorn Scientific, Германия), с добавлением 10%-ной эмбриональной

телячьей сыворотки (Capricorn Scientific, Германия), 1000 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Capricorn Scientific, Германия).

**Использованные экстракты.** Для приготовления экстрактов использовали цветки бессмертника песчаного (АО “Красногорсклексредства”), траву аврана лекарственного (собрана в Саратовской обл.), оберточные листья початков антоциановой формы кукурузы обыкновенной (предоставлено сотрудниками кафедры генетики ФГБОУ ВО “Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского”). Флавоноидсодержащие водные растворы сухих спиртовых экстрактов приготовлены согласно методике, описанной в Патенте на изобретение № 2482863: “Способ получения сухого экстракта из растительного сырья, обладающего биологической активностью” (Полуконова и др., 2012). Способ включает измельчение сырья, экстракцию 96%-ным спиртом на водяной бане, выпаривание экстракта, добавление хлороформа, удаление хлороформа, отделение водной фазы и высушивания при определенных условиях. Экстракт бессмертника песчаного содержит следующие флавоноиды: нарингин и его растворимый агрегат, прунин, кверцетин, апигенин и нарингенин, а также 5-О-глюкозид апигенина и изосалипурпозид (Гринёв и др., 2015). Экстракт кукурузы антоциановой формы, полученный предлагаемым способом, содержит большое количество веществ полифенольной природы, включая кверцетин (Kanevskii et al., 2020). Экстракт аврана лекарственного содержит различные фенольные соединения, моносахариды, органические кислоты и один из флавоноидов – кверцетин (Полуконова и др., 2013). Исследуемые экстракты содержат флавоноиды, но различаются по составу. В исследовании сравнивали действие всей биологически активной композиции на клеточную линию СНО, так как нередко комплекс веществ оказывает большее воздействие, чем отдельное вещество. Все экстракты перед использованием стандартизировали по сумме флавоноидов.

Для оценки влияния на метаболическую активность клеток экстракты использовали в концентрациях, полученных методом двухкратных разведений, в диапазоне от 15.6 до 2000 мкг/мл. Всего было исследовано восемь концентраций каждого из изучаемых экстрактов. В экспериментах по оценке влияния на жизнеспособность клеток экстракты использовали в трех концентрациях, которые были выбраны по результатам МТТ-теста (7.81, 31.3 и 500 мкг/мл для экстрактов бессмертника и аврана и 1.95, 62.5, 1000 мкг/мл для экстракта кукурузы).

**МТТ-тест.** Оценку метаболической активности клеток определяли в МТТ-тесте по способности восстанавливать нитротетразолевый синий ([3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)]-2.5 diphenyltetrazoliumbromide) до формазана по общепринятому методу (Bernas, Dobrucki, 2000). Клетки СНО-К1 культивировали в

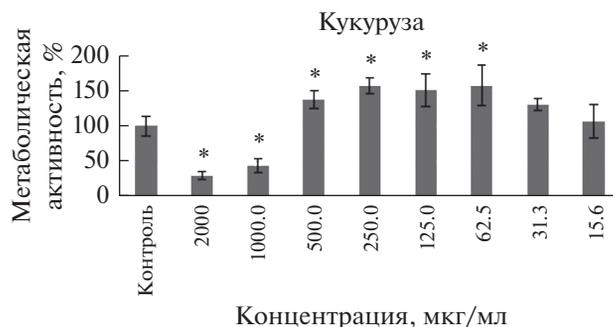


**Рис. 1.** Изменение метаболической активности клеток СНО при действии экстракта бессмертника. \* отмечены достоверные изменения показателя по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ).

стандартных 96-луночных планшетах, по достижении клеточного монослоя 70–90% удаляли старую питательную среду и вносили новую, содержащую исследуемые экстракты. Через 24 ч удаляли старую питательную среду и вносили раствор нитротетразолиевого синего (Thermo Scientific, США) (0.5 мг на 100 мл 0.01 М забуференного физиологического раствора, pH 7.4 (БиолоТ, Россия)), культивировали 1 ч. Содержимое лунок удаляли и вносили ДМСО (Thermo Scientific, США). Далее измеряли оптическую плотность лунок на планшетном спектрофотометре Spark 10M (Tecan Group Ltd., Швейцария) при длине волны 540 нм, с вычетом результатов измерения при 630 нм.

**Идентификацию живых и мертвых клеток** проводили с помощью окрашивания бисбензими́дом (Hoechst 33342) и пропидий йодидом, сочетание этих красителей позволяет визуализировать живые и мертвые клетки (Böhmer, 1978; Loken et al., 1978). В лунки 6-луночного планшета вносили клетки СНО-K1, по достижении клеточного монослоя 70–90% удаляли старую питательную среду и вносили новую, содержащую исследуемые препараты. Через 24 ч удаляли старую питательную среду и вносили свежую, содержащую 1 мкг/мл Hoechst 33342 (Thermo Scientific, США) и 30 мкМ пропидий йодида (Thermo Scientific, США). Через 20 мин промывали в питательной среде ДМЕМ и проводили флуоресцентную микроскопию на инвертированном флуоресцентном микроскопе Leica DMI 3000B (Leica, Германия) при увеличении объектива  $\times 20$ . Проводили подсчет общего количества клеток и количества мертвых клеток в 10 полях зрения в каждой лунке (не менее 2000 клеток). Ядра всех клеток, окрашенные бисбензими́дом, флуоресцировали синим цветом, ядра мертвых клеток флуоресцировали красным цветом.

Каждый эксперимент повторяли три раза, подсчет клеток для каждой экспериментальной группы проводили в 10 лунках планшета для культивирования.



**Рис. 2.** Изменение метаболической активности клеток СНО при действии экстракта кукурузы. \* отмечены достоверные изменения показателя по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ).

**Статистическую обработку результатов** проводили с помощью MS Excel 2010. Данные представлены в форме среднеарифметических значений измеренных величин и их доверительных интервалов при уровне значимости 95%. Оценку достоверности различий между группами проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента ( $p < 0.05$ ).

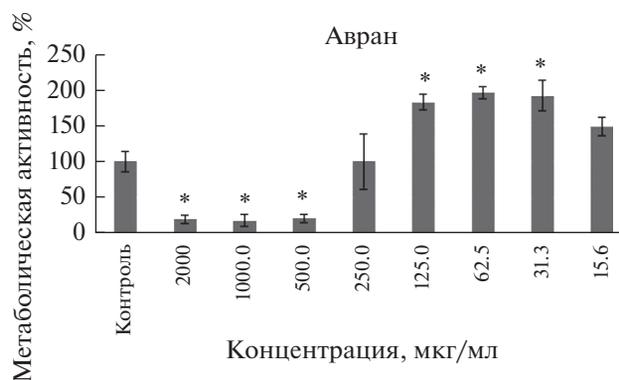
## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате исследования определена метаболическая активность клеток в контроле и при действии экстрактов в разных концентрациях. Согласно результатам МТТ-теста, экстракт бессмертника песчаного в концентрации 31.3 мкг/мл активизирует метаболическую активность до  $157.7 \pm 33.4\%$  ( $p = 0.02$ ) относительно контрольной группы. Угнетение метаболической активности отмечается при использовании концентрации 500 мкг/мл и более (рис. 1).

Экстракт антоциановой формы кукурузы обыкновенной в концентрации 62.5 мкг/мл активизирует метаболическую активность до  $158.1 \pm 28.8\%$  ( $p = 0.001$ ) относительно контрольной группы. Угнетение метаболической активности отмечается только при использовании концентрации 1000 мкг/мл и более (рис. 2).

Экстракт аврана лекарственного в концентрации 31.3 мкг/мл активизирует метаболическую активность до  $196.1 \pm 8.8\%$  ( $p = 0.001$ ) относительно контрольной группы. Угнетение метаболической активности отмечается при использовании концентрации 500 мкг/мл и более (рис. 3).

В результате оценки количества живых и мертвых клеток установлено, что все изученные экстракты в высоких концентрациях оказывают угнетающее действие на клеточную культуру. Экстракты бессмертника песчаного и аврана лекарственного в концентрации 500 мкг/мл снижали количество живых клеток относительно контрольной группы, а экстракт антоциановой формы кукурузы имел аналогичный эффект в концентрации 1000 мкг/мл. Все исследованные экс-



**Рис. 3.** Изменение метаболической активности клеток СНО при действии экстракта аврана. \* – Достоверные изменения показателя по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ).

тракты в концентрации 2000 мкг/мл вызывали гибель 100% клеток и живые клетки в культуре не обнаруживали. Сохраняющуюся при этом метаболическую активность клеток (по результатам МТТ-теста) можно объяснить сохранением активности клеточных ферментов в гибнущих клетках в течение некоторого времени после нарушения целостности их плазматической мембраны. При использовании в меньших концентрациях экстракты не оказывали достоверного влияния на количество живых клеток (табл. 1).

Полученные данные наглядно демонстрируют дозозависимое воздействие всех исследованных экстрактов. При этом наблюдаются различия в дей-

**Таблица 1.** Количество живых клеток в культуре при действии экстрактов в разных концентрациях

Экстракт	Концентрация, мкг/мл	Количество живых клеток, %
Контроль	0	81.4 ± 9.1
	0	81.4 ± 4.3
	0	81.4 ± 8.5
Бессмертник песчаный	7.81	84.3 ± 9.8
	31.3	83.2 ± 5.1
	500	61.9 ± 8.1
Антоциановая форма кукурузы	1.95	86 ± 8.2
	62.5	85.9 ± 6.2
	1000	66.4 ± 7.1
Авран лекарственный	7.81	81.9 ± 8.5
	31.3	75.8 ± 5.8
	500	58.9 ± 5.9

ствии экстрактов в зависимости от используемого сырья. Экстракты аврана и бессмертника в концентрации 31.3 мкг/мл увеличивают метаболическую активность клеток, в то время как экстракт кукурузы имеет такой эффект, начиная с концентрации 62.5 мкг/мл. Угнетение метаболической активности клеток под действием экстракта бессмертника и аврана происходит при применении их в концентрации 500 мкг/мл и более, а кукурузы – 1000 мкг/мл и более.

Несмотря на эти различия можно говорить об общей тенденции действия на клетки всех изученных экстрактов: усиление метаболической активности клеток начинает выявляться при использовании средних концентраций (31.3 и 62.5 мкг/мл). Этот эффект постепенно возрастает по мере возрастания концентрации экстракта, а затем при достижении высоких концентраций (от 500 до 2000 мкг/мл) сменяется угнетением метаболической активности клеток.

Аналогичные результаты получены при идентификации живых и мертвых клеток. Все изученные экстракты в высоких концентрациях (от 500 мкг/мл до 1000 мкг/мл) снижали количество живых клеток. Интересно, что при использовании экстракта аврана лекарственного в концентрации 31.3 мкг/мл отмечалась тенденция к снижению доли живых клеток, несмотря на одновременное значительное увеличение их метаболической активности. Также можно отметить резкое снижение метаболической активности клеток (не только по сравнению с контролем, но и с другими использованными экстрактами) при действии экстракта аврана в высокой концентрации (500 мкг/мл).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Растения издавна служат источниками биологически активных веществ: флавоноидов, полисахаридов, кумаринов и многих других. Многие растения используют в официальной медицине для изготовления лекарственных препаратов. Но среди применяемых человеком растений есть и ядовитые (Кур-

кин, и др., 2007). Так, используемая в нашем эксперименте трава аврана лекарственного содержит алкалоиды, в связи с чем был применен новый метод экстракции для удаления ядовитых компонентов и получения обогащенной флавоноидами фитоконпозиции с низкой токсичностью (Полуконова и др., 2012).

К настоящему времени показана цитотоксическая активность экстракта аврана лекарственного по отношению к клеткам карциномы почки человека A498 и клеткам рака шейки матки HeLa (Полуконова, 2019). Цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам характерна и для экстрактов, получаемых из растений других видов. Определена цитотоксическая активность экстрактов, полученных из растений ашваганды и астрагала в условиях *in vitro* по отношению к клеткам HeLa (Калашникова и др., 2019). Показано угнетающее действие по отношению к культуре клеток аденокарциномы легких человека A549 экстрактов ряда лекарственных растений семейства Agavaceae (Asparagaceae) (Камалова и др., 2019). Фитопрепарат на основе *Vitex agnus-castus* оказывал цитотоксическое действие в отношении клеток рака молочной железы, карциномы желудка (КАТО-III), рака ободочной кишки (COLO 201), рака легкого (Lu-134-АН), промиелолейкоза HL-60, клеток гиперплазии предстательной железы и рака простаты (ВРН-1, LNCaP, PC-3) (Торшин, 2015). Таким образом, растительные извлечения могут стать потенциальными ингибиторами деления клеток опухолей.

Одновременно при выборе перспективных для применения биологически активных соединений необходимо использовать вещества, наименее токсичные для здоровых клеток. Клеточная линия СНО является модельным объектом нормальной ткани организма. Еще в 1999 г. с использованием этой клеточной линии установлена цитотоксичность водного экстракта *Phyllanthus orbicularis*, используемого в традиционной кубинской медицине (Sánchez-Lamar, 1999). Определено цитотоксическое действие экстрактов *Juniperus sabina*, *Zataria multiflora*, *Taxus baccata* как на клеточную линию СНО, так и на опухолевые клетки (Shokrzadeh, 2010).

Помимо оценки безопасности исследуемых веществ актуально изучение их потенциальных защитных свойств. Так, с помощью МТТ-теста было установлено, что экстракт цветков *Ixora coccinea* вызывает снижение цитотоксичности мышьяка в эксперименте с клеточной линией СНО (Salmataj et al., 2018).

Сравнивая результаты, полученные нами с помощью МТТ-теста и при оценке доли живых и мертвых клеток, можно сделать следующие выводы. Во-первых, клеточная культура СНО проявляет различную чувствительность к изученным экстрактам бессмертника песчаного, кукурузы антоциановой формы и аврана лекарственного. Во-вторых, только для экстракта бессмертника песчаного была обнаружена

линейная зависимость между используемой концентрацией и метаболической активностью клеток, а также количеством живых клеток в культуре. В связи с этим использование двух других экстрактов требует более тщательного подбора безопасных концентраций. Можно предположить, что разница в полученных результатах связана с различным качеством экстрактов: получаемые запатентованным методом биологически активные композиции обладают многокомпонентным составом и содержат не только флавоноиды, но и другие соединения.

Согласно полученным нами результатам, экстракты бессмертника песчаного, антоциановой формы кукурузы и аврана лекарственного в относительно низких концентрациях (от 30 до 500 мкг/мл) не являются цитотоксичными. Следовательно, в дальнейших исследованиях различных аспектов их биологической активности на клеточном уровне можно рекомендовать использование экстрактов в указанном диапазоне концентраций.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках инициативного проекта НИОКТР “Получение и исследование экстрактов растений, и установление влияния их химического состава на биологическую активность” (AAAA-A20-120011590047-2).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описаний исследований с использованием животных или людей в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александрова О.И., Околов И.Н., Тахтаев Ю.В., Хорольская Ю.И., Хинтуба Т.С., Блинова М.И. 2015. Сравнительная оценка цитотоксичности антимикробных глазных капель. Офтальмол. ведомости. № 1. С. 89. (Aleksandrova O.I., Okolov I.N. Takhtaev Y.V., Khorolskaya J.I., Hintuba T.S. Blinova M.I. 2015. A comparative evaluation of antimicrobial eye drops cytotoxicity. Ophthalmology J. № 1. P. 89.)
- Андреева В.Ю., Калинкина Г.И. 2000. Разработка методики количественного определения флавоноидов в манжетке обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L.S.L. Химия растительного сырья. № 1. С. 85. (Andreeva V.V., Kalinkina G.I. 2000. Development methods of quantitative determination of flavonoids in the common cuff *Alchemilla vulgaris* L.S.L. Chemistry of Vegetable Raw Materials. № 1. P. 85.)

- Аникина Л.В., Пухов С.А., Дубровская Е.С., Афанасьева С.В., Ключков С.Г. 2014. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и резазурина. Фундаментальные исследования. № 12 (часть 7). С. 1423. (Anikina L.V., Pukhov S.A., Dubrovskaya E.S., Afanasiev S.V., Klochkov S.G. 2014. Comparative determination of cell viability using MTT and resazurin. Fundamental Research. № 12 (part 7). P. 1423.)
- Анисимова М.М., Куркин В.А., Ежков В.Н. 2010. Качественный и количественный анализ флавоноидов травы гречихи посевной. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Т. 12. № 1(8). С. 2011. (Anisimova M.M., Kurkin V.A., Ezhkov V.N. 2010. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of buckwheat grass. Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. V. 12. № 1(8). P. 2011.)
- Гринёв В.С., Широков А.А., Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Курчатова М.Н., Дурнова Н.А., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н. 2015. Полифенольные соединения новой биологически активной композиции из цветков бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench). Химия растительного сырья. № 2. С. 177. (Grinyov V.S., Shirokov A.A., Navolokin N.A., Polukonova N.V., Kurchatova M.N., Durnova N.A., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N. 2015. Polifenol'nye soedineniya novej biologicheski aktivnoj kompozicii iz cvetkov bessmertnika peschanogo. Himiya Rastitel'nogo Syr'ya. № 2. P. 177.)
- Ефимов С.Н., Дмитрук С.И., Ильинских Н.Н. 2004. Антимутagenная активность лекарственных растений Сибирского региона. Бюллетень сибирской медицины. № 3. С. 17. (Efimov S.N., Dmitruk S.I., Ilyinskikh N.N. 2004. Antimutagenic activity of medicinal plants of the Siberian region. Bulletin of Siberian Medicine. № 3. P. 17.)
- Иксанова А.Г., Бондарь О.В., Балакин К.В. 2016. Методы исследования цитотоксичности при скрининге лекарственных препаратов. Казань: Казанский университет. 40 с. (Iksanova A.G., Bondar O.V., Balakin K.V. 2016. Methods of cytotoxicity research in drug screening. Kazan: Kazan University. 40 p.)
- Калашишникова Е.А., Киракосян Р.Н., Зайцева С.М. 2019. Цитотоксичность и фунгицидная активность экстрактов, полученных из растений ашваганды и астрагала в условиях *in vitro*. Актуальные вопросы ветеринарной биологии. № 2(42). С. 57. (Kalashnikova E.A., Zaytseva S.M., Kirakosyan R.N. Topical Issues of Veterinary Biology. № 2(42). P. 57.)
- Камалова Я.Н., Карамова Н.С., Зеленихин П.В., Абдул-Хафиз И., Ильинская О.Н. 2019. Растительное сырье как потенциальный источник противоопухолевых агентов. Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. № 3. (Kamalova Ya.N., Karamova N.S., Zelenikhin P.V., Abdul-Hafiz E.Y., Ilyinskaya O.N. 2019. Plant materials as a potential source of antitumor agents. Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki. V. 161. № 3. P. 385.)
- Купчак Т.В., Николаева Л.О., Шимолина Л.Л. 1995. Выделение и идентификация антоцианов из гибридной кукурузы. Фармацевтический журн. № 6. С. 62. (Kupchak T.V., Nikolaeva L.O., Shimolina L.L. 1995. Isolation and identification of anthocyanins from hybrid Maize. Pharmacy. J. V. 6. P. 62.)
- Куркин В.А. 2007. Фармакогнозия: учебник для фармацевтических вузов (факультетов). Самара: ООО "Офорт" СамГМУ. 1239 с. (Kurkin V.A. 2007. Pharmacognosy: a textbook for pharmaceutical universities (faculties). Samara: LLC "Etching" Samara State Medical Univ. 1239 p.)
- Машурчак Н.В., Кашин А.С., Игнатов В.В. 2009. Зависимость состава флавоноидного комплекса *Helichrysum arenarium* (L.) Moench от условий произрастания в Саратовской области. Поволжский экологический журнал. № 1. С. 54. (Mashurchak N.V., Kashin A.S., Ignatov V.V. 2009. Dependence of the composition of the flavonoid complex *Helichrysum arenarium* (L.) Moench on the vegetation conditions in the Saratov region. Povolzhskiy J. Ecol. V. 1. P. 54.)
- Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А. 2013. Морфология внутренних органов и опухоли лабораторных крыс с перевитым раком печени РС-1 при пероральном введении флавоноидсодержащих экстрактов аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) и кукурузы антоциановой (*Zea mays* L.). Саратовский научно-медицинский журн. Т. 9. № 2. С. 213. (Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnova N.A. 2013. Internal organs morphology and tumors in laboratory rats with transplanted liver cancer PC-1 by oral introduction containing extract of gratiola (*Gratiola officinalis* L.) and anthocyan maize (*Zea mays* L.). Saratov Journal of Medical Scientific Research. V. 9. № 2. P. 213.)
- Полуконова Н.В., Дурнова Н.А., Курчатова М.Н., Наволокин Н.А., Голиков А.Г. 2013. Химический анализ и способ получения новой биологически активной композиции из травы аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.). Химия растительного сырья. № 4. С. 165. (Polukonova N.V., Durnova N.A., Kurchatova M.N., Navolokin N.A., Golikov A.G. 2013. Chemical analysis of the new biological active composition from medicative herb hedge-hissop (*Gratiola officinalis* L.). Chemistry of Plant Raw Materials. № 4. P. 165.)
- Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Дурнова Н.А., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б. 2012. Способ получения сухого экстракта из растительного сырья, обладающего биологической активностью. Патент на изобретение № 2482863. (Polukonova N.V., Navolokin N.A., Durnova N.A., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B. 2012. A method of obtaining a dry extract from vegetable raw materials with biological activity. Patent for invention № 2482863.)
- Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Полуконова А.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н. 2019. Средство, обладающее избирательным действием на опухолевые клетки, активирующее их апоптоз и препятствующее формированию их резистентности. Патент № 2694547 РФ. (Polukonova N.V., Navolokin N.A., Mudrak D.A., Polukonova A.V., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N. 2019. A drug that has a selective effect on tumor cells, activates their apoptosis and prevents the formation of their resistance. Patent № 2694547 of the Russian Federation.)

- Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Райкова С.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А., Шуб Г.М. 2015. Противовоспалительная, жаропонижающая и антимикробная активность флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.). Экспериментальная и клиническая фармакология. Т. 78. № 1. С. 34. (Polukonova N.V., Navolokin N.A., Raikova S.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnovan N.A., Shub G.M. 2015. Anti-inflammatory, antipyretic and antimicrobial activity of flavonoid-containing extract of *Gratiola officinalis* L. Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology. V. 78. № 1. P. 34.)
- Прилепский А.Ю., Дроздов А.С., Богатырев В.А., Староверов С.А. 2019. Методы работы с клеточными культурами и определение токсичности наноматериалов. СПб: Университет ИТМО, 43 с. (Prilepsky A.Yu., Drozdov A.S., Bogatyrev V.A., Staroverov S.A. 2019. Methods of working with cell cultures and determining the toxicity of nanomaterials. St-Petersburg: ITMO. 43 p.)
- Романова М.А., Додонова А.Ш. 2016. Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток. Молодой ученый. № 18(122). С. 110. (Romanova M.A., Dodonova A.Sh. 2016. Study of cytotoxicity of biologically active compounds in cell culture. A Young Scientist. № 18(122). P. 110.)
- Стефанова В.Н., Ярцева Н.М., Петров А.В. 2015. Сравнительный цитогенетический анализ монослойной и суспензионной линий клеток яичника китайского хомячка CHO<sup>DHFR</sup>-. Цитология. Т. 57. № 7. С. 491. (Stefanova V.N., Yartseva N.M., Petrov A.V. 2015. Comparative cytogenetic analysis of monolayer and suspension chinese hamster ovary cell lines CHO<sup>DHFR</sup>-. Tsitologiya. V. 57. № 7. P. 491.)
- Торшин И.Ю., Громова О.А., Лиманова О.А. 2015. Систематический анализ состава и механизмов молекулярного воздействия стандартизированных экстрактов *Vitex agnus-castus*. Трудный пациент. Т. 13. № 1–2. С. 19. (Torshin I.Yu., Gromova O.A., Limanova O.A. 2015. Systematic analysis of composition and molecular mechanisms of action of the *Vitex agnus-castus* standardized extracts. Difficult Patient. V. 13. № 1–2. P. 19.)
- Яковлев Д.С., Султанова К.Т., Золотова Е.А., Гасайниева А.Г., Спасов А.А. 2020. Оптимизация МТТ-теста для определения цитотоксичности новых химических соединений на клеточной линии MCF-7. Волгоградский научно-медицинский журнал. № 1. С. 58. (Yakovlev D.S., Sultanova K.T., Zolotova E.A., Gasainieva A.G., Spasov A.A. 2020. Optimization of MTT assay for evaluation of cytotoxicity of new chemical compounds on MCF-7 cell line. Volgograd J. Medical Research. № 1. P. 58.)
- Bernas T., Dobrucki J.W. 2000. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. Arch. Biochem. Biophys. V. 380. P. 108.
- Böhmer R.M. 1979. Flow cytometric cell-cycle analysis using the quenching of 33258 Hoescht fluorescence by bromodeoxyuridine incorporation. Cell Tissue Kinet., V. 12. P. 101.
- Davis P.K., Ho A., Dowdy S.F. 2001. Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. Biotechniques. V. 30. P. 1322, 1328, 1330-1. <https://doi.org/10.2144/01306rv01>
- Kanevskii M.V., Grinev V.S., Shirokov A.A., Belyachenko Y.A., Polukonova N.V., Navolokin N.A., Bucharskaya A.B., Durnova N.A., Maslyakova G.N. 2020. Comparative spectroscopic and hplc analyses of phenolic compounds in extracts of anthocyanin maize purple Saratov variety grown under various wetting conditions. Pharmacol Chem. J. V. 54. P. 279.
- Loken M.R., Shah V.O., Dattilio K.L., Civin C.I. 1987. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I-normal erythroid development. Blood. V. 69. P. 255.
- Manayi A., Nabavi S.M., Setzer W.N., Jafari S. 2018. Piperine as a potential anti-cancer agent: A review on preclinical studies. Curr. Med. Chem. V. 25. P. 4918. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170523120656>
- Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnova N.A. 2012. Effect of extracts of *Gratiola officinalis* and *Zea mays* on the tumor and the morphology of the internal organs of rats with trasplanted liver cancer. Russian Open Medical J. V. 1. P. 0203.
- Polukonova N.V., Navolokin N.A., Bucharskaya A.B., Mudrak D.A., Baryshnikova M.A., Stepanova E.V., Solomko E.S., Polukonova A.V., Maslyakova G.N. 2018. The apoptotic activity of flavonoid-containing *Gratiola officinalis* extract in cell cultures of human kidney cancer. Russian Open Medical J. V. 7. P. e0402.
- Rosen B.H., Chanson M., Gawenis L.R., Liu J., Sofoluwe A., Zoso A., Engelhardt J.F. 2018. Animal and model systems for studying cystic fibrosis. J. Cyst. Fibros. V. 17. P. S28. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.09.001>
- Salmataj S.A., Kamath S.U., Murty V.R., Pai S.R. 2018. Amelioration of arsenic-induced oxidative stress in CHO cells by *Ixora coccinea* flower extract. Biotech. V. 8. P. 446. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1446-1>
- Sánchez-Lamar A., Fiore M., Cundari E., Ricordy R., Cozzi R., DeSalvia R. 1999. *Phyllanthus orbicularis* aqueous extract: cytotoxic, genotoxic, and antimutagenic effects in the CHO cell line. Toxicol. Appl. Pharmacol. V. 161. P. 231. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8814>
- Shokrzadeh M., Azadbakht M., Ahangar N., Naderi H., SaediSaravi S.S. 2010. Comparison of the cytotoxic effects of *Juniperus sabina* and *Zataria multiflora* extracts with *Taxus baccata* extract and Cisplatin on normal and cancer cell lines. Pharmacogn. Mag. V. 6. P. 102. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.62894>
- Upadhyay S., Palmberg L. 2018. Air-liquid interface: Relevant *in vitro* models for investigating air pollutant-induced pulmonary toxicity. Toxicol. Sci. V. 164. P. 21. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy053>
- Yong C.Q.Y., Valiyaveetill S., Tang B.L. 2020. Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems. Int. J. Environ. Res. Public Health. V. 17. P. 1509. <https://doi.org/10.3390/ijerph17051509>

## Comparative Analysis of the Cytotoxic Effect of Flavonoid-Containing Plant Extracts on the CHO Cell Line

M. N. Kurchatova<sup>a,\*</sup>, A. C. Fomin<sup>b</sup>, A. A. Shirokov<sup>a,b</sup>, and N. A. Durnova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov, 410012 Russia

<sup>b</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia

\*e-mail: kurchatova.marya@yandex.ru

Using the MTT test, different viability and metabolic activity of the multi-layered CHO cell line was established when exposed to extracts of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, *Gratiola officinalis* L., *Zea mays* L. The use of extracts in concentrations from 50 to 250 µg/ml resulted in an increase in the number of viable cells (up to  $86.0 \pm 8.2\%$ ) and stimulated their metabolic activity (up to  $196.1 \pm 8.8\%$ ). The use of extracts in concentrations from 500 to 2000 µg/ml resulted in a decrease in the number of viable cells (up to complete cell death) and inhibition of metabolic activity (up to  $13.4 \pm 11.3\%$ ). The studied plant extracts of *Helichrysum arenarium*, anthocyanin form of *Zea mays* and *Gratiola officinalis* showed different effects on healthy cells, depending on the concentration used.

**Keywords:** CHO, cytotoxicity, MTT test, *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, *Gratiola officinalis* L., *Zea mays* L.

## ПОВРЕЖДЕНИЯ СРЕДНЕЙ КИШКИ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ НОЗЕМОЙ

© 2021 г. Е. К. Еськов<sup>1</sup>, \*, М. Д. Еськова<sup>1</sup>, А. С. Роженков<sup>1</sup>, Е. В. Шестакова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Аналитическая лаборатория экологического мониторинга Российского государственного аграрного заочного университета, Балашиха, Московской обл., 143900 Россия

\*E-mail: ekeskov@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.04.2021 г.

После доработки 30.05.2021 г.

Принята к публикации 08.06.2021 г.

К тенденции массовой гибели пчелиных семей, наметившейся в последние годы, имеет отношение заражение пчел микроспоридиями *Nosema apis* Zander (1909). Эти одноклеточные организмы, проникнув в желудочно-кишечный тракт, разрушают слизистую оболочку средней кишки, что проявляется в деградации эпителиальных клеток. За счет выраженного внутриклеточного отека эпителиоциты слизистой оболочки увеличиваются в объеме, приобретая округло-овальную форму, а в цитоплазме появляется характерная базофильная зернистость. При этом исчезают пищеварительные вакуоли, ядра клеток становятся гиперхромными и отчасти пикнотическими. Камбиальные клетки в желудке больных пчел визуальны не выявляются, а перитрофическая мембрана утрачивается. Отмечается неравномерность длины пищеварительных желез, что обуславливается десквамацией и преждевременной гибелью секреторных клеток. Деструкция эпителиальных клеток средней кишки и утрата перитрофической оболочки приводит к значительному снижению эффективности или полной утрате трофической функции, что приводит к гибели пчел от голода.

**Ключевые слова:** медоносная пчела, средняя кишка, *Nosema apis*, деградация клеток, микроспоридии

**DOI:** 10.31857/S0041377121040118

В последние годы во всем мире отмечается массовая гибель пчелиных семей (“коллапс пчел”). Причины их гибели не имеют убедительного объяснения (Currie et al., 2010; Dainat et al., 2012; Ильясов и др., 2017). В качестве наиболее вероятных причин рассматривается техногенное загрязнение, включающее электромагнитные излучения и токсичные химические вещества (Еськов, Еськова, 2019), а также патогенное воздействие экзо- и эндогенных паразитов (Сотников, Гробов, 2003).

Возрастающую угрозу для медоносной пчелы *Apis mellifera* L. (1758) представляет нозематоз. Его вызывают одноклеточные организмы (протисты), родственные грибам (Eckert et al., 2008), – микроспоридии вида *Nosema apis* Zander (1909) и *Nozema ceranae*, паразитирующие в эпителиальных клетках средней кишки взрослых рабочих пчел, маток и трутней. Заражение насекомых происходит спорами паразита. Споры *N. apis* поступают в пищеварительный тракт с кормом и, оказавшись в средней кишке, проникают в клетки, где и проходит полный цикл развития паразита. *N. apis*, разрушая клетки желудка пчел, приводит к понижению жизнеспособности и (или) гибели всей пчелиной семьи (Гробов, Лихотин, 2003; Fries, 1993). Помимо пчел, микроспоридии, обладая широким видовым разнообразием, паразитируют на животных многих других видов, относящихся к разным таксономическим группам (Соколова, 2009).

В задачу настоящего исследования входило изучение гистологических изменений стенки средней кишки медоносных пчел, зараженных *N. apis*, поскольку именно нарушения функций пищеварительной системы влияют на жизнеспособность пчелиных семей.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования выполняли в конце весны–начале лета 2020 г. на двух генетически сходных группах пчел, каждая из которых содержала по пять семей. В одной группе находились здоровые семьи, в другой – больные нозематозом. Косвенным признаком, указывавшим на то, что семьи второй группы больны нозематозом, являлось наличие множества пятен экскрементов на стенках ульев и сотах.

Поскольку диарея могла быть связана с потреблением некачественного корма, для уточнения причины диареи и выявления спор ноземы, от каждой семьи отбирали по 30 пчел. У каждой пчелы извлекали пищеварительный тракт, отделяли среднюю кишку и растирали ее с небольшим количеством воды в чашке Петри. Полученную каплю суспензии наносили на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и проводили микроскопический анализ при 400-кратном увеличении в слегка затененном поле (Макаров, 2010). Признаком заражения пчелы

*N. apis* являлось наличие в гомогенате средней кишки спор овальной формы.

Для гистологического исследования средней кишки (желудка) у здоровых пчел и пчел, пораженных *N. apis*, извлекали желудочно-кишечный тракт и вычленили из него среднюю кишку (желудок). Материал помещали в кассеты для гистологической проводки, раздельно фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине в течение 24 ч, а затем 2 ч промывали в дистиллированной воде. Зафиксированный и промытый от формалина материал при комнатной температуре дегидратировали в водных растворах этилового спирта возрастающей концентрации, обеспечивая постоянное перемешивание растворов в автоматизированной системе гистологической проводки Chandon Citadel 2000. Затем препараты пропитывали парафином в том же автоматическом гистологическом процессоре.

Пропитанные парафином части средней кишки помещали в металлические формы для изготовления парафиновых блоков, заливали жидким парафином и прижимали кассетой, после чего материал охлаждался до комнатной температуры. Из полученных таким способом парафиновых блоков с помощью ручного роторного микротома Accu-Cut Srm получали гистологические срезы толщиной 4 мкм. Депарафинирование, окраску гематоксилин-эозином и ламинирование защитной пленкой гистологических препаратов проводили в модульной автоматической системе Tissue-Tek Film.

Готовые гистологические препараты исследовали с помощью оптического микроскопа Leica DM 4000 В с объективами 20× и 40×, и окуляром 10×. Микросъемку проводили с помощью компьютерного приложения Leica Application Suite.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В норме средняя кишка медоносной пчелы представляет собой полый складчатый орган, в стенке которого при гистологическом исследовании выделяются три структурно-функциональных отдела (рис. 1а): наружный мышечный слой, слизистая оболочка и перитрофическая мембрана (оболочка). Наружный слой образован поперечно-полосатой мышечной тканью (рис. 1а, 1), представленной клетками вытянутой формы с заметной поперечной исчерченностью. Клетки содержат по одному овальному ядру. Мышечные клетки, расположены слоями в кольцевом, косом и продольном направлениях.

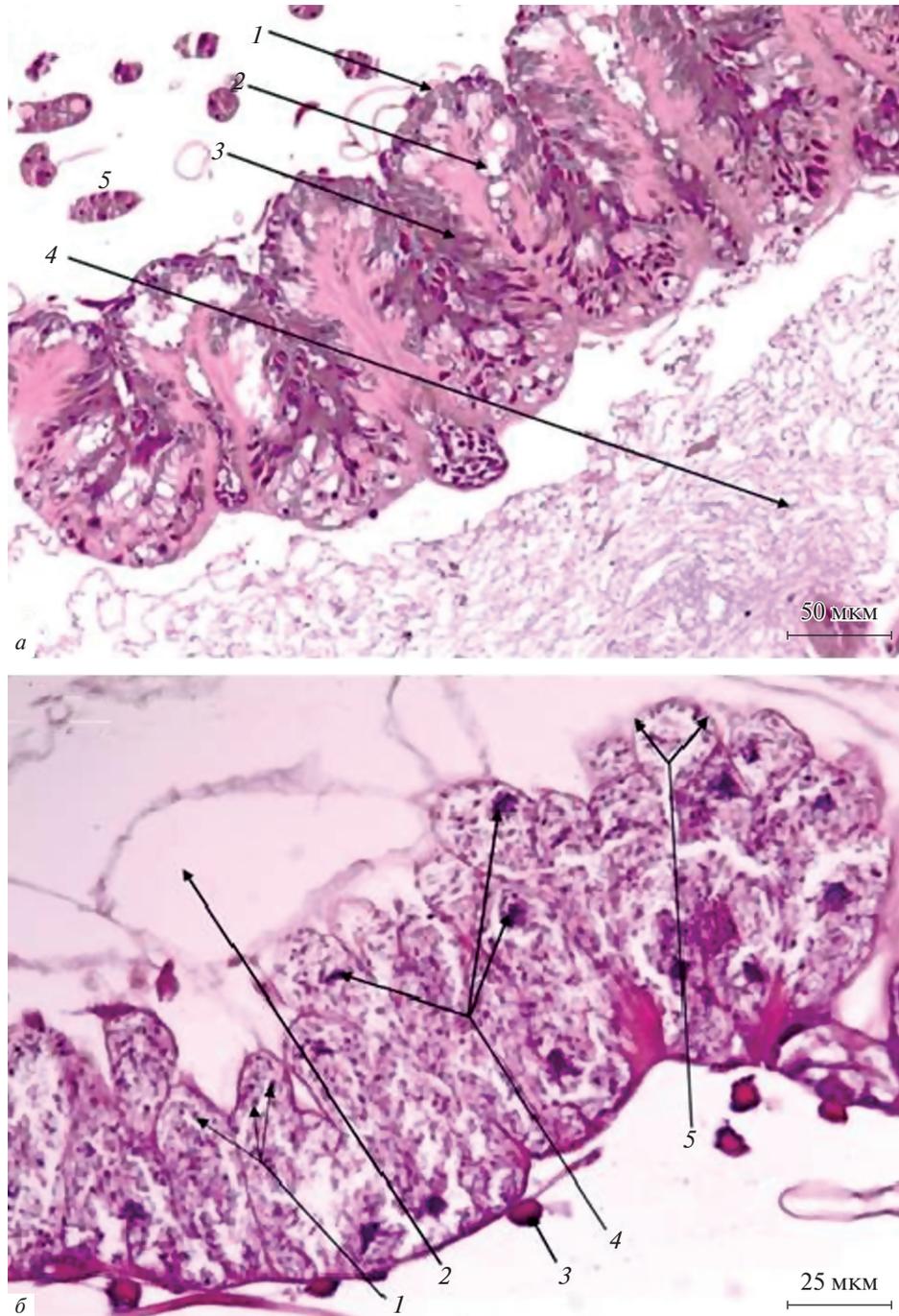
С внутренней стороны к мышечному слою прилежит неоднородная по клеточному составу слизистая оболочка (рис. 1а, 3), сужающаяся от передней к задней части кишки. Слизистая оболочка отделяется от мышечного слоя тонкой базальной мембраной, выполняющей опорную, трофическую, барьерную и другие функции.

Структурно-функциональной единицей слизистой оболочки является простая трубчатая железа, образованная одним слоем специализированного столбчатого (цилиндрического) эпителия. Большая его часть представлена секреторными светлыми вытянутыми клетками с нечеткими контурами, содержащими пищеварительные вакуоли (рис. 1а, 2). Более темные, базофильные, мелкие эпителиоциты, расположенные в базальных отделах железистых крипт, являются, вероятно, камбиальными клеточными элементами, способными к делению и дифференцировке в секреторные клетки.

Пищеварительная секреция осуществляется путем увеличения в размерах внутрицитоплазматических вакуолей, которые в дальнейшем сливаются между собой, образуя один или два крупных пузырька. Впоследствии, клеточная мембрана разрушается и секреторное содержимое, вместе с разрушенными частями клеток, попадает в просвет средней кишки.

Трофический субстрат, находящийся в желудке, обволакивает и отделяет от слизистой оболочки перитрофическая мембрана (рис. 1а, 4), предохраняющая эпителиоциты слизистой оболочки от разрушения. Она представляет собой слой слизи, включающей фрагменты разрушенных клеточных элементов, образовавшихся в результате голокриновой секреции. Через перитрофическую мембрану проникает пищеварительный секрет, а питательные вещества поступают к эпителиальному слою.

У пчел, пораженных *N. apis*, выраженные изменения происходят в пределах слизистой оболочки средней кишки и не затрагивают другие отделы пищеварительного тракта. На малых увеличениях наблюдается некоторое сглаживание складок кишечной стенки (рис. 1б), что возможно связано с выраженным внутриклеточным отеком и увеличением в объеме эпителиоцитов слизистой оболочки. Повышенная десквамация секреторных клеток, связанная с их ускоренной гибелью, приводит к возникновению неравномерности толщины слизистой оболочки. В некоторых участках отмечается отсутствие железистых крипт, вплоть до базальной мембраны. На больших увеличениях прослеживается изменение размеров секреторных клеток. Они увеличиваются в поперечном сечении (с 8–15 мкм в норме до 16–26 мкм при поражении ноземой). При этом в светлой, слабо эозинофильной цитоплазме обнаруживаются многочисленные округлые и овальные базофильные зерна размером от 1 до 5 мкм. Ядра эпителиоцитов выглядят гиперхромными, местами пикнотичными (рис. 1б, 4). Секреторных вакуолей в пораженных клетках не обнаруживается. Камбиальные клетки в слизистой оболочке желудков пчел, пораженных *N. apis*, визуально не определяются. В желудках таких пчел полностью утрачивается перитрофическая мембрана.



**Рис. 1.** Гистологическая организация стенки средней кишки пчел в норме и при поражении нозематозом. *a* – Гистологический препарат средней кишки здоровой пчелы. Обозначения: 1 – клетки мышечного слоя, 2 – пищеварительные вакуоли эпителиальных клеток, 3 – эпителиальные клетки слизистой оболочки, 4 – перитрофическая мембрана, 5 – мальпигиев сосуд. Ув. об.: 20×. *б* – Гистологический препарат средней кишки пчелы, пораженной нозематозом. Обозначения: 1 – набухшие эпителиальные клетки, со светлой цитоплазмой, содержащие споры *Nozema apis*, 2 – отсутствие перитрофической мембраны, 3 – поперечнополосатая мышечная клетка, 4 – гиперхромные и пикнотичные ядра эпителиальных клеток, 5 – увеличенный в объеме эпителиоцит слизистой оболочки со светлой зернистой цитоплазмой. Увел. об. 40×.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Споры ноземы, оказавшиеся в средней кишке пчелы, проникают в клетки путем прокола их оболочек и вступают во внутриклеточную фазу развития

(Исси, Токарев, 2002; Исси и др., 2005). Размножение *N. apis* в пораженных эпителиоцитах слизистой оболочки приводит к увеличению численности паразитов в цитоплазме, что порождает дегенератив-

но-дистрофические изменения в клетках и развитие внутриклеточного отека. Секреторные клетки увеличиваются в объеме, а цитоплазма на гистологических препаратах приобретает светлую, слабо эозинфильную окраску с наличием базофильных зерен округлой и овальной формы. На нарушение секреторной функции эпителиоцитов указывает отсутствие пищеварительных вакуолей и перитрофической мембраны. В норме формирование перитрофической мембраны связано с секреторной функцией эпителиоцитов и последующей голокриновой секрецией. В клетках слизистой оболочки желудка пчелы, пораженной *N. apis*, секреторные процессы прекращаются. По этой причине перитрофическая мембрана не может формироваться и не обнаруживается на гистологических препаратах.

Деструкция перитрофической оболочки, выполняющей функцию фильтра, пропускающего к стенкам желудка продукты полного расщепления пищевых веществ — аминокислот, моносахаридов и др. (Peters, 1968; Тыщенко, 1976), нарушает трофическую функцию. Пчелы лишаются возможности потребления цветочной пыльцы — важного компонента, обеспечивающего их протеинами и липидами. Без этого пчелы не могут продуцировать маточное молочко, необходимое для выкармливания расплода (Асафова и др., 2001). Поэтому численность рабочих особей в семье, пораженной микроспоридиями *N. apis*, неуклонно уменьшается.

Продолжительность развития в организме пчелы одной генерации *N. apis* при благоприятной для них температуре (20–30°C) происходит за 3–4 сут (Buhlmann, 1998), а голодные пчелы выживают в течение 5–6 сут (Еськов, 1995), поэтому генерация паразитов успевает завершить развитие в живой пчеле. Образующиеся споры выделяются в окружающую среду с экскрементами. Интенсификации их выделения и распространения способствует диарея, стимулируемая *N. apis*.

Широкое распространение нозематоза, наряду с другими заболеваниями и загрязнением кормовых участков пчел токсическими элементами вносит свой вклад в отмечаемую в последние десятилетия массовую гибель пчелиных семей (Currie et al., 2010; Dainat et al., 2012; Ильясов и др., 2017). Уменьшение продолжительности жизни трутней и маток происходит отчасти под непосредственным воздействием *N. apis* и опосредованно — под влиянием заражения и снижение жизнеспособности рабочих пчел. У них нарушение пищеварения лишает возможности секреции маточного молочка, необходимого для выкармливания расплода всех трех каст медоносной пчелы. Связанное с этим недоразвитие маток и трутней отражается на снижении их жизнеспособности и воспроизводительной функции (Rhodes, 2011; Гулов и др., 2015). По причине физиологического недоразвития маток, выращенных в семьях больных нозематозом, их замена происходит в первые месяцы жизни

(Anderson, 2004). Подобное явление отмечается, если матки на стадии куколки развиваются при пониженной температуре (Еськов, Торопцев, 1979).

На основании проведенных гистологических исследований установлено, что основная причина гибели пчел, зараженных *N. apis*, обуславливается деструкцией эпителиальных клеток средней кишки и утратой ею перитрофической оболочки, что приводит к нарушению пищеварения. Поэтому предлагаемые при нозематозе белково-углеводные подкормки пчелиных семей (Гробов, Лихотин, 2003) не могут иметь ни лечебного, ни профилактического значения. В отсутствие же эффективных лечебных препаратов пчеловодам остается лишь строго соблюдать профилактические меры — изолировать здоровые семьи от больных, заменять в них кормовые и расплодные соты на обеззараженные, дезинфицировать ульи и пчеловодный инвентарь. Вероятно, в некоторых критических ситуациях биологически целесообразно уничтожать семьи, сильно ослабленные прогрессирующей экспансией паразита.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по заказу Министерства сельского хозяйства РФ за счет средств Федерального бюджета (ЕГИСУ НИОКР № АААА-А20-120031090047-5).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием позвоночных животных в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Асафова Н.Н., Орлов Б.Н., Козин Р.Б. 2001. Физиологически активные продукты пчелиной семьи. Нижний Новгород: изд. Ю.А. Николаев. (Asafova N.N., Orlov B.N., Kozin R.B. 2001. Physiologically active products of the bee family. Nizhny Novgorod: ed. Yu.A. Nikolaev).
- Гробов О.Ф., Лихотин А.К. 2003. Болезни и вредители пчел. М.: Мир. Колос. (Grobov O.F., Likhotin A.K. 2003. Diseases and pests of bees. M.: Mir. Kolos).
- Гулов А.Н., Бородачев А.В., Березин А.С. 2015. Возраст трутней и качество спермы. Пчеловодство. № 9. С. 24. (Gulov A.N., Borodachev A.V., Berezin A.S. 2015. Drone age and sperm quality. Beekeeping. № 9. P. 24.)
- Еськов Е.К. 1995. Экология медоносной пчелы. Рязань: Русское слово. (Eskov E.K. 1995. Ecology of the Honey Bee. Ryazan: Russian word).
- Еськов Е.К., Еськова М.Д. 2019. Критические уровни накопления свинца и кадмия в теле пчел (*Apis mellifera* L.), модифицирующие их поведение. Успехи совр. биол. № 2. С. 178. (Eskov E.K., Eskova M.D. 2019. Critical levels of accumulation of lead and cadmium in the body of bees

- (*Apis mellifera* L.), modifying their behavior. *Advances in Modern Boil.* № 2. P. 178.)
- Еськов Е.К., Торопцев А.И. 1978. Микроклимат пчелиного гнезда как фактор, влияющий на развитие маток. *Журн. общ. биологии.* Т. 39. № 2. С. 262. (Eskov E.K., Toroptsev A.I. 1978. Microclimate of a bee's nest as a factor affecting the development of queens. *Zhurn. Gen. Biology.* Т. 39. № 2. P. 262.)
- Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. 2017. Семь причин смертности семей пчелы *Apis mellifera* в России. *Пчеловодство.* № 9. С. 10. (Ilyasov R.A., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. 2017. Seven causes of mortality of families of *Apis mellifera* bees in Russia. *Beekeeping.* № 9. P. 10.)
- Исси, И.В., Токарев Ю.С. 2002. Влияние микроспоридий на гормональный баланс насекомых. *Паразитология.* Т. 36. С. 405. (Issi I.V., Tokarev Yu.S. 2002. Influence of microsporidia on the hormonal balance of insects. *Parasitology.* V. 36. P. 405.)
- Исси И.В., Долгих В.В., Соколова Ю.Я., Токарев Ю.С. 2005. Факторы патогенности микроспоридий – внутриклеточных паразитов насекомых. *Вестн. сельскохозяйственной науки.* № 3. С. 17 (Issi I.V., Dolgikh V.V., Sokolova Yu.Ya., Tokarev Yu.S. 2005. Factors of pathogenicity of microsporidia – intracellular parasites of insects. *Bul. Agricult. Sci.* № 3. P. 17.)
- Макаров С.Г. 2010. Пораженность пчел варроатозом и нозематозом в Республике Марий Эл. *Пчеловодство.* № 8. С. 2. (Makarov S.G. 2010. Infestation of bees with varroaosis and nosematosis in the Republic of Mari El. *Beekeeping.* № 8. P. 2.)
- Сотников А.Н., Гробов О.Ф. 2003. Причины гибели пчел. *Пчеловодство.* № 7. С. 30. (Sotnikov A.N., Grobov O.F. 2003. Causes of death of bees. *Beekeeping.* № 7. P. 30.)
- Соколова Ю.Я. 2009. Происхождение микроспоридий и их положение в системе эукариот. *Микол. и фитопатология.* № 3. С. 177. (Sokolova Yu.Ya. 2009. The origin of microsporidia and their position in the eukaryotic system. *Mycol. and Phytopathology.* № 3. P. 177.)
- Тыщенко В.П. 1976. Основы физиологии насекомых. Изд-во Ленинградского ун-та.
- Anderson D.L. 2004. Improving queen bee production. *Publication. No. 04/153, Rural Industries Research and Development Corporation.* Canberra, Australia. 16 p.
- Buhlmann G. 1998. *Nosema.* Schweiz. Bienen-Ztg. № 4. P. 177.
- Currie R.W., Pernal S.F., Guzman-Novoa E. 2010. Honey bee colony losses in Canada. *J. Apicult. Res.* V. 49. P. 104.
- Dainat B., Vanengelsdorp D., Neumann P. 2012. Colony collapse disorder in Europe. *Env. Microbiol. Rep.* V. 4. P. 123.
- Eckert J., Friedhoff K.T., Zahner H., Deplazes P. 2008. *Lehrbuch der parasitologie für die tiermedizin (German).* 2nd Ed., Georg Thieme. 140 p.
- Fries I. 1993. *Nosema apis* – a parasite in the honey bee colony. *Bee World.* V. 74. P. 5.
- Peters W. 1968. Vorkommen, zusammensetzung und feinstruktur peritrophischen membranen in tierreich. *Zeit. Morphol. Oeool. Tiere.* V. 62. P. 9.
- Rhodes J., Harden S., Spooner-Hart R., Anderson D., Wheen G. 2011. Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. *Apidologie.* V. 42. P. 29.

## Damage to the Honey Bee's Midgut Caused by *Nosema*

E. K. Eskov<sup>a,\*</sup>, M. D. Eskova<sup>a</sup>, A. S. Rozhenkov<sup>a</sup>, and E. V. Shestakova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Analytical Laboratory for Environmental Monitoring in Russian State Agrarian Correspondence University, Balashikha, 143900 Russia

\*e-mail: ekeskov@yandex.ru

Infection of bees with the microsporidium *Nosema apis* Zander (1909) causes the mass mortality of bee colonies, which has emerged in recent years. Penetrating into the gastrointestinal tract, *Nosema* destroys the walls of the midgut. The damage is expressed in the degradation of the epithelial cells of the mucosa. At the same time, there is an increase in the volume of round and polygonal epithelial cells, their cytoplasm acquires basophilic granularity, the digestive vacuoles disappear, and the cell nuclei become hypochromic and some demonstrate signs of pyknosis. The c,ambial cells in the stomach of sick bees are not detected, and the peritrophic membrane is completely lost. Unevenness along the length of the digestive glands is manifested, which is due to the desquamation of secretory cells. Destruction of the midgut cells and the loss of the peritrophic membrane, almost or completely, deprive the bees of their trophic function, which led to their elimination caused by hunger.

**Keywords:** honey bee, midgut, *Nosema apis*, cell degradation, microsporidia

УДК 577.12.96

## РАЗЛИЧИЯ ПРЕВРАЩЕНИЯ ГИСТИДИНА У ЧЕЛОВЕКА И ДРУГИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2021 г. А. В. Малиновский\*

Санкт-Петербургский филиал “ЭПМ” ФМБА России – СКТБ Биофизприбор, Санкт-Петербург, 197183 Россия

\*E-mail: malinovskiy.andrey@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.04.2021 г.

После доработки 04.05.2021 г.

Принята к публикации 07.05.2021 г.

Принято считать, что превращения аминокислот, входящих в состав природных белков, идентичны у человека и животных. Поэтому деление аминокислот на незаменимые и заменимые во многом совпадает у животных и человека. Но есть две аминокислоты, обмен которых существенно отличается даже у млекопитающих и человека: треонин и гистидин. Причем если у всех других млекопитающих треонин необратимо распадается двумя путями, то у человека – только одним, и это никак не отражается на незаменимости треонина. Что же касается гистидина, то особенности его обмена у человека приводят к тому, что гистидин является заменимой аминокислотой у здорового взрослого человека в отличие от подавляющего большинства млекопитающих. В настоящей работе описываются особенности превращения гистидина у человека и других млекопитающих с объяснением парадоксальной на первый взгляд заменимости гистидина для человека, что необходимо учитывать при составлении рациона.

**Ключевые слова:** гистидин, млекопитающие, человек

DOI: 10.31857/S0041377121040076

Хорошо известно, что белки необходимы для питания человека и животных. Биологическая ценность белка определяется его аминокислотным составом. Одни аминокислоты – незаменимые – не синтезируются в организме при их отсутствии в пище, тогда как другие – заменимые – в аналогичном случае могут синтезироваться в организме. Восемь аминокислот (лизин, треонин, триптофан, метионин, фенилаланин, лейцин, валин и изолейцин) необходимы для всех исследованных видов животных (Майстер, 1961). Но превращение двух аминокислот – треонина и гистидина – у человека отличается даже от других млекопитающих. Причем если разница распада треонина у людей и других млекопитающих, который у тех и других необратим, не влияет на незаменимость этой аминокислоты (Малиновский, 2019), то гистидин парадоксальным образом является незаменимой аминокислотой для большинства млекопитающих, но заменимой для здорового взрослого человека.

В настоящей работе речь идет о различиях превращений гистидина у человека и других млекопитающих, объясняющих разницу в незаменимости (заменяемости) гистидина. Поскольку до конца XX в. ни один фермент биосинтеза гистидина не был выделен из животных тканей, чаще считали, что в животном организме гистидин не синтезируется и это несмот-

ря на то, в срезах печени человека синтез гистидина был зафиксирован еще в середине XX в. (см. ниже). Правда, в литературе по биохимии человека гистидин обычно относили к заменимым аминокислотам для здоровых взрослых людей, но при этом никак не объясняли этот парадокс или выдвигали различные его версии (см. ниже). И только выделение японскими биохимиками уже в XXI веке из печени крупного рогатого скота фермента гистидинолдегидрогеназы позволяет ответить на накопившиеся вопросы. Незаменимость (заменяемость) гистидина должна учитываться при составлении кормов сельскохозяйственных животных, рационов взрослых людей и детей, а также лечебного применения этой аминокислоты при уремии и ревматоидном артрите.

**Незаменимость (заменяемость) гистидина у млекопитающих животных.** В 1937 г. Роуз с сотрудниками (Rose, 1937) путем последовательного поочередного исключения аминокислот из рациона установили, что для белых крыс незаменимыми являются 9 аминокислот, включая гистидин. Вскоре незаменимость гистидина была установлена для мыши, собаки и цыпленка (Майстер, 1961).

В учебнике по биохимии для университетов (Фердман, 1966) говорится о том, что животные способны к синтезу ряда, но далеко не всех встречаю-

щихся в них циклических соединений. Так, например, у животных не синтезируется ядро имидазола, входящее в состав гистидина.

В работе, целиком посвященной метаболизму гистидина у животных и человека, говорится о том, что аминокислота гистидин является незаменимой для большинства животных: крысы, мыши, собаки и цыпленка (Stiefel, 1971). В этой же работе приводится схема метаболизма гистидина. Здесь не имеет смысла приводить эту схему, поскольку все реакции в ней, кроме одной, катаболические. Лишь одна реакция, отражающая синтез гистидина, приведена под вопросом, возможно, потому, что в работе рассматривается метаболизм гистидина не только у животных, но и у человека (см. ниже). В работе также отмечается, что пути биосинтеза гистидина доказаны только для растений и микроорганизмов (Stiefel, 1971).

В другой работе (Ekwonwu, Eugene, 1983) рассматривается метаболизм гистидина в мозге молодых нечеловекообразных обезьян и отмечается, что при недостаточности белка в питании уровень гистидина в мозге резко возрастал. Но если в мозге при этом уровень большинства незаменимых аминокислот не падал, а фенилаланина даже возрастал, то этот факт не может говорить в пользу возможности биосинтеза гистидина в организме. Однако уровень всех других незаменимых аминокислот, в том числе фенилаланина, резко снижался в печени и плазме крови, а гистидина заметно не менялся. Нельзя также считать источником гистидина дипептид гомокарнозин, содержащийся в мозге, так как уровень гистидина в этом дипептиде также увеличивается при белковом голодании. Возможно, снижение концентрации других незаменимых аминокислот в плазме обеспечило лучшее поступление гистидина, а также фенилаланина в мозг по конкурентному механизму.

Паркер с сотрудниками (Parker et al., 1985) отмечают, что мышцы, мускулатура которых не содержит гистидинсодержащего дипептида карнозина, обнаруживают ранние признаки дефицита гистидина при отсутствии его в рационе питания, в отличие от крыс и других млекопитающих. Из этого делается вывод, что пищевой дефицит гистидина у некоторых животных хотя бы частично покрывается карнозином мышц, снижение которого при этом условии наблюдали у крыс (Clemens et al., 1978). Роль карнозина, как возможного источника гистидина в почках собаки, показана и в других работах (Fukuda, Korple, 1979; Cianciaruso et al., 1985).

Среди млекопитающих отдельного разговора заслуживают жвачные. Так, Кочанов и Иванова (1981) рассматривают белковый обмен у северных оленей и лосей и относят гистидин к заменимым аминокислотам. И только в работе XXI в. (Wadud, 2001) впер-

вые сообщается об активности в печени и почках крупного рогатого скота фермента гистидинолдегидрогеназы, окисляющей гистидинол в гистидин (схема 1).

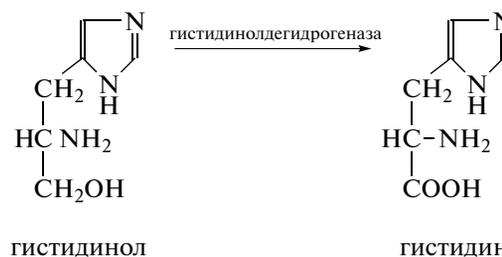


Схема 1. Окисление гистидинола в гистидин.

Причем количество гистидина, образующегося в этой реакции, полностью удовлетворяет потребность в нем у крупного рогатого скота. Отсюда делается вывод, что для крупного рогатого скота гистидин может быть заменимой аминокислотой, если достаточна продукция гистидинола из предшественников. При сравнении активности гистидинолдегидрогеназы из печени и почек крупного рогатого скота с аналогичной активностью у свиньи, не являющейся жвачным животным (Wadud, 2001), было установлено, что количество синтезируемого гистидина не может удовлетворять потребность в нем у свиньи. Из этих результатов автор сделал заключение о том, что гистидин может быть заменимой аминокислотой у крупного рогатого скота, но незаменимой у свиней (Wadud, 2001).

Другим автором показана активность гистидинолдегидрогеназы в печени, почках и мышцах крупного рогатого скота, а также свиньи, мыши, домашней птицы и дикой утки и обсуждается незаменимость гистидина у этих животных (Onodera, 2003). В работе указывается, что гистидин может не быть незаменимой аминокислотой как для растущего, так и для взрослого крупного рогатого скота, если образование гистидинола из его предшественников достаточно в органах, содержащих гистидинолдегидрогеназу — печени, почках и мышцах. В то же время автор отмечает (Onodera, 2003), что образование гистидина у телят возрастает с весом тела: у растущих телят (до 300 кг веса тела) потребность в гистидине возрастает, а у телят весом 450 кг образование гистидина в организме уже превышает потребность в нем.

Начальным продуктом синтеза гистидина в органах считают фосфорибозилпирофосфат, но при этом автор (Onodera, 2003) заявляет, что именно активность гистидинолдегидрогеназы определяет возможность синтеза гистидина *de novo*, так как этот

фермент катализирует конечный шаг в серии реакций в пути биосинтеза гистидина. У всех исследованных видов животных обнаружена гистидинолдегидрогеназа, но разной активности. Делается вывод, что эта активность и является тем самым показателем, по которому можно судить о незаменимости гистидина для того или иного вида животного (Onodera, 2003).

**Незаменимость (заменяемость) гистидина у человека.** Уже давно было показано, что гистидин не является необходимым для обеспечения азотистого равновесия у человека (Rose, 1949). Авторы работы, в которой срезы печени человека инкубировали с  $^{14}\text{C}$ -меченным формиатом, нашли вновь образованное меченое соединение, которое с помощью бумажной хроматографии было идентифицировано как гистидин (Levy, Coon, 1952).

У более 50 индивидуумов, находящихся на диете, лишенной гистидина, поддерживалось азотистое равновесие или положительный азотистый баланс (Rose et al., 1954). Таким образом, способность взрослого человека успешно обходиться без включения в пищу гистидина является общим явлением и не ограничивается случайным индивидом. Накопленные в лаборатории данные не дали достаточного основания решить, синтезируется ли гистидин клетками человека или микроорганизмами, обитающими в пищеварительном тракте. Предположение в пользу клеток человека поддерживаются упомянутыми выше наблюдениями (Levy, Coon, 1952).

Роуз в своей работе (Rose, 1957) подчеркивает совершенно неожиданное наблюдение относительно гистидина у человека: гистидин требуется всем предварительно протестированным видам млекопитающих, исключая человека, у которого гистидин не влияет на азотистый баланс, а также на физическое самочувствие. Проведенные эксперименты не дают приемлемых оснований сомневаться, что гистидин не является необходимым для поддержания азотистого равновесия у взрослого человека. Автор также пишет, что результаты дальнейших исследований должны показать, требуется ли гистидин растущему ребенку, поскольку нельзя исключить возможность того, что аминокислоты, которые не являются необходимыми для поддержания азотистого равновесия у нормальных субъектов в обычных условиях, могут становиться незаменимыми при заболеваниях, а также при таких физиологических состояниях, как репродукция или лактация (Rose, 1957). Кроме того, автор считает, что нельзя ни утверждать, ни отрицать участие кишечных микроорганизмов в синтезе гистидина, но в то же время стоит принять во внимание обнаруженное образование гистидина в срезах печени человека (Levy, Coon, 1952). К сожалению, это

количество гистидина слишком мало, чтобы его можно было полностью охарактеризовать (Rose, 1957).

Хотя многие экспериментальные животные нуждаются в ведении гистидина с пищей для роста и обеспечения азотистого равновесия, имеются данные, что у молодых здоровых людей азотистое равновесие может сохраняться и при диете, не содержащей гистидина (Stiefel, 1971). Эти данные указывают на возможность синтеза гистидина в тканях человека, но их можно толковать и иначе, например, предположить, что гистидин синтезируется при участии микрофлоры кишечника, или образуется при распаде гемоглобина (Stiefel, 1971). Однако в еще более ранней работе (Levy, Coon, 1952) доказывается возможность именно синтеза гистидина в организме человека. И не случайно в учебнике по биохимии для медицинских институтов (Штрауб, 1963) также говорится, что для человека гистидин является заменимой аминокислотой, и что не слишком продолжительное его отсутствие в пище не вызывает никаких расстройств в организме и приводится схема биосинтеза гистидина в организме человека. Утверждается, что гистидин синтезируется из гистидинола (Штрауб, 1963), и это подтверждено в недавнее время (Wadud, 2001; Onodera, 2003). При этом Штрауб (1963) приводит предполагаемую схему биосинтеза гистидина у человека из пуринового основания аденина, а пуриновые основания, как известно, синтезируются в животном организме (Фердман, 1966). Здесь не имеет смысла приводить эту схему, ибо она реализуется у микроорганизмов, но не подтверждена у человека. Были сообщения о том, что для грудных детей гистидин является незаменимой аминокислотой (Snyderman, 1963).

Кребс (Krebs, 1964), как и Роуз (Rose, 1954), отмечает, что взрослые люди в отличие от растущих крыс не требуют поставок гистидина для поддержания азотистого равновесия. Поскольку потеря гистидина (плюс метилгистидин) с мочой составляет 200–300 мг в день, поддержка азотистого равновесия не может объясняться сохранением гистидина в организме. Это наводит на мысль, что взрослый человек может синтезировать достаточное количество гистидина. Рассматривая потребности в белках и незаменимых аминокислотах людей разных возрастных групп (от грудных детей до пожилых людей), авторы делают вывод о том, что гистидин, возможно, заменим у взрослых людей и детей школьного возраста, но незаменим у грудных детей (Irwin, Hegsted, 1971).

Отмечается (Stiefel, 1971), что гистидин является незаменимой аминокислотой для ребенка, в то время как у взрослого человека азотистое равновесие может поддерживаться безгистидиновой диетой.

Эти данные показывают, что потребность в гистидине у взрослого человека может отличаться от потребности в нем у крысы и собаки. Однако такие факторы, как синтез гистидина кишечными бактериями и продолжительность экспериментального периода могут быть значимы для окончательных выводов. Конечные заключения не могут быть выведены до тех пор, пока точно не определено, синтезируется ли гистидин у взрослого человека. Есть только одна реакция синтеза гистидина, приведенная под вопросом (Stiefel, 1971), т. к. не показаны продукты, из которых гистидин может образоваться. Однако в этой же работе говорится о том, что наблюдаемая у людей гистидинемия может быть результатом избыточной продукции гистидина.

Авторы работы, целиком посвященной вопросу незаменимости аминокислоты гистидина у человека (Stiefel, Herman, 1972), считают, что этот вопрос полностью не решен и требует дальнейших исследований, ибо ко времени написания статьи никто должным образом не показал, что гистидин может синтезироваться у человека, несмотря на то, что была показана роль  $^{14}\text{C}$ -формиата как предшественника имидазольного кольца гистидина в срезах печени (Levy, Coon, 1952). Возможно, гистидин требуется не только грудным детям, но и взрослым при определенных болезненных состояниях (уремия и ревматоидный артрит) (Stiefel, Herman, 1972). Збарский и др., (1972) заявляют, что хотя гистидин незаменим в питании животных, по-видимому, является заменимой аминокислотой для человека, поскольку у людей даже при отсутствии гистидина в пище азотистое равновесие сохраняется. Эти же авторы предполагают, что потребность в гистидине в известной мере покрывается за счет карнозина мышц и гомокарнозина мозга.

Прорывом, показывающим синтез гистидина в организме взрослого человека, явилась работа (Sheng, Badger, 1977), в которой взрослым людям через 22 сут безгистидиновой диеты перорально вводили  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . При этом  $^{15}\text{N}$  появлялся в общем белке плазмы крови, глобине гемоглобина и мочевины. Причем  $^{15}\text{N}$  присутствовал как в аминогруппе гистидина, так и в его имидазольном кольце. Из этого авторы (Sheng, Badger, 1977) сделали заключение, что гистидин синтезируется у нормального взрослого человека. Данный эксперимент не показывает ни локализацию, ни степень биосинтеза гистидина, хотя кишечная микрофлора может вносить в него свой вклад. В другом эксперименте (Wixom et al., 1977) 48-летний здоровый мужчина получал внутривенное безгистидиновое питание в течение 72 сут эксперимента, в ходе которого 3-суточного безлизинового питания было достаточно для резко отрицательного

азотистого баланса. Отсутствие же гистидина привело азотистый баланс почти к нулю без заметных изменений содержания мочевины, мочевой кислоты, креатинина и короткоживущих белков в сыворотке крови.

Отмечается, что гистидин является единственным среди незаменимых аминокислот, при исключительно низком содержании которого в пище в течение короткого времени поддерживается азотистое равновесие (Swendseid, 1981). Этот автор приводит несколько гипотез для объяснения этого феномена: 1) гистидин составляет 8% молекулы гемоглобина, и распад гемоглобина обеспечивает наибольшее количество гистидина в сравнении с другими незаменимыми аминокислотами; 2) гидролиз дипептида карнозина мышц освобождает гистидин, хорошим доказательством этого является снижение содержания карнозина у крыс в мышцах при безгистидиновой диете и пополнение содержания карнозина при снабжении гистидином (Clemens et al., 1978; Swendseid, 1981); 3) биосинтез гистидина (Sheng, 1977). Комбинация этих гипотез может объяснить уникальную потребность тканей в гистидине при безгистидиновой диете. Есть данные (Swendseid, 1981), что у женщин при безгистидиновой диете отрицательный азотистый баланс, возможно, может развиваться быстрее, чем у мужчин из-за меньшей мышечной массы и потому более ограниченных запасов карнозина.

Большие запасы гистидина в теле человека в виде гемоглобина и карнозина в организме человека могут рекрутироваться и поддерживать азотистое равновесие в течение длительной диеты (Swendseid, 1981). В то же время автор считает, что сложно оценить бактериальный синтез гистидина в нормальных условиях (Swendseid, 1981). Хотя эти приведенные данные согласуются с возможностью некоторого синтеза гистидина *in vivo*, они не демонстрируют его достаточность для удовлетворения потребности организма или что он не ограничен бактериями.

В книге о современном питании (Ross et al., 2014) также подтверждается высказанная Кребсом (Krebs, 1964) возможность синтеза гистидина в организме человека. В этой книге специальный раздел посвящен гистидину и замечено, что хотя незаменимость гистидина показана для крыс, трудно определить его незаменимой аминокислотой для взрослых людей.

Чем же тогда можно объяснить данный парадокс? Для этого нужно обратиться к работе, в которой рассматривается фермент гистидинолдегидрогеназа не только у животных, но и у людей (Onodera, 2003). Стоит напомнить, что в этой работе делается вывод о том, что незаменимость (заменимость) гистидина для того или иного вида, включая человека, определяется активностью гистидинолдегидрогеназы. Не-

смотря на то, что начальным продуктом синтеза гистидина в животном организме является фосфорибозилпирофосфат, именно активность гистидинолдегидрогеназы определяет возможность синтеза гистидина *de novo*, т. к. как этот фермент катализирует конечный шаг в серии реакций в пути биосинтеза гистидина. У всех исследованных видов животных и человека обнаружена гистидинолдегидрогеназа, но с разной активностью. Для окончательного суждения об отсутствии незаменимости гистидина для здорового взрослого человека потребуется определить активность гистидинолдегидрогеназы в некоторых органах взрослых людей.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на схожесть превращения большинства аминокислот с таковым у животных, человек отличается даже от других млекопитающих по превращению незаменимой аминокислоты треонина и условно незаменимой аминокислоты гистидина. Что касается биосинтеза гистидина, из всех ферментов, катализирующих его реакции, к настоящему времени выделен только фермент гистидинолдегидрогеназа. Она обнаружена у всех исследованных видов животных, но обладает разной активностью. Эта активность и является тем самым критерием, по которому можно судить о незаменимости гистидина для того или иного вида животного. В одних случаях эндогенный биосинтез гистидина может удовлетворять потребности организма в этой аминокислоте (здоровые взрослые люди и крупный рогатый скот) и не может в других, таких как большинство животных, а также грудные дети и люди, страдающие почечной недостаточностью и ревматоидным артритом.

Все изложенное должно учитываться при составлении соответствующих рационов людей и сельскохозяйственных животных, а также при применении гистидина для облегчения состояния больных уремией и ревматоидным артритом.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Збарский Б.И., Иванов И.И., Мардашев С.Р.* 1972. Биологическая химия. Л.: Медицина. 401 С.
- Кочанов Н.Е., Иванова Г.М., Вебер А.Э., Симаков А.Ф.* 1981. Обмен веществ у диких жвачных животных (северные олени и лоси). Л.: Наука. 192 с.
- Майстер А.* 1961. Биохимия аминокислот. М.: Иностранная литература. 121 с.
- Малиновский А.В.* 2019. Причины возникновения незаменимости треонина в свете эволюции. Цитология. Т. 61. № 7. С. 521.
- Фердман Д.Л.* 1966. Биохимия. М.: Высшая школа. С. 252.
- Штрауб Ф.Б.* 1963. Биохимия. Будапешт: АН Венгрии. С. 221.
- Cianciaruso B., Fukuda S., Jones M R., Kopple J. D.* 1985. Net release or uptake of histidine and carnosine in kidney of dogs. *Am. J. Physiol.* V. 248. P. E51.
- Clemens R.A., Kopple J.D., Swendseid M.E.* 1978. Metabolic effects of histidine free diets in rats. (Abstract). *Fed. Proc.* V. 37. P. 263.
- Enwonwu C.O., Eugene E.O.* 1983. Different effects of protein malnutrition and ascorbic acid deficiency on histidine metabolism in the brains of infant nonhuman primates. *J. Neurochem.* V. 41. P. 230.
- Fukuda S., Kopple J.D.* 1979. Evidence that dog kidney is an endogenous source of histidine. *Am. J. Physiol.* V. 237. P. E1.
- Irwin M.I., Hegsted D.M.* 1971. A conspectus of research on protein requirements of man. *J. Nutr.* V. 101. P. 387.
- Krebs H.A.* 1964. The metabolic fate of amino acids. In: *Mammalian protein metabolism*. N.-Y.: Academic Press. V. 1. P. 125.
- Laidlaw S.A., Kopple J.D.* 1987. Newer concepts of the indispensable amino acids. *Am. J. Clin. Nutr.* V. 46. P. 593.
- Levy L., Coon M.J.* 1952. Histidine synthesis in yeast and human liver. *Fed. Proc.* V. 11. P. 248.
- Onodera R.* 2003. Essentiality of histidine in ruminant and other animals including human beings. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* V. 16. P. 445.
- Parker C.J., Riess G.T., Sardesai V.M.* 1985. Essentiality of histidine in adult mice. *J. Nutr.* V. 115. P. 824.
- Rose W.C.* 1937. The nutritive significance of the amino acids and certain related compounds. *Science.* V. 86. P. 298.
- Rose W.C.* 1949. Amino acid requirements of man. *Fed. Proc.* V. 8. P. 546.
- Rose W.C., Haines W.J., Warner D.J.* 1954. The amino acid requirements of man. V. The role of lysine, arginine and tryptophan. *J. Biol. Chem.* V. 20. P. 421.
- Rose W.C.* 1957. The amino acid requirements for adult man. *Nutr. Abstr. Rev.* V.27. P.631.
- Ross A.C., Caballero B., Cousins R.J., Tucker K.L., Ziegler T.R.* 2014. *Modern nutrition in health and disease*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sheng Y.B., Badger T.M.* 1977. Incorporation of <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl into histidine in adult man. *J. Nutr.* V. 107. P. 621.
- Snyderman S.E., Boyer A., Roitman E., Holt E., Prose P.H.* 1963. The histidine requirement of the infant. *Pediatrics.* V. 31. P. 786.
- Stiefel F.B., Herman R.H.* 1971. Histidine metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* V. 24. P. 207.
- Stiefel F.B., Herman R.H.* 1972. Is histidine an essential amino acid in man? *Am. J. Clin. Nutr.* V. 25. P. 182.
- Swendseid M.E.* 1981. *Essential amino acid requirements: A review*. ESN:FAO/WHO/UNU/ EPR/81/30: University of California.
- Wadud S., Onodera R., Or-Rashid M.M.* 2001. Synthesis of histidine in liver and kidney of cattle and swine. *Anim. Sci.* V. 72. P. 253.
- Wixom R.L., Anderson H.L., Terry B.E., Sheng Y-B.* 1977. Total parenteral with selective histidine depletion in man. I. Responses in nitrogen metabolism and related areas. *Am. J. Clin. Nutr.* V. 30. P. 887.

## Differences of Histidine Conversion in Human and Other Mammals

A. V. Malinovsky\*

*Biophyspribor, Russian Federal Medico-Biological Agency, Saint Petersburg, 197183 Russia*

*\*e-mail: malinovskiy.andrey@yandex.ru*

It is considered that transformation of amino acids found in the structure of natural proteins is the same with man and animals. So, division of amino acids into essential and nonessential amino acids is largely the same in animals and humans. However, there are two amino acids whose essentiality differs greatly even in mammals and man. These are threonine and histidine. While in case with all other mammals threonine is degraded irreversibly in two ways, in case with humans this occurs only in one way which nevertheless does not influence essentiality of threonine. As to histidine the features of its nonessentiality found with man leads to the fact that histidine is a nonessential amino acid in the healthy adults unlike the case with a majority of mammals. In the present paper the transformation features of histidine in mammals and man are described and paradoxical nonessentiality of histidine for man is explained, which is necessary to take into account when making up ration.

**Keywords:** histidine, mammals, man