# СОДЕРЖАНИЕ

## Том 64, номер 4, 2022

Применение флуоресцентной микроскопии в изучении процессов внутриклеточной сигнализации	
Е. В. Панферов, А. Б. Малашичева	309
HAR: история, функции, роль в эволюции и патогенезе заболеваний человека А. С. Рыжкова, А. А. Хабарова, А. С. Чвилёва, Т. А. Шнайдер	321
Коллагеновые фибриллы различного диаметра: условия формирования и основные принципы функционирования <i>М Ю Сироткина Ю А Нашекина</i>	335
Получение и характеристика линии устойчивых к цисплатину клеток рака толстой кишки человека	
А. В. Моршнева, О. О. Гнедина, Д. Н. Киндт, М. В. Иготти	344
Клетки рака молочной железы изменяют чувствительность к гормональным и ростовым стимулам при 3D-культивировании <i>А. А. Нуштаева, М. М. Савикова, М. С. Ермаков, М. F. Варламов</i>	
Д. Д. Новак, В. А. Рихтер, О. А. Коваль	353
Оценка колоколизации белка теплового шока HSP70 и маркеров клеток глиобластомы, подобных стволовым	
Н. М. Юдинцева, А. Л. Михрина, А. С. Нечаева, М. А. Шевцов	366
Катехоламинергические структуры субфорникального органа крысы В. А. Разенкова, Д. Э. Коржевский	372
Ионный гомеостаз и стресс-индуцированное старение мезенхимных	
А. Н. Шатрова, А. П. Домнина, Н. А. Пуговкина, И. И. Марахова	381
Анализ перестроек фибриллярного актина в мезенхимных стволовых клетках человека линии FetMSC с использованием фрактальной размерности Минковского	
А. В. Ревитцер, В. И. Чубинский-Надеждин, Ю. А. Негуляев	390
Криорезистентность клеток с фенотипом, подобным мезенхимным стволовым, выделенным из подкожной жировой ткани человека	20(
И. П. Савченкова, Е. А. Савченкова, М. И. Тулюкин	396
Мускариновые ацетилхолиновые рецепторы подтипов M1–M5 в соматической мускулатуре дождевого червя Lumbricus terrestris	
Л. Ф. Нуруллин, Е. М. Волков	404

## Contents

## Vol. 64, No. 4, 2022

Fluorescence imaging of signal transduction pathways	
E. V. Panferov, A. B. Malashicheva	309
HARs: History, function, evolution and disease A. S. Ryzhkova, A. A. Khabarova, A. S. Chvileva, T. A. Shnaider	321
Collagen fibrils of various diameters: formation conditions and basic principles of functioning <i>M. Yu. Sirotkina, Yu. A. Nashchekina</i>	335
The establishment and characterization of the cisplatin-resistant human colon cancer cell line A. V. Morshneva, O. O. Gnedina, D. N. Kindt, M. V. Igotti	344
Breast cancer cells in 3D models changes their response to hormonal and growth factors A. A. Nushtaeva, M. M. Savinkova, M. S. Ermakov, M. E. Varlamov, D. D. Novak, V. A. Richter, O. A. Koval	353
Assessment of the colocalization of heat shock protein Hsp70 with markers of tumor stem-like cells <i>N. M. Yudintceva, A. L. Mikhrina, A. S. Nechaeva , M. A. Shevtsov</i>	366
Catecholaminergic structures of rat's subfornical organ V. A. Razenkova, D. E. Korzhevskii	372
Ion homeostasis and stress-induced senescence in human mesenchymal stem cells A. N. Shatrova, A. P. Domnina, N. A. Pugovkina, I. I. Marakhova	381
The analysis of F-actin rearrangement in FetMSC human mesenhymal stem cell line using Minkovsky fractal dimension <i>A. V. Revittser, V. I. Chubinskiy-Nadezhdin, Y. A. Negulyaev</i>	390
Cryoresistance of mesenchymal stromal cells isolated from human subcutaneous adipose tissue <i>I. P. Savchenkova, E. A. Savchenkova, M. I. Gulvukin</i>	396
Muscarinic acetylcholine receptors of M1–M5 subtypes in the somatic muscle of the earthworm <i>Lumbricus terrestris</i> <i>L. F. Nurullin, E. M. Volkoy</i>	404
L. 1. 1. (m. mann), L. 111. / 00007	404

УДК 57.086.2

## ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ В ИЗУЧЕНИИ ПРОЦЕССОВ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

© 2022 г. Е. В. Панферов<sup>1,</sup> \*, А. Б. Малашичева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия \*E-mail: panferov.aux@gmail.com Поступила в редакцию 15.03.2022 г. После доработки 13.04.2022 г. Принята к публикации 15.04.2022 г.

В обзоре рассмотрены основные современные методики и подходы флуоресцентной микроскопии, применяющиеся в исследовании внутриклеточных сигнальных каскадов. Обсуждаются методики анализа фиксированных препаратов и прижизненной визуализации, отдельное внимание уделено методам сверхразрешающей микроскопии. Анализируются границы применения и ограничения методов, представлены научные достижения последних лет, полученные при помощи описываемых методик.

*Ключевые слова:* световая микроскопия, флуоресцентная микроскопия, внутриклеточная сигнализация, прижизненная визуализация, иммунофлоуресценция, сверхразрешающая микроскопия

DOI: 10.31857/S0041377122040058

Клетки многоклеточных организмов способны воспринимать и отвечать на широкий набор внеклеточных и внутриклеточных факторов. Этот процесс называется внутриклеточной сигнализацией и является ключевым как в процессе развития организма, так и в поддержании гомеостаза в дифференцированных тканях. В связи с этим, изучение процессов внутриклеточной сигнализации представляет большой интерес для современной биологии. Для декодирования сигнальных каскадов, лежащих в основе этих процессов, необходимо получить информацию о локализации и транслокации участвующих в них молекул, измерить, где и когда они активны, как меняется их функциональное состояние, как и в каком порядке они взаимодействуют между собой. В настоящем обзоре мы рассмотрим, как на эти вопросы возможно ответить при помощи современных методик световой микроскопии, а также проиллюстрируем их примерами экспериментальных работ последних лет.

#### ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ИЗУЧЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ НА СВЕТООПТИЧЕСКОМ УРОВНЕ

Современная флуоресцентная микроскопия является важным инструментом в области экспериментальной биологии. Несмотря на то, что методики молекулярной биологии хорошо позволяют ответить на вопросы "что и как?" происходит в клетке, они, как правило, не дают возможности оценить временные и пространственные особенности этих процессов, то есть ответить на вопросы "где и когда?". Оптическая микроскопия, в частности флуоресцентная, предоставляет широкий спектр возможностей для решения таких экспериментальных задач. Другой точкой расхождения молекулярных методов и микроскопии является их статистический аспект. Методы молекулярной биологии, как правило, анализируют клеточные популяции целиком, с одной стороны достигая большой статистической мощности, но с другой - теряя возможность отслелить изменчивость на уровне инливилуальных клеток. Безусловно, существуют методы так называемого single-cell анализа, позволяющие отследить такие изменения (Lun, Bodenmiller, 2020), но их едва ли можно назвать рутинными. В то же время микроскопия в любом своем проявлении несколько менее эффективна для анализа популяций, что компенсируется отсутствием их статистической гомогенизации.

Принятые сокращения: FCS – флуоресцентная корреляционная спектроскопия (Fluorescence Correlation Spectroscopy); FCCS – флуоресцентная кросс-корреляционная спектроскопия (Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy); FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ* (Fluorescent *in situ* Hybridization); FLIM – микроскопия визуализации времени жизни флуоресценции (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy); FRAP – восстановление флуоресценции после фотовыцетания (Fluorescence Recovery After Photobleaching), FRET – Форстерский резонансный перенос энергии (Forster Resonance Energy Transfer); SIM – микроскопия структурированного освещения (Structured Illumination Microscopy); SMLM – микроскопия локализации одиночных молекул (Single Molecule Localization Microscopy); STED – подавление спонтанного испускания (Stimulated Emission-Depletion).

Это позволяет выявлять отдельные события, которые могли бы быть остаться незамеченными при использовании исключительно молекулярно-биологического анализа. Из сказанного выше очевидно, что современная оптическая микроскопия не является неким противопоставлением молекулярной биологии, а наоборот, является комплементарным ей набором методик, позволяющим при совместном использовании намного более точно описывать биологические системы, нежели каждый из этих подходов способен по отдельности.

Одним из наиболее ярких примеров такого взаимодействия является изучение внутриклеточной сигнализации. Для процессов внутриклеточной сигнализации характерно значительное количество последовательно активирующихся компонентов, причем время и место их активации играют большую биологическую роль (Nair et al., 2019). В изучении сигнальных процессов важно не только охарактеризовать этот каскад, но и отследить клеточный ответ на него. В рамках данного обзора последний аспект затронут не будет, поскольку разнообразие таких процессов столь велико, что в рамках одной обзорной статьи их уместить было бы невозможно. Вместо этого мы сосредоточимся на описании методических подходов, используемых для анализа протекания собственно сигнальных каскадов, хотя все описываемые методы могут быть применены более широко.

#### ВИЗУАЛИЗАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ НА ФИКСИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТАХ

Наиболее распространенным методом микроскопического исследования является визуализация компонентов сигнальных путей на фиксированных препаратах. Это связано с несколькими факторами: во-первых, для пробоподготовки может быть необходима жесткая обработка образца, несовместимая с жизнедеятельностью клеток; во-вторых, момент получения образца и его анализ могут быть значительно разнесены во времени. Наконец, фиксированные препараты не претерпевают физиологических изменений при длительном воздействии яркого возбуждающего света, что позволяет получать микрофотографии более высокого качества, чем в случае прижизненной визуализации, за счет увеличения выдержки и яркости источника освещения (Hobro, Smith, 2017). В качестве фиксированных препаратов могут выступать как клеточные культуры, так и гистологические срезы, и в отдельных случаях даже оптически просветленные цельные органы лабораторных животных (Matryba et al., 2019).

Одним из примеров жесткой обработки является использование пермебеализующих клеточные мембраны химических агентов, что позволяет применять антитела для иммунофлуоресцентной визуализации внутриклеточных антигенов. Серьезным ограничением этого метода является отсутствие коммерческих антител на некоторые сигнальные молекулы, а также сложности с визуализацией меток, связанных со структурами, плохо сохраняющимися при фиксации (Meyer, Teruel, 2003).

Наиболее распространенным в изучении внутриклеточной сигнализации подходом является подтверждение активации сигнального пути путем иммунофлуоресцентного выявления одного из его компонентов и дальнейшее сравнение интенсивности и локализации флуоресцентного сигнала между экспериментальными группами. Важно отметить, что получаемые таким образом данные достаточно сложно интерпретировать количественно. Стохастическая природа конъюгации антител с молекулами красителя приводит к наличию даже в моноклональных стоковых растворах нескольких подвидов антител с разной плотностью связанных конъюгатов. Этот феномен не только влияет на аффинность самого антитела, но и может приводить к концентрационному тушению флуоресценшии за счет формирования эксимеров из конъюгированных к одному и тому же антителу флуоресцентных молекул (Szabó et al., 2018). Следовательно, использование антител для оценки сравнительной интенсивности флуоресценции в количественных биофизических экспериментах, например, с использованием метода Форстерского резонансного переноса энергии, нежелательно. Тем не менее, поскольку распределение плотности конъюгатов соответствует распределению Пуассона (Vira et al., 2010), для менее точных измерений иммунофлуоресцентная окраска вполне допустима. Примерами таких экспериментальных работ может быть подтверждение активании сигнального пути Wnt путем визуализании кластеризации лиганда Frizzled и транслокализации β-катенина в ходе искусственно индуцированной локализации MCK (Rotherham et al., 2018), демонстрация ядерной транслокации YAP и TAZ после обработки клеток MCF7 экзосомами, выделяемыми полученными из MCK адипоцитами (Wang et al., 2019), или полтверждение увеличения уровня экспрессии компонентов пути Notch при эпителиально-мезенхимном переходе (Wang et al., 2009).

Одним из преимуществ иммунофлуоресцентного мечения является возможность использования для визуализации антител, выработанных против определенных доменов белковой молекулы или даже против белков в определенных функциональных состояниях. Поскольку в процессах внутриклеточной сигнализации процессы посттрансляционной модификации белков играют ключевую роль, возможность зафиксировать их представляет большой интерес. Так, визуализация фосфорилирования белка позволяет зафиксировать активацию того или иного сигнального пути. Таким образом была показана активация фосфорилированной формой α-синуклеина пути JNK и отдельных компонентов МАРК-каскада при помощи визуализации их фосфорилированных форм в нейронах при болезни Паркинсона,

что в свою очередь приводит к фрагментации митохондрий и является одним из механизмов патогенетических факторов этого заболевания (Grassi et al., 2019). В качестве другого примера можно привести работу, демонстрирующую активацию посредством фосфорилирования JAK2-STAT3 каскада в астроцитах при хронической чесотке (Du et al., 2019). Существуют также работы, демонстрирующие ацетилирование белков, например белков микротрубочек в результате активации пути Shh, который контролирует таким образом процессы внутриклеточного транспорта и миграции клеток (Singh et al., 2019). В тех случаях, когда при активации сигнального пути происходит протеолиз одного из участвующих белков, для отслеживания дальнейшей судьбы отделенной части удобно использовать антитела, распознающие только такой фрагмент. К таким белкам относятся, например, каспазы, активирующиеся после протеолиза своих проферментных форм. Визуализация активности каспаз в период развития волосяных фолликулов показала, что каспазы являются не только индукторами апоптоза, но и принимают участие в регуляции пролиферативной активности клеток, контролируя таким образом размер органов (Yosefzon et al., 2018).

Визуализация синтеза и локализации нуклеиновых кислот в клетках или тканях возможна при помощи метода флуоресцентной гибридизации in situ (FISH), в котором интересующие экспериментатора последовательности в образце гибридизуются с флуоресцентно мечеными комплементарными зондами. В контексте изучения внутриклеточной сигнализации это может быть интересно для визуализации РНК, принимающих участие в сигнальных процессах. Например, показано, что микроРНК-181а в клетках колоректального рака подавляет экспрессию ингибитора SRC-киназы SRCIN1, приводя к активации SRC/VEGF каскада, запускающего процесс ангиогенеза, а, значит, потенциально может служить терапевтической мишенью (Sun et al., 2018). В другой работе было показано, что увеличение уровня микроРНК-146а-5р в клетках дорсальных ганглиев подавляет сигнальный путь IRAK1/TRAF6, способствуя снижению боли (Wang et al., 2018). Кольцевые РНК также могут служить целью FISHвизуализации. Показано, что кольцевая РНК circPVT1 в клетках легочной карциномы способствует росту и инвазии опухоли за счет взаимодействия с транскрипционным фактором E2F2 (Li et al., 2018). Кроме того, с использованием методик гибридизации с повышенной чувствительностью, возможна локализация транскрипционных изоформ, отличающихся одиночными нуклеотидами, на уровне отдельных клеток. Таким образом была визуализирована дифференциальная экспрессия четырех транскрипционных изоформ рецептора нейрегулина ErbB4 (Erben et al., 2018).

Как было указано выше, современные методики оптической микроскопии также являются компле-

ментарными и методам молекулярной биологии. В этом контексте особый интерес представляет возможность контролируемой изоляции отдельных участков интереса непосредственно с микропрепарата для дальнейшего анализа молекулярно-биологическим методами (Bevilacqua, Ducos, 2018). Такой подход называется микродиссекцией, и может быть реализован как при помощи механического отсечения определенных участков препарата при помощи микроманипуляторов, так и бесконтактно, с использованием ультрафиолетового лазера высокой мощности. Изолированные участки препарата, в качестве которого могут выступать как клеточная культура, так и гистологический срез, автоматизированным способом собираются в микропробирки, после чего могут быть полвергнуты дальнейшему анализу. Примером применения такой методики является изоляция из препарата сетчатки отдельных кровеносных сосудов для изучения влияния пути Wnt на прохождение в них процессов трансцитоза путем постановки qPCR с выделенной РНК (Wang et al., 2020). Полученный материал можно также анализировать и на протеомном уровне. Таким образом было выявлено, что метастазирующие сквамозно-клеточные карциномы отличает от неметастазирующих повышенный уровень компонентов сигнального пути KEGG (Shapanis et al., 2021).

#### ПРИЖИЗНЕННАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

Флуоресцентная визуализация белков прижизненно возможна во многом благодаря использованию репортерных флуоресцентных белков. Такой подход связан с определенными ограничениями: искусственное добавление к сигнальному белку флуоресцентного домена может привести к нарушению его функциональной активности, и требует проверки на предмет возможных нарушений в физиологии клетки перед началом эксперимента. Кроме того, неравномерная доставка генно-инженерных конструкций, индуцирующих такую экспрессию, затрудняет прямую оценку уровня экспрессии по интенсивности флуоресценции введенных в клетку меток (Meyer, Teruel, 2003). Тем не менее, на данный момент этот метод является оптимальным для визуализации динамики белковых сигнальных молекул в живой клетке. Например, отследить в динамике активацию пути Wnt возможно при помощи репортеров ТОР-GFP, что в частности было использовано для описания активации этого сигнального пути в раковых клетках лигандом Wnt3 (Le et al., 2019). Другим примером может послужить отслеживание формирования эпителиальных клеточных контактов в культуре MCF10A, показавшее, что FMNL2, регулирующий состояние актинового цитоскелета, рекрутируется в места формирования контактов без участия Cdc42 (Grobe et al., 2018).

Использование лазерных сканирующих систем позволяет реализовывать специальные методы исследования для получения информации о тех или иных физических параметрах используемых молекул, которые совокупно называют F-методами (рис. 1). В методе восстановления флуоресценции после фотовыцветания (FRAP) флуоресцентная метка в регионе интереса препарата выжигается лазером, после чего измеряется скорость диффузии оставшихся меченых молекул в эту область. Этот метод наиболее полезен для описания характеристик транспорта молекул между различными клеточными компартментами. Так, отслеживание фактора CSL, являющегося эффекторной молекулой пути Notch, показало, что он обладает достаточно сложным поведением: после выжигания случайных участков в ядре было зафиксировано, что в отсутствие активации Notch CSL скоротечно связывается с ДНК, в то время как при активации Notch время связывания в таргетных локусах существенно возрастает за счет взаимодействия с коактиватором Mastermind и возможного локального ремоделирования хроматина (Gomez-Lamarca et al., 2018). В другой работе путем оценки изменений подвижности SOX9 и корреляционного анализа таковых данных с данными ChIP-qPCR, авторы делали вывод о транскрипционной активности фактора при индукции различных сигнальных путей (Govindaraj et al., 2019).

Более точными способами анализа динамики молекул являются методы флуоресцентной корреляционной (FCS) и кросскорреляционной (FCCS) спектроскопии, позволяющие оценить параметры кинетики диффузии молекул в фокальном объеме конфокальной системы путем продолжительной съемки фиксированной точки в образце и измерения флуктуаций флуоресценции в ней. Это дает возможность измерить скорость диффузии и концентрацию меченых молекул в случае FCS, а также оценить, диффундируют ли две меченые молекулы совместно в случае FCCS. Так, при помощи FCS была охарактеризована кластеризация GPCR Smog в ответ на лиганд Fog, являющаяся ключевым процессом в формировании сигнальных комплексов, ответственных за формирование клеточных контактов во время выпячивания эктодермы Drosophila melanogaster (Jha et al., 2018). При помощи адекватных калибровочных стандартов измерять можно концентрацию не только меченых белков, но и других веществ, принимающих участие в сигнальных путях. Например, возможно измерение концентрации газов в клетках путем использования соответствующих инликаторных молекул. флуоресцирующих в присутствии того или иного газа, таких как DAF2-DA, реагирующего на NO (Markiewicz et al., 2022). Кросс-корреляционная спектроскопия особенно полезна для изучения механизмов димеризации, поскольку позволяет оценить не только сам факт наличия взаимодействия, но и некоторые его параметры, такие как константа диссоциации образовавшегося комплекса. Примером такого исследования является оценка взаимодействия Wnt3 с Fzd1, в ходе которого было показано, что большую роль в этом процессе играет липидирование Wnt3 по S212 (Dhasmana et al., 2021).

Метод Форстерской (или флуоресцентной) резонансной передачи энергии (FRET) позволяет определить наличие или отсутствие взаимодействия межлу двумя флуоресцентно мечеными молекулами. Физическая основа этого метода заключается в безызлучательном переносе энергии от молекулыдонора к молекуле-акцептору при близком перекрытии спектра испускания флуоресценции первой со спектром возбуждения второй. Такие молекулы называются FRET-парой. Этот феномен возможен только при нахождении молекул на расстоянии не более 10 нм друг от друга (Chen et al., 2006), что позволяет говорить об их непосредственном взаимодействии. FRET также позволяет отследить конформационные изменения, если FRET-парой мечены разные домены одного и того же белка (Lohse et al., 2007). Так. при помоши FRET-пары, присоединенной к С-концевым доменам белков LRRC8, формирующих при гетерогексамеризации ответственные за регуляцию объема клетки анионные каналы VRAC, было показано, что активация этих каналов происходит в ответ на стимуляцию DAG, а не в ответ на изменение ионной силы. как считалось ранее (König et al., 2019). В последние годы начинают появляться и более сложные FRET-системы, в которых излучение одного донора передается на один из нескольких возможных акцепторов (Bunt, Wouters, 2017). Примером FRET с использованием сразу нескольких молекул может выступить анализ активации сигнальной системы Hyal-2/WWOX/Smad4 гиалуроновой кислотой. С помощью трехмолекулярного FRET с участием всех белков комплекса было показано, что гиалуроновая кислота сначала взаимодействует со Smad4, который затем взаимодействует с WWOX и Hyal-2, после чего WWOX взаимодействует с p53, a Hyal-2 – с WWOX (Hsu et al., 2017). Стоит отметить, что метод FRET при необходимости может также использоваться и на фиксированных препаратах, но в связи с отсутствием временной динамики и особенностями стехиометрии антител, целесообразнее его использование прижизненно.

Феномен FRET также лежит в основе репортерной активности многих флуоресцентных белковых комплексов. Принцип действия этих FRET-биосенсоров заключается в изменении конформации в ответ на связывание искомой молекулы таким образом, что разнесенные в пространстве при ее отсутствии донор и акцептор сближаются, что можно детектировать как FRET-взаимодействие (Zhang et al., 2019). Такие комплексы позволят детектировать молекулы, получить зонды на которые иным образом чаще всего невозможно, что является одной из причин активного развития этой сферы в последние годы. К примеру, получены и применяются экспериментально сенсоры как на "популярные" молекулы, та-



**Рис. 1.** F-методы, применяемые для прижизненной визуализации клеточных процессов. a – Метод FRAP: участок клетки выжигается лазером, после чего постепенно происходит восстановление окраски;  $\delta$  – метод FCS: проходящие через фокальный объем конфокальной системы меченые молекулы регистрируются в виде флуктуаций интенсивности флуоресценции, на основе которых затем выводится анализируемая функция автокорреляции G(t); e – метод FCCS, отличающийся от FCS анализом двух меток; за счет функции автокорреляции можно оценить, движутся ли две молекулы совместно; e – метод FRET: когда две меченые молекулы находятся на расстоянии, при возбуждении флуоресценции метки первой молекулы светится только она; при сближении происходит безызлучательный переход энергии на вторую метку, и начинает светиться уже она; d – применение метода FRET в аптамерных маяках: когда зонд не связан с целью, феномен FRET наблюдается; при связывании, за счет изменения конформации, метки разносятся в пространстве и эффект пропадает; e – метод FLIM: системная электро-ика засекает, сколько времени проходит между импульсом лазера и попаданием на детектор фотона, составляется гистограмма распределения плотности фотонов с разным временем попадания на детектор для каждой точки изображения, матеного и того же флуорохрома в условиях наличия или отсутствия феномена FRET.

кие, как cGMP, CaMKII, cAMP и PKA (Reddy et al., 2018), так и на более экзотические соединения, например ионы свинца (Yang et al., 2020). Отдельным подвидом FRET-биосенсоров являются аптамерные молекулярные маяки. В данном случае FRET-пара находится на концах замкнутой в подковоподобную структуру нуклеотидной последовательности, которая при связывании с целевой молекулой за счет сложной системы Ван-дер-Ваальсовых, электростатических и диполь-дипольных взаимодействий закручивается вокруг мишени, нарушая FRET-взаимодействие и позволяя фиксировать флуоресценцию донора (Moutsiopoulou et al., 2019).

Одним из наиболее технически сложных методов оптической микроскопии является метод FLIM, позволяющий с помощью четко синхронизированной системы из импульсного лазера, высокочувствительного лавинного или гибридного фотоэлектронного умножителя и управляющей электроники отслеживать, какое время каждый тип флуорохромов в образце находится в возбужденном состоянии

после одиночного импульса лазера. Это время, τ, не зависит от яркости или спектральных характеристик флуорохрома, но зависит от многих физико-химических параметров среды, в которой он находится. В области изучения внутриклеточной сигнализации этот феномен наиболее широко используется для количественной оценки феномена FRET (Grant et al., 2007). Несмотря на то, что обычный FRET может указать на факт наличия взаимодействия между двумя мечеными молекулами, он не позволяет оценить свойства этого взаимодействия. Поскольку т донора и акцептора при взаимодействии меняется, на ее основе можно делать количественные выводы о некоторых параметрах. К примеру, в работе, описывающей прижизненную структуру механосенсорного комплекса Src. Pvk2 и MBD2 в остеоцитах, с помошью информации о τ флуоресцентных меток этих белков был сделан вывод, что Src и MBD2 не взаимодействуют между собой напрямую, что не было очевидно только по данным FRET (Day et al., 2021). Добавление  $\tau$ компоненты также позволяет повысить чувствительность FRET-биосенсоров. К примеру, FRETсенсор на сАМР может быть использован не только для визуализации самого факта наличия вторичного мессенджера в клетке, но и для оценки эффективности его деградации фосфоэстеразами, поскольку этот процесс изменяет кинетику затухания флуоресценции сенсора (Harkes et al., 2021).

Помимо уже упомянутых FRET-биосенсоров, существуют и другие способы детектировать небелковые сигнальные молекулы. Интересным примером такого сенсорного белка является кальциевый сенсор GCaMP, основанный на кальмодулин-зависимой киназе легких цепей миозина. При связывании иона кальция конформация этого белка меняется таким образом, что связанный флуоресцентный белок конвертируется в анионную форму и начинает флуоресцировать (Mao et al., 2008). Наиболее активно визуализация кальциевой сигнализации используется для отслеживания активности возбудимых клеток, таких как нейроны (Stringer, Pachitariu, 2019) или кардиомиоциты (Kreutzer et al., 2020). Помимо этого, кальциевая визуализация также полезна для визуализации процессов апоптоза и нарушения баланса АФК в митохондриях (Bertero, Maack, 2018; Humeau et al., 2018). Например, таким образом было подтверждено что чувствительный к оксидативному стрессу кальциевый канал TRPM2 непосредственно участвует в индукции апоптоза в условиях оксидативного стресса (Kang et al., 2018). Другим примером подобной работы является установление того, что нарушения в нейронах контактного взаимодействия эндоплазматического ретикулума с митохондриями приводит к нарушению в последних кальциевого гомеостаза, в конечном итоге приводя к процессам нейродегенерации (Lee et al., 2018). Существуют сенсоры и для других ионов, работающие по схожему принципу. Так, получены сенсоры на ионы меди (Fu et al., 2019), которые, по-видимому, принимают участие в сигнальном каскаде, обеспечивающем метаболическое взаимодействие астроглии с нейронами (Kardos et al., 2018). Существуют также зонды и на ионы железа, принимающие участие в регуляции широкого круга процессов роста и развития (Senthil Murugan et al., 2018), цинка (Yang et al., 2018).

Современная оптическая микроскопия позволяет не только охарактеризовать процессы внутриклеточной сигнализации, но и непосредственно влиять на них при помощи подходов оптогенетики. Оптогенетика в широком смысле слова представляет собой введение в клетку генетических конструкций, кодирующих фоточувствительные белки, меняющие свое поведение в ответ на свет определенной длины волны, как правило, за счет изменения конформации специального фоточувствительного домена. В настоящее время наработан обширный арсенал таких конструкций: в случае индуцированной светом димеризации, энергия фотонов заставляет фоточувствительный домен изменить конформацию белка таким образом, что он приобретает способность связываться с другим белком. В другом случае, называемом фотовысвобождением (uncaging), при воздействии света на фоточувствительный домен конформация белка изменяется таким образом, что белок "разворачивается" в активную форму. Фотовысвобождение как правило применяется для белков, для которых характерно аллостерическое автоингибирование (Farahani et al., 2021).

Так, метод индуцированной димеризации может применяться для рекрутирования меченого белка в конкретную область клетки, в зависимости от белкапартнера, с которым димеризация происходит. Этот метод может быть применен также и для секвестрирования белка из его "родного" компартмента, кластеризации белков, и даже регуляции транскрипции (например, рекрутированием определенного транскрипционного фактора в нужное время в нужное место). С другой стороны, фотовысвобождение может применяться для прямого контроля активности белков, например, путем перевода модифицированных ферментов в рабочую конформацию (Kolar, Weber, 2017).

Наглядной иллюстрацией пользы такого подхода в изучении сигнальных каскадов является управление сигнальным путем ВМР. Созданный в рамках одной из таких работ оптогенетический индуктор ВМР представляет собой рецептор ВМР с присоединенным к цитоплазматическому домену фоточувствительным димеризационным доменом. При облучении синим светом этот домен димеризуется, запуская каскад ВМР. Впоследствии авторам удалось оценить изменение уровня экспрессии NANOG Oct4 и фосфорилированного SMAD 1/5 при помощи иммунофлуоресцентного мечения, а также применить широкий набор молекулярных методов для изучения клеток, в которых осуществлялась индукция. Как отмечают авторы, такой подход проще и



**Рис. 2.** Основные современные методики сверхразрешающей микроскопии. a - SIM: возбуждающий свет перед попаданием на образец разделяется дифракционной решеткой на упорядоченный паттерн, поворачивая который при съемке можно получить высокочастотную информацию для последующей математической реконструкции структуры образца;  $\delta - STED$ : два лазера соосно проходят в сканирующую систему конфокального микроскопа и одномоментно попадают на препарат, где тороидально сфокусированный истощающий лазер подавляет флуоресценцию, вызванную возбуждающим лазером в участках, отличных от центральной области своего возбуждающего пятна, что и определяет эффективное пятно возбуждения таких систем; a - SMLM: одномоментно в образце возбуждается только часть флуорохромов, что при цикличной съемке позволяет с течением времени точно определить позиции всех флуоресцентных меток в образце на основе их функции рассеяния точки; не, за счет характерных изменений, вносимых ею в характер функции рассеивания.

надежнее использования рекомбинантных активирующих конструкций (Humphreys et al., 2020). Еще более интересными являются случаи, когда после оптогенетического запуска сигнального пути начинается прижизненное наблюдение за клетками с использованием заблаговременно введенной репортерной конструкции. Например, отслеживание при помощи флуоресцентного биосенсора поведения фосфатидной кислоты, являющейся важным вторичным мессенджером, после оптогенетической индукции ее синтеза в разных органеллах позволило показать, что фосфатидная кислота, синтезируемая в разных органеллах имеет разный тропизм (Tei, Baskin, 2020).

#### СВЕРХРАЗРЕШАЮЩАЯ МИКРОСКОПИЯ

Разрешение световой микроскопии фундаментально ограничено волновой природой света, что было впервые математически описано Эрнстом Аббе в 1873 г. В связи с дифракцией электромагнитных волн минимальное расстояние, на котором два флуоресцирующих объекта можно различить как раздельные (разрешение), примерно равно половине

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

длины волны возбуждающего света. Это расстояние называют дифракционным пределом, и указанная закономерность на практике сводится к невозможности получить разрешение лучше ~200 нм на обычном световом микроскопе. Однако существуют подходы, в совокупности получившие название сверхразрешающей световой микроскопии, позволяющие путем ряда технических ухищрений этот предел обойти (Sigal et al., 2018). В области изучения внутриклеточной сигнализации этот арсенал методов имеет большое значение в связи с тем, что многие события, важные для понимания сигнальных каскадов, происходят в масштабах меньших, чем возможно визуализировать при помощи классических методов световой микроскопии. Несмотря на крайне широкое разнообразие существующих сверхразрешающих методик, большая часть применяющихся в настоящее время коммерческих систем имеет в своей основе один из трех основных методов, которые коротко охарактеризованы далее (рис 2.).

В основе метода структурированного освещения (SIM) лежит освещение образца не по всему полю зрения, а решетчатым паттерном. Изображение захватывается 3–6 раз, с каждым кадром паттерн освещения

поворачивается таким образом, чтобы в местах пересечения происходила интерференция. Регистрируемая при этом высокочастотная информация в дальнейшем используется для математического восстановления структуры образца (Gustafsson, 2000). Интересно, что происходит этот феномен только в фокальной плоскости, поэтому при последовательной съемке образца с движением по оси Z возможна трехмерная реконструкция. Разрешение SIM обычно колеблется в пределах 100 нм, хотя некоторые современные системы могут доходить даже до 65 нм. Этот метод не имеет ограничений по подбору флуорохромов, наименее фототоксичен из трех основных подходов, и, как правило, именно он используется для съемки живых клеток. Однако для визуализации фиксированных препаратов он также пригоден. В качестве примера такой работы можно привести изучение тропизма сигнальных молекул к первичной ресничке, в которой было показано, что полиглутаминирование аксонемы играет в этом процессе ключевую роль. Размер исследуемых структур не позволил бы различить исследуемые структуры с использованием обычного конфокального микроскопа (He et al., 2018). Прижизненную визуализацию при помощи SIM можно проиллюстрировать работой, количественно характеризующей роль кофилинового сигнального пути в процессах роста аксонального конуса за счет колокализации кофилина и коакстатина с актиновым шитоскелетом с точностью, недоступной для дифракционно-ограниченных методов (Hou et al., 2021).

В методе STED улучшение разрешения достигается за счет тушения флуоресценции от возбуждающего лазера конфокального микроскопа коллимированным с ним лазером, сфокусированного тороидально. Диаметр отверстия этого торуса дифракционно не ограничен, и именно им определяется реальное пятно возбуждения (Hell, Wichmann, 1994). STED достигает разрешения в 85-30 нм в зависимости от модели, умеренно фототоксичен и умеренно быстр по скорости съемки, что делает его использование в живых клетках возможным, хотя и не оптимальным. Число меток также ограниченно, поскольку они не должны возбуждаться истощающим лазером. Например, с помощью STED-микроскопии было показано, что форма STAT3, фосфорилированная в ответ на взаимодействие FAK с α6-интегрином, в ядре клеток глиомы колокализуется с ТЕТЗ, конвертирующей 5-метилцитозин в 5-гидроксиметилцитозин. Вместе STAT3 и TET3 способствуют повышению экспрессии генов, отвечающих за поддержание глиомы (Herrmann et al., 2020). Другим примером использования STED является описание распределения EGFR, подавляющего процесс дифференцировки эпендимных клетках нейрогенной ниши латеральной вентрикулярной зоны с точностью до отдельных кластеров (Abdi et al., 2019). Интересным примером прижизненного использования STED является регистрация кальциевой сигнализации в пресинапсах клеток внутреннего уха живой мыши, что позволило авторам описать эту систему с большей точностью, нежели это удавалось им при помощи конфокальной микроскопии (Neef et al., 2018).

Наконец, методы локализационной микроскопии (SMLM) основаны на цикличном возбуждении небольших групп флуорохромов в образце импульсами лазера, после чего на основании функции рассеивания одиночного источника света позиция этих флуорохромов может быть реконструирована математически. Как именно достигается попеременная активация флуорохромов зависит от конкретного метода, но, как правило, для этого нужен тот или иной буфер сложного состава. Из-за цикличной съемки метод отличается длительностью и фототоксичностью, а также требует серьезного внимания к условиям съемки, таким как тепловой дрейф объектива, микровибрации, и даже размер молекул антител. При этом возможно относительно рутинное получение разрешения в 25-10 нм (Shivanandan et al., 2014). При помоши этого метода была детально описана причина подавления сигнального пути Нірро при механическом напряжении. С помощью двойной окраски на YAP и F-актин было показано, что YAP при механическом напряжении выходит из ядра в шитоплазму, за счет растягивания ядерных поровых комплексов актиновыми стресс-фибриллами (Gao et al., 2020). Высокое разрешение локализационной микроскопии позволяет не просто предсказать расстояния между молекулами на основе феномена FRET или колокализации, а непосредственно их увидеть. Примером такой работы является использование активной стабилизации столика микроскопа и его оптических компонентов для повышения точности локализации флуоресцентных меток до нескольких нанометров, что позволило авторам детально описать изменения, происходящие с иммунологическим синапсом в процессе Т-клеточной сигнализации. В частности, авторы показали, что расстояние между TCR и CD45 в активных и покоящихся Т-клетках отличается на 4-7 нм (Coelho et al., 2020). Наконец, несмотря на техническую сложность исполнения, прижизненная локализационная визуализация технически осуществима. Особенный интерес она представляет для отслеживания поведения одиночных молекул, что позволяет с большой точностью описывать кинетику их движения. В качестве примера такой работы можно привести описание кинетики димеризации ключевых факторов плюрипотентности Sox2 и Oct4 в эмбриональных стволовых клетках. Показано, что сначала с ДНК связывается Sox2, к которому затем присоединяется Oct4. Интересно, что успешное присоединение к ДНК этого комплекса происходит не сразу: Sox2 линейно перемещается по ДНК и каждые несколько секунд производит короткие неспецифические связывания, после чего вместе с Oct4 собирается в нужном локусе (Chen et al., 2014).

Серьезным ограничением описанных выше методик является необходимость наличия дорогостоящего и сложного в освоении оборудования. В тех случаях, когда прижизненная визуализация не требуется, возможно использование альтернативного подхода, в котором сама клетка искусственно расширяется при помощи гидрогеля с сохранением пространственного взаиморасположения белковых молекул. Этот метод, получивший название экспансионной микроскопии (ExM), позволяет увеличивать размеры клетки до 10 раз, с соответствующим увеличением эффективного разрешения. Еще большего разрешения можно достичь при визуализации таких расширенных образцов с помощью "настоящих" методов сверхразрешающей микроскопии, вплоть до молекулярного (Zwettler et al., 2020). Примером экспериментального применения методики ExM является визуализация кластеризации рианодиновых рецепторов с получением эффективного разрешения в 15 нм при помощи обычного конфокального микроскопа (Sheard et al., 2019).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные методики флуоресцентной микроскопии являются многофункциональным инструментом, позволяющим исследователям отследить и охарактеризовать поведение практически любых сигнальных молекул, в том числе прижизненно, что, несомненно, делает их важнейшим инструментом для изучения внутриклеточных сигнальных каскадов.

При этом развитие данной области не стоит на месте. Регулярно публикуются новые экспериментальные методики, представляющие собой как доработанные старые, так и принципиально новые подходы. Появляются все менее фототоксичные методики прижизненной съемки (Chen et al., 2014), растет предел достижимого разрешения в сверхразрешающей микроскопии, приближаясь к молекулярному (Gwosch et al., 2020), появляются стратегии корреляции данных с криоэлектронной микроскопией (Wolff et al, 2016). Эти и другие методики, несомненно, в будущем сыграют большую роль в изучении в том числе и процессов внутриклеточной сигнализации.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-4664.2022.1.4.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием животных или людей в качестве объектов.

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- *Abdi K., Neves G., Pyun J., Kiziltug E., Ahrens A., Kuo C.T.* 2019. EGFR signaling termination via numb trafficking in ependymal progenitors controls postnatal neurogenic niche differentiation. Cell Rep. V. 28. P. 2012.
- Bertero E., Maack C. 2018. Calcium signaling, reactive oxygen species in Mitochondria. Circ. Res. V. 122. P. 1460.
- *Bevilacqua C., Ducos B.* 2018. Laser microdissection: a powerful tool for genomics at cell level. Mol. Aspects Med. V. 59. P. 5.
- Bunt G., Wouters F.S. 2017. FRET from single to multiplexed signaling events. Biophys. Rev. V. 9. P. 119.
- Chen B.C., Legant W.R., Wang K., Shao L., Milkie D.E., Davidson M.W., Janetopoulos C., Wu X.S., Hammer J.A. 3rd, Liu Z., English B.P., Mimori-Kiyosue Y., Romero D.P., Ritter A.T., Lippincott-Schwartz J., et al. 2014. Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution. Science. V. 346. P. 1257998.
- Chen H., Puhl H.L., Koushik S.V., Vogel S.S., Ikeda S.R. 2006. Measurement of FRET efficiency, ratio of donor to acceptor concentration in living cells. Biophys. J. V. 91. P. 39.
- Chen J., Zhang Z., Li L., Chen B.C., Revyakin A., Hajj B., Legant W., Dahan M., Lionnet T., Betzig E., Tjian R., Liu Z. 2014. Single-molecule dynamics of enhanceosome assembly in embryonic stem cells. Cell. V. 156. P. 1274.
- Coelho S., Baek J., Graus M.S., Halstead J.M., Nicovich P.R., Feher K., Gandhi H., Gooding J.J., Gaus K. 2020. Ultraprecise single-molecule localization microscopy enables in situ distance measurements in intact cells. Sci. Adv. V. 6: eaay8271.
- Day R.N., Day K.H., Pavalko F.M. 2021. Direct visualization by FRET-FLIM of a putative mechanosome complex involving Src, Pyk2, MBD2 in living MLO-Y4 cells. PLoS One. V. 16: e0261660.
- Dhasmana D., Veerapathiran S., Azbazdar Y., Nelanuthala A.V.S., Teh C., Ozhan G., Wohland T. 2021. Wnt3 is lipidated at conserved cysteine, serine residues in zebrafish neural tissue. Front. Cell Dev. Biol. V. 9: 671218.
- Du L., Hu X., Yang W., Yasheng H., Liu S., Zhang W., Zhou Y., Cui W., Zhu J., Qiao Z., Maoying Q., Chu Y., Zhou H., Wang Y., Mi W. 2019. Spinal IL-33/ST2 signaling mediates chronic itch in mice through the astrocytic JAK2-STAT3 cascade. Glia. V. 67. P. 1680.
- Erben L., He M.X., Laeremans A., Park E., Buonanno A. 2018. A novel ultrasensitive in situ hybridization approach to detect short sequences, splice variants with cellular resolution. Mol. Neurobiol. V. 55. P. 6169.
- Farahani P.E., Reed E.H., Underhill E.J., Aoki K., Toettcher J.E. 2021. Signaling, deconstructed: using optogenetics to dissect, direct information flow in biological systems. Annu. Rev. Biomed. Eng. V. 23. P. 61.
- Fu Y., Pang X.X., Wang Z. Q., Chai Q., Ye F. 2019. A highly sensitive, selective fluorescent probe for determination of Cu(II), application in live cell imaging. Spectrochim. Acta. Part A Mol. Biomol. Spectrosc. V. 208. P. 198.
- Gao J., He L., Zhou L., Jing Y., Wang F., Shi Y., Cai M., Sun J., Xu H., Jiang J., Zhang L., Wang H. 2020. Mechanical force

regulation of YAP by F-actin, GPCR revealed by superresolution imaging. Nanoscale. V. 12. P. 2703.

- Gomez-Lamarca M.J., Falo-Sanjuan J., Stojnic R., Abdul Rehman S., Muresan L., Jones M.L., Pillidge Z., Cerda-Moya G., Yuan Z., Baloul S., Valenti P., Bystricky K., Payre F., O'Holleran K., Kovall R., Bray S. J. 2018. Activation of the Notch signaling pathway in vivo elicits changes in CSL nuclear dynamics. Dev. Cell. V. 44. P. 611.
- Govindaraj K., Hendriks J., Lidke D.S., Karperien M., Post J.N. 2019. Changes in fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) as an indicator of SOX9 transcription factor activity. Biochim. Biophys. Acta. Gene Regul. Mech. V. 1862. P. 107.
- Grant D.M., McGinty J., McGhee E.J., Bunney T.D., Owen D.M., Talbot C.B., Zhang W., Kumar S., Munro I., Lanigan P.M., Kennedy G.T., Dunsby C., Magee A.I., Courtney P., Katan M., Neil M.A.A., French P.M.W. 2007. High speed optically sectioned fluorescence lifetime imaging permits study of live cell signaling events. Opt. Express. V. 15. P. 15656.
- *Grassi D., Diaz-Perez N., Volpicelli-Daley L.A., Lasmézas C.I.* 2019. Pα-syn\* mitotoxicity is linked to MAPK activation, involves tau phosphorylation, aggregation at the mito-chondria. Neurobiol. Dis. V. 124. P. 248.
- Grobe H., Wüstenhagen A., Baarlink C., Grosse R., Grikscheit K. 2018. A Rac1-FMNL2 signaling module affects cellcell contact formation independent of Cdc42, membrane protrusions. PLoS One. V. 13. e0194716.
- *Gustafsson M.G.L.* 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. J. Microsc. V. 198. P. 82.
- Gwosch K.C., Pape J.K., Balzarotti F., Hoess P., Ellenberg J., Ries J., Hell S.W. 2020. MINFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells. Nat. Methods. V. 17. P. 217.
- Harkes R., Kukk O., Mukherjee S., Klarenbeek J., van den Broek B., Jalink K. 2021. Dynamic FRET-FLIM based screening of signal transduction pathways. Sci. Rep. V. 11: 20711.
- He K., Ma X., Xu T., Li Y., Hodge A., Zhang Q., Torline J., Huang Y., Zhao J., Ling K., Hu J. 2018. Axoneme polyglutamylation regulated by Joubert syndrome protein ARL13B controls ciliary targeting of signaling molecules. Nat. Commun. V. 9: 3310.
- Hell S.W., Wichmann J. 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. Opt. Lett. V. 19. P. 780.
- Herrmann A., Lahtz C., Song J., Aftabizadeh M., Cherryholmes G.A., Xin H., Adamus T., Lee H., Grunert D., Armstrong B., Chu P., Brown C., Lim M., Forman S., Yu H. 2020. Integrin α6 signaling induces STAT3-TET3-mediated hydroxymethylation of genes critical for maintenance of glioma stem cells. Oncogene. V. 39. P. 2156.
- *Hobro A.J., Smith N.I.* 2017. An evaluation of fixation methods: spatial, compositional cellular changes observed by raman imaging. Vib. Spectrosc. V. 91. P. 31.
- Hou X., Nozumi M., Nakamura H., Igarashi M., Sugiyama S. 2021. Coactosin promotes F-actin protrusion in growth cones under cofilin-related signaling pathway. Front. Cell Dev. Biol. V. 9: 660349.

- Hsu L.J., Hong Q., Chen S.T., Kuo H L., Schultz L., Heath J., Lin S.R., Lee M.H., Li D.Z., Li Z.L., Cheng H.C., Armand G., Chang N.S. 2017. Hyaluronan activates Hyal-2/WWOX/Smad4 signaling, causes bubbling cell death when the signaling complex is overexpressed. Oncotarget. V. 8. P. 19137.
- Humeau J., Bravo-San Pedro J.M., Vitale I., Nuñez L., Villalobos C., Kroemer G., Senovilla L. 2018. Calcium signaling, cell cycle: progression or death. Cell Calcium. V. 70. P. 3.
- Humphreys P.A., Woods S., Smith C.A., Bates N., Cain S.A., Lucas R., Kimber S.J. 2020. Optogenetic control of the BMP signaling pathway. ACS Synth. Biol. V. 9. P. 3067.
- Jha A., van Zanten T.S., Philippe J.M., Mayor S., Lecuit T. 2018. Quantitative control of GPCR organization, signaling by endocytosis in epithelial morphogenesis. Curr. Biol. V. 28. P. 1570.
- Kang P., Zhang W., Chen X., Yi X., Song P., Chang Y., Zhang S., Gao T., Li C., Li S. 2018. TRPM2 mediates mitochondriadependent apoptosis of melanocytes under oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. V. 126. P. 259.
- Kardos J., Héja L., Simon Á., Jablonkai I., Kovács R., Jemnitz K. 2018. Copper signalling: causes, consequences. Cell Commun. Signal. V. 16: 71.
- *Kolar K., Weber W.* 2017. Synthetic biological approaches to optogenetically control cell signaling. Curr. Opin. Biotechnol. V. 47. P. 112.
- König B., Hao Y., Schwartz S., Plested A.J.R., Stauber T. 2019. A FRET sensor of C-terminal movement reveals VRAC activation by plasma membrane DAG signaling rather than ionic strength. Elife. V. 8. e45421.
- Kreutzer J., Viehrig M., Pölönen R.P., Zhao F., Ojala M., Aalto-Setälä K., Kallio P. 2020. Pneumatic unidirectional cell stretching device for mechanobiological studies of cardiomyocytes. Biomech. Model. Mechanobiol. V. 19. P. 291.
- Le P.N., Keysar S.B., Miller B., Eagles J.R., Chimed T.S., Reisinger J., Gomez K.E., Nieto C., Jackson B.C., Somerset H.L., Morton J.J., Wang X.J., Jimeno A. 2019. Wnt signaling dynamics in head, neck squamous cell cancer tumor-stroma interactions. Mol. Carcinog. V. 58. P. 398.
- Lee K.S., Huh S., Lee S., Wu Z., Kim A.K., Kang H.Y., Lu B. 2018. Altered ER-mitochondria contact impacts mitochondria calcium homeostasis, contributes to neurodegeneration in vivo in disease models. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. V. 115. P. E8844.
- Li X., Zhang Z., Jiang H., Li Q., Wang R., Pan H., Niu Y., Liu F., Gu H., Fan X., Gao J. 2018. Circular RNA circPVT1 promotes proliferation, invasion through sponging miR-125b, activating E2F2 signaling in non-small cell lung cancer. Cell. Physiol. Biochem. V. 51. P. 2324.
- Lohse M.J., Bünemann M., Hoffmann C., Vilardaga J.P., Nikolaev V.O. 2007. Monitoring receptor signaling by intramolecular FRET. Curr. Opin. Pharmacol. V. 7. P. 547.
- *Lun X.K., Bodenmiller B.* 2020. Profiling cell signaling networks at single-cell resolution. Mol. Cell. Proteomics. V. 19. P. 744.
- Mao T., O'Connor D.H., Scheuss V., Nakai J., Svoboda K. 2008. Characterization, subcellular targeting of GCaMP-type genetically-encoded calcium indicators. PLoS One. V. 3. e1796.

- Markiewicz R., Litowczenko J., Gapiński J., Woźniak A., Jurga S., Patkowski A. 2022. Nanomolar nitric oxide concentrations in living cells measured by means of fluorescence correlation spectroscopy. Molecules. V. 27. P. 1010.
- Matryba P., Kaczmarek L., Gołąb J. 2019. Advances in ex situ tissue optical clearing. Laser Photonics Rev. V. 13: 1800292.
- *Meyer T., Teruel M.N.* 2003. Fluorescence imaging of signaling networks. Trends Cell Biol. V. 13. P. 101.
- Nair A., Chauhan P., Saha B., Kubatzky K.F. 2019. Conceptual evolution of cell signaling. Int. J. Mol. Sci. V. 20: 3292.
- Neef J., Urban N.T., Ohn T.L., Frank T., Jean P., Hell S.W., Willig K.I., Moser T. 2018. Quantitative optical nanophysiology of Ca<sup>2+</sup> signaling at inner hair cell active zones. Nat. Commun. V. 9: 290.
- Reddy G.R., West T.M., Jian Z., Jaradeh M., Shi Q., Wang Y., Chen-Izu Y., Xiang Y.K. 2018. Illuminating cell signaling with genetically encoded FRET biosensors in adult mouse cardiomyocytes. J. Gen. Physiol. V. 150. P. 1567.
- Rotherham M., Henstock J.R., Qutachi O., El Haj A.J. 2018. Remote regulation of magnetic particle targeted Wnt signaling for bone tissue engineering. Nanomedicine Nanotechnology. Biol. Med. V. 14. P. 173.
- Senthil Murugan A., Vidhyalakshmi N., Ramesh U., Annaraj J. 2018. In vivo bio-imaging studies of highly selective, sensitive rhodamine based fluorescent chemosensor for the detection of Cu<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> ions. Sensors Actuators, B Chem. V. 274. P. 22.
- Shapanis A., Lai C., Smith S., Coltart G., Sommerlad M., Schofield J., Parkinson E., Skipp P., Healy E. 2021. Identification of proteins associated with development of metastasis from cutaneous squamous cell carcinomas (cSCCs) via proteomic analysis of primary cSCCs. Br. J. Dermatol. V. 184. P. 709.
- Sheard T.M.D., Hurley M.E., Colyer J., White E., Norman R., Pervolaraki E., Narayanasamy K. K., Hou Y., Kirton H.M., Yang Z., Hunter L., Shim J.U., Clowsley A.H., Smith A.J., Baddeley D., Soeller C., Colman M.A., Jayasinghe I. 2019. Three-dimensional, chemical mapping of intracellular signaling nanodomains in health, disease with enhanced expansion microscopy. ACS Nano. V. 13. P. 2143.
- Shivanandan A., Deschout H., Scarselli M., Radenovic A. 2014. Challenges in quantitative single molecule localization microscopy. FEBS Lett. V. 588. P. 3595.
- Sigal Y.M., Zhou R., Zhuang X. 2018. Visualizing, discovering cellular structures with super-resolution microscopy. Science. V. 361. P. 880.
- Singh R., Holz P.S., Roth K., Hupfer A., Meissner W., Müller R., Buchholz M., Gress T.M., Elsässer H.P., Jacob R., Lauth M. 2019. DYRK1B regulates Hedgehog-induced microtubule acetylation. Cell. Mol. Life Sci. V. 76. P. 193.
- Stringer C., Pachitariu M. 2019. Computational processing of neural recordings from calcium imaging data. Curr. Opin. Neurobiol. V. 55. P. 22.
- Sun W., Wang X., Li J., You C., Lu P., Feng H., Kong Y., Zhang H., Liu Y., Jiao R., Chen X., Ba Y. 2018. MicroRNA-181a promotes angiogenesis in colorectal cancer by targeting

SRCIN1 to promote the SRC/VEGF signaling pathway. Cell Death Dis. V. 9: 438.

- Szabó Á., Szendi-Szatmári T., Ujlaky-Nagy L., Rádi I., Vereb G., Szöllősi J., Nagy P. 2018. The effect of fluorophore conjugation on antibody affinity, the photophysical properties of dyes. Biophys. J. V. 114. P. 688.
- *Tei R., Baskin J.M.* 2020. Spatiotemporal control of phosphatidic acid signaling with optogenetic, engineered phospholipase Ds. J. Cell Biol. V. 219: e201907013.
- Vira S., Mekhedov E., Humphrey G., Blank P. S. 2010. Fluorescent-labeled antibodies: Balancing functionality, degree of labeling. Anal. Biochem. V. 402. P. 146.
- Wang S., Su X., Xu M., Xiao X., Li X., Li H., Keating A., Zhao R.C. 2019. Exosomes secreted by mesenchymal stromal/stem cell-derived adipocytes promote breast cancer cell growth via activation of Hippo signaling pathway. Stem Cell Res. Ther. V. 10: 117.
- Wang Z., Li Y., Kong D., Banerjee S., Ahmad A., Azmi A. S., Ali S., Abbruzzese J.L., Gallick G.E., Sarkarr F.H. 2009. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. Cancer Res. V. 69. P. 2400.
- Wang Z., Liu F., Wei M., Qiu Y., Ma C., Shen L., Huang Y. 2018. Chronic constriction injury-induced microRNA-146a-5p alleviates neuropathic pain through suppression of IRAK1/TRAF6 signaling pathway. J. Neuroinflammation. V. 15: 179.
- Wang Z., Liu C.H., Huang S., Fu Z., Tomita Y., Britton W.R., Cho S.S., Chen C.T., Sun Y., Ma J.X., He X., Chen J. 2020. Wnt signaling activates MFSD2A to suppress vascular endothelial transcytosis, maintain blood-retinal barrier. Sci. Adv. V. 6: eaba7457.
- Wolff G., Hagen C., Grünewald K. 2016. Towards correlative super-resolution fluorescence, electron cryo-microscopy. Biol. Cell. V. 108. P. 245.
- Yang D.M., Fu T.F., Lin C.S., Chiu T.Y., Huang C.C., Huang H.Y., Chung M.W., Lin Y.S., Manurung R.V., Nguyen P.N.N., Chang Y.F. 2020. High-performance FRET biosensors for single-cell, in vivo lead detection. Biosens. Bioelectron. V. 168. P. 112571.
- Yang Y.S., Ma C.M., Zhang Y.P., Xue Q.H., Ru J.X., Liu X.Y., Guo H.C. 2018. A highly selective 'turn-on' fluorescent sensor for zinc ion based on a cinnamyl pyrazoline derivative, its imaging in live cells. Anal. Methods. V. 10. P. 1833.
- Yosefzon Y., Soteriou D., Feldman A., Kostic L., Koren E., Brown S., Ankawa R., Sedov E., Glaser F., Fuchs Y. 2018. Caspase-3 regulates YAP-dependent cell proliferation, organ size. Mol. Cell. V. 70. P. 573.
- Zhang X., Hu Y., Yang X., Tang Y., Han S., Kang A., Deng H., Chi Y., Zhu D., Lu Y. 2019. Forster resonance energy transfer (FRET)-based biosensors for biological applications. Biosens. Bioelectron. V. 138: 111314.
- Zwettler F.U., Reinhard S., Gambarotto D., Bell T.D.M., Hamel V., Guichard P., Sauer M. 2020. Molecular resolution imaging by post-labeling expansion single-molecule localization microscopy (Ex-SMLM). Nat. Commun. V. 11: 3388.

#### ПАНФЕРОВ, МАЛАШИЧЕВА

### **Fluorescence Imaging of Signal Transduction Pathways**

E. V. Panferov<sup>*a*, \*</sup> and A. B. Malashicheva<sup>*a*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, 194064 Russia \*e-mail: panferov.aux@gmail.com

The review article details the main methods, approaches currently used in fluorescence microscopy to visualize intracellular signal transduction pathways. Both fixed samples, live-cell imaging are discussed, with particular attention being placed on super-resolution microscopy. Practical applications, limitations are given for each technique, illustrated by the selected recent scientific advancements.

*Keywords:* light microscopy, fluorescence microscopy, cellular signaling, live-cell imaging, immunofluorescence, super-resolution microscopy

УДК 575.8:616-01/09

## НАR: ИСТОРИЯ, ФУНКЦИИ, РОЛЬ В ЭВОЛЮЦИИ И ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. А. С. Рыжкова<sup>1</sup>, А. А. Хабарова<sup>1</sup>, А. С. Чвилёва<sup>2</sup>, Т. А. Шнайдер<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия <sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

\**E-mail: shnayder.t@yandex.ru* Поступила в редакцию 22.03.2022 г. После доработки 13.04.2022 г. Принята к публикации 13.04.2022 г.

Предполагается, что большую роль в эволюции человека играют в первую очередь изменения механизмов регуляции генов, а не изменения последовательностей, кодирующих белок. Недавние исследования выявили существование особого класса геномных элементов – HAR (human accelerated regions). Они представляют собой консервативные у млекопитающих некодирующие последовательности ДНК, начавшие в ходе эволюции накапливать специфические для человека мутации. С момента их открытия фактическая роль HAR в эволюции человека оставалась неясной, поскольку они почти исключительно представлены некодирующими последовательностями без аннотаций. В настоящее время известно, что HAR-элементы обогащены мотивами связывания транскрипционных факторов и гистоновыми метками активного хроматина. Исследования последних лет с использованием данных функциональной геномики, вычислительных подходов и генетического анализа показали, что многие HAR участвуют в регуляции генов развития и внесли значительный вклад в эволюцию мозга человека, в частности увеличение объема коры больших полушарий. Также есть несколько свидетельств связи полиморфизмов в последовательностях HAR с развитием различных нейропатологий, таких как расстройства аутистического спектра, шизофрения и болезнь Хантингтона. Такие функциональные методики анализа, как высокопроизводительный репортерный анализ и скрининги с использованием системы CRISPR, значительно увеличивают количество охарактеризованных регуляторных элементов, специфичных для человека. Дальнейшее исследование НАР и других эволюционно динамичных областей генома может прояснить некоторые сложные эволюционные изменения, лежащие в основе уникальной цитоархитектуры и когнитивных способностей мозга человека. В данном обзоре мы осветили подходы к идентификации HAR в геноме, их роль в регуляции активности генов, вклад в эволюцию мозга человека и рассмотрели некоторые патологические эффекты от мутаций в последовательностях HAR.

*Ключевые слова:* зоны ускоренного развития у человека, HAR, нейрогенез, эволюция головного мозга **DOI:** 10.31857/S0041377122040083

Головной мозг - это один из самых сложно устроенных органов. Грандиозный эволюционный скачок, произошедший около 14 млн лет назад, привел к значительному увеличению его размеров и появлению уникальных когнитивных способностей у рода Ното. В основе таких глобальных изменений лежит эволюция сложных молекулярно-генетических механизмов, контролирующих развитие головного мозга человека. В 1975 году была выдвинута гипотеза (Kings, Wilson, 1975) о первостепенной роли изменений механизмов регуляции генов, а не изменения последовательностей, кодирующих белок, которая за последние два десятилетия подкрепилась целым рядом исследований (Cretekos et al., 2008; Prabhakar et al., 2008; Guerreiro et al., 2013; Cooper et al., 2014). В данном контексте обнаруженные совсем недавно в геноме человека зоны ускоренного развития (human *accelerated regions* – HAR) (Pollard et al., 2006; Prabhakar et al., 2006) представляют собой особый интерес как один из драйверов эволюции.

В этом обзоре мы рассмотрим основные подходы для идентификации последовательностей НАR в геноме, их роль в регуляции активности генов и вклад в эволюцию головного мозга человека. Также мы обратим внимание на некоторые патологии нервной системы, возникающие в результате мутаций в последовательностях НАR.

#### СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ НАК В ГЕНОМЕ

Зоны ускоренного развития человека (HAR) – это консервативные последовательности ДНК, ко-торые достаточно медленно изменялись на протяже-

нии эволюции млекопитающих, но после отделения линии человека начали активно накапливать мутации и подвергаться положительному отбору. Именно этот процесс, как полагают многие исследователи, значительно повлиял на активность генов и привел к росту когнитивных способностей у человека.

Первые работы с описанием НАR были опубликованы в 2006 г. С помощью методов сравнительной геномики авторы проанализировали скорость нуклеотидных мутаций у человека (Pollard et al., 2006). На первом этапе были выровнены геномы шимпанзе, мыши и крысы для поиска консервативных регионов с идентичностью минимум 96% и длиной более 100 пар нуклеотидов (п.н.). Затем для каждой из примерно 35 000 таких последовательностей млекопитающих (средняя длина 140 п.н.) исследовали ортологичные фрагменты во всех других доступных геномах позвоночных в поисках областей, которые имеют большое количество изменений у человека по сравнению с другими видами. В результате были выявлены 49 регионов со статистически значимым увеличением частоты изменений у человека. 96% обнаруженных HAR располагались в некодирующих, преимушественно в богатых ГЦ и прителомерных районах. Значительная часть HAR прилегала к генам, участвующим в регуляции транскрипции и развитии нервной системы.

При исследовании консервативных некодирующих последовательностей (HAR) у 8 позвоночных, включая человека, авторы (Prabhakar et al., 2006) обнаружили 992 элемента со специфичными для человека нуклеотидными заменами при  $P \le 0.005$ , среди которых новых замен было на 79% больше, чем тех, которые произошли бы случайно.

Другие авторы использовали иной статистический метод (Bird et al., 2007). На первом этапе ими был выбран топ 5% консервативных некодирующих последовательностей. Анализ последовательностей был осуществлен с использованием программ MULTIZ и PhastCons (Felsenstein, Churchill, 1996; Mayor et al., 2000; Siepel et al., 2005) по 17 геномам позвоночных от рыб до млекопитающих, включая человека. Выбранные последовательности, имеющие более чем четыре замены у человека, по сравнению с шимпанзе были выровнены с соответствующими последовательностями макаки-резуса. После исключения из таких последовательностей псевдогенов, ретротранспозонов, вариации числа копий генов (сору number variants, CNV), осталось 1145 последовательностей.

Следующее исследование было посвящено поиску регионов с ускоренными изменениями, обнаруженными с помощью теста отношения правдоподобия (*likelihood ratio test*, LRT), нацеленного на выявление только некодирующих областей, путем учета локальных скоростей изменения последовательности (Bush, Lahn, 2008). Таким образом, в геноме человека было обнаружено 63 участка с высокой скоростью изменений (HAR). Основное различие от ранее обнаруженных нуклеотидных последовательностей заключалось в отсутствие значительного обогащения ГЦ в обнаруженных регионах.

Анализ результатов секвенирования 29 геномов млекопитающих (Lindblad-Toh et al., 2011) и их анализ с помощью программного обеспечения PhyloP (Pollard et al., 2010) позволил выявить 563 региона HAR. Кроме того, было дополнительно обнаружено 1930 HAR, которые были консервативны у пяти видов приматов, но скорость изменений этих районов значительно увеличилась у человека, причем наибольшая скорость замещений происходит в основном в регуляторных регионах с меньшим эволюционным консерватизмом (Lindblad-Toh et al., 2011).

В работе 2015 г. авторы использовали другой подход (Gittelman et al., 2015): они начали исследовать сайты чувствительности к дезоксирибонуклеазе I (DNase I hypersensitive site, DHS), которые предположительно являются активными регуляторными элементами генома (Dorschner et al., 2004; Maurano et al., 2012). Причиной применения подхода, основанного на использовании DHS, в дополнение к сравнительной геномике, было то, что, согласно некоторым исследованиям, регуляторные последовательности у разных видов, несмотря на их консервативность, могут быть активными у одних видов и неактивными у других (Dermitzakis, Clark, 2002). Использование DHS помогает выбрать регионы с активными метками молекулярной регуляции. Для идентификации HAR в геноме человека авторы использовали карты DHS из 130 типов клеток, определенных в проектах ENCODE и Roadmap Epigenomics (https://www.encodeproject.org/, http://www.roadmapepigenomics.org/). После объединения данных по DHS по типам клеток было получено 2093197 сайтов (средний размер составлял 290 п.н.), затем после полногеномного выравнивания геномов 6 видов приматов были получены отдельные выравнивания для каждого сайта DHS. Специфичные для человека замены в DHS сравнивались с окружающими районами длиной около 50 тыс. п.н., которые, как считалось, эволюционировали в рамках нейтральной эволюционной модели. Для этого использовали программу PhyloFit из пакета PHAST (Hubisz et al., 2011). Затем использование PhyloP позволило выявить 524 регуляторных последовательности, которые были консервативны у всех видов, кроме человека. Такие сайты назвали human-accelerated DHS (haDHS). В обнаруженных регионах накапливались мутации в среднем в 4 раза быстрее. Интересно, что по сравнению с консервативными неускоренными DHS, haDHS в среднем контактировали с меньшим числом генов, что позволяет предположить, что адаптивная эволюция приводит к более узконаправленной регуляции экспрессии генов.

Различные биоинформатические подходы, использованные разными авторами, привели к получению наборов данных с разными свойствами. Детально эти



**Рис. 1.** Разные способы выявления HAR в геномах. *Сверху* указаны основные ключевые подходы для идентификации HAR: консервативные элементы, используемые как кандидаты для поиска HAR и число видов, участвовавших в анализе; число выявленных кандидатов в HAR; статистические методы, используемые для поиска регионов с ускоренными изменениями (мутированием). LRT – likelihood ratio test; ANC – accelerated conserved non-coding sequences; HACNSs – human accelerated conserved non-coding sequences; HTBE – human terminal branch elements; 2xHAR – second generation HAR. *Внизу* пересекающиеся окружности показывают пересечение данных, полученных разными методами (адаптировано и переведено из: Franchini, Pollard, 2017).

различия рассмотрены в нескольких обзорах и приведены на рис. 1 (Franchini, Pollard, 2017; Levchenko et al., 2018). Например, в некоторых работах рассматривали и кодирующие, и некодирующие последовательности (Pollard et al., 2006; Lindblad-Toh et al., 2011; Gittelman et al., 2015), в то время как в других авторы ограничивали свои исследования только некодирующими областями (Prabhakar et al., 2006; Bird et al., 2007). При этом наборы данных, которые включали и кодирующие области, или, например, были связаны с чувствительными к ДНКазе сайтами. кажутся более репрезентативными для биологической реальности. Для выравнивания и определения районов использовались различные виды животных, начиная от шести приматов и заканчивая 17 видами позвоночных и 29 видами млекопитающих. Таким обра-

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

зом, вопрос как об эволюционной консервативности HAR, так и в целом об инструментах для их поиска в геноме человека, остается открытым. Другим ключевым вопросом современных исследований, посвященных HAR, является изучение функций таких геномных районов.

#### ФУНКЦИИ НАВ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ

При помощи инструментов сравнительной геномики к настоящему времени выявлено более 3100 HAR, находящихся в некодирующих областях генома. Важно, что HAR распределены в геноме неслучайным образом. Они склонны группироваться в определенных локусах и находятся вблизи генов развития и генов, экспрессирующихся в центральной нервной системе (Pollard et al., 2006; Capra et al., 2013; Kamm et al., 2013а). Большинство HAR находится при этом в межгенных областях. Таким образом, типичный HAR располагается в группе с несколькими другими в генной "пустыне", окруженной одним или несколькими генами развития, что наталкивает на мысль о наличии у них регуляторных функций.

Основная сложность в ассоциации конкретных НАR с регуляцией активности генов человека заключается в том, что подавляющее большинство этих геномных элементов находится в не аннотированных областях генома, и их эволюционная консервативность не свидетельствует напрямую об их функции. Важной проблемой остается определение того, какие именно последовательности HAR действительно являются драйверами эволюционных изменений. Функциональная геномика, в частности, масштабные транскриптомные и эпигеномные проекты, вроде ENCODE и Roadmap Epigenomics, предоставляют большой объем данных для предсказания того, какие HAR выступают в роли регуляторных элементов (Hoffman et al., 2013). Например, данные транскриптомного анализа, распределения зон открытого хроматина, эксперименты ChIP-seq с антителами к РНК-полимеразе, различным транскрипционным факторам и гистоновым модификациям помогают идентифицировать активно транскрибирующиеся гены и их промоторы, а также дистальные энхансеры. Кроме того, интеграция данных функциональной геномики и вычислительных подходов, в частности машинного обучения, позволяет связывать конкретные HAR с определенными функциями. Более прицельным и прямым способом установления функционального значения этих последовательностей является оценка эффектов мутаций в HAR.

Авторы одного из исследований (Capra et al., 2013) совместили косвенные и прямые свидетельства того, что HAR выступают в роли энхансеров, воспользовавшись коллекцией из 2649 HAR, обнаруженных в более ранних работах (Pollard et al., 2006; Prabhakar et al., 2006; Bird et al., 2007; Bush, Lahn, 2008; Lindblad-Toh et al., 2011). Анализ локализации НАR выявил обогащение ими в окрестностях генов, вовлеченных в регуляцию эмбрионального развития. Далее для нескольких линий клеток был проведен анализ доступных эпигеномных данных, а именно: распределения меток H3K4me1 и H3K27ac, характерных для энхансеров, связывания транскрипционного коактиватора P300/CBP и белка СТСF, опосредующего формирование промотор-энхансерных петель. Обогашение последовательностей HAR указанными эпигенетическими метками свидетельствует о том, что около 29% HAR функционируют как энхансеры во время развития мозга, сердца и конечностей. Для валидации энхансерной функции HAR напрямую применяли методику с использованием репортерных генетических конструкций in vivo. Кроме того, была обнаружена видоспецифичность функций HAR: паттерн энхансерной активности отличался в мозге трансгенных мышей с встройкой последовательности HAR человека или же последовательности шимпанзе.

В другой работе (Doan et al., 2016) при помощи технологии захвата конформации хромосом 3С (chromosome conformation capture), позволяющей получить информацию о геномных контактах интересующего локуса, был проведен систематический анализ генов-мишеней для более чем 500 HAR. С использованием геномных данных здоровых людей и пациентов с расстройствами аутистического спектра, а также данных Roadmap Epigenomics авторы выявили основные регуляторные функции HAR, в частности в нервной системе. Для этого авторами (Doan et al., 2016) были выбраны несколько редких гомозиготных мутаций, соответствующих следующим критериям: наличие активных регуляторных меток, локализация в пределах 1 млн. п.н. от генов, ассоциированных с развитием нервной системы, а также отсутствие у пациентов мутаций в кодирующих последовательностях, объясняющих патологический фенотип (расстройство аутистического спектра (РАС), синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), первазивное расстройство развития). В іп vitro экспериментах были выявлены функциональные эффекты мутаций в ряде HAR, формирующих регуляторные петли с промоторами некоторых генов нейрогенеза, таких как CUX1, PTBP2, GPC4 и MEF2C. Аномальная экспрессия этих генов связана с серьезными дефектами синаптогенеза и других процессов нейрального развития (Allen et al., 2012; Li et al., 2014; Cubelos et al., 2015). Таким образом, были идентифицированы несколько конкретных HAR, играющих важную роль в развитии мозга человека и предрасположенности к нарушениям в его развитии.

В упомянутых выше исследованиях была проведена некоторая предварительная функциональная характеристика, однако для исчерпывающего картирования генов-мишеней, регулируемых энхансерами HAR, следует учитывать тканевую специфичность, поскольку многие регуляторные хроматиновые контакты являются высоко тканеспецифичными (Won et al., 2016). Авторы определили стадии развития организма и ткани. в которых HAR выполняют регулирующую роль (Won et al., 2019). Список из почти трех тысяч HAR был сопоставлен с участками DHS в клетках 51 типа и тканей. DHS-зоны хроматина связаны с транскрипционной активностью, поскольку являются доступными для связывания белков, например, транскрипционных факторов. В соответствии с более ранними работами, обогащение HAR было замечено в регуляторных элементах, активных в эмбриональном развитии (надпочечники, головной мозг, почки, легкие и мышцы), причем наибольшее обогащение наблюдали в мозге плода.

Список из известных HAR проверили на пересечение с активными эпигенетическими метками:

НЗК27ас, НЗК4те1 и НЗК4те2. Полученные данные указывают на то, что HAR обогащены в энхансерах, регулирующих гены в развивающемся мозге в большей степени, чем в мозге взрослого человека. Наконец, были использованы данные о пространственных промотор-энхансерных контактах генома в кортикальной пластинке и герминальной зоне развивающейся коры мозга человека (Won et al., 2016). И снова, подтверждая и дополняя полученные ранее данные, генами-мишенями HAR по большей части оказывались регуляторы сигнальных путей, участвующих в развитии мозга человека, регионализации, формировании дорсо-вентральной паттернизации мозга (EMX2, PAX6, GLI3, NKX6.1 и NKX6.2), миграции нейронов кортекса (TBR1, CUX1, POU3F2, POU3F3, RORB, MDGA1 и ETV1) и пролиферации нейрональных предшественников (PAX6, HES1, SOX2, GLI3 и TBR2).

В этой же работе (Won et al., 2016) для экспериментальной валидации функций HAR была использована CRISPR/Cas9-опосредованная система активации транскрипции (dCas9-VP64). При помощи этого метода было проверено три взаимодействия НАR с их предполагаемыми целевыми генами -GLI2, GLI3 и TBR1. Эти гены кодируют важные регуляторы развития переднего мозга и миграции нейронов кортекса. Было проанализировано, какой эффект оказывает активация HAR на их предполагаемые гены-мишени в нейральных клетках-предшественниках человека. Результаты данного эксперимента подтвердили, что хроматиновые контакты упомянутых HAR с промоторами генов-мишеней действительно являются функциональными. Благодаря этому было получено прямое подтверждение того, что НАR-энхансеры регулируют ряд специфических генов, участвующих в увеличении коры головного мозга у рода Ното в отряде приматов.

Показано, что даже однонуклеотидные замены способны породить новые регуляторные функции этих последовательностей у человека. Не так давно для изучения этого явления был использован массовый параллельный репортерный анализ (massively parallel reporter assay, MPRA) (Ashuach et al., 2019). B методе MPRA синтезированная библиотека кандидатных регуляторных элементов помешается в конструкцию перед геном репортером, содержащим случайный олигонуклеотидный баркод. Затем для оценки регуляторной активности используют высокопроизводительное секвенирование коллекции баркодов. Таким образом, появилась возможность исследовать тысячи вариаций в регуляторных последовательностях одновременно в ходе одного эксперимента.

МРRА был совмещен с данными о распределении эпигенетических меток (H3K27ac, H3K4me1, DNaseI-seq) *in vivo*, т.е. в тканях мозга человека на разных этапах его развития (Girskis et al., 2021). Кроме того, чтобы определить, связана ли характерная

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

для человека дивергенция последовательностей НАR со специфическими изменениями активности нейрональных энхансеров в развитии мозга, авторы сравнили функциональную активность более 3100 элементов НАR человека с их ортологами у шимпанзе. Это исследование показало, что почти половина всех НAR действует как энхансеры в ходе развития нервной системы, а их *цис*-регуляторная архитектура претерпела значительные изменения, уникальные для человека (Girskis et al., 2021).

Помимо достаточно широко освешенной в литературе функции HAR как регуляторных элементов, небольшая доля этих последовательностей содержит некодирующие РНК (5.1% п.н.) (Hubisz, Pollard, 2014). В частности, HAR1 является частью последовательности, с которой считывается некодирующая PHK HAR1F. Ее экспрессия активируется у человека в ходе развития кортекса (Pollard et al., 2006). Кроме того, интересным примером является быстро эволюционирующий регион, обнаруженный в интроне гена FOXP2. Мутации в этом гене часто связывают с эволюцией речи у человека. Данный район, вероятно, выполняет функцию энхансерной РНК (эРНК). эРНК являются продуктами активных энхансеров и играют важную роль в регуляции генной активности. Большинство эРНК связаны с хроматином. Механизмы их действия разнообразны. Они способны изменять доступность хроматина, активно взаимодействуя с белками, ассоциированными с хроматином. Кроме того, эРНК играют роль в формировании петли энхансер-промотор и взаимодействуют с транскрипционными факторами. Более подробно пример HAR в интроне гена FOXP2 рассматривается в следующем разделе.

В совокупности результаты рассмотренных работ демонстрируют, что многочисленные сложные аспекты развития мозга человека подчиняются специфической для человека регуляции, в значительной степени находящейся под влиянием зон ускоренного развития.

#### РОЛЬ НАК В ЭВОЛЮЦИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Мозг человека — один из самых сложно устроенных органов среди всех животных. За последние 14 млн лет его размер увеличился почти в три раза по сравнению с ближайшими ныне живущими приматами, шимпанзе и бонобо. Этот процесс сопровождался приобретением новых уникальных навыков человека, таких как речь (Aboitiz, García, 1997) и сложные социальные взаимодействия (Herrmann et al., 2007; Tomasello, Vaish, 2013).

В основе такого грандиозного когнитивного скачка лежит эволюция сложных молекулярно-генетических механизмов, контролирующих развитие головного мозга человека. Сравнительный анализ геномов позволил выявить порядка 16 млн нуклеотидных замен, возникших в линии человека после расхождения с общим предком шимпанзе (Consortium, 2005). Из них только порядка 10% приходятся на белок-кодирующие участки генома, при этом большая часть является нейтральными. Такая небольшая степень молекулярной дивергенции вряд ли может объяснить глобальные анатомические и когнитивные изменения, появившиеся у человека.

Одной из возможных причин диверсификации может быть появление у человека новых уникальных генов, например, за счет дупликаций. За последние годы были описаны несколько таких примеров: *HYDIN2* (Doggett et al., 2006), *SRGAP2C* (Dennis et al., 2012; Charrier et al., 2012), *ARHGAP11B* (Florio et al., 2015) и *NOTCH2NL* (Fiddes et al., 2018; Suzuki et al., 2018). Однако стоит учесть, что появление новых функциональных дуплицированных генов – это довольно редкое явление (Bailey et al., 2002; Sudmant et al., 2010).

Почти 50 лет назад была выдвинута гипотеза (King, Wilson, 1975), согласно которой анатомические и функциональные эволюционные различия между человеком и шимпанзе чаше основаны на изменениях механизмов, контролирующих экспрессию генов, чем на изменениях последовательностей белков. За последние годы был накоплен огромный массив данных, подтверждающих это предположение для разных видов животных (Cretekos et al., 2008; Prabhakar et al., 2008; Guerreiro et al., 2013; Cooper et al., 2014). Среди ярких примеров морфологических изменений, ассоциированных с изменениями паттернов экспрессии отдельных генов, можно выделить утрату конечностей у змей, которая вызвана потерей одного из энхансеров гена Shh (Kvon et al., 2016) и редукцию таза у колюшек за счет делеции энхансера гена Pitx1 (Chan et al., 2010). Учитывая, что большинство из описанных HAR обладают энхансерной активностью (Capra et al., 2013), и многие из них найдены рядом с генами, участвующими в развитии коры головного мозга (Johnson et al., 2009; Kamm et al., 2013a, 2013b; Caporale et al., 2019), предположение, что именно эти регуляторные элементы являются одними из драйверов эволюции головного мозга человека, в последние годы приобретает все большую популярность (Haygood et al., 2010; Mitchell, Silver, 2018: Wei et al., 2019: Girskis et al., 2021). Ниже будут рассмотрены несколько ярких примеров, иллюстрирующих роль HAR в изменении регуляции экспрессии генов в ходе нейрогенеза человека.

Ген FOXP2. Устная речь является одним из главных и уникальных эволюционных приобретений человека. Ее возникновение было связано с масштабными изменения молекулярных механизмов, обеспечивающих развитие головного мозга и речевого тракта. Отправной точкой в расшифровке генетических изменений, приведших к появлению устной речи, можно считать многолетние исследования уникальной британской семьи (KE family) с тяжелыми нарушениями речи (Vargha-Khadem et al., 1995; Fishег et al., 1998; Lai et al., 2000). В 2001 г. обнаружили генетическую причину изучаемой семейной патологии — мутацию в гене *FOXP2* (Lai et al., 2001). Кроме того, в последующие годы были описаны новые клинические случаи тяжелых нарушений развития речи, вызванные мутациями в этом генетическом локусе (MacDermot et al., 2005; Feuk et al., 2006; Zeesman et al., 2006; Lennon et al., 2007; Rice et al., 2012; Reuter et al., 2017; Zilina et al., 2012). С тех пор ген *FOXP2* рассматривается как один из ключевых генов-кандидатов, отвечающих за развитие устной речи у человека.

Белок FOXP2 (forkhead box protein P2) является транскрипционным фактором (Lai et al., 2001), действующим в основном как белок-репрессор (Spiteri et al., 2007; Vernes et al., 2007; Oswald et al., 2017). У человека он обнаруживается во многих органах, в том числе головном мозге, причем как в период эмбриогенеза (Lai et al., 2003), так и постнатальном развитии (Bruce, Margolis, 2002).

Ортологи гена *FOXP2* были обнаружены у большинства позвоночных (Zhang et al., 2002; Enard et al., 2002). Особого внимания заслуживает высокая консервативность этого белка: сравнительные исследования позволили выявить всего две аминокислотные замены, различающие человека и шимпанзе (Enard et al., 2002). Кроме того, одна из двух замен в процессе эволюции возникла независимо у некоторых представителей хищных (Zhang et al., 2002) и нескольких видов летучих мышей (Li et al., 2007). При этом в исследованиях других видов животных со сложной вокальной коммуникацией, таких как певчие виды птиц, киты и дельфины, специфических для человека аминокислотных замен не обнаружено (Webb, Zhang, 2005).

Полученные данные указывают на неоднозначность вывода о решающей роли мутаций в гене FOXP2 в эволюции речи у человека и других животных. Вероятно, весомый вклад внесли генетические изменения, затрагивающие не только кодирующую часть гена, но и регуляторные элементы, обеспечивающие сложный пространственно-временной паттерн его экспрессии. Об этом свидетельствуют результаты последних работ. В частности, в интроне между 8 и 9 экзонами гена *FOXP2* был обнаружен район, который характеризуется высокой консервативностью у большинства позвоночных, но у человека обогащенный большим количеством однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism – SNP) (Atkinson et al., 2018). Сопоставление полученных результатов с опубликованными ранее эпигенетическими и транскриптомными данными позволило предположить, что данный район может выполнять функцию эРНК. В этом районе, кроме того, были обнаружены консенсусные сайты связывания целого ряда транскрипционных факторов, в частности три сайта для BRN2, экспрессия которого ограничивается исключительно головным мозгом (Schreiber et al., 1993). Интересно, что в еще одной работе была обнаружена однонуклеотидная замена в одном из этих сайтов, специфичная только для человека, которая может приводить к изменению экспрессии гена *FOXP2* (Maricic et al., 2013).

Результаты самой масштабной работы по поиску регуляторных областей гена *FOXP2*, содержащих специфичные для человека изменения, были обнародованы в 2019 г. В изучаемом генетическом локусе были обнаружены двенадцать HAR, сгруппированных в два кластера (Caporale et al., 2019). Функциональность каждого региона была проверена *in vivo* с помощью репортерных конструкций: оказалось, что по крайней мере пять из них обладают энхансерной активностью. Кроме того, два из этих активных HAR, помимо увеличения экспрессии репортерного гена, вызывали его дифференциальную экспрессию в нервной системе у аквариумной рыбки *Zebrafish* (*Danio rerio*) по сравнению с ортологичными последовательностям шимпанзе (Caporale et al., 2019).

Ген PPP1R17. Еще одним важным эволюционным приобретением человека в процессе эволюции стало быстрое увеличение объема коры больших полушарий. В последние годы все чаще высказывается предположение, что HAR в этом процессе сыграли важную роль. Масштабное исследование энхансерной активности и эпигенетического статуса продемонстрировало, что многие из описанных HAR являются важными регуляторными элементами в нейрогенезе человека (Girskis et al., 2021). Особое внимание в этой работе было уделено локусу, содержащему ген PPP1R17. Сам по себе этот ген мало изучен и о его роли в развитии головного мозга человека до недавнего времени было почти ничего не известно. Оказалось, что в локусе, помимо PPP1R17 и его проксимального промотора, располагаются два HAR.

С помощью таргетного захвата конформации хромосом было подтверждено взаимодействие промотора этого гена с двумя обнаруженными HAR, что может указывать на их важную роль в регуляции экспрессии PPP1R17 в нейрогенезе человека. Это предположение было подкреплено детальным сравнительным анализом паттерна экспрессии этого гена у разных видов млекопитающих. Высокий уровень экспрессии PPP1R17 был обнаружен в клетках мозжечка у всех исследованных видов млекопитающих. Однако в отличие от консервативного паттерна в мозжечке, в развивающейся коре исследователи обнаружили сильную дивергенцию: у приматов, в том числе у человека, обнаружен высокий уровень экспрессии, в то время как у хорьков и мышей экспрессия отсутствовала. Кроме того, было установлено, что в кортексе приматов *PPP1R17* экспрессировался преимущественно в нейральных клетках-предшественниках (НКП), локализованных в герминальной зоне, которая в процессе эволюции претерпела резкое увеличение размеров (Rakic, 1988, 1995). Одна из основных причин такой экспансии – прохождение НКП человека через многочисленные дополнительные раунды симметричного нейрогенного деления перед терминальной дифференцировкой (Betizeau et al., 2013; Dehay et al., 2015; Pollen et al., 2015; Pfeiffer et al., 2016). Усиление пролиферативного потенциала было обнаружено при оверэкспрессии *PPP1R17* в НКП мыши, что указывает на важную роль паттерна экспрессии этого гена в эволюции нейрогенеза млекопитающих.

**Ген FZD8.** Еще одним важным примером гена, дифференциальная экспрессия которого способствует увеличению размеров головного мозга человека, является FZD8. В регуляторной области этого гена был обнаружен HAR, обладающий энхансерной активностью (Boyd et al., 2015). Анализ захвата конформации хромосом подтвердил специфическое связывание обнаруженного HAR с основным промотором гена *FZD8* в неокортексе эмбриона мыши. Интродукция последовательностей предполагаемого энхансера и ортологичного региона шимпанзе в геном мышей позволила выявить существенные различия в их активности. В частности, было установлено, что энхансер человека обеспечивал более раннюю и сильную экспрессию *FZD8* на ранних этапах нейрогенеза. Это привело к изменению динамики клеточного цикла НКП и увеличению размеров головного мозга у трансгенных мышей.

Полученные данные подчеркивают исключительную роль HAR в эволюции головного мозга человека, демонстрируя, что они являются ключевыми инструментами в изменении паттернов экспрессии генов нейрогенеза.

#### НАК И ЗАБОЛЕВАНИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

В последние годы возросло внимание к мутациям в регуляторных районах генома из-за их предполагаемой взаимосвязи с некоторыми заболеваниями человека. Полученные данные, подтверждающие роль НАК в формировании нервной системы, позволили предположить их вовлеченность в развитие некоторых неврологических заболеваний. В этом направлении исследований были получены результаты, указывающие на связь мутаций в HAR и таких нарушениях, как шизофрения (Pollard et al., 2006; Xu et al., 2008; Kamm et al., 2013b; Bhattacharyya et al., 2021; Erady et al., 2021), расстройство аутистического спектра (Kamm et al., 2013b; Oksenberg et al., 2013; Doan et al., 2016), биполярное расстройство (Erady et al., 2021), болезнь Хантингтона (Johnson et al., 2010) и синдром Симпсона-Голаби-Бемеля (Doan et al., 2016).

Шизофрения. Шизофрения — это тяжелое психическое расстройство, характеризующееся такими симптомами, как галлюцинации, бред и нарушение концентрации внимания. Наследуемость шизофрении составляет около 70%, что ставит ее в число наиболее наследуемых психических расстройств (Sullivan et al., 2003; van Dongen, Boomsma, 2013). Еще в первой публикации, посвященной поиску HAR, было высказано предположение о связи между шизофренией и мутациями в зонах ускоренного развития человека (Pollard et al., 2006). Предпосылками к этой гипотезе стало обнаружение совместной экспрессии на одинаковых стадиях эмбрионального развития HAR1F и гена *RELN*. Ранее было установлено, что снижение уровня экспрессии *RELN* является наиболее статистически значимым отклонением, вызывающим шизофрению (Impagnatiello et al., 1998; Guidotti et al., 2000; Knable et al., 2001).

Еще одним геном-кандидатом развития шизофрении является *NPAS3* (Kamnasaran et al., 2003; Pickard et al., 2005, 2009; Huang et al., 2010), который содержит самый большой кластер из 14 некодирующих HAR (Kamm et al., 2013a, 2013b). Было доказано, что 11 из 14 HAR в *NPAS3* играют роль энхансеров во время развития нервной системы.

С помощью полногеномного поиска ассоциаций у пациентов с шизофренией было выявлено несколько SNP в HAR, связанных с изменением экспрессии генов развития нервной системы (*SLC25A13, MAD1L1, ULK4* и др.) (Bhattacharyya et al., 2021). Одним из возможных эффектов этих замен является модификация сайтов связывания транскрипционных факторов, контролирующих экспрессию генов нейрогенеза. Например, экспериментально было показано снижение аффинности транскрипционного фактора TFCP2 к регуляторному району гена *MAD1L1*.

В 2021 году вышла статья, демонстрировавшая связь HAR с патофизиологией шизофрении и биполярного расстройства в контексте новых открытых рамок считывания (Erady et al., 2021), причем были приведены доказательства связи этих патологий между собой.

Гипотеза, проходящая красной нитью через многие исследования, связанные с поиском ассоциаций HAR с заболеванием шизофренией, состоит в том, что шизофрения могла быть результатом эволюции мозга, характерной для человека, и некоторые мутации в HAR, связанные с этим заболеванием, могли пройти несколько этапов положительного отбора (Erady et al., 2021).

Расстройство аутистического спектра (РАС). Эта патология является общим нарушением развития нервной системы, характеризующемся неспособностью поддерживать и инициировать социальное вза-имодействие, а также ограниченными интересами и повторяющимися поведенческими актами. РАС имеют высокую наследуемость, что подтверждается множеством исследований, связанных с генами-кандидатами РАС, такими как *AUTS2* (Kalscheuer et al., 2007; Oksenberg et al., 2013), *WNT2* (Wassink et al., 2001) и *SHANK3* (Jeffries et al., 2005).

Первым исследованным HAR-ассоциированным геном-кандидатом аутизма стал *AUTS2* (Oksenberg et al., 2013). Было установлено, что этот ген содержит в своих интронах три HAR: HAR31 (Pollard et al., 2006), HACNS174 и HACNS369 (Prabhakar et al.,

2006). Для двух из них была доказана энхансерная активность в головном мозге, слуховых пузырьках и глазах (Oksenberg et al., 2013). В уже упомянутой статье о *NPAS3* были обнаружены другие гены, связанные с шизофренией и PAC (Kamm et al., 2013b): в локусе гена *CNTNAP2* шесть HAR (Alarcón et al., 2008; Peñagarikano, Geschwind, 2012), гена *RBFOX1* – восемь HAR (Barnby et al., 2005; Sebat et al., 2007; Xu et al., 2008). Позже появились доказательства того, что двуаллельные мутации HAR лежат в основе наследственных случаев PAC (до 5%). Такие изменения были идентифицированы у нескольких пациентов с PAC в активных энхансерах *CUX1*, *PTBP2*, *GPC4*, *CDKL5* и других генов, вовлеченных в работу нервной системы человека (Doan et al., 2016).

Вклад мутаций в ускоренных областях человека в развитие РАС явно менее изучен по сравнению с влиянием этих мутаций на патогенез шизофрении, но потенциал исследований в этой области и его актуальность высоки.

Болезнь Хантингтона. Болезнь Хантингтона (БХ) это наследственное заболевание, приводящее к возникновению дегенеративных процессов в полосатом теле и коре головного мозга, что является причиной физических, умственных и эмоциональных изменений. Было показано, что многие гены-мишени фактора транскрипции REST репрессированы у пациентов с БХ (Zuccato, Cattaneo, 2007; Johnson et al., 2008). Результаты сравнения образцов нормального мозга и мозга, пораженного БХ, выявили пониженную экспрессию *HAR1F* и *HAR1R* в полосатом теле пациентов с БХ (Johnson et al., 2010), причем в одном из них был обнаружен сайт посадки транскрипционного фактора REST. Однако механизмы патогенеза этого заболевания до сих пор остаются неясными.

Синдром Симпсона-Голаби-Бемеля. Этот синдром представляет собой Х-сцепленное заболевание, характеризующееся избыточным ростом, лицевыми дисморфозами, врожденными пороками сердца и другими аномалиями (Xuan et al., 1999). Мутации в генах GPC3 и GPC4 были описаны у нескольких пациентов с этим синдромом и нарушением умственного развития (Pilia et al., 1996; Veugelers et al., 2000). Кроме того, недавно были найдены гомозиготные мутации в HAR интрона GPC4, которые также приводили к формированию патологического фенотипа. Предполагается, что мутации удаляют сайты связывания транскрипционных факторов, тем самым понижая регуляторную активность гена GPC4 (Doan et al., 2016). Эти результаты демонстрируют регуляторную активность HAR, но связь между мутациями в эволюционно значимых областях и развитии синдрома Симпсона-Голаби-Бемеля нуждается в дальнейших исследованиях.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Недавние исследования выявили существование особого класса геномных элементов – НАR. Они представляют собой некодирующие последовательности ДНК, которые оставались консервативными в ходе эволюции млекопитающих, но начали накапливать специфические для человека мутации после эволюционного расхождения с шимпанзе 5–7 млн лет назад.

Процесс поиска HAR в геноме включает в себя два основных этапа – выравнивание и поиск консервативных последовательностей с последующим сравнением их между видами. Разные исследовательские группы при этом использовали немного отличные подходы для определения ускоренных областей, получая соответственно лишь частично пересекающиеся наборы регионов и нескольких наборов данных с разными свойствами. Тем не менее, статистические методы в общей сложности позволили выявить более 3100 HAR, расположенных в некодирующих районах генома. Именно неслучайное расположение большинства таких регионов в геноме межгенные промежутки, расположенные рядом с одним или двумя генами, играющими важную роль в развитии, - вероятнее всего говорит о регуляторной функции HAR. Эта гипотеза нашла свое экспериментальное подтверждение во многих работах (Capra et al., 2013; Doan, 2016). Несмотря на сложности выявления HAR, влияющих на регуляцию конкретного гена, к настоящему времени многим исследователям удалось определить несколько HAR, играющих важную роль в развитии мозга человека и регулирующих ряд специфических генов, участвующих в увеличении коры головного мозга у рода Люди (*Homo*) из отряда приматов (Doan, 2016; Won et al., 2016, 2019).

Таким образом, именно регуляторная активность HAR по мнению многих авторов лежит в основе грандиозного эволюционного скачка и именно эти регуляторные элементы являются одними из драйверов эволюции головного мозга человека (Haygood et al., 2010; Mitchell, Silver, 2018; Wei et al., 2019; Girskis et al., 2021).

Можно ожидать, что в ближайшее десятилетие будут изучены молекулярные функции еще многих НАR. Но последующие функциональные исследования, необходимые для связи молекулярных изменений с признаками, в обозримом будущем останутся малопродуктивными и сложными. Возможно, по мере того, как будет секвенировано все больше геномов людей, мы сможем получить информацию о мутациях в HAR, которая позволит обнаружить их функциональные эффекты на уровне популяции.

Особенный интерес представляет попытка выявить связь между заболеваниями и мутациями в НАR и, в конечном итоге, разгадать роль, которую эти регионы сыграли в патогенезе. Важно также помнить, что ускоренные регионы не являются специфичной чертой человека. У шимпанзе произошло больше изменений в геноме (Varki, Altheide, 2005), чем у человека. Данные и методы для изучения закономерностей такой ускоренной эволюции регионов в филогении млекопитающих уже имеются, поэтому можно надеяться, что эти исследования прольют свет на то, есть ли что-то уникальное в генах и сигнальных путях человека, на которые нацелена ускоренная эволюция нашего вида.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность М.А. Нуриддинову и О.Л. Серову (Институт цитологии и генетики СО РАН) за ценные замечания к статье.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (19-29-04067 мк) и бюджетного проекта (№ FWNR-2022-0019).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- *Aboitiz F, García R.V.* 1997. The evolutionary origin of the language areas in the human brain. A neuroanatomical perspective. Brain Res. Brain Res. Rev. V. 25. P. 381. https://doi.org/10.1016/s0165-0173(97)00053-2
- Alarcón M., Abrahams B.S., Stone J. L., Duvall J.A, Perederiy J.V., Bomar J.M., Sebat J., Wigler M, Martin C.L., Ledbetter D.H., Nelson S.F., Cantor R.M., Geschwind D.H. 2008. Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. Am. J. Hum. Genet. V. 82. P. 150. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.005
- Allen N.J., Bennett M.L., Foo L.C., Wang G.X., Chakraborty C., Smith S.J., Barres B.A. 2012. Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AM-PA receptors. Nature. V. 486. P. 410. https://doi.org/10.1038/nature11059
- Ashuach T., Fischer D.S., Kreimer A., Ahituv N., Theis F.J., Yosef N. 2019. MPRAnalyze: statistical framework for massively parallel reporter assays. Genome. Biol. V. 20. P. 183. https://doi.org/10.1186/s13059-019-1787-z
- Atkinson E.G., Audesse A.J., Palacios J.A., Bobo D.M., Webb A.E., Ramachandran S., Henn B.M. 2018. No Evidence for Recent Selection at FOXP2 among Diverse Human Populations. Cell. V. 174. P. 1424. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.048
- Bailey J.A., Gu Z., Clark R.A., Reinert K., Samonte R.V., Schwartz S., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Eichler E.E. 2002. Recent segmental duplications in the human genome. Science. V. 297. P. 1003. https://doi.org/10.1126/science.1072047

- Barnby G., Abbott A., Sykes N., Morris A., Weeks D.E., Mott R., Lamb J., Bailey A.J., Monaco A.P., International Molecular Genetics Study of Autism Consortium. 2005. Candidate-gene screening and association analysis at the autism-susceptibility locus on chromosome 16p: evidence of association at GRIN2A and ABAT. Am. J. Hum. Genet. V. 76. P. 950. https://doi.org/10.1086/430454
- Betizeau M., Cortay V., Patti D., Pfister S., Gautier E., Bellemin-Ménard A., Afanassieff M., Huissoud C., Douglas R.J., Kennedy H., Dehay C. 2013. Precursor diversity and complexity of lineage relationships in the outer subventricular zone of the primate. Neuron. V. 80. P. 442. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.032
- Bhattacharyya U., Deshpande S.N., Bhatia T., Thelma B.K. 2021. Revisiting Schizophrenia from an Evolutionary Perspective: An Association Study of Recent Evolutionary Markers and Schizophrenia. Schizophr. Bull. V. 47. P. 827. https://doi.org/10.1093/schbul/sbaa179
- Bird C.P., Stranger B.E., Liu M., Thomas D.J., Ingle C.E., Beazley C., Miller W., Hurles M.E., Dermitzakis E.T. 2007. Fast-evolving noncoding sequences in the human genome. Genome. Biol. V. 8. P. R118. https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-6-r118
- Boyd J.L., Skove S.L., Rouanet J.P., Pilaz L.J., Bepler T., Gordân R., Wray G.A., Silver D.L. 2015. Human-chimpanzee differences in a FZD8 enhancer alter cell-cycle dynamics in the developing neocortex. Curr. Biol. V. 25. P. 772. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.041
- Bruce H.A., Margolis R.L. 2002. FOXP2: novel exons, splice variants, and CAG repeat length stability. Hum. Genet. V. 111. P. 136.

https://doi.org/10.1007/s00439-002-0768-5

Bush E.C., Lahn B.T. 2008. A genome-wide screen for noncoding elements important in primate evolution. BMC Evol. Biol. V. 8. P. 17.

https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-17

*Caporale A.L., Gonda C.M., Franchini L.F.* 2019. Transcriptional enhancers in the FOXP2 locus underwent accelerated evolution in the human lineage. Mol. Biol. Evol. V. 36. P. 2432.

https://doi.org/10.1093/molbev/msz173

*Capra J.A., Erwin G.D., McKinsey G., Rubenstein J.L., Pollard K.S.* 2013. Many human accelerated regions are developmental enhancers. Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B. V. 368. P. 20130025.

https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0025

Chan Y.F., Marks M.E., Jones F.C., Villarreal G., Shapiro M.D., Brady S.D., Southwick A.M., Absher D.M., Grimwood J., Schmutz J., Myers R.M., Petrov D., Jónsson B., Schluter D., Bell M.A. et al. 2010. Adaptive evolution of pelvic reduction in sticklebacks by recurrent deletion of a Pitx1 enhancer. Science. V. 327. P. 302.

https://doi.org/10.1126/science.1182213

- Charrier C., Joshi K., Coutinho-Budd J., Kim J.E., Lambert N., de Marchena J., Jin W.L., Vanderhaeghen P., Ghosh A., Sassa T., Polleux F. 2012. Inhibition of SRGAP2 function by its human-specific paralogs induces neoteny during spine maturation. Cell. V. 149. P. 923. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.034
- *Consortium, Chimpanzee Sequencing and Analysis.* 2005. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. Nature. V. 437. P. 69. https://doi.org/10.1038/nature04072

- Cooper K.L., Sears K.E., Uygur A., Maier J., Baczkowski K.S., Brosnahan M., Antczak D., Skidmore J.A., Tabin C.J. 2014. Patterning and post-patterning modes of evolutionary digit loss in mammals. Nature. V. 511. P. 41. https://doi.org/10.1038/nature13496
- Cretekos C.J., Wang Y., Green E.D., Martin J.F., Rasweiler J.J., Behringer R.R. 2008. Regulatory divergence modifies limb length between mammals. Genes Dev. V. 22. P. 141. https://doi.org/10.1101/gad.1620408
- Cubelos B., Briz C.G., Esteban-Ortega G.M., Nieto M. 2015. Cux1 and Cux2 selectively target basal and apical dendritic compartments of layer II-III cortical neurons. Dev. Neurobiol. V. 75. P. 163. https://doi.org/10.1002/dneu.22215
- Dehay C., Kennedy H., Kosik K.S. 2015. The outer subventricular zone and primate-specific cortical complexification. Neuron. V. 85. P. 683.

https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.060

- Dennis M.Y., Nuttle X., Sudmant P.H., Antonacci F., Graves T.A., Nefedov M., Rosenfeld J.A., Sajjadian S., Malig M., Kotkiewicz H., Curry C.J., Shafer S., Shaffer L.G., de Jong P.J., Wilson R.K., Eichler E.E. 2012. Evolution of human-specific neural SRGAP2 genes by incomplete segmental duplication. Cell. V. 149. P. 912. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.033
- Dermitzakis, E.T., Clark A.G. 2002. Evolution of transcription factor binding sites in Mammalian gene regulatory regions: conservation and turnover. Mol. Biol. Evol. V. 19. P. 1114. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004169
- Doan R.N., Bae B.I., Cubelos B., Chang C., Hossain A.A., Al-Saad S., Mukaddes N.M., Oner O., Al-Saffar M., Balkhy S., Gascon G.G., Nieto M., Walsh C.A., Homozygosity Mapping Consortium for Autism. 2016. Mutations in Human Accelerated Regions Disrupt Cognition and Social Behavior. Cell. V. P. 341.

https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.071

Doggett N.A., Xie G., Meincke L.J., Sutherland R.D., Mundt M.O., Berbari N.S., Davy B.E., Robinson M.L., Rudd M.K., Weber J.L., Stallings R.L., Han C. 2006. A 360-kb interchromosomal duplication of the human HYDIN locus. Genomics. V. 88. P. 762.

https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.07.012

- Dorschner M.O., Hawrylycz M., Humbert R., Wallace J.C., Shafer A., Kawamoto J., Mack J., Hall R., Goldy J., Sabo P.J., Kohli A., Li Q., McArthur M., Stamatoyannopoulos J.A. 2004. High-throughput localization of functional elements by quantitative chromatin profiling. Nat. Methods. V. 1. P. 219. https://doi.org/10.1038/nmeth721
- Enard W., Przeworski M., Fisher S.E., Lai C.S., Wiebe V., Kitano T., Monaco A.P., Pääbo S. 2002. Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language. Nature. V. 418. P. 869.

https://doi.org/10.1038/nature01025

- Erady C., Amin K., Onilogbo T.O.A.E, Tomasik J., Jukes-Jones R., Umrania Y., Bahn S., Prabakaran S. 2021. Novel open reading frames in human accelerated regions and transposable elements reveal new leads to understand schizophrenia and bipolar disorder. Mol. Psychiatry. V. 27. P. 1455. https://doi.org/10.1038/s41380-021-01405-6
- *Felsenstein J., Churchill G.A.* 1996. A Hidden Markov Model approach to variation among sites in rate of evolution. Mol. Biol. Evol. V. 13. P. 93. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025575

ups://doi.org/10.1093/0xiordjournals.molbev.a0255/5

Feuk L., Kalervo A., Lipsanen-Nyman M., Skaug J., Nakabayashi K., Finucane B., Hartung D., Innes M., Kerem B., Nowaczyk M.J., Rivlin J., Roberts W., Senman L., Summers A., Szatmari P. et al. 2006. Absence of a paternally inherited FOXP2 gene in developmental verbal dyspraxia. Am. J. Hum. Genet. V. 79. P. 965. https://doi.org/10.1086/508902

Fiddes I.T., Lodewijk G.A., Mooring M., Bosworth C.M., Ewing A.D., Mantalas G.L., Novak A.M., van den Bout A., Bishara A., Rosenkrantz J.L., Lorig-Roach R., Field A.R., Haeussler M., Russo L., Bhaduri A. et al. 2018. Humanspecific NOTCH2NL genes affect Notch signaling and

cortical neurogenesis. Cell. V. 173. P. 1356.

- https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.051
  Fisher S.E., Vargha-Khadem F., Watkins K.E., Monaco A.P., Pembrey M.E. 1998. Localisation of a gene implicated in a severe speech and language disorder. Nat. Genet. V. 18. P. 168. https://doi.org/10.1038/ng0298-168
- Florio M., Albert M., Taverna E., Namba T., Brandl H., Lewitus E., Haffner C., Sykes A., Wong F.K., Peters J., Guhr E., Klemroth S., Prüfer K., Kelso J., Naumann R. et al. 2015. Human-specific gene ARHGAP11B promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. Science. V. 347. P. 1465.

https://doi.org/10.1126/science.aaa1975

- Franchini L.F, Pollard K.S. 2017. Human evolution: the noncoding revolution. BMC Biol. V. 15. P. 89. https://doi.org/10.1186/s12915-017-0428-9
- Girskis K.M., Stergachis A.B., DeGennaro E.M., Doan R.N., Qian X., Johnson M.B., Wang P.P., Sejourne G.M., Nagy M.A., Pollina E.A., Sousa A.M.M., Shin T., Kenny C.J., Scotellaro J.L., Debo B.M. et al. 2021. Rewiring of human neurodevelopmental gene regulatory programs by human accelerated regions. Neuron. V. 109. P. 3239. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.08.005
- Gittelman R.M., Hun E., Ay F., Madeoy J., Pennacchio L., Noble, W.S. Hawkins R.D., Akey J.M. 2015. Comprehensive identification and analysis of human accelerated regulatory DNA. Genome. Res. V. 25. P. 1245. https://doi.org/10.1101/gr.192591.115
- Guerreiro I., Nunes A., Woltering J.M., Casaca A., Nóvoa A., Vinagre T., Hunter M.E., Duboule D., Mallo M. 2013. Role of a polymorphism in a Hox/Pax-responsive enhancer in the evolution of the vertebrate spine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 110. P. 10682. https://doi.org/10.1073/pngs.1300502110

https://doi.org/10.1073/pnas.1300592110

- Guidotti A., Auta J., Davis J.M., Di-Giorgi-Gerevini V., Dwivedi Y., Grayson D.R., Impagnatiello F., Pandey G., Pesold C., Sharma R., Uzunov D., Costa E. 2000. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. Arch. Gen. Psychiatry. V. 57. P. 1061. https://doi.org/10.1001/archpsyc.57.11.1061
- Haygood R., Babbitt C.C., Fedrigo O., Wray G.A. 2010. Contrasts between adaptive coding and noncoding changes during human evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 107. P. 7853.

https://doi.org/10.1073/pnas.0911249107

Herrmann E., Call J., Hernàndez-Lloreda M.V., Hare B., Tomasello M. 2007. Humans have evolved specialized skills of social cognition: the cultural intelligence hypothesis. Science. V. 317. P. 1360.

https://doi.org/10.1126/science.1146282

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

- Hoffman M.M., Ernst J., Wilder S.P., Kundaje A., Harris R.S., Libbrecht M., Giardine B., Ellenbogen P.M., Bilmes J.A., Birney E., Hardison R.C., Dunham I., Kellis M., Noble W.S. 2013. Integrative annotation of chromatin elements from ENCODE data Nucleic Acids Res. V. 41. P. 827. https://doi.org/10.1093/nar/gks1284
- Huang J., Perlis R.H., Lee P.H., Rush A.J., Fava M., Sachs G.S., Lieberman J., Hamilton S.P., Sullivan P., Sklar P., Purcell S., Smoller J.W. 2010. Cross-disorder genomewide analysis of schizophrenia, bipolar disorder, and depression. Am. J. Psychiatry. V. 167. P. 1254. https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.09091335
- Hubisz M.J., Pollard K.S. 2014. Exploring the genesis and functions of Human Accelerated Regions sheds light on their role in human evolution. Curr. Opin. Genet. Dev. V. 29. P. 15. https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.07.005
- Hubisz M.J., Pollard K.S., Siepel A. 2011. PHAST and RPHAST: phylogenetic analysis with space/time models. Brief. Bioinform. V. 12. P. 41. https://doi.org/10.1093/bib/bbq072
- Impagnatiello F., Guidotti A.R., Pesold C., Dwivedi Y., Caruncho H., Pisu M.G., Uzunov D.P., Smalheiser N.R., Davis J.M., Pandey G.N., Pappas G.D., Tueting P., Sharma R.P., Costa E. 1998. A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 95. P. 15718.
  - https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15718
- Jeffries A.R., Curran S., Elmslie F., Sharma A., Wenger S., Hummel M., Powell J. 2005. Molecular and Phenotypic Characterization of Ring Chromosome 22. Am. J. Med. Genet. A. V. 137. P. 139. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30780
- Johnson M.B., Kawasawa Y.I., Mason C.E., Krsnik Z., Coppola G., Bogdanović D., Geschwind D.H., Mane S.M., State M.W., Sestan N. 2009. Functional and evolutionary insights into human brain development through global transcriptome analysis. Neuron. V. 62. P. 494. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.027
- Johnson R., Richter N., Jauch R., Gaughwin P.M., Zuccato C.,
- *Cattaneo E., Stanton L.W.* 2010. Human accelerated region 1 noncoding RNA is repressed by REST in Huntington's disease. Physiol. Genomics. V. 41. P. 269. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00019.2010
- Johnson, R., Zuccato C., Belyaev N.D., Guest D.J., Cattaneo E., Buckley N.J. 2008. A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease. Neurobiol. Dis. V. 29. P. 438.

https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.11.001

Kalscheuer V.M., FitzPatrick D., Tommerup N., Bugge M., Niebuhr E., Neumann L.M., Tzschach A., Shoichet S.A., Menzel C., Erdogan F., Arkesteijn G., Ropers H.H., Ullmann R. 2007. Mutations in autism susceptibility candidate 2 (Auts2) in patients with mental retardation. Hum. Genet. V. 121. P. 501.

https://doi.org/10.1007/s00439-006-0284-0

- Kamm G.B., López-Leal R., Lorenzo J.R., Franchini L.F. 2013a. A fast-evolving human NPAS3 enhancer gained reporter expression in the developing forebrain of transgenic mice. Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B. V. 368. P. 20130019. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0019
- Kamm G.B., Pisciottano F., Kliger R., Franchini L.F. 2013b. The developmental brain gene NPAS3 contains the largest number of accelerated regulatory sequences in the human

genome. Mol. Biol. Evol. V. 30. P. 1088. https://doi.org/10.1093/molbev/mst023

- Kamnasaran D., Muir W.J., Ferguson-Smith M.A., Cox D.W. 2003. Disruption of the neuronal PAS3 gene in a family affected with schizophrenia. J. Med. Genet. V. 40. P. 325. https://doi.org/10.1136/jmg.40.5.325
- King M.C., Wilson A.C. 1975. Evolution at two levels in humans and chimpanzees. Science. V. 188. P. 107. https://doi.org/10.1126/science.1090005
- *Knable M.B., Torrey E.F., Webster M.J., Bartko J.J.* 2001. Multivariate analysis of prefrontal cortical data from the Stanley Foundation Neuropathology Consortium. Brain Res. Bull. V. 55. P. 651.
  - https://doi.org/10.1016/s0361-9230(01)00521-4
- Kvon E.Z., Kamneva O.K., Melo U.S., Barozzi I., Osterwalder M., Mannion B.J., Tissières V., Pickle C.S., Plajzer-Frick I., Lee E.A., Kato M., Garvin T.H., Akiyama J.A., Afzal V., Lopez-Rios J. et al. 2016. Progressive Loss of Function in a Limb Enhancer during Snake Evolution. Cell. V. 167. P. 633.

https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.028

- Lai C.S., Fisher S.E., Hurst J.A., Levy E.R., Hodgson S., Fox M., Jeremiah S., Povey S., Jamison D.C., Green E.D., Vargha-Khadem F., Monaco A.P. 2000. The SPCH1 region on human 7q31: genomic characterization of the critical interval and localization of translocations associated with speech and language disorder. Am. J. Hum. Genet. V. 67. P. 357. https://doi.org/10.1086/303011
- Lai C.S., Fisher S.E., Hurst J.A., Vargha-Khadem F, Monaco A.P. 2001. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. Nature. V. 413. P. 519. https://doi.org/10.1038/35097076
- Lai CS., Gerrelli D., Monaco A.P., Fisher S.E., Copp A.J. 2003. FOXP2 expression during brain development coincides with adult sites of pathology in a severe speech and language disorder. Brain. V. 126. P. 2455. https://doi.org/10.1093/brain/awg247
- Lennon P.A., Cooper M.L., Peiffer D.A., Gunderson K.L., Patel A., Peters S., Cheung S.W., Bacino C.A. 2007. Deletion of 7q31.1 supports involvement of FOXP2 in language impairment: clinical report and review. Am. J. Med. Genet. A. V. 143A. P. 791.

https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31632

Levchenko A., Kanapin A., Samsonova A., Gainetdinov R.R. 2018. Human accelerated regions and other human-specific sequence variations in the context of evolution and their relevance for brain development. Genome Biol. Evol. V. 10. P. 166.

https://doi.org/10.1093/gbe/evx240

Li G., Wang J., Rossiter S.J., Jones G., Zhang S. 2007. Accelerated FoxP2 evolution in echolocating bats. PLoS One. V. 2. P. e900.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000900

- Li Q., Zheng S., Han A., Lin C.H., Stoilov P., Fu X.D., Black D.L. 2014. The splicing regulator PTBP2 controls a program of embryonic splicing required for neuronal maturation. Elife. V. 3. P. e01201. https://doi.org/10.7554/eLife.01201
- Lindblad-Toh K., Garber M., Zuk O., Lin M.F., Parker B.J., Washietl S., Kheradpour P., Ernst J., Jordan G., Mauceli E., Ward L.D., Lowe C.B., Holloway A.K., Clamp M., Gnerre S. et al. 2011. A high-resolution map of human evolutionary

constraint using 29 mammals. Nature. V. 478. P. 476. https://doi.org/10.1038/nature10530

- MacDermot K.D., Bonora E., Sykes N., Coupe A.M., Lai C.S., Vernes S.C., Vargha-Khadem F., McKenzie F., Smith R.L., Monaco A.P., Fisher S.E. 2005. Identification of FOXP2 truncation as a novel cause of developmental speech and language deficits. Am. J. Hum. Genet. V. 76. P. 1074. https://doi.org/10.1086/430841
- Maricic T., Günther V., Georgiev O., Gehre S., Curlin M., Schreiweis C., Naumann R., Burbano H.A., Meyer M., Lalueza-Fox C., de la Rasilla M., Rosas A., Gajovic S., Kelso J., Enard W. et al. 2013. A recent evolutionary change affects a regulatory element in the human FOXP2 gene. Mol. Biol. Evol. V. 30. P. 844. https://doi.org/10.1093/molbev/mss271
- Maurano M.T., Humbert R., Rynes E., Thurman R.E., Haugen E., Wang H., Reynolds A.P., Sandstrom R., Qu H., Brody J., Shafer A., Neri F., Lee K., Kutyavin T., Stehling-Sun S. et al. 2012. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. Science. V. 337. P. 1190. https://doi.org/10.1126/science.1222794
- Mayor C., Brudno M., Schwartz J.R., Poliakov A., Rubin E.M., Frazer K.A., Pachter L.S., Dubchak I. 2000. VISTA: visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length. Bioinformatics. V. 16. P .1046. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.11.1046
- Mitchell C., Silver D.L. 2018. Enhancing our brains: Genomic mechanisms underlying cortical evolution. Semin. Cell. Dev. Biol. V. 76. P. 23. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.045
- *Oksenberg N., Stevison L., Wall J.D., Ahituv N.* 2013. Function and regulation of AUTS2, a gene implicated in autism and human evolution. PLoS Genet. V. 9. P. e1003221. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003221
- Oswald F, Klöble P., Ruland A., Rosenkranz D., Hinz B., Butter F, Ramljak S., Zechner U., Herlyn H. 2017. The FOXP2-driven network in developmental disorders and neurodegeneration. Front. Cell. Neurosci. V. 11. P. 212. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00212
- Peñagarikano O., Geschwind D.H. 2012. What does CNTNAP2 reveal about autism spectrum disorder? Trends Mol. Med. V. 18. P. 156.

https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.01.003

- Pfeiffer M., Betizeau M., Waltispurger J., Pfister S.S., Douglas R.J., Kennedy H., Dehay C. 2016. Unsupervised lineage-based characterization of primate precursors reveals high proliferative and morphological diversity in the OSVZ. J. Comp. Neurol. V. 524. P. 535. https://doi.org/10.1002/cne.23820
- Pickard B.S., Christoforou A., Thomson P.A., Fawkes A., Evans K.L., Morris S.W., Porteous D.J., Blackwood D.H., Muir W.J. 2009. Interacting haplotypes at the NPAS3 locus alter risk of schizophrenia and bipolar disorder. Mol. Psychiatry. V. 14. P. 874.

https://doi.org/10.1038/mp.2008.24

- Pickard B.S., Malloy M.P., Porteous D.J., Blackwood D.H., Muir W.J. 2005. Disruption of a brain transcription factor, NPAS3, is associated with schizophrenia and learning disability. Am. J. Med. Genet., Part B. V. 136B. P. 26. https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30204
- Pilia G., Hughes-Benzie R.M., MacKenzie A., Baybayan P., Chen E.Y., Huber R., Neri G., Cao A., Forabosco A.,

*Schlessinger D.* 1996. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson–Golabi–Behmel overgrowth syndrome. Nat. Genet. V. 12. P. 241. https://doi.org/10.1038/ng0396-241

- *Pollard K.S., Hubisz M.J., Rosenbloom K.R., Siepel A.* 2010. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. Genome Res. V. 20. P. 110. https://doi.org/10.1101/gr.097857.109
- Pollard, K.S., Salama S.R., Lambert N., Lambot M.A., Coppens S., Pedersen J.S., Katzman S., King B., Onodera C., Siepel A., Kern A.D., Dehay C., Igel H., Ares M., Vanderhaeghen P. et al. 2006. An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. Nature. V. 443. P. 167. https://doi.org/10.1038/nature05113
- Pollen A.A., Nowakowski T.J., Chen J., Retallack H., Sandoval-Espinosa C., Nicholas C.R., Shuga J., Liu S.J., Oldham M.C., Diaz A., Lim D.A., Leyrat A.A., West J.A., Kriegstein A.R. 2015. Molecular identity of human outer radial glia during cortical development. Cell. V. 163. P. 55. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.004
- Prabhakar S., Noonan J.P., Pääbo S., Rubin E.M. 2006. Accelerated evolution of conserved noncoding sequences in humans. Science. V. 314. P. 786. https://doi.org/10.1126/science.1130738
- Prabhakar S., Visel A., Akiyama J.A., Shoukry M., Lewis K.D., Holt A., Plajzer-Frick I., Morrison H., Fitzpatrick D.R., Afzal V., Pennacchio L.A., Rubin E.M., Noonan J.P. 2008. Human-specific gain of function in a developmental enhancer. Science. V. 321. P. 1346. https://doi.org/10.1126/science.1159974
- *Rakic P.* 1988. Specification of cerebral cortical areas. Science. V. 241. P. 170.
- *Rakic P.* 1995. A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. Trends Neurosci. V. 18. P. 383. https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)93934-p
- Reuter M.S., Riess A., Moog U., Briggs T.A., Chandler K.E., Rauch A., Stampfer M., Steindl K., Gläser D., Joset P., DDD Study, Krumbiegel M., Rabe H., Schulte-Mattler U., Bauer P. et al. 2017. FOXP2 variants in 14 individuals with developmental speech and language disorders broaden the mutational and clinical spectrum. J. Med. Genet. V. 54. P. 64. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104094
- Rice G.M., Raca G., Jakielski K.J., Laffin J.J., Iyama-Kurtycz C.M., Hartley S.L., Sprague R.E., Heintzelman A.T., Shriberg L.D. 2012. Phenotype of FOXP2 haploinsufficiency in a mother and son. Am. J. Med. Genet., Part A. V. 158A. P. 74. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34354
- Schreiber E., Tobler A., Malipiero U., Schaffner W., Fontana A. 1993. cDNA cloning of human N-Oct3, a nervous-system specific POU domain transcription factor binding to the octamer DNA motif. Nucleic Acids Res. V. 21. P. 253. https://doi.org/10.1093/nar/21.2.253
- Sebat J., Lakshmi B., Malhotra D., Troge J., Lese-Martin C., Walsh T., Yamrom B., Yoon S., Krasnitz A., Kendall J., Leotta A., Pai D., Zhang R., Lee Y.H., Hicks J. et al. 2007. Strong association of de novo copy number mutations with autism. Science. V. 316 P. 445.

https://doi.org/10.1126/science.1138659

Siepel A., Bejerano G., Pedersen J.S., Hinrichs A.S., Hou M., Rosenbloom K., Clawson H., Spieth J., Hillier L.W., Richards S., Weinstock G.M., Wilson R.K., Gibbs R.A., Kent *W.J., Miller W. et al.* 2005. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. Genome Res. V. 15. P. 1034. https://doi.org/10.1101/gr.3715005

- Spiteri E., Konopka G., Coppola G., Bomar J., Oldham M., Ou J., Vernes S.C., Fisher S.E., Ren B., Geschwind D.H. 2007. Identification of the transcriptional targets of FOXP2, a gene linked to speech and language, in developing human brain. Am. J. Hum. Genet. V. 81. P. 1144. https://doi.org/10.1086/522237
- Sudmant P.H., Kitzman J.O., Antonacci F., Alkan C., Malig M., Tsalenko A., Sampas N., Bruhn L., Shendure J., Eichler E.E., 1000 Genomes Project. 2010. Diversity of human copy number variation and multicopy genes. Science. V. 330. P. 641. https://doi.org/10.1126/science.1197005
- Sullivan P.F., Kendler K.S., Neale M.C. 2003. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. Arch. Gen. Psychiatry. V. 60. P. 1187. https://doi.org/10.1001/archpsyc.60.12.1187
- Suzuki I. K., Gacquer D., Van Heurck R., Kumar D., Wojno M., Bilheu A., Herpoel A., Lambert N., Cheron J., Polleux F., Detours V., Vanderhaeghen P. 2018. Human-Specific NOTCH2NL Genes Expand Cortical Neurogenesis through Delta/Notch Regulation. Cell. V. 173. P. 1370. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.067
- *Tomasello M., Vaish A.* 2013. Origins of human cooperation and morality. Annu. Rev. Psychol. V. 64. P. 231. https://doi.org/10.1146/annurev-psych-113011-143812
- van Dongen J., Boomsma D.I. 2013. The evolutionary paradox and the missing heritability of schizophrenia. Am. J. Med. Genet. B: Neuropsychiatr. Genet. V. 162B. P. 122. https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32135
- Vargha-Khadem F., Watkins K., Alcock K., Fletcher P., Passingham R. 1995. Praxic and nonverbal cognitive deficits in a large family with a genetically transmitted speech and language disorder. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 92. P. 930. https://doi.org/10.1073/pnas.92.3.930
- Varki A., Altheide T.K. 2005. Comparing the human and chimpanzee genomes: searching for needles in a haystack. Genome Res. V. 15. P. 1746. https://doi.org/10.1101/gr.3737405
- Vernes S.C., Spiteri E., Nicod J., Groszer M., Taylor J.M., Davies K.E., Geschwind D.H., Fisher S.E. 2007. Highthroughput analysis of promoter occupancy reveals direct neural targets of FOXP2, a gene mutated in speech and language disorders. Am. J. Hum. Genet. V. 81. P. 1232. https://doi.org/10.1086/522238
- Veugelers M., Cat B.D., Muyldermans S.Y., Reekmans G., Delande N., Frints S., Legius E., Fryns J.P., Schrander-Stumpel C., Weidle B., Magdalena N., David G. 2000. Mutational analysis of the GPC3/GPC4 glypican gene cluster on Xq26 in patients with Simpson-Golabi-Behmel syndrome: identification of loss-of-function mutations in the GPC3 gene. Hum. Mol. Genet. V. 9. P. 1321. https://doi.org/10.1093/hmg/9.9.1321
- Wassink T.H., Piven J., Vieland V.J., Huang J., Swiderski R.E., Pietila J., Braun T., Beck G., Folstein S.E., Haines J.L., Sheffield V.C. 2001. Evidence Supporting Wnt2 as an Autism Susceptibility Gene. Am. J. Med. Genet. V. 105. P. 406. https://doi.org/10.1002/ajmg.1401

- Webb, D.M., Zhang J. 2005. FoxP2 in song-learning birds and vocal-learning mammals. J. Hered. V. 96. P. 212. https://doi.org/10.1093/jhered/esi025
- Wei Y., de Lange S.C., Scholtens L.H., Watanabe K., Ardesch D.J., Jansen P.R., Savage J.E., Li L., Preuss T.M., Rilling J.K., Posthuma D., van den Heuvel M.P. 2019. Genetic mapping and evolutionary analysis of human-expanded cognitive networks. Nat. Commun. V. 10. P. 4839. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12764-8
- Won H., de la Torre-Ubieta L., Stein J.L., Parikshak N.N., Huang J., Opland C.K., Gandal M.J., Sutton G.J., Hormozdiari F., Lu D., Lee C., Eskin E., Voineagu I., Ernst J., Geschwind D.H. 2016. Chromosome conformation elucidates regulatory relationships in developing human brain. Nature. V. 538. P. 523. https://doi.org/10.1038/nature19847
- Won H., Huang J., Opland C.K., Hartl C.L., Geschwind D.H. 2019. Human evolved regulatory elements modulate genes involved in cortical expansion and neurodevelopmental disease susceptibility. Nat. Commun. V. 10. P. 2396. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10248-3
- Xu S., Han J.C., Morales A., Menzie C.M., Williams K., Fan Y.S. 2008. Characterization of 11p14-p12 deletion in WAGR syndrome by array CGH for identifying genes contributing to mental retardation and autism. Cytogenet. Genome Res.

V. 122. P. 181. https://doi.org/10.1159/000172086

- Xuan J.Y., Hughes-Benzie R.M., MacKenzie A.E. 1999. A small interstitial deletion in the GPC3 gene causes Simpson– Golabi–Behmel syndrome in a Dutch-Canadian family. J. Med. Genet. V. 36. P. 57.
- Zeesman S., Nowaczyk M.J., Teshima I., Roberts W., Cardy J.O., Brian J., Senman L., Feuk L., Osborne L.R., Scherer S.W. 2006. Speech and language impairment and oromotor dyspraxia due to deletion of 7q31 that involves FOXP2. Am. J. Med. Genet., Part A. V. 140. P. 509. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31110
- Zhang, J., Webb D.M., Podlaha O. 2002. Accelerated protein evolution and origins of human-specific features: Foxp2 as an example. Genetics. V. 162. P. 1825. https://doi.org/10.1093/genetics/162.4.1825
- Zilina O., Reimand T., Zjablovskaja P., Männik K., Männamaa M., Traat A., Puusepp-Benazzouz H., Kurg A., Ounap K. 2012. Maternally and paternally inherited deletion of 7q31 involving the FOXP2 gene in two families. Am. J. Med. Genet., Part A. V. 158A. P. 254. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34378
- Zuccato C., Cattaneo E. 2007. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. Prog. Neurobiol. V. 81. P. 294. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.01.003

### HARs: History, Function, Evolution and Disease

#### A. S. Ryzhkova<sup>*a*</sup>, A. A. Khabarova<sup>*a*</sup>, A. S. Chvileva<sup>*b*</sup>, and T. A. Shnaider<sup>*a*</sup>, \*

<sup>a</sup>Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>b</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

\*e-mail: shnayder.t@yandex.ru

It is assumed that changes in gene regulation mechanisms play a major role in human evolution rather than proteincoding sequence changes. Recent studies have identified human accelerated regions (HARs) – a special class of genomic elements. These non-coding DNA regions are highly conserved in mammals but show an increased number of substitutions in the human lineage. Since their discovery, the actual role of HARs in human evolution has remained obscure as they are almost exclusively represented by unannotated non-coding sequences. HARs are enriched in transcription factor binding motifs and active histone modifications. Recent studies used functional genomics, computational approaches, and genetic analysis to show that many HARs are involved in the developmental genes regulation and the evolution of the human brain. There is also a body of evidence linking polymorphisms in HARs with various neuropathologies such as autism spectrum disorders, schizophrenia, and Huntington's disease. Functional assays such as high-throughput reporter analysis and CRISPR-based screenings significantly increased the number of human-specific regulatory elements characterized. Further exploration of HARs and other evolutionarily dynamic regions in the genome may elucidate some of the complex evolutionary changes that underlie the unique cytoarchitecture and cognitive abilities of the human brain. In this review, we consider different approaches used to identify HARs, their role in gene regulation, their contribution to the evolution of the human brain, and highlight some of the pathological effects of mutations in HARs.

Keywords: human accelerated regions, HAR, neurogenesis, brain evolution

УДК 577.12

## КОЛЛАГЕНОВЫЕ ФИБРИЛЛЫ РАЗЛИЧНОГО ДИАМЕТРА: УСЛОВИЯ ФОРМИРОВАНИЯ И ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ

© 2022 г. М. Ю. Сироткина<sup>1</sup>, Ю. А. Нащекина<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия \*E-mail: nashchekina.yu@mail.ru Поступила в редакцию 14.03.2022 г. После доработки 22.04.2022 г. Принята к публикации 26.04.2022 г.

В организме коллаген является одним из основных белков внеклеточного матрикса и находится в различных тканях преимущественно в фибриллярной форме. Диаметр фибрилл коллагена с одной стороны зависит от различных химических и физических факторов, а с другой — определяет свойства тканей, в состав которых входят сами фибриллы. В работе подробно изучено влияние коллагенов различных типов, протеогликанов и неорганических веществ на диаметр фибрилл на основе коллагена I типа. Исследование факторов, влияющих на процессы фибриллообразования *in vitro* и *in vivo*, не только позволит решить фундаментальные задачи по изучению механизмов фибриллообразования, но и выявить причины нарушения формирования фибрилл, приводящие к возникновению различных заболеваний. Возможность управления процессом формирования фибрилл с заданным диаметром *in vitro* позволит создать тканеинженерные конструкции, имитирующие нативные ткани, вне организма.

*Ключевые слова*: коллаген I типа, фибрилла, внеклеточный матрикс, химические и физические факторы **DOI:** 10.31857/S0041377122040113

Коллаген — один из наиболее распространенных белков во внеклеточном матриксе. Благодаря высокой биосовместимости и слабой антигенности, коллаген широко используется в качестве материала при создании тканеинженерных конструкций на основе матриц и клеток для использования в регенеративной медицине (Pawelec et al., 2016).

Среди основных качеств тканеинженерных конструкций можно выделить следующие: биосовместимость, механические характеристики, прозрачность, скорость ремоделирования. Правильно подобранная для конкретного органа совокупность свойств тканеинженерной конструкции позволяет обеспечить комфортные условия для жизнедеятельности трансплантируемых и собственных клеток организма, что позволяет достигать наилучшего терапевтического эффекта (Yamada et al., 2014).

В организме насчитывается до 30 видов различных типов коллагена, но самым распространенным из них является коллаген I типа. В тканях коллаген I типа находится в фибриллярной форме, поэтому для имитации нативной структуры ткани матрицы для культивирования клеток в основном разрабатывают из фибриллярного коллагена (Busra, Lokana-than, 2019). Основными параметрами фибрилл, вли-яющими на свойства матриц, являются их диаметр, а также наличие особого порядка внутрифибриллярной структуры.

335

Так, в многочисленных исследованиях была замечена корреляция между диаметром коллагеновых фибрилл, типом тканей, в которых они расположены, и их свойствами (Hosoyamada, Sakai, 2012; Kadler, 2017). Поэтому важнейшим условием для успешного создания *in vitro* тканеинженерной конструкции на основе фибриллярного коллагена для восстановления конкретного органа является необходимость учета диаметра фибрилл, характерного для тканей этого органа.

В связи с вышеизложенным цель настоящего обзора заключается в анализе различных факторов, влияющих на диаметр коллагеновых фибрилл в процессе их молекулярной сборки, а также взаимосвязи структуры фибрилл с их свойствами.

#### КОЛЛАГЕНОВЫЕ ФИБРИЛЛЫ И ИХ СБОРКА

Коллаген I типа представляет собой спиральную молекулу длинной 300 нм и шириной 1.5 нм, состоящую из одной цепи α1 и двух цепей α2. На концах она имеет два неспиральных участка, которые называют теломерами. Изначально во внеклеточное пространство фибробластами синтезируется белок проколлаген, на концах которого имеются теломеры и N- и C-участки (рис. 1). Далее, под действием, протеиназ N- и C-концевые участки отщепляются и полу-



Рис. 1. Схематическое изображение формирования фибрилл коллагена in vitro и in vivo.

ченные коллагеновые молекулы собираются в фибриллы (Hulmes, 2009).

Сформированная фибрилла коллагена геометрически представляет собой цилиндр, диаметр которого не изменяется на всем ее протяжении (Parry, Craig, 2017). Фибрилла состоит из множества молекул коллагена, связанных за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий, формируя исчерченную структуру, молекулы в которой располагаются со сдвигом равным 67 нм и называемым D-периодом (рис. 1) (Wess, 2009). В настоящее время существуют две гипотезы, описывающие строение фибрилл. Одна из них утверждает, что фибриллы коллагена состоят из микрофибрилл, которые располагаются друг относительно друга в виде тетрагональной решетки. Рост фибрилл в толщину осуществляется с шагом 8.5 нм (Hulmes, 2002). Другая гипотеза представляет укладку молекул коллагена в виде псевдогексагональной упаковки. Обе гипотезы имеют экспериментальное подтверждение. Их объединяет предположение, что фибрилла имеет центр с диаметром 3.2 нм и растет в соответствии с псевдогексагональной упаковкой и с шагом 3.6 нм (Parry, Craig, 2017).

Другими двумя конкурирующими гипотезами объясняется принцип формирования фибрилл *in vivo*. Одна из гипотез подразумевает рост фибрилл путем нуклеации и последующего слияния друг с другом либо латерально, либо конец к концу (Canty et al., 2005; Fang et al., 2012). Другая гипотеза формирования фибрилл описывает сборку фибрилл подобно жидким кристаллам холистического типа, которые собираются самопроизвольно. Прямого доказательства этого подхода пока не получено, но существуют косвенные признаки, доказывающие это. Например, коллаген и проколлаген при высоких концентрациях способны образовывать жидкокристаллические агрегаты в ограниченном пространстве. Коллаген, находящийся внутри клеточных везикул и высвобожденный из клетки, находится в очень высоких концентрациях (Giraud-Guille et al., 2008; Fang, 2012).

В пределах одной ткани диаметр коллагеновых фибрилл достаточно широко варьирует в зависимости от ткани и возраста организма. Так, например, эмбриональные или незрелые ткани обычно содержат разнообразные фибриллы с малым диаметром, собирающиеся в пучки. Как правило, по мере созревания средний диаметр фибрилл заметно увеличивается. А в процессе старения диаметр фибрилл снова уменьшается (Parry, Craig, 2017). В ткани фибриллы могут собираться в группы с примерно одинаковым диаметром, так называемые популяции. Популяции фибрилл коллагена обнаружены в таких тканях как связки, артерии, дерма и нервная ткань (Junqueira, 1983).



Рис. 2. Физические и химические факторы, влияющие на формирование фибрилл.

#### ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ДИАМЕТР КОЛЛАГЕНОВЫХ ФИБРИЛЛ *IN VIVO* И *IN VITRO*

На параметры фибрилл как *in vitro*, так и *in vivo* оказывают влияние факторы как химического, так и физического характера (рис. 2). Сборка фибрилл *in vitro* протекает самопроизвольно при определенных условиях и зависит от концентрации коллагена в растворе, pH, ионной силы раствора и температуры (Raub, 2007). Немаловажными факторами, влияющим на процесс фибриллобразования *in vivo*, а также на диаметр формирующихся фибрилл, являются другие компоненты внеклеточного матрикса, такие как коллаген III типа в эмбриональных тканях, коллаген V типа в роговице, коллаген IX типа в тканях хряща, а также протеогликаны.

#### БЕЛКИ ВКМ КАК РЕГУЛЯТОРЫ СБОРКИ КОЛЛАГЕНОВЫХ ФИБРИЛЛ

Коллаген III типа. Коллаген III типа составляет около 10% всех коллагенов и находится на втором месте по содержанию в организме после коллагена I. Он представляет собой гомотример и состоит из трех цепей  $\alpha$ 1 (Hulmes, 2009). Коллаген III типа часто образует гетерофибриллы с коллагеном I типа и в основном располагается на поверхности фибриллы. В процессе биосинтеза коллагена III типа его обработка N-концевой протеиназой проходит медленнее, чем коллагена I типа и поэтому в ткани

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

происходит накопление молекул с неотщепленным N-концевым участком (pN-коллаген III типа). Такие концевые участки pN-коллагена III типа, включенные в периферию фибриллы, ограничивают их дальнейший латеральный рост (Hulmes, 2002). В ткани в присутствии коллагена III типа диаметр фибрилл коллагена I типа не превышает 60 нм, в то время в отсутствие коллагена III типа диаметр фибрилл коллагена I типа может достигать 500 нм (Fleischmajer, 1990). В дерме диаметр коллагеновых фибрилл больше в более глубоких слоях, что связывают с меньшим количеством коллагена III типа (Junqueira, 1983).

Соотношение типов коллагена I и III зависит от многих условий, в том числе от типа ткани, пола и возраста. С возрастом это соотношение (I : III) становится выше (Wang, 2011). Кроме того, это соотношение различно в нормальной и рубцовой тканях (Wang, 2011). Так, в коже и тканях сердца в гетерофибриллах I/III соотношение коллагенов составляет 2:1 и 3:1 соответственно, в то время как в рубцовых тканях оно заметно выше -5:1 (Li et al., 2021). Нарушение этого соотношения ведет к ухудшению механических свойств ткани. Известно, что у людей дилатационная кардиомиопатия связана с увеличением соотношения коллагена I и III типа в эндомизии и перимизии сердца (Marijianowski et al., 1995). А мутации в гене коллагена III типа ведут к возникновению синдрома Элерса-Данлоса IV типа, который несет опасность разрыва кровеносных сосудов во взрослом возрасте (Liu et al., 1997). Также у пациентов с послеоперационными грыжами в коже наблюдалось нарушение соотношения коллагенов I/III. Так у пациентов с послеоперационными и рецидивирующими грыжами соотношение коллагенов составляло 1 : 0.8, в то время как для здоровой ткани соотношение было 1.2 : 0.2 (Klinge et al., 2000).

Для тканей кожи пожилых людей характерно снижение синтеза коллагена I и III типа, что связано как со старением фибробластов, так и с их недостаточной механической стимуляцией со стороны BKM (Varani et al., 2006). Известно, что при заживлении раны фибриллы коллагена III типа появляются в ране на 2-е сут после повреждения, тогда как коллаген I типа — после 4-х сут (Tracy et al., 2016). Кроме того, показано, что коллаген III типа повышает гибкость и растяжимость тканей, а соотношение коллагенов I/III влияет на эластичность и скорость заживления кожи (Li et al., 2021).

Коллаген V типа. В отличие от I и III типа, у коллагена V типа перманентно сохраняется N-концевой неспиральный участок (Hulmes, 2009). Коллаген V типа относится к фибриллярным коллагенам. Это гетеротример, имеющий несколько изоформ. Несмотря на то, что молекула коллагена V типа возможна в виде различных комбинаций трех  $\alpha$ -цепей, наиболее распространенная представляет из себя гетеротример, включающий одну цепь  $\alpha$ 1 и две  $\alpha$ 2. Коллаген V присутствует практически во всех не хрящевых тканях. В большинстве тканей его содержание составляет менее 5%, но в роговице его концентрация составляет около 20% (Hulmes, 2002).

Коллаген V типа также образует гетерофибриллы с коллагеном I типа. Тройная спираль коллагена V погружена внутрь фибриллы, а концевой участок выступает на поверхности. Такое строение гетерофибриллы в роговице позволяет сохранить равномерный диаметр фибрилл размером не более 23 нм. Следует отметить, что толщина фибрилл в роговице тесно связана с ее прозрачностью (Müller et al., 2004). Эксперименты на гетерозиготных мутантных мышах с делецией в гене *Col5a1* показали серьезные нарушения фибриллогенеза в роговице. В строме роговицы увеличилось количество крупных, не равномерных по диаметру фибрилл. Но коллаген V типа не единственный фактор, влияющий на фибриллогенез. Протеогликаны также играют ключевую роль в регуляции диаметра фибрилл в роговице (Sun et al., 2011).

У людей гетерозиготная мутация в одном из генов, кодирующих коллаген V типа, ведет к классической форме синдрома Элерса–Данлоса I/II типа. Это генерализованное заболевание соединительной ткани с широким поражением тканей, характеризуется хрупкой растяжимой кожей, атрофическими рубцами, дряблостью суставов, высокой распространенностью дилатации корня аорты и другими расстройствами соединительной ткани (Steinmann, 2002). Для гомозиготных нулевых мышей с делецией Col5al характерна эмбриональная летальность из-за невозможности своевременного образования фибрилл в процессе эмбриогенеза. Авторами было выдвинуто предположение, что коллаген V типа играет ключевую роль в фибриллообразовании и запускает нуклеацию фибрилл коллагена I типа, когда концентрация коллагена I типа мала (Sun et al., 2011).

Коллаген IX типа. Еше одним коллагеном. сохраняющим N-концевой участок в процессе биосинтеза, является коллаген IX типа, который также ограничивает латеральный рост фибрилл на основе коллагена II типа, например, в хрящевой ткани. Ткань гиалинового хряща выполняет амортизирующую функцию, а также является основой для будущей костной ткани. Она представляет собой гель, содержание воды в котором достигает 70-80%. Фибриллы механически сохраняют форму и препятствуют набуханию ткани. Фибриллы гиалинового хряща состоят из коллагена II типа с включением коллагенов IX и XI типов. Подобно коллагену I типа они содержат фибриллы с D-периодичностью размером 67 нм (рис. 1), однако имеют большее расстояние между молекулами и большее содержание воды (на 50-100%), чем в фибриллах коллагена I типа. Большое количество воды может быть связано с разницей в количестве гликозилированных остатков гидроксилизина в молекуле коллагена. Также поглощение воды и осмотическое давление обусловлено высоким отрицательным зарядом ткани, который, в свою очередь, связан с наличием декоринов. Присутствие коллагена IX типа обеспечивает отрицательный заряд поверхности фибрилл.

Коллаген IX типа – гетеротример, состоящий из трех разных цепей. Коллаген IX играет важную роль в ограничении латерального роста и сохранении однородности фибрилл коллагена II типа. Так, например, показано, что коллаген IX типа ограничивает диаметр фибрилл до 20 нм, который характерен для фибрилл эмбрионального или незрелого хряща. Нарушение соотношения коллагенов II и IX в ткани ведет к возникновению аномальных фибрилл. На мутантных мышах показано, что избыточная экспрессия коллагена II ведет к утолщению фибрилл, а нарушение синтеза коллагена IX ведет к аномальным фибриллам с нерегулярным диаметром. Подобные симптомы у людей наблюдаются при заболеваниях Стиклера с тяжелой формой хондродисплазии (Blaschke et al., 2000).

Коллаген IX также участвует в формировании нехрящевых тканей. Он экспрессируется во время развития организма в тканях, содержащих коллаген I, включая сухожилия (Sun et al., 2020).

**Протеогликаны.** Протеогликаны — это подкласс сложных белков, имеющих два семейства. Малые, богатые лейцином, протеогликаны способны связываться с коллагеном и участвуют в регуляции фибриллогенеза (Iozzo et al., 2015). Для таких протеогли-

канов как декорин, аспорин, фибромодулин и люмикан обнаружены участки взаимодействия с коллагеном. По некоторым данным бигликан также взаимодействует с коллагеном. Аспорин связывается с коллагеном, но не влияет на диаметр фибрилл, а воздействует на его биоминерализацию (Kalamajski, Oldberg, 2010).

Декорин, бигликан, фибромодулин и люмикан согласно некоторым исследованиям также участвуют в фибриллогенезе (Hwang, Halper, 2021). Декорин специфически связывается с доменом коллагена за счет присутствия GAG-цепи (Kalamajski, Oldberg, 2010). А LRR-повторы декорина образуют дугообразную форму и предположительно связываются с 4-6 молекулами коллагена. Взаимодействие осушествляется за счет водородных и электростатических связей (Orgel et al., 2009). Декорин контролирует латеральную агрегацию коллагеновых фибрилл и тем самым ограничивает их рост (Yoon, Halper, 2005). Кроме того, он может функционально восполнять отсутствие бигликана (Ameye, Young, 2002). Мыши с нокаутом декорина имеют хрупкую кожу и слабые сухожилия (Danielson et al., 1997). У человека мутации в гене декорина приводят к врожденной дистрофии роговицы (Bredrup et al., 2010).

Бигликан — это протеогликан, на 65% гомологичен декорину (Iozzo, Schaefer, 2015). В роговице бигликан может заменять декорин (Svensson et al., 1995). Дефицит бигликанов ведет к возникновению аномальных фибрилл в костях, дерме и сухожилиях (Ameye, Young, 2002). Бигликан регулирует фибриллогенез, но не способствует уменьшению диаметра фибрилл.

Интересно, что GAG-цепи на бигликане присутствуют только при раннем развитии фибрилл, на декорине же — до тех пор, пока не сформируются толстые фибриллы. Бигликан, а не декорин, активируется в сжатых сухожилиях, где механическое напряжение вызывает фибриллогенез коллагена. И, вероятно, бигликан способствует правильному формированию фибрилл и вместе с тем задерживает рост крупных фибрилл на ранних стадиях фибриллогенеза (Kalamajski, Oldberg, 2010; Moorehead et al., 2019).

Фибромодулин имеет два сайта связывания с коллагеном. Люмикан имеет гомологичный фибромодулину сайт связывания (Kalamajski, Oldberg, 2010). Нокаут у мышей фибромодулина приводит к остеоартриту и слабости сухожилий. А нокаут люмикана — к хрупкости кожи с помутнением роговицы (Chakravarti et al., 2000). Люмикан способен функционально заменять фибромодулин у мышей с дефицитом фибромодулина, но не наоборот (Jepsen et al., 2002). Показано, что в сухожилиях при дифиците фибромодулина наблюдаются более тонкие фибриллы. Кроме того, известно, что на ранних этапах развития сухожилий в них в большей степени представлены люмикан и бигликан, а на поздних – фибромодулин и декорин. Остеоглицин (мимекан) также участвует в регуляции диаметра фибрилл. Показано, что мыши с нокаутом генов остеоглицина имеют фибриллы с большим диаметром как в роговице, так и в дерме (Kalamajski, Oldberg, 2010).

Кератокан — протеогликан, мутации в котором приводят к редкому заболеванию глаз, характеризующемуся плоской роговицей и ее помутнению (Huang, 2019).

#### ФИЗИЧЕСКИЕ И ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ДИАМЕТР КОЛЛАГЕНОВЫХ ФИБРИЛЛ

Физические факторы. Среди причин, вызывающих изменение диаметра фибрилл, отмечено влияние таких факторов, как время, pH, ионная сила, температура, а также стимуляция лазером, гаммаизлучением, ультразвуком и магнитным полем. Величина pH раствора коллагена *in vitro* является одним из ключевых условий фибриллообразования, влияющих на диаметр фибрилл. Было изучено воздействие на микроструктурные характеристики фибрилл величины pH буферного раствора, равной 6.0, 7.0, 7.4, 8.0, и 9.0. Показано, что с повышением значения pH уменьшается диаметр фибрилл, но увеличивается их длина (Roeder, 2009). Кроме того, показано, что с повышением pH улучшается прозрачность коллагеновых матриц (Tidu et al., 2018).

Ионная сила раствора, которую можно варьировать путем добавления различного количества хлористого натрия в фосфатный буфер, также влияет на диаметр фибрилл. Показано, что при очень низкой ионной силе (при концентрации хлористого натрия 24 мМ) размер фибрилл ограничен (диаметр составляет примерно 15–20 нм). При большей ионной силе (диапазон концентрации хлористого натрия в фосфатном буфере – 127–261 мМ) фибриллы увеличиваются и собираются в пучки. Когда ионная сила достигает очень высоких значений (концентрация хлористого натрия – 529–1300 мМ), фибриллы присутствуют в растворе в двух состояниях: в виде крупных агрегатов и в виде нанофибрилл (Gobeaux et al., 2008).

Температура — еще один фактор, влияющий на диаметр фибрилл. Показано, что более низкая температура способствует формированию более толстых фибрилл. Так, при 34°С диаметр фибрилл составляет 20—70 нм, а при 20°С — уже около 200 нм. Повышение температуры не в процессе фибриллогенеза, а путем радиочастотной обработки участков ткани ведет к слипанию фибрилл, увеличению диаметра, размыванию краев и потере исчерченного рисунка фибрилл (Roeder, 2009). Наблюдали и обратный эффект, называемой усадкой коллагена, сопровождающийся уменьшением диаметра фибрилл (Lopez, 1998).

Гамма-излучение, как известно, оказывает негативное воздействие на ткани. Исходя из этого, иссле-

дователи рассматривали изменение архитектуры коллагена. При воздействии гамма-излучения до 500 рад в течение от 1 до 8 нед. фибриллы коллагена сохраняли организацию и поперечнополосатый паттерн, но увеличивались в диаметре. При этом наблюдали повышение температуры, приводящее к усадке коллагена, которая связана с увеличением количества поперечных связей.

Лазерная стимуляция также влияет на фибриллы коллагена. В низких дозах лазерное излучение стимулирует синтез коллагена: ускоряет фиброплазию и увеличивает количество мРНК коллагена I и III типа. Показано, что стимуляция гелий-неоновым лазером ведет к уменьшению диаметра фибрилл и увеличению плотности фибрилл. Это связано с повышенной скоростью ремоделирования сухожилия и, вместе с тем, с малым диаметром фибрилл, который наблюдается в ранней рубцовой ткани (Enwemeka et al., 1990). Увеличение диаметра фибрилл в процессе лазерной стимуляции связывают с их слипанием из-за повышения температуры, аналогично радиочастотной температурной обработке (Lopez et al., 1998).

Ультразвуковая обработка связок используется в качестве терапии для поврежденных тканей. Чтобы исследовать влияние ультразвука на диаметр коллагеновых фибрилл, связки *in vivo* обрабатывали ультразвуком с частотой от 0.5 до 2 Вт/см<sup>2</sup>. В результате наблюдали нелинейный U-образный ответ, означающий, что максимальное количество толстых фибрилл отмечается при наибольшей и наименьшей интенсивности обработки (Ng, Fung, 2007). Разницу в диаметре фибрилл авторы связывают с изменением условий синтеза коллагена. Вместе с этим отмечают, что прочность связок при обработке ультразвуком с частотой от 1 до 2 Вт/см<sup>2</sup> также является нелинейной.

Сильное магнитное поле используют в тканевой инженерии как способ создания ориентированных коллагеновых молекул и фибрилл (Torbet et al., 2007). При воздействии на коллагеновые матрицы *in vitro* сильным магнитным полем (с индукцией 6 и 12 Тл), отмечали рост диаметра фибрилл с усилением магнитного поля. Увеличение диаметра фибрилл объясняется легкостью объединения ориентированных фибрилл и повышенного формирования пучков с соседними фибриллами (Chen et al., 2011).

Химические факторы. На диаметр коллагеновых фибрилл *in vitro* и *ex vivo* оказывают влияние и химические агенты. Так, например, рибофлавин, который используется при лечении кератоконуса. Это заболевание характеризуется конусообразной формой роговицы глаза из-за нарушения структуры стромы. Рибофлавин в случае действия ультрафиолетового (УФ) излучения создает дополнительные сшивки в коллагене роговицы, чем позволяет сохранить целостность ткани. Роговицы, обработанные рибофлавином и УФ-излучением, имеют фибриллы большего диаметра (Choi et al., 2013).

Полисахариды, такие как гиалуроновая кислота, альгинат натрия и карбоксиметилцеллюлоза заметно влияют на диаметр фибрилл в процессе фибриллогенеза. Показано, что присутствие гиалуроновой кислоты и альгината натрия ведет к увеличению диаметра фибрилл коллагена, но не изменяет их D-периодичность (рис. 1). А присутствие карбоксиметилцеллюлозы ведет к значительному увеличению центров нуклеации фибриллогенеза и уменьшению диаметра фибрилл (Tsai et al., 2006).

Фиксирующие агенты, применяемые в препаративной обработке тканеинженерных конструкций на основе коллагена для просвечивающей электронной микроскопии, оказывают влияние на диаметр фибрилл изучаемых образцов (Akhtar, 2012). Было рассмотрено три варианта обработки ткани фиксирующими агентами. Так в ткани, зафиксированной в глутаровом альдегиде и смоле Шпора, диаметр составил около 40 нм, в глутаровом альдегиде и смоле Шпора с добавлением тетроксида осмия диаметр составил около 30 нм, в параформальдегиде и смоле LR White — около 55 нм (Akhtar, 2012).

В организме коллаген подвергается воздействию таких ферментов, как амилаза и коллагеназа. При обработке ткани этими ферментами диаметр фибрилл уменьшается. Причем под действием коллагеназы, в отличие от амилазы, в фибриллах значительно нарушается D-периодичность (Kazaili et al., 2021).

Неорганические вещества, такие как хлорид лития и ортованадат натрия, входящие в состав лекарственных препаратов, также изменяют диаметр фибрилл коллагена. Хлорид лития, психотропный препарат, оказывает многочисленные побочные эффекты на кожу и печень. Изучено влияние лития на коллагеновые фибриллы мышей. В течение 30 сут мышам вводили раствор хлорида лития в концентрации от 1.5 до 0.7 ммоль/кг, в результате структура коллагеновых фибрилл изменилась, в частности уменьшился их диаметр (Kounadi et al., 1995). Ортованадат (ванадат) натрия является одним из компонентов инъекции, используемой для лечения повреждения связок. Показано, что в результате такой терапии увеличивается диаметр фибрилл и улучшается их пространственная ориентация. Такой эффект связывают с фосфорилированием тирозина и снижением экспрессии  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) и, как следствие, предотвращением дифференцировки миофибробластов с последующим формированием новых коллагеновых пучков (Chen et al., 2006).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе рассмотрены основные факторы, влияющие на процесс фибриллобразования молекулярного коллагена I типа и на свойства самих фибрилл. В организме на эти процессы влияет множество факторов, и, как продемонстрировано в литературе, основное воздействие оказывает присутствие коллагенов других типов. Как правило, уменьшение количества коллагенов III или V типов приводит к уменьшению диаметра гетерофибрилл на основе коллагена I типа. Функционирование различных тканей организма, а также различные нарушения зависят, в том числе, и от структурной организации коллагеновых фибрилл. Так, изменение эластичности кожи, прочности связок и прозрачности роговицы напрямую зависят от структурной организации и диаметра коллагеновых фибрилл. В дальнейшем необходимо изучить более детально не только факторы, но и механизмы, лежашие в основе изменения лиаметра фибрилл.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20120).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adachi E., Hayashi T. 1986. In vitro formation of hybrid fibrils of type V collagen and type I collagen limited growth of type I collagen into thick fibrils by type V collagen. Connect. Tiss. Res. V. 14. P. 257.
- *Akhtar S.* 2012. Effect of processing methods for transmission electron microscopy on corneal collagen fibrils diameter and spacing. Microsc. Res. Tech. V. 75. P. 1420.
- Ameye L., Young M. 2002. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. Glycobiology. V. 12. P. 107R.
- Blaschke U., Eikenberry E., Hulmes D., Galla H., Bruckner P. 2000. Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. J. Biol. Chem. V. 275. P. 10370.
- Bredrup C., Stang E., Bruland O., Palka B., Young R., Haavik J., Knappskog P., Rødahl E. 2010. Decorin accumulation contributes to the stromal opacities found in congenital stromal corneal dystrophy. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. V. 51. P. 5578.

*Busra M.F.M., Lokanathan Y.* 2019. Recent development in the fabrication of collagen scaffolds for tissue engineering applications: A review. Curr. Pharm. Biotechnol. V. 20. P. 992.

- *Canty G.E., Kadler K.E.* 2005. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. J. Cell. Sci. V. 118. P. 1341.
- Chakravarti S., Petrol W., Hassell J., Jester J., Lass J., Paul J., Birk D. 2000. Corneal opacity in lumican-null mice: defects in collagen fibril structure and packing in the posterior stroma. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. V. 41 P. 3365.
- Chen J., Iosifidis M., Zhu J., Tatarintsev I., Wang J. 2006. Vanadate ingestion enhances the organization and collagen fibril diameters of rat healing medical collateral ligaments. Knee. Surg. Sports. Traumatol. Arthrosc. V. 14. P. 750.
- Chen S., Hirota N., Okuda M., Takeguchi M., Kobayashi H., Hanagata N., Ikoma T. 2011. Microstructures and rheological properties of tilapia fish-scale collagen hydrogels with aligned fibrils fabricated under magnetic fields. Acta. Biomat. V. 7 P. 644.
- *Enwemeka C., Rodriquez O., Gall N., Walsh N.* 1990. Morphometrics of collagen fibril populations in He : Ne laser photostimulated tendons. J. Clin. Laser Med. Surg. V. 8. P. 47.
- Fang M., Goldstein E., Turner A., Les C., Orr B., Fisher G. Welch K., Rothman E., Banaszak Holl M. 2012. Type I collagen dspacing in fibril bundles of dermis, tendon, and bone: Bridging between nano- and micro-level tissue hierarchy. ACS Nano. V. 6. P. 9503.
- Fleischmajer R., Perlish J., Burgeson R., Shaikh-Bahai F., Timpl R. 1990. Type I and Type III collagen interactions during fibrillogenesis. Ann. N.-Y. Acad. Sci. V. 580. P. 161.
- Giraud-Guille M., Mosser G., Belamie E. 2008. Liquid crystallinity in collagen. Interface Science. V. 13 P. 303.
- Gobeaux F., Mosser G., Anglo A., Panine P., Davidson P., Giraud-Guille M.-M., Belamie E. 2008. Fibrillogenesis in dense collagen solutions: A physicochemical study. J. Mol. Biol. V. 376. P.1509.
- Hosoyamada Y., Sakai T. 2012. Structural arrangement of collagen fibrils in the periarterial connective tissue of the kidney: their functional relevance as a structural stabilizer against arterial pressure. Anat. Sci. Int. V. 87. P. 80.
- Huang C., Long X., Peng C., Lin P., Tan H., Lv W., Wu L. 2019. Novel variants in the KERA gene cause autosomal recessive cornea plana in a Chinese family: A case report. Mol. Med. Rep. V. 19. P. 4711.
- Hulmes D. 2002. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. J. Struct. Biol. V. 137. P. 2.
- *Hulmes S.D.* 2009. Collagen diversity, synthesis and assembly. In: Collagen. Boston, Springer, 15–47.
- Hwang, C., Halper J. 2021. Proteoglycans and diseases of soft tissues. In: Advances Exper. Med. Biol. Boston: Springer, V. 1348. P. 127.
- *Iozzo R., Schaefer L.* 2015. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. Matrix. Biol. V. 42. P. 11.
- Jepsen K., Wu F., Peragallo J., Paul J., Roberts L., Ezura Y., Oldberg A., Birk D., Chakravarti S. 2002. A syndrome of Joint

Laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice. J. Biol. Chem. V. 277. P. 35e532.

- Junqueira L., Montes G., Martins J., Joazeiro P. 1983. Dermal collagen distribution. Histochem. V. 79. P. 397.
- *Kadler K.E.* 2017. Collagen fibril formation *in vitro* and *in vivo* Int. J. Exp. Path. V. 98. P. 4.
- Kalamajski S., Oldberg A. 2010. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. Matrix Biology. V. 29. P. 248.
- Kazaili A., Abdul-Amir Al-Hindy H., Madine J., Akhtar R. 2021. Nano-scale stiffness and collagen fibril deterioration: Probing the cornea following enzymatic degradation using Peakforce-QNM AFM. Sensors. V. 21. P. 1629.
- Klinge U., Si Z., Zheng H., Schumpelick V., Bhardwaj R. S., Klosterhalfen B. 2000. Abnormal collagen I to III distribution in the skin of patients with incisional hernia. Eur. Surg. Res. V. 32. P. 43.
- Kounadi E., Tzaphlidou M., Fountos G., Glaros D. 1995. An electron microscopic study of collagen fibril structure after lithium treatment–II. The effects of low lithium dose and short treatment on mouse skin collagen. Micron. V. 26. P. 113.
- *Kuivaniemi H., Tromp G.* 2019. Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. Gene. V. 707. P. 151.
- *Li W., Chi N., Rathnayake R., Wang R.* 2021. Distinctive roles of fibrillar collagen I and collagen III in mediating fibroblast-matrix interaction: A nanoscopic study. Biochem. Biophys. Res. Commun. V. 560. P. 66.
- Liu X., Wu H., Byrne M., Krane S., Jaenisch R. 1997. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. Proc. Natl. Acad. Sci. V. 94. P. 1852.
- Lopez M., Hayashi K., Fanton G., Thabit G., Markel M. 1998. The effect of radiofrequency energy on the ultrastructure of joint capsular collagen. J. Arthr. Rel. Surg. V. 14. P. 495.
- *Marijianowski M., Teeling P., Mann, J., Becker A.* 1995. Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I/type III collagen ratio: A quantitative assessment. J. Am. Coll. Cardiol. V. 25 P. 1263.
- Moorehead C., Prudnikova K., Marcolongo M. 2019. The regulatory effects of proteoglycans on collagen fibrillogenesis and morphology investigated using biomimetic proteoglycans. J. Struct. Biol. V. 206. P. 204.
- *Müller L., Pels E., Schurmans L., Vrensen G.* 2004. A new threedimensional model of the organization of proteoglycans and collagen fibrils in the human corneal stroma. Exp. Eye. Res. V. 78. P. 493.
- *Ng G.Y., Fung D.T.* 2007. The effect of therapeutic ultrasound intensity on the ultrastructural morphology of tendon repair. Ultrasound. Med Biol. V. 33. P. 1750.
- Orgel J., Eid A., Antipova O., Bella J., Scott J. 2009. Decorin core protein (decoron) shape complements collagen fibril surface structure and mediates its binding. PLoS One. V. 4. P. e7028.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007028

*Ottani V., Raspanti M., Ruggeri A.* 2001. Collagen structure and functional implications. Micron. V. 32 P. 251.

- *Parry D., Craig S.* 2017. Collagen fibrils during development and maturation and their contribution to the mechanical attributes of connective tissue. In: Collagen. V. II. Biochem. Biomech. N.Y.: RC Press. P. 2.
- Pawelec K.M., Best S.M. Cameron R.E. 2016. Collagen: A network for regenerative medicine. J. Mater. Chem. B. V. 4. P. 6484.
- Raub C., Suresh V., Krasieva T., Lyubovitsky J., Mih J.D., Putnam A.J., Bruce Tromberg J., George S. 2007. Noninvasive assessment of collagen gel microstructure and mechanics using multiphoton microscopy. Biophys. J. V. 92 P. 2212.
- *Roeder B.A.* 2009. Fibril microstructure affects strain transmission within collagen extracellular matrices. J. Biomech. Eng. V. 131. P. 031004.
- Steinmann B. 2002. The Ehlers-Danlos Syndrome. In: Connective tissue and its heritable disorders. N.-Y.: Wiley-Liss, Inc. P. 431.
- Sun M., Chen S., Adams S., Florer J., Liu H., Kao W., Wenstrup R., Birk D. 2011. Collagen V is a dominant regulator of collagen fibrillogenesis: dysfunctional regulation of structure and function in a corneal-stroma-specific Col5a1-null mouse model. J. Cell. Sci. V. 124. P. 4096.
- Sun M., Luo E.Y., Adams S.M., Adams T., Ye Y., Shetye S., Soslowsky S., Birk D. 2020. Collagen XI regulates the acquisition of collagen fibril structure, organization and functional properties in tendon. Matrix Biol. V. 94. P. 77.
- Svensson L., Heineg D., Oldberg A. 1995. Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4–5. J. Biol. Chem. V. 270. P. 20712.
- Tidu A., Ghoubay-Benallaoua D., Teulon C., Asnacios S., Grieve K., Portier F., Schanne-Klein M.-C., Borderie V., Mosser G. 2018. Highly concentrated collagen solutions leading to transparent scaffolds of controlled three-dimensional organizations for corneal epithelial cell colonization. Biomater. Sci. V. 6. P. 1492.
- Torbet J., Malbouyres M., Builles N., Justin V., Roulet M., Damour O., Oldbergc A., Ruggieroa F., Hulmes D. 2007. Orthogonal scaffold of magnetically aligned collagen lamellae for corneal stroma reconstruction. Biomaterials. V. 28. P. 4268.
- *Tracy L.E., Minasian R.A., Caterson E.J.* 2016. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. Adv. Wound Care (New Rochelle). V. 5. P. 119.
- *Tsai S.-W., Liu R.-L., Hsu F.-Y., Chen C.-C.* 2006. A study of the influence of polysaccharides on collagen self-assembly: Nanostructure and kinetics. Biopolymers. V. 83. P. 381.
- Varani J., Dame M., Rittie L., Fligiel S., Kang S., Fisher G., Voorhees J. 2006. Decreased collagen production in chronologically aged skin. Am. J. Pathol. V. 168 P. 1861.
- Yamada S., Yamamoto K., Ikeda T., Yanagiguchi K., Hayashi Y. 2014. Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine. Biomed. Res. Int. V. 2014. P. 302932.
- *Yoon J., Halper J.* 2005. Tendon proteoglycans: Biochemistry and function. Musculoskelet. Neuronal. Interact. V. 5. P. 22.
- *Young M., Bi Y., Ameye L., Chen X.* 2002. Biglycan knockout mice: New models for musculoskeletal diseases. Glyco-conj. J. V. 19. P. 257.
# Collagen Fibrils of Various Diameters: Formation Conditions and Basic Principles of Functioning

# M. Yu. Sirotkina<sup>*a*</sup> and Yu. A. Nashchekina<sup>*a*</sup>, \*

<sup>a</sup>Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia \*e-mail: nashchekina.yu@mail.ru

In the body, collagen is one of the main proteins of the extracellular matrix and is found in various tissues mainly in the fibrillar form. The diameter of collagen fibrils, on the one hand, depends on various chemical and physical factors, and, on the other hand, determines the properties of tissues, which include the fibrils themselves. The effect of various types of collagens, proteoglycans, and inorganic substances on the diameter of fibrils based on type I collagen was studied in detail. The study of the factors influencing the processes of fibril formation in vitro and in vivo will not only solve the fundamental problems of studying the mechanisms of fibril formation, but also reveal the causes of fibril formation disorders that lead to various diseases. The ability to control the formation of fibrils with a given diameter in vitro will make it possible to create tissue-engineered constructs that mimic native tissues outside the body.

Keywords: collagen type I, fibrils, extracellular matrix, chemical and physical factors

УДК 576.385.5

# ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИИ УСТОЙЧИВЫХ К ЦИСПЛАТИНУ КЛЕТОК РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. А. В. Моршнева<sup>1, \*</sup>, О. О. Гнедина<sup>1</sup>, Д. Н. Киндт<sup>1</sup>, М. В. Иготти<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия \*E-mail: amorshneva@incras.ru

> Поступила в редакцию 11.03.2022 г. После доработки 05.04.2022 г. Принята к публикации 20.04.2022 г.

Важным этапом исследований, посвященных анализу механизмов опухолевого рецидива и лекарственной устойчивости, является получение модельных линий опухолевых клеток, устойчивых к интересующему препарату. В представленной работе описан процесс получения линии клеток рака толстой кишки HCT116, устойчивых к цисплатину, и дана характеристика некоторых параметров устойчивых клеток, включая оценку пролиферативной, метаболической и миграционной активности. Результаты исследований показывают, что полученная линия HCT116/C обладает более чем 30-кратной устойчивостью к цисплатину по сравнению с исходными клетками. Таким образом, в результате нашей работы была создана *in vitro* модель резистентности к цисплатину клеток колоректального рака, которая открывает возможности для будущих исследований по преодолению лекарственной устойчивости *in vitro* и поиска новых подходов противораковой терапии *in vivo*.

*Ключевые слова*: онкология, колоректальный рак, хеморезистентность, рецидивирование, устойчивые клетки, цисплатин

**DOI:** 10.31857/S0041377122040022

Колоректальный рак - одна из наиболее агрессивных и трудно поддающихся лечению форм рака. Особенно остро в терапии колоректального рака стоит проблема рецидивирования опухолей, которая тесно связана с проблемой лекарственной устойчивости, приобретаемой опухолевыми клетками в ходе лечения. В этом случае часть опухолевых клеток выживает, формируя новую опухоль, более устойчивую к действию терапевтических препаратов. При этом опухолевые клетки, сформировавшие устойчивость к одному шитостатику, часто проявляют пониженную чувствительность и к ряду других препаратов явление, известное как перекрестная устойчивость или кросс-резистентность (Gupta et al., 1988). Проблема развития лекарственной устойчивости часто возникает при терапии препаратами платины, до сих пор активно используемыми в химиотерапии колоректального рака (Dilruba, Kalavda, 2016). Изучение механизмов, лежащих в основе формирования этой устойчивости и поиск способов ее преодоления, часто проводится in vitro на клеточных моделях, включающих чувствительные и устойчивые к препарату интереса линии клеток.

Основными задачами настоящей работы являются получение и характеристика такой клеточной модели — чувствительных и устойчивых к цисплатину клеток колоректального рака человека HCT116. Цисплатин — химиотерапевтический препарат на основе платины, который активно используется в клинике для борьбы с различными злокачественными новообразованиями (Dasari, Tchounwou, 2014). Цисплатин вызывает перекрестные сшивки с пуриновыми основаниями ДНК, нарушая процессы ее репарации, что впоследствии приводит к гибели раковых клеток (Galluzzi et al., 2012; Dasari, Tchounwou, 2014).

Устойчивые к различным препаратам клетки колоректального рака широко представлены в литературе. Схемы обработки клеток цитостатиком могут отличаться периодичностью времени действия агента — постоянное или импульсное (эпизодическое), также может варьировать дозировка препарата фиксированная или возрастающая. В стратегиях с постоянным присутствием цитостатика в культуральной среде используют более низкие концентрации агента, тогда как стратегии импульсного воздействия позволяют проводить обработку клеток цитостатиком в высоких дозировках, чередуя воздействие с периодами восстановления на чистой культуральной среде.

На основе клеток колоректального рака человека были получены линии, устойчивые к различным препаратам, используемым в клинической практике. Устойчивые к доксорубицину клетки линии HCT115 были получены при непрерывном воздей-

ствии постепенно увеличивающейся концентрации доксорубицина от 0.5 до 55 мкг/мл в течение 13 мес.. после чего клетки переводили на чистую среду и проверяли на устойчивость (Choi et al., 1996). При альтернативном подходе (Fanciulli et al., 2000) доксорубицин-устойчивые линии клеток рака толстого кишечника LoVo получали, подвергая исходные клетки кратковременной (в течение 1 ч) обработке доксорубицином в повышенной концентрации (10 мкг/мл) с последующим вырашиванием клеток в редкой плотности (500 клеток на 60-мм чашку) в среде, не содержащей доксорубицин. Через 2 нед. выделяли устойчивые колонии и выращивали до монослоя для следующей кратковременной обработки. По истечении 12 циклов обработки доксорубицином в течение 7 мес. полученные устойчивые клетки постоянно поддерживали в культуральной среде в присутствии 10 мкг/мл доксорубицина. Показатель ІС50 для чувствительных клеток составлял 0.03 мкг/мл. тогда как для устойчивых клеток -5.7 мкг/мл (Fanciulli et al., 2000).

Существуют исследования, показывающие, что одни и те же родительские клетки при применении различных способов индукции устойчивости к лекарству могут дать линии с различающимися характеристиками. Так, клетки AdR1.2 были получены при длительном непрерывном воздействии доксорубицина на клетки LoVo со ступенчатым повышением концентрации от 0.01 до 1.2 мкг/мл в течение 16 мес. с последующим постоянным поддержанием ее 1.2 мкг/мл. тогда как клетки SRA1.2 были получены из LoVo с помощью процедуры, состоящей из девяти импульсных коротких (в течение 1 ч) лекарственных циклов с высокой концентрацией доксорубицина (1.2 мкг/мл) в течение 9 мес., по окончании чего резистентные клетки SRA1.2 выращивали в среде без доксорубицина. Обе устойчивые сублинии были перекрестно устойчивы и перекрестно чувствительны к одинаковому спектру цитотоксических агентов. Однако есть ряд различий, среди которых обратимость устойчивого фенотипа у клеток AdK1.2 при выращивании клеток в среде без лекарства, тогда как SRA1.2 сохраняли свою устойчивость в течение не менее 10 мес. в аналогичных условиях (Yang, Trujillo, 1990).

Примерно 47-кратная устойчивость к иринотекану развивалась в клетках рака толстой кишки S1 при импульсном воздействии агентом (0.5 мкМ) в течение 48 ч с перерывом на 7 сут (Wu et al., 2021). После 3–5 циклов лекарственной обработки клетки культивировали с возрастающими концентрациями иринотекана, каждый раз увеличивая их на 50%. Устойчивые клеточные линии экспоненциально росли в присутствии 20 мкМ иринотекана. Для дальнейшего использования полученные устойчивые клетки выдерживали в среде, не содержащей лекарственного средства, в течение 14 сут перед экспериментом (Wu et al., 2021).

Для создания in vitro устойчивой к оксалиплатину клеточной линии каршиномы толстой кишки (Tang et al., 2007) исходные чувствительные клетки ТНС8307 подвергали продолжительному воздействию оксалиплатина в концентрации 0.108 мкг/мл с постепенным увеличением концентрации препарата через кажлые 2 нед. непрерывной обработки до конечной концентрации 6 мкг/мл в течение 9 мес. Стабильно устойчивую клеточную линию культивировали в присутствии конечной концентрации оксалиплатина еще на протяжении 4-х мес. Перед дальнейшим анализом резистентную линию раковых клеток поддерживали в течение 1 нед. без лекарств для устранения острых эффектов. Полученная линия была в 31 раз более устойчива к оксалиплатину, чем исходные клетки (Tang et al., 2007). По подобному сценарию получали оксалиплатинустойчивые линии на основе клеток колоректального рака SW620 и LoVo при непрерывном воздействии оксалиплатина в низкой концентрации с постепенным ее увеличением в течение 10 мес. (Liu et al., 2010).

Устойчивую к цисплатину линию карциномы (CC531) толстой кишки крысы получали *in vitro* при непрерывном присутствии в среде клеток цисплатина в низкой концентрации (0.75 мкМ), на которой продолжали поддерживать установившиеся устойчивые клоны (Vrie et al., 1993). Таким же образом индуцировали устойчивость к цисплатину клеток рака толстой кишки человека LoVo, поэтапно обрабатывая их агентом для отбора устойчивых клонов, которые затем были объединены для последующих экспериментов (Chen et al., 2021).

Для развития устойчивости к 5-фторурацилу (5-FU), оксалиплатину и иринотекану клетки линии колоректального рака НСТ116 подвергались повторяющейся обработке препаратов в постепенно возрастающих концентрациях в течение более 10 мес. (Boyer et al., 2004). Устойчивую к 5-фторурацилу линию затем культивировали в присутствии 2 мкМ 5-FU, иринотекан-устойчивую линию – в присутствии 1 мкМ иринотекана, а оксалиплатинустойчивая линия была оценена как стабильно устойчивая и велась на среде без вещества с импульсными обработками оксалиплатином (8 мкМ) каждые 4 нед. Перед каждым экспериментом устойчивые линии культивировали в среде без препарата в течение 48 ч. Концентрации полумаксимального ингибирования (IC50) в устойчивых к 5-FU, оксалиплатину и иринотекану линиях были выше в 3, 31 и 10 раз соответственно относительно родительских чувствительных клеточных линий (Boyer et al., 2004).

Линии, устойчивые к цитотоксическому воздействию, являются незаменимым модельным объектом в исследованиях механизмов лекарственной устойчивости клеток колоректального рака и причин его рецидивирования.

В представленной работе описано реализованное нашей исследовательской группой получение линии устойчивых к цисплатину клеток колоректального рака человека при итеративной обработке исходных клеток HCT116 цисплатином, а также приведены результаты экспериментов, подтверждающих устойчивость полученной линии к цисплатину. Работа проведена на базе Института цитологии РАН. За стартовую была взята определенная нами методом МТТ концентрация полумаксимального ингибирования жизнеспособности клеток, составившая 9 мкМ. Клетки, полученные после нескольких циклов обработки цисплатином в возрастающей концентрации, показали высокую степень резистентности и не снижают жизнеспособность при действии 50 мкМ цисплатина.

# МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные линии и культивирование клеток. Клетки рака прямой кишки человека HCT116 были любезно предоставлены О.Н. Демидовым (Университет Бургундии Франш-Конте, Безансон, Франш-Конте, Франция). Клетки культивировали при 37°С и 5% CO<sub>2</sub> в среде DMEM (Биолот, Россия), дополненной 10% сыворотки (FCS; Gibco, CША), 2мM Lглутамина (Биолот, Россия) и содержащей 40 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия). В ходе работы на основе линии HCT116 были получены устойчивые к цисплатину клоны (линия HCT116/C).

**Тест МТТ.** Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью колориметрического теста МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид), позволяющего количественно измерять метаболическую активность клеток. МТТ — это желтый тетразолевый краситель, который проникает в клетку и под действием НАДФН-зависимых оксидоредуктазных ферментов, восстанавливается до нерастворимого соединения формазана, который затем переводится в растворимое состояние с помощью диметилсульфоксида (ДМСО).

Для проведения теста клетки рассеивали в 96-луночные планшеты в плотности  $30 \times 10^3$  клеток на 1 лунку и культивировали в присутствии цисплатина в соответствующей концентрации в течение 24-72 ч, после чего культуральную среду удаляли, а клетки инкубировали в растворе МТТ (Sigma) в PBS в конечной концентрации 0.5 мг/мл в течение 1 ч при 37°С в СО<sub>2</sub>-инкубаторе. Затем раствор МТТ убирали и лизировали клетки в ДМСО до растворения гранул формазана. Оптическую плотность раствора в каждой лунке определяли спектрофотометрически при длине волны 570 нм (Multiscan-EX; Labsystems, США), используя величину оптической плотности ДМСО в качестве референсного значения. Абсолютные значения оптической плотности, прямо пропорциональные интенсивности клеточного дыхания и, соответственно, жизнеспособности клеток, в каждой временной точке пересчитывали относительно контрольных необработанных цисплатином клеток, принимаемых за единицу, и представляли на графи-ках в относительных значениях.

Показатель IC50 и индекс устойчивости (RI). Вычисление IC50 цисплатина (его концентрации полумаксимального ингибирования жизнеспособности клеток) проводили с помощью веб-инструмента ААТ Bioquest, Inc. (Quest Graph<sup>TM</sup> IC50 Calculator; https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator) на основе результатов теста МТТ, представленных в виде таблицы, где каждой концентрации цисплатина соответствует усредненное и нормированное на контроль (относительное) значение поглощения МТТ (570 нм). Индекс устойчивости (RI) вычисляли как отношение IC50 устойчивых клонов к IC50 исходных чувствительных клеток (RI = IC50<sub>НСТИ6/C</sub>/IC50<sub>НСТИ6</sub>).

Кривые роста клеток. Клетки рассеивали на чашки 3 см в плотности 80 × 10<sup>3</sup> клеток на чашку. Через 24 ч после рассева к клеткам добавляли цисплатин в концентрации 18 мкМ и, спустя 24, 48 и 72 ч после добавления агента, проводили подсчет общего числа клеток в каждой экспериментальной точке с использованием камеры Горяева. Для каждой экспериментальной точки клетки в чашке считали трижды. Данные представляли как среднее значение и его стандартная ошибка в каждой временной точке.

Тест на зарастание царапины. Для проведения теста на миграционную активность в монослое клеток (12-луночный планшет) проводили прямые царапины с помощью наконечника дозатора на 200 мкл. Фоторегистрацию царапины проводили в момент и через 24 ч после нанесения царапин с помощью инвертированного светового микроскопа. Для обработки изображений и вычисления площади царапины использовали программу Image J (Schneider et al., 2012).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор стартовой концентрации цисплатина для получения устойчивых клонов. В представленной работе устойчивые к цисплатину клетки колоректального рака человека на основе линии НСТ116 были получены при циклической обработке исходных клеток возрастающими концентрациями цисплатина. Для выбора стартовой концентрации цитотоксического агента провели тест МТТ, оценив жизнеспособность родительских клеток НСТ116 при действии возрастающих концентраций цисплатина (рис. 1а, в). На основе полученных данных была рассчитана концентрация цисплатина, соответствующая концентрации IC50 для каждой временной точки (рис. 16). Чтобы сбалансировать интенсивность клеточной гибели на начальных этапах получения устойчивых клонов, в качестве стартовой была выбрана концентрация 9 мкМ, соответствующая IC50 в точке 48 ч.

Получение устойчивой к цисплатину линии клеток HCT116/C. На рис. 2 схематично представлен процесс индукции устойчивости клеток к цисплатину,



Рис. 1. Зависимость изменения жизнеспособности (ЖС) клеток НСТ116 при действии цисплатина в различных концентрациях в течение 24-72 ч согласно результатам теста МТТ. Результаты теста представлены в виде графика изменения оптической плотности, прямо пропорциональной ЖС клеток (а), и графика изменения (%) ЖС клеток (в) при действии цисплатина на временных точках 24-72 ч. Цифры над кривыми (а) - концентрация цисплатина, мкМ. Результаты представлены относительно значений для контрольных необработанных цисплатином клеток в каждой временной точке, принятых за единицу (а), или 100% (в). Горизонтальная линия на графиках (а, в) соответствуют IC50 (концентрации цисплатина для полумаксимального подавления ЖС); точные значения ІС50, рассчитанные для каждой временной точки, приведены в таблице (б). На графиках представлен результат усреднения 3–5 независимых экспериментов, вертикальные отрезки – стандартные ошибки среднего (SEM).

примененной в представленной работе (рис. 2). Для получения устойчивых клонов исходные клетки НСТ116 подвергали последовательным циклам обработки цисплатином в возрастающей концентрации. Клетки обрабатывали цисплатином в стартовой концентрации (9 мкМ), подобранной, как описано выше, в течение 24 ч. Спустя 24 ч действия агента среду меняли на свежую, не содержащую цисплатин. После периода восстановления продолжительностью 2-3 нед. образовавшиеся колонии собирали 0.5%-ным раствором трипсина-ЭДТА. Полученные таким образом клетки выращивали в виде монослойной культуры до сливания колоний, а затем подвергались еще одному циклу обработки цисплатином по описанной выше методике.

декс устойчивости клеток (RI) для того, чтобы принять решение об увеличении концентрации цитотоксического агента. RI является важным параметром оценки степени устойчивости клеток к химическому или физическому воздействию и широко используется при получении резистентных клеточных линий (Zhang et al., 2006). Принято считать, что клетки с RI в пределах 0-2 все еще считаются чувствительными, тогда как устойчивость средней степени характеризуется значением RI в диапазоне значений 2-10, превышение которого (RI > 10) говорит о высокой устойчивости клеток (Harker et al., 1989; Michalak et al., 2020). При удвоении RI нами принималось решение о повышении концентрации цисплатина вдвое для следующего цикла обработки клеток.

После 2-3-х циклов обработки определяли ин-

цитология **№** 4 2022 том 64



восстановления

**Рис. 2.** Схема получения устойчивых к цисплатину клеток HCT116 (*a*) и кривые жизнеспособности (*б*) чувствительных (HCT116) и устойчивых (HCT116/C) клеток после 4–6 циклов обработки цисплатином (10–50 мкМ) в течение 48 ч. *a* – Исходные клетки подвергали итеративной обработке цисплатином в возрастающих концентрациях (9, 18 и 40 мкМ); концентрацию цисплатина удваивали после каждого удвоения значения IC50 по мере приобретения клетками устойчивости. *б* – По данным МТТ-теста; значение для контроля (необработанных клеток) принято за единицу для каждой клеточной линии.

Для определения RI проводили перерасчет IC50 устойчивых клонов по результатам МТТ-теста, и вычисляли индекс устойчивости RI, как отношение IC50 устойчивых и чувствительных клеток (RI = IC50<sub>HCT116/C</sub>/IC50<sub>HCT116</sub>). Концентрацию цисплатина для обработки клеток удваивали при каждом удвоении RI.

Данные МТТ-теста показали, что IC50 после одного цикла обработки цисплатином в концентрации 9 мкМ, увеличилась до 12.5 мкМ, в результате чего индекс устойчивости RI составил 1.4. Такой показатель RI указывает на сохраняющуюся чувствительность клеток. В связи с этим проводили второй цикл обработки цисплатином с теми же условиями, что и первый. После второго цикла показатель RI превысил 2, в связи с чем концентрацию цисплатина повысили до 18 мкМ. После 2–3-х циклов действия цисплатина в концентрации 18 мкМ индекс RI отдельных клонов был выше 14, что свидетельствует о формировании высокой устойчивости. Далее обработку цисплатином продолжали при его концентрации 40 мкМ.

Данные МТТ-теста показывают, что после 4— 6 циклов обработки цисплатином в возрастающей концентрации клетки выдерживают до 48 ч действия цисплатина, не достигая полумаксимального ингибирования жизнеспособности ни на одной из выбранных концентраций (рис. 3). Более того, определяемая с помощью МТТ-теста IC50 клеток после шестого цикла была значительно выше IC50 родительских клеток и составила 250 мкМ, что соответствует индексу устойчивости RI = 27.8.

Таким образом, за 6–7 циклов обработки исходных клеток HCT116 цисплатином в возрастающей концентрации (9–40 мкМ) сформировалась 30кратная устойчивость.

# Сравнительная характеристика скорости пролиферации клеток линий НСТ116 и НСТ116/С.

Пониженная чувствительность клеток к цитотоксическому воздействию может быть обусловлена низкой пролиферативной активностью клеток. Для того, чтобы выяснить, не является ли наблюдаемое снижение чувствительности клеток НСТ116/С к цисплатину следствием снижения темпа пролиферации, мы провели сравнительный анализ скорости деления устойчивых и чувствительных клеток. Для этого строили кривые роста исходных клеток НСТ116, а также устойчивых клеток НСТ116/С, сформированных после 7-го цикла действия цисплатина. Данные, представленные на рис. 3а, свидетельствуют, что в клетках НСТ116/С скорость пролиферации существенно не снижена и практически совпадает с пролиферативной активностью родительских клеток HCT116 (рис. 4*a*).

Далее было проведено сравнение влияния цисплатина на пролиферацию исходных и чувствительных клеток. Данные кривых роста показывают, что при культивировании в присутствии 18 мкМ цисплатина чувствительных клеток НСТ116 исходный размер популяции сокращается более чем вдвое к 72 ч действия агента, что свидетельствует об индукции клеточной гибели (рис. 46). Увеличение популяции устойчивых клеток НСТ116/С замедляется в присутствии цисплатина, однако не происходит такого сокрашения популяции, как в чувствительных клетках (рис. 4в). По данным кривых роста можно утверждать, что исходные клетки линии НСТ116 гибнут более интенсивно по сравнению с полученной резистентной линией, поскольку при действии цисплатина в течение 72 ч число клеток в линии НСТ116 в 15 раз меньше по сравнению с контролем, тогда как в линии HCT116/C — только в 3 раза (рис. 4z - d), что



**Рис. 3.** Графики изменения жизнеспособности чувствительных (HCT116) и устойчивых (HCT116/C) клеток после 4–6-ого цикла обработки цисплатином (10–50 мкМ) в течение 48 ч. Данные представлены относительно необработанного цисплатином контроля, принятого за единицу для каждой клеточной линии. Цифры справа от кривых – число циклов цисплатина.



**Рис. 4.** Кривые роста популяции клеток HCT116 и HCT116/C в контроле и после обработки цисплатином (a-e), микрофотографии (c) и численность (d) их популяций. a – Изменение относительного количества чувствительных (HCT116) и устойчивых клеток (HCT116/C) при культивировании в среде без цисплатина в течение 24–72 ч.  $\delta$ , e – Изменение относительного количества соответственно исходных и устойчивых клеток в контроле (K) и при действии 18 мкМ цисплатина (Ц) в течение 24–72 ч; результаты представлены как отношение числа клеток в текущий момент к исходному числу клеток в день добавления агента, принятого за 1 для каждой клеточной линии. e – Репрезентативные фотографии клеток HCT116/C, необработанных цисплатоном (18 мкМ) в течение 72 ч.  $\partial$  – Численность популяций клеток HCT116 и HCT116/C, необработанных или обработанных цисплатином (18 мкМ) в течение 72 ч (на основе кривой роста). Численность популяции в контроле в точке 72 ч принята за единицу для каждой из линий, ее величины относительно соответствующего контроля указаны над столбцами. Вертикальные отрезки – стандартная ошибка среднего (SEM).



**Рис. 5.** Изменение площади зарастания царапины в монослое клеток. a – Репрезентативные микрофотографии царапин в монослое чувствительных (HCT116) и устойчивых (HCT116/C) клеток после 4—6 циклов обработки цисплатином сразу (0 ч) и спустя 24 ч после нанесения царапины.  $\delta$  – Изменение площади царапины при ее зарастании клетками вычисляли как отношение площади царапины через 24 ч к площади через 0 ч после повреждения (%). Для вычисления площади царапин использовали программу Image J. На гистограмме представлен результат усреднения трех независимых экспериментов для чувствительных (*светлый столбик*) и устойчивых (*темные столбики*) клеток, *вертикальные отрезки* – стандартная ошибка среднего (SEM). Для проверки значимости различий использовали тест Манна–Уитни для сравнения с чувствительными клетками клетками клетками клетками и устойчивых клонов попарно (\*P < 0.05), а также группу устойчивых клонов (\*P = 0.01).

также свидетельствует о приобретении устойчивости полученной популяции к цисплатину.

Изменение миграционной активности клеток НСТ116 при приобретении устойчивости к цисплатину. Для измерения основных параметров миграционной активности клеток, таких как скорость, постоянство и полярность используют тест на "зарастание царапины" или раны. В ходе эксперимента анализировали царапины в монослое чувствительных (НСТ116) и устойчивых (НСТ116/С) клеток после 4-6 циклов обработки цисплатином в двух временных точках: непосредственно после нанесения царапины (0 ч) и через 24 ч. На репрезентативных микрофотографиях царапин клеточного монослоя (24 ч после начала эксперимента) видно, что устойчивые клоны проявляют повышенную миграционную активность по сравнению с исходными клетками (рис. 5).

Таким образом, анализ *in vitro* показал более высокую миграционную способность химиорезистентных клеток HCT116 при анализе миграции во время заживлении раны. Это может указывать на то, что при приобретении устойчивости клетки претерпевают эпителиально-мезенхимный переход (ЭМП), что увеличивает их способность к миграции.

Способность клеток мигрировать необходима для многих физиологических процессов, включая эмбриональное развитие, заживление ран. Тем не менее, миграция клеток также участвует в ряде патологических процессов, таких как инвазия опухоли, неоангиогенез и метастазирование.

Метастазирование неразрывно связано с устойчивостью к химиотерапии как клинически, так и биологически, однако молекулярная основа этой связи неизвестна. Существуют исследования, свидетельствующие о том, что развитие химиорезистентности сопровождается приобретением метастатического фенотипа и, соответственно, увеличенной миграционной активностью. Так, миграционная активность клеток аденокаршиномы толстой кишки человека НТ-29. устойчивых к 5-фторурацилу (5-FU), была выше по сравнению с родительскими при культивировании в присутствии 5-FU (Durinikova et al., 2018). Кроме того, показано, что цисплатин-резистентные клетки рака яичников IGROV1-СР обладают более высокими миграционными свойствами по сравнению с родительскими из-за дерегуляции ZEB1 (Cui et al., 2018), а также из-за их способности к быстрой регуляции фокальной адгезии через паксиллин, винкулин и талин (Huang et al., 2020). Следовательно, приобретение клетками химиорезистентности может приводить к повышению их миграционного потенциала, что согласуется с нашими данными, полученными в настоящей работе для цисплатин-устойчивых клеток.

Один из возможных механизмов устойчивости опухолевых клеток к цитотоксическому действию

лекарств заключается в замедлении пролиферации опухолевых клеток, снижении их метаболической активности (уход в состояние покоя или сна). Однако представленные нами данные указывают, что полученные устойчивые клетки имеют сравнимый с родительскими пролиферативный потенциал и являются метаболически активными. Таким образом, можно заключить, что в реализацию наблюдаемой в клетках HCT116/C устойчивости к цисплатину вовлечены специфические механизмы химиорезистентности. Установление этих механизмов требует дополнительных исследований.

# ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке правительства Санкт-Петербурга и частично Фондом директора Института цитологии РАН.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах представленной работы животные и люди не участвовали.ì

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Boyer J., McLean E.G., Aroori S., Wilson P., McCulla A., Carey P.D., Longley D.B., Johnston P.G. 2004. Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. V. 10. P. 2158.
- Chen P., Liu X.-Q., Lin X., Gao L.-Y., Zhang S., Huang X. 2021. Targeting YTHDF1 effectively re-sensitizes cisplatin-resistant colon cancer cells by modulating GLS-mediated glutamine metabolism. Mol. Ther. Oncolytics. V. 20. P. 228.
- *Choi S.-U., Kim N.-Y., Choi E.-J., Kim K.-H., Lee C.-O.* 1996. Establishment of doxorubicin-resistant subline derived from hct15 human colorectal cancer cells. Arch. Pharm. Res. V. 19. P. 342.
- Cui Y., Qin L., Tian D., Wang T., Fan L., Zhang P., Wang Z. 2018. ZEB1 promotes chemoresistance to cisplatin in ovarian cancer cells by suppressing SLC3A2. Chemotherapy. V. 63. P. 262.
- *Dasari S., Tchounwou P.B.* 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. Eur. J. Pharmacol. V. 0. P. 364.
- *Dilruba S., Kalayda G.V.* 2016. Platinum-based drugs: past, present and future. Cancer Chemother. Pharmacol. V. 77. P. 1103.
- Durinikova E., Kozovska Z., Poturnajova M., Plava J., Cierna Z., Babelova A., Bohovic R., Schmidtova S., Tomas M., Kucerova L., Matuskova M. 2018. ALDH1A3 upregulation and spontaneous metastasis formation is associated with ac-

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

quired chemoresistance in colorectal cancer cells. BMC Cancer. V. 18. P. 848.

- Fanciulli M., Bruno T., Giovannelli A., Gentile F.P., Di Padova M., Rubiu O., Floridi A. 2000. Energy metabolism of human LoVo colon carcinoma cells: correlation to drug resistance and influence of lonidamine. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. V. 6. P. 1590.
- Galluzzi L., Senovilla L., Vitale I., Michels J., Martins I., Kepp O., Castedo M., Kroemer G. 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. Oncogene. V. 31. P. 1869.
- *Gupta R.S., Murray W., Gupta R.* 1988. Cross resistance pattern towards anticancer drugs of a human carcinoma multidrug-resistant cell line. Br. J. Cancer. V. 58. P. 441.
- Harker W.G., Slade D.L., Dalton W.S., Meltzer P.S., Trent J.M. 1989. Multidrug resistance in mitoxantrone-selected HL-60 leukemia cells in the absence of P-glycoprotein overexpression. Cancer Res. V. 49. P. 4542.
- Huang H.-K., Lin Y.-H., Chang H.-A., Lai Y.-S., Chen Y.-C., Huang S.-C., Chou C.-Y., Chiu W.-T. 2020. Chemoresistant ovarian cancer enhances its migration abilities by increasing store-operated Ca<sup>2+</sup> entry-mediated turnover of focal adhesions. J. Biomed. Sci. V. 27. P. 36.
- Liu Z., Qiu M., Tang Q.-L., Liu M., Lang N., Bi F. 2010. Establishment and biological characteristics of oxaliplatin-resistant human colon cancer cell lines. Chin. J. Cancer. V. 29. P. 661.
- Michalak M., Lach M.S., Antoszczak M., Huczyński A., Suchorska W.M. 2020. Overcoming resistance to platinumbased drugs in ovarian csancer by salinomycin and its derivatives—an in vitro study. Molecules. V. 25. P. 537.
- Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. 2012. NIH image to imageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods. V. 9. P. 671.
- *Tang H., Liu Y.-J., Liu M., Li X.* 2007. Establishment and gene analysis of an oxaliplatin-resistant colon cancer cell line THC8307/L-OHP. Anticancer. Drugs. V. 18. P. 633.
- Vrie W., Heyden S.V.D., Gheuens E., Bijma A., Bruijn E., Marquet R., Oosterom A., Eggermont A. 1993. Drug resistance in rat colon cancer cell lines is associated with minor changes in susceptibility to cytotoxic cells. Cancer Immunol. Immunother. V. 37. P. 337.
- Wu Z.-X., Yang Y., Zeng L., Patel H., Bo L., Lin L., Chen Z.-S. 2021. Establishment and characterization of an irinotecanresistant human colon cancer cell line. Front. Oncol. V. 10. P. 624954.
- Yang L.Y., Trujillo J.M. 1990. Biological characterization of multidrug-resistant human colon carcinoma sublines induced/selected by two methods. Cancer Res. V. 50. P. 3218.
- Zhang G., Fang L., Zhu L., Zhong Y., Wang P.G., Sun D. 2006. Syntheses and biological activities of 3'-azido disaccharide analogues of daunorubicin against drug-resistant leukemia. J. Med. Chem. V. 49. P. 1792.

# The Establishment and Characterization of the Cisplatin-Resistant Human Colon Cancer Cell Line

A. V. Morshneva<sup>a, \*</sup>, O. O. Gnedina<sup>a</sup>, D. N. Kindt<sup>a</sup>, and M. V. Igotti<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia \*e-mail: 1195alisa@gmail.com

To analyze the tumor recurrence mechanisms and the drug resistance it is important to generate model lines of tumor cells that are resistant to the drug of interest. This paper describes the establishment of the cisplatin-resistant colon cancer cell line HCT116 and characterizes some parameters of resistant cells, including the assessment of its proliferative, metabolic and migration activity. The research results show that the line HCT116/C obtained has more than 30-fold resistance to cisplatin compared to the original cells. Thus, as a result of our work, an *in vitro* model of resistance to cisplatin in colorectal cancer cells was created, which opens up opportunities for future research on overcoming drug resistance *in vitro* and searching for new approaches to anticancer therapy *in vivo*.

Keywords: oncology, colon cancer, chemoresistance, tumor recurrence, drug-resistant cells, cisplatin

УДК 57.085.23:616-006.66

# КЛЕТКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ИЗМЕНЯЮТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ГОРМОНАЛЬНЫМ И РОСТОВЫМ СТИМУЛАМ ПРИ 3D-КУЛЬТИВИРОВАНИИ

© 2022 г. А. А. Нуштаева<sup>1, \*</sup>, М. М. Савинкова<sup>1, 2</sup>, М. С. Ермаков<sup>1</sup>, М. Е. Варламов<sup>1, 2</sup>, Д. Д. Новак<sup>1, 2</sup>, В. А. Рихтер<sup>1</sup>, О. А. Коваль<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия <sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

> \*E-mail: nushtaeva.anna@gmail.com Поступила в редакцию 25.03.2022 г. После доработки 21.04.2022 г. Принята к публикации 22.04.2022 г.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании формирования и роста моно- (3D) и гетерогенных (3D-2) сфероидов на основе комбинации опухолевых и стромальных клеток, имитирующих три типа РМЖ: ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup> и ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup> при воздействии 17-В эстрадиола (E2) и TGFВ. Линии опухолевых клеток РМЖ МСF7, MDA-MB-231 и SK-BR-3 использовали в качестве моделей для формирования 3D-культур и фибробласты здоровой ткани молочной железы BN120f для формирования соответствующих гетерогенных 3D-2 культур. Предложены единообразные условия 3D-культивирования всех трех культур клеток РМЖ, позволяющие получать пролиферирующие сфероиды. При смешивании опухолевых клеток и здоровых фибробластов в соотношении 1:4 внутреннее ядро формировали фибробласты, а эпителиальные опухолевые клетки образовывали внешний слой 3D-2-структур. Морфологический анализ сфероидов показал, что при таком со-культивировании опухолевых и здоровых клеток в модели 3D-2 формируются более округлые и структурированные сфероиды по типу самоорганизации в микроткань в сравнении с моно-культивированием опухолевых клеток в 3D-модели. Установлено, что Е2 стимулирует пролиферацию клеток в составе сфероидов 3D и 3D-2 вне зависимости от имитации типа РМЖ входящих в них опухолевых клеток, тогда как при культивировании в 2D-модели клетки MDA-MB-231 не чувствительны к 17β-эстрадиолу. В составе сфероидов клетки MDA-MB-231 утрачивали, а SK-BR-3 приобретали чувствительность к пролиферативному воздействию TGFB. Таким образом, показано, что клеточные 3Dи 3D-2-модели РМЖ являются важным инструментом при изучении опухолевой прогрессии и востребованы при тестировании новых противоопухолевых подходов, несмотря на существующие 2D-модели.

*Ключевые слова*: рак молочной железы, 17-β эстрадиол, трансформирующий фактор роста бета (TGFβ), рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2), опухолевые клетки, фибробласты, клеточные линии, 3D культуры клеток

DOI: 10.31857/S0041377122040046

Рак — одна из ведущих причин смерти взрослого населения в мире, которая в 2020 г. унесла жизни почти 10 млн человек (Ferlay et al., 2021). В 2020 г. лидером по выявлению новых случаев заболевания (2.26 млн. случаев) был рак молочной железы (РМЖ), что делает его исследование актуальной биомедицинской проблемой. РМЖ — это гетерогенное заболевание как на гистологическом, так и на молекулярном уровне, опухолевые образования которого состоят из генетически измененных опухоле-

вых клеток, взаимодействующих с нормальными и ассоциированными с опухолью фибробластами, эндотелиальными клетками, перицитами и иммунными клетками (Fouad, Aanei, 2017). Разделение на определенные типы РМЖ проводят на основании экспрессии ключевых молекулярных маркеров – рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR) и рецептора эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2) (Zubair et al., 2021).

Развитие РМЖ часто связано с нарушением регуляции биосинтеза гормонов и факторов роста. Гормоны эстрогенового ряда, такие как 17-β эстрадиол (Е2), способны ингибировать апоптоз в клетках гормон-зависимого РМЖ и играют ключевую роль в его прогрессировании (Fernando, Wimalasena, 2004). Е2 играет важную роль в регуляции физиологических

Принятые сокращения: E2 – 17-β эстрадиол; РМЖ – рак молочной железы; EGF и EGFR – эпидермальный фактор роста и рецептор EGF соответственно; HER2 и HER3 – рецептор эпидермального фактора роста 2-го и 3-го типа соответственно; TGFβ – трансформирующий фактор роста бета.

процессов как у женщин, так и у мужчин, и вовлечен в патологии молочной железы (Acconcia, Marino, 2011; Fernando, Wimalasena, 2004). Для опухолевых клеток молочной железы, которые экспрессируют ER, гормоны эстрогенового ряда способствуют развитию и прогрессированию РМЖ, стимулируют инвазию и метастазирование опухолевых клеток в отдаленные органы или лимфатические узлы (Park et al., 2016). Поэтому терапия, направленная на ингибирование активации ER, достаточно успешна в клинике. В то же время показано, что терапевтическое блокирование активации ER является стрессовым фактором, способствующим сильным компенсаторным механизмам, в том числе в раковых клетках (Suba, 2020). В случае, когда передача сигналов через ER полностью подавлена, опухолевые клетки демонстрируют неконтролируемую пролиферацию, и может наблюдаться рост опухоли (Suba, 2020). Таким образом, взаимосвязь функционального состояния ER и опухолевой прогрессии при РМЖ очевидна.

Трансформирующий фактор роста В (TGF-B) является важнейшей сигнальной молекулой иммунной системы, он регулирует генерацию и эффекторные функции многих типов иммунных клеток (Sanjabi et al., 2017). В микроокружении опухоли он оказывает выраженное иммуносупрессивное действие, и его повышенное содержание коррелирует с плохим ответом на иммунотерапию. Реакцией большинства клеток взрослого организма на стимуляцию TGF-β является активация пролиферации, дифференцировки, адгезии, метаболических изменений и клеточной гибели (Batlle, Massagué, 2019). ТGF-β функционирует как опухолевый супрессор, который может индуцировать апоптоз в пред-злокачественных клетках и подавлять пролиферацию в клетках карциномы. Однако клоны раковых клеток, которые инактивируют или изменяют путь TGF-β, могут использовать коммуникацию с помощью ТGF-β для опухолевой прогрессии, в том числе при развитии РМЖ (Tian, Schiemann, 2017). Все эти данные указывают на важность исследования влияния E2 и TGF-β на развитие и прогрессирование опухолевых клеток при РМЖ.

2D- и 3D-клеточные модели онкологических заболеваний позволяют осуществлять функциональное профилирование опухолей и выявлять молекулярные и клеточные ансамбли, участвующие в патогенезе (Jo et al., 2018; Weiswald et al., 2015). 2D-культивирование имеет много ограничений из-за того, что клетки в 2D-модели не могут воспроизвести архитектуру и функциональные особенности тканей *in vivo* (Costa et al., 2016). Исследования последних лет показывают способность 3D-культур поддерживать особенности молекулярного фенотипа опухолевых клеток, которые наблюдаются в условиях in vivo, и такие модели позволяют оценивать действие гормонов и ростовых факторов в опухолевой прогрессии (Weiswald et al., 2015). 3D-культуры по сравнению с культурами 2D дают возможность моделировать многоклеточное микроокружение опухоли, более полно отражая ее индивидуальные особенности и оценивать пролиферацию и дифференцировку клеток, анализировать ответы на стимулы, выявлять особенности метаболизма лекарств и т.д. (Antoni et al., 2015).

Трехмерные модели РМЖ обеспечивают как этические, так и экономические преимущества при прогностической оценке ответа опухоли на лечение, например, химио- и таргетную терапию, устраняя разрыв между 2D-культурами и исследованиями *in vivo* на животных, тем самым сокрашая количество животных, умерщвляемых в доклинических исследованиях (Langhans, 2018). Однако большинство современных 3D-моделей состоят только из одного типа клеток, в то время как для физиологической релевантности модель должна также учитывать сложные межклеточные взаимодействия в микроокружении опухоли и быть гетерогенной, то есть содержать не только опухолевые клетки. Гетерогенные 3D сфероиды, сформированные опухолевыми и стромальными клетками, далее называются 3D-2-сфероиды по аналогии с моделями, описанными в литературе (Osswald et al., 2019). 3D-2 является наиболее репрезентативной моделью опухоли, в которой может происходить взаиморегуляция метаболических процессов при паракринной секреции цитокинов и факторов роста клетками с различным гистологическим происхожлением.

В настоящей работе в качестве опухолевых клеток для формирования 3D-культур использовали иммортализованные культуры PMЖ: клетки гормонзависимой аденокарциномы MCF7, клетки гормоннезависимой HER2-положительной аденокарциномы SK-BR-3 и трижды негативной аденокарциномы MDA-MB-231. Первичную клеточную культуру фибробластов BN120f, полученную из ткани здоровой молочной железы использовали для создания 3D-2модели PMЖ. Основная задача исследования заключалась в сравнении пролиферативного ответа на стимуляцию E2 и TGF-β в клеточных моделях 2D, 3D и 3D-2 на основе опухолевых клеток, имитирующих три типа PMЖ (ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup> и ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup>).

# МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Реактивы и материалы. Использовали следующие реактивы: культуральные среды Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) и Leibovitz's L-15 (L-15), эмбриональная бычья сыворотка (FBS), раствор антибиотиков-антимикотиков (пенициллин, стрептомицина сульфат, амфотерицин) и TrypLE<sup>TM</sup> Express Enzyme (GIBCO, Life Technologies, США), GlutaMAX<sup>TM</sup> (GIBCO, Invitrogen, Франция), зеоцин (Thermo Fiesher, США), натрийфосфатный буфер (PBS), бычий сывороточный альбумин (BSA; Amresco, США), Trypan Blue Stain 0.4% (Logos Biosystems, Южная Корея), B-27<sup>TM</sup> Plus Sup-

Клетки, 2D-модели	Гормональный статус	Наличие рецепторов факторов роста	Тип РМЖ
MCF7	Гормон-зависимая	HER2 <sup>-</sup> /HER3 <sup>-</sup> /EGFR <sup>-</sup>	Люминальный тип А
MDA-MB-231	Гормон-независимая	HER2 <sup>-</sup> /HER3 <sup>-</sup> /EGFR <sup>+, -</sup>	Трижды негативный тип
SK-BR-3	Гормон-независимая	HER2 <sup>high</sup> /HER3 <sup>-</sup> /EGFR <sup>+</sup>	Тип HER2

Таблица 1. Характеристика опухолевых клеток

рlement, рекомбинантный белок человека FGF-basic (LifeTechnologies, США), EGF человека, инсулин человека, 17- $\beta$ -эстрадиол, трансформирующий фактор роста бета (TGF- $\beta$ ) (Sigma-Aldrich, Германия), (Amresco, США), гистологический гель Tissue-Tek O.C.T. Compound (Electron Microscopy Sciences, США), монтирующая среда для гистологических препаратов Витрогель, гематоксилин и эозин водноспиртовой концентрированный (Biovitrum, Россия); флаконы для культивирования с площадью поверхности 25 см<sup>2</sup> (TPP, Швейцария), 96-луночные планшеты с U-образными лунками (Thermo Scientific, Япония), электронные планшеты E-plate RTCA (ASEA Biosciences, США).

Оборудование. Использовали центрифугу Minispin (Еррепdorf, Германия),  $CO_2$ -инкубатор (Heraeus, Германия), инвертированный микроскоп Axio Skope 2 Plus (Carl Zeiss, Германия) и Eclipse Ti2 (Nikon Corporation, Япония), криотом NX 70 (Thermo FS, Германия) и систему iCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA; ASEA Biosciences, США).

Клетки и культивирование. В качестве опухолевых клеток для формирования сфероидов 3D-культур (моно-культивирование) использовали иммортализованные коллекционные культуры: клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF7, клеточную линию аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, любезно предоставленную С.М. Деевым (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва), клеточную линию аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 (Российская коллекция клеточных культур, ЦВТ ХИМРАР, Москва) и эмбриональные клетки надпочечников человека НЕК-293Т (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт ци-РАН, Санкт-Петербург) для сборки тологии вирусных частиц и проведения трансдукции. В табл. 1 приведена сводная характеристика опухолевых клеток по экспрессии рецепторов фактора роста и гормонального статуса. В качестве модели стромальных клеток для последующего получения гетерогенных моделей 3D-2 использовали первичную культуру фибробластов BN120f, полученную из здоровой ткани молочной железы по методологии, описанной ранее (Nushtaeva et al., 2018).

Клетки линии MCF7 и BN120f культивировали в среде IMDM, клетки линии MDA-MB-231 — в среде L-15, клетки линии SK-BR-3 и HEK-293T — в среде

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

DMEM/F-12, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco<sup>™</sup>, США), 2 мМ L-глутамина, раствор антибиотиков-антимикоти-ков (100 ед/мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицин).

Клетки снимали с подложки с помощью TripLE <sup>тм</sup> при достижении монослоя, открепленные клетки разбавляли полной ростовой средой в соотношении объемов 1 : 3-1 : 4 для продолжения культивирования. Все клетки культивировали в в условиях стандартной влажности при температуре  $37.0 \pm 1.0^{\circ}$ С в атмосфере CO<sub>2</sub> ( $5.0 \pm 0.5\%$ ).

Культивирование сфероидов проводили при стандартных условиях в планшетах с U-образным дном Nunclon<sup>тм</sup> Sphera (Thermo Scientific<sup>тм</sup>, Япония) в питательной среде DMEM/F-12 в присутствии EGF (20 нг/мл), bFGF (20 нг/мл), инсулина (5 мкг/мл), 2% B27 и 0.4% BSA (Yuan, 2011). Формирование и культивирование сфероидов проводили в двух режимах — моно-культивирования (3D), при котором сфероид формировался только из культур опухолевых клеток (10<sup>3</sup> клеток на 1 лунку) и со-культивирования опухолевых и стромальных клеток (3D-2; соотношение клеток на 1 лунку 1 : 1 или 1 : 4 клеток).

Получение лентивирусных частиц и трансдукция эукариотических клеток для получения линий, продуцирующих флуоресцентные белки mKate2 и eGFP. Сборку вирусных частиц, псевдотипированных поверхностным белком G вируса везикулярного стоматита (VSV), проводили в клетках линии HEK-293T, используя стандартный протокол кальций-фосфатной трансфекции (Kingston et al., 2003). В качестве лентивирусного вектора использовали систему из трёх плазмид: psPAX2 (12260; Addgene, США) – пакующий вектор; pMD2.G (12259; Addgene, США) - вектор оболочки, и векторные лентивирусные плазмиды с необходимым для встройки геном: CDH-EF1a-Luc2-IRES-mKate2, кодирующая флюоресцентный белок mKate2 ( $\lambda_{Ex} = 588$  нм,  $\lambda_{Em} = 633$  нм), или pLVX-CMV-Fluc-P2A-EGFP-PGK-Puro, кодирующая зеленый флюоресцентный белок eGFP ( $\lambda_{Fx} = 488$  нм,  $\lambda_{\rm Em} = 509$  нм). Клетки НЕК-293Т заранее рассаживали в лунки 6-луночного планшета. Векторные плазмиды psPAX2, pMD2.G, CDH-EF1a-Luc2-IRES-mKate2 (или pLVX-CMV-Fluc-P2A-EGFP-PGK-Puro) инкубировали с буфером HBS (50 мМ Hepes, 10 мМ KCl, 12 мМ декстрозы, 1.5 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 280 мМ NaCl, pH  $7.05 \pm 0.05$ ). Полученный раствор добавляли по каплям к растущим клеткам НЕК-293Т. Через 48 ч культуральную среду от клеток НЕК-293Т пропускали через фильтр с размером пор 0.45 мкм. Вирусные частицы концентрировали центрифугированием при 20000 g в течение 90 мин при 4°С (Simmons, Alberola-Ila, 2016). К осадку вируса добавляли 100 мкл культуральной среды, инкубировали 40 мин при 4°С, периодически перемешивая, после чего добавляли вирус к клеткам MCF7, SK-BR-3 и MDA-MB-231, растущим в 24-луночных планшетах, добавляли среду с концентрированным вирусом в присутствии полибрена (8 мкг/мл). Планшет с клетками центрифугировали 40 мин при 37°С, после чего клетки с вирусом инкубировали в течение 24 ч в стандартных условиях. Через 48 ч после трансдукции к клеткам добавляли антибиотик пуромицин (1 мкг/мл) для селекции клеток. экспрессирующих целевые нуклеотидные последовательности и продолжали культивирование. Эффективность селекции оценивали методом флуоресцентной микроскопии.

Морфологический анализ 3D-моделей опухолевых сфероидов и 3D-2-моделей опухолево-стромальных сфероидов. Микроскопический анализ формирования и роста сфероидов проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония). Изображения анализировали с помощью программного обеспечения NIS-Elements. Размеры сфероидов высчитывали по формуле объема сферы  $V=0.5LW^2$ , где L определяется как диаметр, соединяющий пару самых дальних точек на контуре сфероида, а W – наибольший диаметр, перпендикулярный L (Chen et al., 2014). По полученным данным строили гистограммы роста сфероидов.

Для гистологического анализа сфероиды 3Dкультур и гетерогенных 3D-2-культур РМЖ заключали в гистологический водорастворимый реагент гель Tissue-Tek O.C.T. Compound (Electron Microscoру Sciences, США) на основе гликоля и смол, создающий идеальную среду для заморозки тканей и приготовления криосрезов на криотомах. Срезы толщиной 5 мкм изготавливали на криотоме NX 70 (Thermo FS, Германия), окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной схеме. Окрашенный срез заключали в монтирующую среду для гистологических препаратов Витрогель (Biovitrum, Россия). Окрашенные срезы визуализировали с использованием микроскопа Axio scop 2 Plus (Carl Zeiss, GmbH).

Определение жизнеспособности клеток в режиме реального времени на системе iCELLigence. Клетки  $(3 \times 10^6$  на 1 флакон) выращивали в культуральных флаконах площадью 25 см<sup>2</sup> в стандартных условиях. Клетки открепляли от подложки с помощью TripLE<sup>тм</sup>. Пролиферацию и жизнеспособность клеток контролировали в режиме реального времени через систему iCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA) (ASEA Biosciences), которая позволяет исследовать динамику роста адгезивных культур клеток в режиме реального времени по описанной ранее методологии (Koval et al., 2015). Действие прибора основано на том, что в подложку E-plate для роста клеток встроены электроды, и присутствие клеток на поверхности электородов влияет на локальное сопротивление на границе электрода с раствором: чем больше клеток прикрепляется к электродам, тем выше будет сопротивление. Сопротивление является измеряемой величиной (Cell Index, CI) при оценке скорости пролиферации, числа клеток, изменения морфологии и жизнеспособности клеток. Клеточный индекс (CI) рассчитывали для каждой лунки E-планшета с помощью программного обеспечение RTCA 1.2 (Roche Diagnosis, Франция). Кривые роста были сгенерированы в реальном времени из системы iCELLigence.

Клетки высаживали (30 тыс. клеток на 1 лунку) на 8-луночные E-plate со встроенной матрицей микроэлектронных датчиков в общем объеме 500 мкл полной культуральной среды. На первом этапе эксперимента измеряли 100 мкл полной культуральной среды для анализа фона.

Статистическая обработка. Обработку полученных результатов проводили в программе STATISTICA 10.0. Для определения групповых средних и ошибок среднего использовали описательную статистику (Descriptive statistic). Данные по изменению объема опухолевых сфероидов анализировали с использованием Repeated Measures ANOVA с градациями факторов "экспериментальное воздействие" (стимуляция трансформирующим фактором роста бета (TGF- $\beta$ ), Е2 или отсутствие стимуляции) с последующей оценкой межгрупповых различий с помощью апостериорного критерия (Post-hoc) Ньюмана-Кеулса (Newman-Keuls test).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологический анализ моделей 3D и 3D-2 РМЖ. Перекрестное взаимодействие между опухолевыми клетками и фибробластами в микроокружении опухоли влияет на секрецию факторов роста и цитокинов (хемокинов), которые, в свою очередь, поддерживают рост или жизнеспособность опухолевых клеток, индуцируют неоваскуляризацию и иммуносупрессию клеток в микроокружении при РМЖ (Majety et al., 2015). Чтобы понять механизмы, лежащие в основе перекрестного взаимодействия между опухолевыми клетками и фибробластами *in vitro*, необходима система совместного культивирования, в которой опухолевые клетки могут взаимодействовать с фибробластами, подобно взаимодействию *in situ*.

Для получения 3D и гетерогенных 3D-2-моделей РМЖ использовали пластик с низкими адгезивными свойствами и среду DMEM/F12 с добавлением ростовых факторов, как указано в разделе "Материал и методика". На рис. 1 представлены фотографии полученных сфероидов в проходящем свете на 10-е сут культивирования. Наиболее крупные сфероиды с



**Рис. 1.** Сравнительный анализ размеров, формы и плотности сфероидов РМЖ трех клеточных линий, культивируемых в режиме моно-культивирования (3D) и со-культивирования с фибробластами (3D-2). 10-е сут культивирования. Микроскопия в проходящем свете. Увел. об.: 10×.

четкой границей были сформированы клетками культуры SK-BR-3. Уплотнение в центре сфероида указывало на наличие некротического ядра. Самые мелкие сфероиды были получены из клеток культуры трижды негативного РМЖ MDA-MB-231 и были представлены в виде организованного сфероида из клеток-колоний. Размер сфероидов из клеток гормон-зависимой культуры MCF7 был сопоставим с размером сфероида, сформированного клетками культуры SK-BR-3, но не имел четко очерченной границы и плотного некротического ядра.

При добавлении фибробластов BN120f к опухолевым клеткам и последующем со-культивировании тенденция к различию размеров сфероидов сохранялась: самыми крупными оставались сфероиды из клеток SK-BR-3, а самыми мелкими — MDA-MB-231. Можно предположить, что опухолевые клетки с высокой скоростью пролиферации вносят основной вклад в размер сфероидов, тогда как медленно пролиферирующие здоровые клетки BN120f растут с одинаковой скоростью в составе различных культур 3D-2 (рис. 1).

Динамика изменений морфологии сфероидов 3D и 3D-2 показала, что добавление фибробластов к опухолевым клеткам в модели 3D-2 ведет к более раннему формированию плотных структур с более округлой формой, чем при моно-культивировании в режиме 3D (рис. 2, со-культивирование с BN120f). Для клеток SK-BR-3 этот эффект был отмечен на ранних стадиях культивирования (1–3 сут), а для клеток MDA-MB-231 – на протяжении всего наблюдения (7 сут).

Для визуализации взаимного расположения опухолевых и стромальных клеток в сфероидах были получены линии опухолевых клеток MCF7, SK-BR-3 и MDA-MB-231, стабильно экспрессирующие красный флуоресцентный белок mKate2 (рис. 3). Фибробласты BN120f экспрессировали зеленый флуоресцентный белок eGFP (рис. 3). При смешивании опухолевых клеток и здоровых фибробластов в соотношении 1 : 4 внутренней каркас формировали фибробласты, а эпителиальные опухолевые клетки образовывали внешний слой 3D-2-структур (рис. 4). Формирование внутреннего каркаса из фибробластов не зависело от типа используемых опухолевых клеток.

Анализ препаратов образцов сфероидов, окрашенных гематоксилин-эозином, показал, что при со-культивировании опухолевых и стромальных клеток в модели 3D-2 происходит формирование внутренних стромальных прослоек среди эпителиальных долек, подобных строению опухолевой ткани PMЖ *in vivo* (рис. 5). Можно видеть, что сфероиды SK-BR-3 формируют более плотные межклеточные контакты как в случае моно-культивирования, так и в модели 3D-2. В случае культуры MDA-MB-231 добавление фибробластов к опухолевым клеткам в 3D-2-модели ведет к уплотнению межклеточных контактов с прослойкой стромальных клеток (рис. 5).

Пролиферация клеток РМЖ в двумерной (2D) модели при воздействии гормоном E2 и фактором роста TGF-β. Для анализа влияния экзогенных стимулов на пролиферацию клеток иммортализованных культур MCF7, SK-BR-3 и MDA-MB-231, а также клеток



**Рис. 2.** Динамика роста сфероидов РМЖ трех клеточных линий при моно-культивировании (3D) и со-культивировании с фибробластами BN120f (3D-2). Данные ежедневного мониторинга в течение 7 сут культивирования. Микроскопия в проходящем свете. Увел. об.: 10×.

первичной культуры фибробластов, полученной из здоровой ткани молочной железы BN120f, проводили мониторинг роста клеток в режиме реального времени на приборе iCelligence. К клеткам, находящимся в логарифмической фазе роста добавляли E2 (1 нМ) или TGF- $\beta$  (5 нг/мл) и продолжали культивирование в стандартных условиях (Tian, Schiemann 2017). К контрольным образцам добавляли физиологический раствор. Величина клеточного индекса CI (Cell Index) отражает относительное количество клеток в лунке в каждый момент времени.

Можно видеть, что E2 оказывает стимулирующее влияние на пролиферацию всех исследуемых клеток РМЖ — как гормон-зависимых, так и гормон-независимых (рис. 6). При этом минимальный стимули-

рующий эффект отмечен для клеток гормон-независимого типа MDA-MB-231. В то же время Е2 не влияет на пролиферацию здоровых фибробластов BN120f.

Существенную симуляцию пролиферации оказывало добавление TGF- $\beta$  к клеткам трижды негативного типа PMЖ MDA-MB-231 — значение CI увеличивалось в 4 раза по сравнению с контрольными клетками (рис. 6). В случае клеток MCF7 эффект усиления пролиферации под действием TGF- $\beta$  был непродолжительным (рис. 6), а в случае клеток SK-BR-3 (рис. 6) наблюдали незначительное снижение пролиферации. Таким образом, клетки гормон-зависимой линии PMЖ MCF7 и гормон-назависимой SK-BR-3 менее чувствительны к TGF- $\beta$ . Пролифе-



**Рис. 3.** Репрезентативные изображения клеток трех клеточных линий РМЖ, продуцирующих красный флуоресцентный белок mKate2 и фибробластов BN120f, продуцирующих зеленый флуоресцентный белок eGFP. Увел. об.: 10×.



**Рис. 4.** Распределение опухолевых (*красное свечение*) и стромальных (*зеленое свечение*) клеток в гетерогенной модели 3D-2. Формирование сфероидов в течение 1, 3 и 7 сут культивирования. Увел. об.: 10×.

MCF7+BN120f

### НУШТАЕВА и др.

Моно-культивирование

**Рис. 5.** Гистологические срезы сфероидов РМЖ трех клеточных линий при моно-культивировании (3D) и со-культивировании с фибробластами BN120f (3D-2) через 6 сут. Световая микроскопия. Окрашивание гематоксилин-эозином. Черным квадратом выделен участок формирования стромальной прослойки (стрелки). Увел. об.: 40×.

рация здоровых фибробластов BN120f незначительно усиливалась при добавлении TGF-β.

Можно сделать вывод, что клетки, имитирующие гормон-зависимый тип РМЖ и тип HER2<sup>+</sup> более чувствительны к E2, а клетки трижды негативного РМЖ – к TGF-β в используемых концентрациях.

Пролиферация клеток в составе полученных моделей РМЖ 3D и 3D-2 при стимуляции E2 и TGF-β. Пролиферативную способность клеток в составе сфероидов оценивали по динамике изменения их размера, выраженного через изменение объема сфероида в процессе культивирования, предполагая, что увеличение объема сфероида отражает жизнеспособность делящихся клеток.

Формирование сфероидов анализировали каждые 24 ч на протяжении 9 сут. При анализе размеров сфероидов в первые и последние сут эксперимента и для оценки различий влияния стимулирующего фактора использовали *t*-критерий Стьюдента (рис. 7). Различия считали достоверно значимыми при P < 0.05. На рис. 7 представлены данные о размерах сфероидов при моно-культивировании (3D) и со-культивировании (3D-2) для культур опухолевых клеток MCF7, SK-BR-3 и MDA-MB-231 при стимуляции E2 и TGF- $\beta$ . Из представленных данных видно, что ни E2, ни TGF- $\beta$  не снижали жизнеспособности сфероидов в исследуемых моделях.

Мы обнаружили, что при стимуляции Е2 происходит увеличение объема сфероидов как при монокультивировании опухолевых клеток, так при сокультивировании с фибробластами BN120f вне зависимости от использованных опухолевых клеток. Мы предполагаем, что положительный эффект E2 на рост сфероидов может объясняться тем, что E2 способствует самоорганизации сфероида на начальных стадиях. Добавление TGF-β эффективно стимулировало рост сфероидов SK-BR-3 как при моно-культивировании, так и в режиме 3D-2-моделей, но не влияло на сфероиды MCF7 и MDA-MB231.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что вектор влияния E2 и TGF- $\beta$  на рост сфероидов при моно-культивировании сохраняется и при культивировании в формате 3D-2 культуры с фибробластами BN120f. Сравнение роста культур в режимах 2D- и 3D-культивирования опухолевых клеток при воздействии E2 и TGF- $\beta$  выявило различия и сходство в ответе на стимуляцию. Так, стимуляция 17 $\beta$ -эстрадиолом вела к увеличению пролиферации клеток как в составе 2D-, так и 3D-культур. Эффект от добавления TGF- $\beta$  различался для 2D и 3D культур: отсутствовала стимуляция роста MDA-MB-231 (рис. 7) и появлялась стимуляция роста клеток SK-BR-3 (рис. 7) в составе 3D-клеточных моделей.

Таким образом, мы показали, что стимуляция E2 опухолевых и опухолево-стромальных сфероидов ведет к увеличению их объема, что позволяет сделать вывод о позитивном влиянии гормонального фактора на жизнеспособность сфероидов как гормон-зависимых, так и гормон-независимых клеточных культур. Мы предполагаем, что положительный эффект стимуляции E2 сфероидов при моно-культивировании



**Рис. 6.** Влияния гормона E2 и TGF-β на жизнеспособность клеток MCF7, SK-BR-3, MDA-MB-231 и BN120f (2D-модели) в режиме реального времени на приборе iCelligence. Через 48 ч после культивирования в стандартных условиях к клеткам добавляли 1 нМ/мл E2 или 5нг/мл TGF-β (TGF) и продолжали культивирование. В качестве контроля использовали физиологический раствор. Представлены кривые пролиферации в режиме реального времени. Момент добавления препаратов обозначен стрелкой. CI (Cell Index) – относительная величина пролиферации клеток.

может объясняться тем, что 17β-эстрадиол способствует самоорганизации сфероида. Кроме того, следует отметить, что ни E2, ни TGF-β не снижали жизнеспособности сфероидов в исследуемых моделях.

Более того, показано, что чувствительность опухолевых клеток в 2D- и 3D-моделях РМЖ по отношению к гормональным и ростовым стимулам отличается, что указывает на важность применения 3D-культур при тестировании опухолевых клеток на чувствительность к различным препаратам.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Создание 3D-клеточной модели РМЖ предполагает формирование близких к сферическим структур, представляющих собой самоорганизованные кластеры-колонии клеток с тканеподобной архитектурой (Weiswald et al., 2015). Разработка оптимизированного, воспроизводимого и дешевого метода получения 3D-сфероидов все еще является актуальной задачей. В нашей работе предложены единообразные условия 3D-культивирования для трех культур клеток РМЖ – МСF7, MDA-MB-231 и SK-BR-3, позволяющие получать пролиферирующие сфероиды. Среди указанных линий, получение сфероидов клеток SK-BR-3 можно отнести к наиболее сложным задачам. Так, при сравнении 42-х методов получения сфероидов из тех же опухолевых клеток РМЖ (MCF7. MDA-MB-231 и SK-BR-3) авторы отмечали значительные отличия способности к сферообразо-

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

ванию между ними (Froehlich et al., 2016). Культура клеток МСГ7 позволяла получить сфероиды при всех исследуемых способах получения, клетки MDA-MB-231 формировали сфероиды только в одном случае — при наслоении клеток на 3.5%-ный матригель. — а культура клеток SK-BR-3 не позволила получить сфероиды ни при каких из исследуемых условий (Froehlich et al., 2016). В другой работе (Воуer et al., 2021) авторам удалось получить 3D-культуру клеток SK-BR-3 при использовании культурального пластика Nunclon<sup>™</sup> Sphera<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientifіс, США), однако полученные структуры они описывали как рыхлые разветвленные агрегаты без четкой внешней границы. Поэтому предложенный в нашей работе метод получения крупных сфероидов SK-BR-3 с четкой округлой границей позволяет в дальнейшем воспроизводимо получать 3D модель SK-BR-3, а также формировать гетерогенные сфероиды на их основе.

Гетерогенные сфероиды, состоящие из опухолевых клеток и клеток, имитирующих опухоль-ассоциированные фибробласты, позволяют изучать взаимодействие опухоли с внеклеточным матриксом (Majety et al., 2015). Такие 3D-2-структуры также полезны для изучения побочных эффектов при химиои радиотерапии, например, фиброза молочной железы, который является основным непрямым токсическим последствием радиотерапии при РМЖ (Yakavets et al., 2020). В нашей работе для получения гетерогенных 3D-2-моделей РМЖ, состоящих из



**Рис.** 7. Влияния Е2 и TGF- $\beta$  на размеры сфероидов РМЖ трех клеточных линий в модели 3D (*левые гистограммы*) и 3D-2 (сокультивирование с клетками BN120f, *правые гистограммы*) при стимуляции Е2 и TGF- $\beta$  в первые и девятые сутки культивирования. К – контроль. Результаты представлены как среднее значение и его ошибка. Различия достоверны при \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 и \*\*\*P < 0.001 по критерию Ньюман–Кеулса.

опухолевых клеток и фибробластов, мы использовали тот же метод, как и для 3D культур. Добавление фибробластов ускоряло процесс формирования опухолево-стромальных сфероидов, что согласуется с данными из литературы (Yakavets et al., 2020; Pal, 2020), в которых показано, что добавление фибробластов MRC-5 или мезенхимальных стволовых клеток к клеткам MCF7 в условиях сферообразования

вело к получению более крупных и хорошо оформленных гетерогенных клеточных структур, когда опухолевые клетки формировали внешний слой, а внутреннее ядро формировали фибробласты. Эти данные согласуются с полученными нами результатами, демонстрирующими формирование фибробластами внутреннего ядра в гетерогенных сфероидах. Тем не менее, обнаруженного нами эффекта ускорения самоорганизации в плотные сфероиды при со-культивировании клеток SK-BR-3 и фибробластов ранее описано не было.

Мы показали, что стимуляция 17-В эстрадиолом и ТGF-β по-разному влияла на пролиферацию клеток в 2D и 3D культурах одних и тех же линий. В 2Dкультурах клетки, имитирующие гормон-зависимый тип РМЖ и тип HER2<sup>+</sup> были более чувствительны к E2, а клетки трижды негативного РМЖ – к TGF-β в используемых концентрациях. Положительный эффект стимуляции Е2 как сфероидов гормон-зависимых, так и гормон-независимых клеток MDA-MB-231 невозможно объяснить только наличием рецепторов и активацией рецептор-опосредованного механизма пролиферации. В случае сфероидов, наиболее вероятно, что Е2 способствует их самоорганизации, формированию правильных межклеточных 3D-контактов и взаимообмену сигнальными молекулами. Такими сигнальными молекулами, стимулирующими клеточное деление, могут быть (в том числе) малые некодирующие РНК, выполняющие функции активаторов или ингибиторов экспрессии определенных генов. Известно, например, что miR-22 подавляет экспрессию ΕRα в опухолях молочной железы и стимулирует пролиферацию клеток в 3D-, но не в 2Dмоделях (Vesuna et al., 2021). Экспрессия miR-203, напротив. характерна именно для ER-положительных опухолей молочной железы (Ru et al., 2011).

На основе данных по изменению транскриптома клеток MCF7 в составе 2D- и 3D-культуры в агарозном гидрогеле было показано, что добавление E2 к 3D-структурам приводило к активации не только известных эстроген-чувствительных генов, таких как рецептор прогестерона (PR), белок PDZK1, участвующий в метаболизме холестерола, и лиганд EGFR амфирегулин (AREG), но и множества других генов, в том числе генов, кодирующих белки адгезии, по сравнению с 2D-культурой (Vantangoli et al., 2016). Поэтому обнаруженные нами эффекты ставят новые научные задачи поиска межклеточных регуляторных молекул в 3D-культурах.

Другим важным фактором, влияющим на чувствительность опухолевых клеток в 2D- и 3D-культурах может быть гипоксия (Nushtaeva et al., 2019). При формировании крупных сфероидов изменяется градиент концентрации кислорода от наружных слоев клеток к внутренним, формируя в последних локальную гипоксию. Показано, что состояние гипоксии ведет к подавлению экспрессии рецепторов ЕR $\alpha$  в ER-положительных опухолях на примере линии клеток T47D (Whitman et al., 2019). Таким обра-

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

зом, целый ряд факторов может изменять чувствительность опухолевых клеток к гормональным стимулам в 3D-моделях опухолей молочной железы по сравнению с 2D-моделями помимо исходного рецепторного статуса. Учитывая стимулирующий эффект 17 $\beta$ -эстрадиола на рост 3D-культур РМЖ вне зависимости от рецепторного статуса, можно предположить, что адыовантная гормон-супрессирующая терапия, например, с использованием тамоксифена, может быть в некоторой степени полезна не только для гормон-зависимых типов РМЖ, но и для гормон-независмых.

Действие TGF-β на пролиферацию клеток тоже различно для 2D- и 3D-культур: в составе клеточных моделей 3D отсутствовала стимуляция роста MDA-MB-231 и появлялась стимуляция роста клеток SK-BR-3. TGF-β является лигандом для рецепторов семейства ErbB, к которым относятся HER2, HER3 и рецептор эпидермального фактора роста EGFR (Roskoski, 2014). Среди используемых в нашей работе клеточных линий РМЖ, клетки SK-BR-3 являются HER2-положительной культурой, а MDA-MB-231 высоко положительна по EGFR, и только линия клеток MCF7 негативна как по HER2, так и по EGFR (Brockhoff et al., 2001; Oh et al., 2015). B cpaBнении с TGF-β, для которого не показана про-онкогенная роль на ранних стадиях опухолевой прогрессии, связывание лиганда EGF с рецептором EGFR выраженно стимулирует про-онкогенную трансформацию, активируя митозы в большинстве типов клеток (Wee et al., 2015). В то же время для многих типов рака показано, что взаимная регуляция сигнальных путей TGF-β и EGFR активирует опухолевую прогрессию: TGF-β и EGF могут активировать злокачественный фенотип, действуя синергично (Richter et al., 2011). Показано, что TGF- $\beta$  в эпителиальных опухолевых клетках с экспрессией HER2/EGFR vсиливает пролиферацию опухолевых клеток (Huang et al., 2021).

Таким образом, наиболее вероятно, что обнаруженная нами стимуляция роста  $HER2^{-}/EGFR^{+}$  клеток MDA-MB-231 при добавлении TGF- $\beta$  в 2D-модели и  $HER2^{+}/EGFR^{+}$  клеток SK-BR-3 в 3D-модели происходит в результате усложнения регуляторных механизмов сигнального каскада HER2/EGFR при формировании 3D-сфероидов. Отсутствие рецепторов HER2/EGFR в клетках MCF7 объясняет отсутствие чувствительности этих клеток к TGF- $\beta$  как в моделях 2D, так и 3D (Troitskaya et al., 2021).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-74-10039); работы по культивированию клеток BN120f выполнены в рамках проекта базового бюджетного финансирования Минобрнауки РФ (№ АААА-А17-117020210023-1).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не включала эксперименты с участием животных или людей.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

# СПИСОК ЛИТЕАТУРЫ

*Acconcia F, Marino M.* 2011. The effects of 17β-estradiol in cancer are mediated by estrogen receptor signaling at the plasma membrane. Front. Physiol. V. 2. P. eCollection 2011.

https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00030

Antoni D., Burckel H., Josset E., Noel G. 2015. Three-dimensional cell culture: A breakthrough *in vivo*. IJMS. V. 16. P. 5517.

https://doi.org/10.3390/ijms16035517

- *Batlle E., Massagué J.* 2019. Transforming growth factor-β signaling in immunity and cancer. Immunity. V. 50. P. 924–940. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024
- Boyer J.Z., Phillips G.D.L., Nitta H., Garsha K., Admire B., Kraft R., Dennis E., Vela E., Towne, P. 2021. Activity of trastuzumab emtansine (T-DM1) in 3D cell culture. Breast Cancer Res. Treat. V. 188. P. 65. https://doi.org/10.1007/s10549-021-06272-x
- Brockhoff G., Hei P., Schlegel J., Hofstaedter F., Knuechel R. 2001. Epidermal growth factor receptor, c-erbB2 and cerbB3 receptor interaction, and related cell cycle kinetics of SK-BR-3 and BT474 breast carcinoma cells. Cytometry. V. 44. P. 338.

https://doi.org/10.1002/1097-

0320(20010801)44:4<338::AID-CYTO1125>3.0.CO;2-V

- Chen W., Wong C., Vosburgh E., Levine A.J., Foran D.J., Xu E.Y. 2014. High-throughput image analysis of tumor spheroids: A user-friendly software application to measure the size of spheroids automatically and accurately. JoVE. P. 51639. https://doi.org/10.3791/51639
- Costa E.C., Moreira A.F., de Melo-Diogo D., Gaspar V.M., Carvalho M.P., Correia I.J. 2016. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. Biotechnol. Advances. V. 34. P. 1427.

https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002

- Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Parkin D.M., Piñeros M., Znaor A., Bray F. 2021. Cancer statistics for the year 2020: An overview. Int. J. Cancer. V. 149. P. 778. https://doi.org/10.1002/ijc.33588
- *Fernando R.I., Wimalasena J.* 2004. Estradiol abrogates apoptosis in breast cancer cells through inactivation of BAD: Ras-dependent nongenomic pathways requiring signaling through ERK and Akt. Mol. Biol. Cell. V. 15. P. 3266. https://doi.org/10.1091/mbc.e03-11-0823
- *Ferreira L.P., Gaspar V.M., Mano J.F.* 2018. Design of spherically structured 3D *in vitro* tumor models advances and prospects. Acta Biomat. V. 75. P. 11. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.034

*Fouad Y.A., Aanei C.* 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. Am. J. Cancer Res. V. 7. P. 1016.

Froehlich K., Haeger J.-D., Heger J., Pastuschek J., Photini S.M., Yan Y., Lupp, A. Pfarrer, C., Mrowka R., Schleußner E., Markert U.R., Schmidt A. 2016. Generation of multicellular breast cancer tumor spheroids: comparison of different protocols. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. V. 21. P. 89. https://doi.org/10.1007/s10911-016-9359-2

- Huang Y., Ognjenovic J., Karandur D., Miller K., Merk A., Subramaniam S., Kuriyan, J. 2021. A molecular mechanism for the generation of ligand-dependent differential outputs by the epidermal growth factor receptor. eLife. V. 10. P. e73218. https://doi.org/10.7554/eLife.73218
- Jo Y., Choi N., Kim K., Koo H.-J., Choi J., Kim H.N. 2018. Chemoresistance of cancer cells: requirements of tumor microenvironment-mimicking *in vitro* models in anti-cancer drug development. Theranostics. V. 8. P. 5259. https://doi.org/10.7150/thno.29098
- Kingston R.E., Chen C.A., Rose J.K. 2003. Calcium Phosphate Transfection. Curr. Protoc. Mol. Biol. V. 63. P. 9.1.1– 9.1.11.

https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0901s63

- Koval O.A., Sakaeva G.R., Fomin A.S., Nushtaeva A.A., Semenov D.V., Kuligina E.V., Gulyaeva L.F., Gerasimov A.V., Richter V.A. 2015. Sensitivity of endometrial cancer cells from primary human tumor samples to new potential anticancer peptide lactaptin. J. Cancer Res. Ther. V. 11. P. 345. https://doi.org/10.4103/0973-1482.157301
- Langhans S.A. 2018. Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning. Front. Pharmacol. V. 9. P. 6. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006
- Majety M., Pradel L.P., Gies M., Ries C.H. 2015. Fibroblasts influence survival and therapeutic response in a 3D co-culture model. PLoS One. V. 10. P. e0127948. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127948
- Nushtaeva A.A., Karpushina A.A., Ermakov M.S., Gulyaeva L.F., Gerasimov A.V., Sidorov S.V., Gayner T.A., Yunusova A.Y., Tkachenko A.V., Richter V.A., Koval O.A. 2019. Establishment of primary human breast cancer cell lines using "pulsed hypoxia" method and development of metastatic tumor model in immunodeficient mice. Cancer Cell Int. V. 19. P. 46.

https://doi.org/10.1186/s12935-019-0766-5

- Nushtaeva A.A., Stepanov G.A., Semenov D.V., Juravlev E.S., Balahonova E.A., Gerasimov A.V., Sidorov S.V., Savelyev E.I., Kuligina E.V., Richter V.A., Koval O.A. 2018. Characterization of primary normal and malignant breast cancer cell and their response to chemotherapy and immunostimulatory agents. BMC Cancer. V. 18. P. 728. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4635-8
- Oh S., Ju J., Yang W., Lee K., Nam K., Shin I. 2015. EGFR negates the proliferative effect of oncogenic HER2 in MDA-MB-231 cells. Archives Biochem. Biophys. V. 575. P. 69. https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.04.008
- *Osswald A., Hedrich V., Sommergruber W.* 2019. 3D-3 Tumor Models in Drug Discovery for Analysis of Immune Cell Infiltration. Methods Mol. Biol. V. 1953. P. 151-162. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9145-7\_10
- Pal A., Ashworth J., Collier P., Probert C., Jones S., Pernaut Leza E., Meakin M., Ritchie A., Onion D., Clarke P., Allegrucci C., Grabowska A. 2020. A 3D heterotypic breast cancer model demonstrates a role for mesenchymal stem cells in driving a proliferative and invasive phenotype. Cancers (Basel). V. 12. P. 2290.

https://doi.org/10.3390/cancers12082290

Park S.-J., Kim J.-G., Kim N.D., Yang K., Shim J.W., Heo K. 2016. Estradiol, TGF-β1 and hypoxia promote breast cancer stemness and EMT-mediated breast cancer migration. Oncol. Letters. V. 11. P. 1895. https://doi.org/10.3892/o1.2016.4115

364

*Richter P., Umbreit C., Franz M., Berndt A., Grimm S., Uecke A., Böhmer F.D., Kosmehl H., Berndt A.* 2011. EGF/TGFβ1 co-stimulation of oral squamous cell carcinoma cells causes an epithelial-mesenchymal transition cell phenotype expressing laminin 332: EGF/TGFβ1 co-stimulation of OS-CC cells causes an EMT cell phenotype. J. Oral Pathol. Med. V. 40. P. 46.

https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00936.x

- *Roskoski R.* 2014. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. Pharmacological Research. V. 79. P. 34. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002
- Ru P., Steele R., Hsueh E.C., Ray R.B. 2011 Anti-miR-203 Upregulates SOCS3 expression in breast cancer cells and enhances cisplatin chemosensitivity. Genes Cancer. V. 2. P. 720. https://doi.org/10.1177/1947601911425832
- Sanjabi S., Oh S.A., Li M.O. 2017. Regulation of the immune response by tgf-β: from conception to autoimmunity and infection. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. V. 9. P. a022236.

https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022236

Simmons A., Alberola-Ila J. 2016. Retroviral Transduction of T Cells and T Cell Precursors. Methods Mol. Biol. V. 1323. P. 99–108.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2809-5\_8

- Suba Z. 2020. Compensatory estrogen signal is capable of dna repair in antiestrogen-responsive cancer cells via activating mutations. J. Oncol. P. 1. https://doi.org/10.1155/2020/5418365
- *Tian M., Schiemann W.P.* 2017. TGF-β stimulation of EMT programs elicits non-genomic ER-α activity and anti-estrogen resistance in breast cancer cells. JCMT. V. 3. P. 150. https://doi.org/10.20517/2394-4722.2017.38
- Troitskaya O., Novak D., Nushtaeva A., Savinkova M., Varlamov M., Ermakov M., Richter V., Koval O. 2021. EGFR Transgene stimulates spontaneous formation of MCF7 breast cancer cells spheroids with partly loss of HER3 receptor. Int. J.

Mol. Sci. V. 22. P. 12937.

https://doi.org/10.3390/ijms222312937

- Vantangoli M.M., Madnic, S.J., Wilson S., Boekelheide K. 2016. Estradiol exposure differentially alters monolayer versus microtissue MCF-7 human breast carcinoma cultures. PLoS One. V. 11. P. e0157997.
- https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157997 Vesuna F, Lisok A., van Diest P., Raman V. 2021. Twist activates miR-22 to suppress estrogen receptor alpha in breast can-

cer. Mol. Cell Biochem. V. 476. P. 2295. https://doi.org/10.1007/s11010-021-04065-w

Wee P., Shi H., Jiang J., Wang Y., Wang Z. 2015. EGF stimulates the activation of EGF receptors and the selective activation of major signaling pathways during mitosis. Cellular Signalling. V. 27. P. 638.

https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.11.030 Weiswald L.-B., Bellet D., Dangles-Marie V. 2015. Spherical

cancer models in tumor biology. Neoplasia. V. 17. P. 1. https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004
Whitman N.A., Lin Z.-W., Kenney R.M., Albertini L., Lockett M.R.

Whitman N.A., Lin Z.-W., Kenney R.M., Albertini L., Lockett M.R. 2019. Hypoxia differentially regulates estrogen receptor alpha in 2D and 3D culture formats. Archives Biochem. Biophys. V. 671. P. 8.

https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.05.025

- Yakavets I., Francois A., Benoit A., Merlin J.-L., Bezdetnaya L., Vogin G. 2020. Advanced co-culture 3D breast cancer model for investigation of fibrosis induced by external stimuli: optimization study. Sci. Rep. V. 10. P. 21273.
- https://doi.org/10.1038/s41598-020-78087-7
- Yuan Ý. 2011. IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures. Int. J. Oncol. https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1275
- Zubair M., Wang S., Ali N. 2021. Advanced Approaches to breast cancer classification and diagnosis. Front. Pharmacol. V. 11. P. 632079. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.632079

# Breast Cancer Cells in 3D Models Changes Their Response to Hormonal and Growth Factors

# A. A. Nushtaeva<sup>*a*, \*</sup>, M. M. Savinkova<sup>*a*, *b*</sup>, M. S. Ermakov<sup>*a*</sup>, M. E. Varlamov<sup>*a*, *b*</sup>, D. D. Novak<sup>*a*, *b*</sup>, V. A. Richter<sup>*a*</sup>, and O. A. Koval<sup>*a*, *b*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>b</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

\*e-mail: nushtaeva.anna@gmail.com

The aim of this study was to investigate the formation and growth of mono- (3D) and heterogeneous (3D-2) spheroids consisting of stromal cells and tumor cells simulating three types of BC:  $ER^+/PR^+$ ;  $HER2^+$ ;  $ER^-/PR^-/HER2^-$  including under exposure to 17- $\beta$  estradiol and TGF $\beta$ . MCF7, MDA-MB-231 and SK-BR-3 BC cell lines were used as a models for 3D cultures, and BN120f fibroblasts of healthy breast tissue were used for 3D-2 spheroids. In this work, we proposed uniform 3D culturing conditions for all three cultures of breast cancer cells, which produce proliferating spheroids. In 3D-2 structures the inner core was composed of fibroblasts while external layer was formed by epithelial cancer cells when tumor cells and fibroblasts were mix in in proportion 1 : 4. Morphological analysis of the spheroids showed that co-culture of tumor and stromal cells in 3D-2 model leads to the formation of more rounded and structured spheroids than in 3D monoculture, imitating self-organization into microtissue. It was found that 17 $\beta$ -estradiol stimulates cell proliferation in 3D and 3D-2 spheroids regardless tumor type simulation by cells used, whereas in the 2D model MDA-MB-231 cells are not sensitive to 17 $\beta$ -estradiol. Then incorporated into spheroids, MDA-MB-231 cells have lost the sensitivity to TGF $\beta$  while SK-BR-3 cells become TGF $\beta$ -sensitive. Thus, 3D and 3D-2 cell models of breast cancer are shown to be essential tools in studying tumor progression and important in testing new antitumor approaches, despite the existing 2D models.

*Keywords*: breast cancer, 17- $\beta$  estradiol, transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ), epidermal growth factor receptor type 2 (HER2), tumor cells, stromal cells, cell lines, 3D cell cultures

УДК 57.085.1;57.085.23

# ОЦЕНКА КОЛОКОЛИЗАЦИИ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP70 И МАРКЕРОВ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ, ПОДОБНЫХ СТВОЛОВЫМ

© 2022 г. Н. М. Юдинцева<sup>1, \*</sup>, А. Л. Михрина<sup>2</sup>, А. С. Нечаева<sup>3</sup>, М. А. Шевцов<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

<sup>3</sup>Центр персонализированной медицины "Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова" Минздрава России, Санкт-Петербург, 197341 Россия

> \**E-mail: yudintceva@mail.ru* Поступила в редакцию 09.03.2022 г. После доработки 18.03.2022 г. Принята к публикации 18.03.2022 г.

В связи с агрессивностью мультиформной глиобластомы (МГБ) существует острая необходимость поиска биомаркеров, которые могут быть использованы для ранней диагностики и для тераностики заболевания. В настоящей работе с помощью мультиплексного метода анализа гистологических препаратов МГБ выявлена экспрессия белка теплового шока Hsp70 и сделана количественная оценка его колоколизации с маркерами клеток опухоли, подобных стволовым (КПС). Равномерное распределение в опухоли клеток, экспрессирующих Hsp70, а также его колоколизация с маркерами КПС (Nestin и Sox2) свидетельствуют о перспективности использования Hsp70 в качестве мишени для таргетной терапии злокачественных новообразований головного мозга.

*Ключевые слова*: мультиформная глиобластома, белок теплового шока Hsp70, стволоподобные клетки опухоли, мультиплексный анализ, биомаркеры, Nestin, Sox2

DOI: 10.31857/S0041377122040125

Мультиформная глиобластома (МГБ) представляет собой злокачественную опухоль головного мозга и характеризуется низкой выживаемостью пациентов. Медиана выживаемости при МГБ составляет 14-15 мес. с 10% вероятностью 5-летней выживаемости (Gallego, 2015). Из-за невозможности преодоления препаратами гематоэнцефалического барьера и существующих анатомических ограничений системное введение многих противоопухолевых препаратов имеет низкую эффективность лечения (Razavi et al., 2016). Стандартным лечением пациентов является хирургическая резекция опухоли с последующей лучевой терапией, введением темозоломида и для облегчения симптомов дексаметазона (Parlato et al., 2006). В связи с агрессивностью заболевания существует острая необходимость поиска биомаркеров, которые могут быть использованы как для ранней диагностики в качестве мишеней, так и для тераностики заболевания. Несмотря на десятилетия исследований по разработке биомаркеров для выявления и прогнозирования МГБ, лишь немногие из них дали

многообещающие результаты и оценка их эффективности, по-прежнему, представляет собой очень сложную задачу. На основе подробного генетического анализа изменения профиля экспрессирующихся белков МГБ была создана огромная база данных биомаркеров различных классов. Однако, к сопока жалению. ЭТО также не привело K значительным прорывам в лечении МГБ, что, вероятно, связано с молекулярной гетерогенностью опухоли (Muir et al., 2020).

Основными изучаемыми биомаркерами МГБ, имеющими клиническое значение, являются О<sup>6</sup>-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза (MGMT), рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR), факторы роста тромбоцитов (PDGFRA) и эндотелия сосудов (VEGF), а также белок p16<sup>Ink4a</sup>, включенный в регуляцию клеточного цикла (Phillips et al., 2006; Sasmita et al., 2017). Другой перспективной мишенью для таргетной терапии опухоли головного мозга являются белки теплового шока (heat shock proteins -HSP), которые составляют большое семейство консервативных белков, действующих как молекулярные шапероны и играющих ключевую роль во внутриклеточном белковом гомеостазе, регуляции апоптоза, зашите от различных стрессовых факторов (гипоксии, теплового и окислительного). Помимо

**Принятые сокращения:** ИГХ – иммуногистохимия; ИФ – иммунофлуоресценция; МГБ – мультиформная глиобластома; КПС – клетки, подобные стволовым; DAB – 3,3'-диаминобензидин; HSP – белки теплового шока; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор.

внутриклеточной локализации, члены различных семейств HSP экспонированы на плазматической мембране злокачественно трансформированных, но не нормальных клеток, что делает их привлекательными в качестве возможных мишеней для терапии и диагностики рака (Kumar et al., 2016; Shevtsov et al., 2020). Одним из таких белков является белок теплового шока с мол. массой 70 кДа (Hsp70). Белок Hsp70 обнаружен на плазматической мембране клеток различных опухолей, включая первичные глиобластомы (Thorsteinsdottir et al., 2017), клеточную карциному головы и шеи, карциному легкого (Breuninger et al., 2018), колоректальный рак и рак желудка (Pfister et al., 2007), остеосаркомы (Uozaki et al., 2000) и др. Hsp70 также может играть роль в ассоциации опухолевых клеток с внеклеточным матриксом, влияя на их подвижность и инвазию, что также делает его привлекательным в качестве мишени для лечения МГБ (Barreca et al., 2017).

Известно, что МГБ, как и другие виды опухолей, обладает клеточной гетерогенностью, в частности в ней присутствуют клетки опухоли, подобные стволовым (КПС), которые считаются аналогами здоровых стволовых клеток. КПС в значительной степени ответственны за прогрессирование и рецидив заболевания, а также опосредуют резистентность к проводимой терапии (Vargas-Toscano et al., 2021). Молекулярными биомаркерами, связанными с плюрипотенттностью стволовых клеток являются такие маркеры, как Мус, Oct, Nanog, Sox-2 и Nestin. Они представляют терапевтический интерес в качестве молекулярных биомаркеров и мишеней для разработки новых многоцелевых стратегий лечения рака и предотвращения рецидивов заболевания (Mimeault et al., 2014).

В настоящее время в диагностике золотым стандартом по-прежнему остается иммуногистохимическое (ИГХ) исследование биопсии, которое позволяет выявлять молекулярные биомаркеры и различать различные типы МГБ на основе ее молекулярной характеристики. Одним из наиболее информативных методов ИГХ-исследования является мультиплексный анализ, который позволяет изучать гистологические препараты на более высоком качественном и количественном уровнях. Подбор оптимальных реагентов и оборудования в тандеме с программным обеспечением позволяет получать количественные данные по оценке колоколизации биомаркеров в тканях, фенотипированию и распределению клеток, определению их функций и др. (Mori et al., 2020; Sidi et al., 2021; Taube et al., 2021). Использование системы Opal Multiplex выполняют аналогично методу стандартной ИГХ. Однако данная система имеет ряд преимуществ: одновременное многоцветное окрашивание препарата, высокая проникающая способность реагентов, выявление различных фенотипов клеток и др. Уникальное программное обеспечение позволяет выполнять анализ мультиплексных изображений и получать статистически достоверные количественные данные.

В настоящей работе проведен анализ гистологических препаратов МГБ человека с целью выявления и количественной оценки колоколизации белка теплового шока Hsp70 с маркерами КПС с использованием системы мультиплексного анализа Opal Multiplex.

# МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал. Работа проведена с использованием послеоперационного материала от пациентов с диагнозом МГБ (Центр персонализированной медицины Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова). Протокол клинического исследования был одобрен Комитетом по этике Федерального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова и соответствовал принципу Хельсинкской декларации. Все пациенты подписали форму информированного добровольного согласие на предоставление гистологического материала для проведения научных исследований.

Послеоперационный материал фиксировали в 10%-ном формалине. Гистологические препараты готовили в соответствии со стандартным протоколом, толщина срезов составляла 3–5 мкм. После процедуры депарафинизации препаратов и демаскировки антигенов препараты окрашивали с помощью набора Opal 3-Plex Manual Detection Kit (Akoya Biosciences, США).

ИГХ-окрашивание. Препараты последовательно инкубировали с первичными антителами: Anti-Hsp70 (Abcam, USA), Anti-Nestin (Satna-Cruz, CIIIA) и Anti-Sox2 (Chemicon, США). Разведение первичных антител выполняли в соотношении 1 : 100. В качестве вторичных использовали универсальные антитела с полимером, конъюгированные с пероксидазой хрена (Opal<sup>™</sup> Polymer anti-Rabbit HRP Kit), инкубирование с которыми выполняли в течение 30 мин. Затем после трехкратной отмывки препаратов раствором PBS наносили на 10 мин Opal (флуорохром). Каждому первичному антителу (Anti-Hsp70, Anti-Nestin и Anti-Sox2) соответствовал определенный флуорохром (Opal 520, Opal 570 и Opal 690 соответственно). После инкубации с флуорохромом Opal 520 (с целью удаления антител и для сохранения только флуоохрома) стекла помещали в раствор ЭДТА (версен) и нагревали в течение 20 мин на водяной бане при 98.5°С. Обработку выполняли последовательно для каждого флуорохрома. На последнем этапе ядра клеток окрашивали 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Abcam, Великобритания), монтировали препараты в среде Mounting medium (Abcam, Великобритания).

Окрашенные препараты анализировали с использованием системы конфокальной микроскопии Mantra 2 Quantitative Pathology Workstation с наличием программного обеспечения Pathology Views<sup>™</sup> для анализа флуоресцентных изображений в традиционном режиме светлого поля и DAB (3,3'-диаминобензидин), который является субстратом пероксидазы



Рис. 1. Конфокальная микроскопия гистологических срезов МГБ человека. Иммунофлуоресценция (ИФ) препаратов, окрашенных с использованием соответстующих антител к Hsp70 (*маджента*), Nestin (*зеленый цвет*), Sox2 (*желтый цвет*), DAPI (*циан*). Окрашивание DAB (3,3'-диаминобензидин): Hsp70, Nestin, Sox2 (*коричневый цвет*). Ядра (DAPI) (*синий цвет*). Масштабный отрезок: 400 мкм.

хрена. Ядра детектировали с помощью диодного лазера (405 нм), флуорохромы (Opal 520, Opal 570 и Opal 690) — с помощью лазеров с соответствующей длиной волны. Выявление маркеров и оценка колоколизации двух маркеров выражена в %. Клетки (с маркерами и их отсутствием) считали на всем снимке и принимали за 100%.

# РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью системы Opal Multiplex на гистологических препаратах ткани МГБ человека (n = 4) была

выявлена экспрессия белка теплового шока Hsp70 и маркеров КПС (Nestin и Sox2) (рис. 1). Для количественной оценки колоколизации Hsp70 с выявленными биомаркерами были построены карты фенотипирования препарата. В соответствии с окраской ядер DAPI (рис. 2*a*) выделяли ядра клеток (рис. 2*б*). Затем препарат условно сегментировали на зону некроза (*синий цвет*) и зону окружающей жизнеспособной ткани (*коричневый цвет*) (рис. 2*в*). Клетки, содержащие Hsp70, Nestin и Sox2 (рис. 2*г*) отмечали *красным*, *маджента* и зеленым цветами соответ-



**Рис. 2.** Последовательность построения карты фенотипирования для гистологических срезов МГБ человека. *a* – Окраска ядер DAPI; *б* – фенотипирование ядер (*зеленый цвет*); *в* – сегментация ткани на зону некроза (*синий цвет*) и жизнеспособную (ЖС) ткань (*коричневый цвет*); *г* – фенотипирование клеток по маркерам Hsp70, Nestin и Sox2: *красный, маджента и зеленый* соответственно; *д* – карта фенотипирования по зонам ткани (некроза и ЖС) и клеткам, содержащим Hsp70, Nestin, Sox2. Масштабный отрезок: 400 мкм.



**Рис. 3.** Выявление и оценка колоколизации биомаркеров. *Верхний ряд* – зона некроза, *нижний ряд* – зона жизнеспособной (ЖС) ткани. Hsp70 – *красный* цвет, Nestin и Sox2 – *зеленый*; колоколизация Hsp70 с Nestin и Hsp70 с Sox2 – *желтый* цвет; отсутствие маркеров – *синий* цвет.

ственно. Полученная карта фенотипирования представлена на рис. 2*д*.

На основе карты фенотипирования с помощью программного обеспечения Pathology Views<sup>™</sup> для анализа флуоресцентных изображений количественно оценивали колоколизацию Hsp70 с Nestin и Hsp70 с Sox2 в зонах некроза и жизнеспособной ткани (рис. 3, табл. 1). Полученные количественные данные не выявили существенных различий в распределении клеток, экспрессирующих Hsp70, в зонах некроза и жизнеспособной ткани (36 и 41% соответственно), что может свидетельствовать об их равномерном распределении в опухоли.

Ранее было показано, что белок теплового шока Hsp70 в изобилии присутствует в опухолях, обеспечивая избирательное преимущество злокачествен-

ных клеток за счет подавления множественных путей апоптоза, регуляции некроза, обхода программы клеточного старения, вмешательства в опухолевый иммунитет, стимулирования ангиогенеза и поддержки метастазирования. Нsp70 присутствует в большинстве различных видов рака. Выживаемость пациентов и рост опухоли часто коррелирует с изменением уровня его экспрессии. Действие Hsp70 в различных состояниях его каталитического цикла позволяет предположить, что он может многофункционально воздействовать на злокачественные клетки (Albakova et al., 2020). Известно, что во всех организмах белки теплового шока обеспечивают древнюю защитную систему, действуя как молекулярные шапероны и способствуя правильному фолдингу и рефолдингу неправильно свернутых белков, а также

Таблица 1. Оценка содержания и колоколизации биомаркеров (Hsp70, Nestin, Sox2) на гистологических препаратах МГБ человека

Зона	Наличие маркера, %			Отсутствие	Колоколизация	
	Hsp70	Nestin	Sox2	маркера, %	Hsp70/Nestin	Hsp70/Sox2
Некроз	36	18	0	46	18	0
ЖС-ткань	41	10	10	39	57	30

Примечание. Число клеток на снимке (с маркерами и их отсутствием) принимали за 100%. ЖС – жизнеспособная ткань.

устранению старых и поврежденных клеток. Через свои субстрат-связывающие домены Hsp70 взаимодействует с широким спектром молекул, от развернутых до нативно свернутых и агрегированных белков, и обеспечивают цитопротекторную роль против различных клеточных стрессов. В патофизиологических условиях высокая экспрессия Hsp70 приводит к ингибированию апоптоза и позволяет клеткам выживать даже при летальных повреждениях. Кроме того, повышенная экспрессия Hsp70 в опухолевых клетках может быть ответственна за онкогенез и прогрессирование опухоли, обеспечивая устойчивость к химиотерапии (Kumar et al., 2016).

Достаточно высокая колоколизация Hsp70 с факторами Nestin и Sox2 была выявлена преимущественно в зоне жизнеспособной ткани (57 и 30% соответственно, табл. 1). Фактор транскрипции Sox2, так же, как и Nestin (маркер нейрональных стволовых клеток/клеток-предшественников), необходимы для эмбрионального развития и играют решаюшую роль в поддержании стволовости эмбриональных клеток и различных популяций взрослых стволовых клеток. С другой стороны, нарушение регуляции экспрессии Sox2 связано с множеством типов рака (Novak et al., 2020) и влияет на пролиферацию, миграцию, инвазию и метастазирование. Также было показано, что нокдаун экспрессии Nestin в клетках глиобластомы человека приводит к снижению пролиферации, миграции и инвазии (Matsuda et al., 2011, 2015). Таким образом, Nestin и Sox2 также представляют интерес в качестве терапевтических мишеней при некоторых опухолях, включая глиобластому.

Достижения в области геномики и протеомики позволяют обнаружить и протестировать огромное количество биомаркеров, однако этого по-прежнему недостаточно для создания полнофункциональной коммерчески доступной терапии МГБ. Поиск эффективных биомаркеров МГБ необходимо проводить, рассматривая сложные молекулярные пути заболевания в целом. Полученные нами данные позволяют предполагать перспективность дальнейших исследований белков теплового шока, в частности Hsp70, и использования его в качестве мишени для таргетной терапии злокачественных новообразований головного мозга.

# БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают большую благодарность Группе компании ООО "БиоЛайн" за предоставленные для работы реактивы и оборудование, а также сотруднику компании Дьяковой Дарье за помощь в подготовке и анализе препаратов.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-58-55001).

# СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол клинического исследования одобрен Комитетом по этике Федерального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова. Все пациенты подписали информированное согласие на предоставление материала для проведения научных исследований.

# КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Albakova Z.A., Grigoriy A., Kanevskiy L.M., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. 2020. HSP70 multi-functionality in cancer. Cells. V. 9. P. 587. https://doi.org/10.3390/cells9030587
- Barreca M.M., Spinello W., Cavalieri V., Turturici G., Sconzo G., Kaur P., Tinnirello R., Asea A., Geraci F. 2017. Extracellular Hsp70 enhances mesoangioblast migration via an autocrine signaling pathway. 2017. J Cell Physiol. V. 232. P. 1845. https://doi.org/10.1002/jcp.25722
- Breuninger S., Stangl S., Werner C., Sievert W., Lobinger D., Foulds G.A., Wagner S., Pickhard A., Piontek G., Kokowski K. 2018. Membrane Hsp70-A novel target for the isolation of circulating tumor cells after epithelial-to-mesenchymal transition. Front. Oncol. V. 8. P. 497. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00497
- *Gallego O.* 2015. Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. Curr. Oncol. V. 22. P. 273. https://doi.org/10.3747/co.22.2436
- Kumar S., Stokes J., Singh U.P., Gunn K.S., Acharya A., Manne U., Mishra M. 2016. Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. Cancer Lett. V. 374. P. 156. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.056
- Matsuda Y., Ishiwata T., Yoshimura H., Hagio M., Arai T. 2015. Inhibition of nestin suppresses stem cell phenotype of glioblastomas through the alteration of post-translational modification of heat shock protein HSPA8/HSC71. Cancer Letters. V. 357. P. 602. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.030
- Matsuda Y., Naito Z., Kawahara K., Nakazawa N., Korc M., Ishiwata T. 2011. Nestin is a novel target for suppressing pancreatic cancer cell migration, invasion and metastasis. Cancer Biol. Ther. V. 11. P. 512. https://dx.doi.org/10.4161%2Fcbt.11.5.14673
- *Mimeault M, Batra S.K.* 2014. Altered gene products involved in the malignant reprogramming of cancer stem/progenitor cells and multitargeted therapies. Mol. Aspects Med. V. 39. P. 3.
- Mori H., Bolen J., Schuetter L., Massion P., Hoyt C., Vanden Berg S., Esserman L., Borowsky A., Campbel M. 2020. Characterizing the tumor immune microenvironment with tyramide-based multiplex immunofluorescence. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. V. 25. P. 417. https://doi.org/10.1016/j.mam.2013.08.001
- *Muir M., Gopakumar S., Traylor J., Lee S., Rao G.* 2020. Glioblastoma multiforme: novel therapeutic targets. Expert Opin Ther Targets. V. 24. P. 605. https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1762568
- Novak D., Hüser L., Elton J.J., Umansky V., Altevogt P., Utikal J. 2020. SOX2 in development and cancer biology. Semin

Cancer Biol. V. 67(Pt 1). P. 74. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.007

- Parlato C., Barbarisi M., Moraci M., Moraci A. 2006. Surgery, radiotherapy and temozolomide in treating high-grade gliomas. Front. Biosci. V. 1. P. 1280. https://doi.org/10.2741/1881
- Pfister K., Radons J., Busch R., Tidball J.G., Pfeifer M., Freitag L., Feldmann H.J., Milani V., Issels R., Multhoff G. 2007. Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: Association with different routes of metastasis. Cancer. V. 110. P. 926.
- Phillips H.S., Kharbanda S., Chen R., Forrest W.F., Soriano R.H., Wu T.D., Misra A., Nigro J.M., Colman H., Soroceanu L., Williams P.M.y, Modrusan Z., Feuerstein B.G., Aldape K. 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. Cancer Cell. V. 9. P. 157. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.02.019
- Razavi S.M., Lee K.E., Jin B.E., Aujla P.S., Gholamin S., Li G. 2016. Immune evasion strategies of glioblastoma. Fron.t Surg. V 3: P. 11. https://doi.org/10.3389/fsurg.2016.00011
- Sasmita A.O., Wong Y.P., Ling A.P.K. 2018. Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. Asia Pac. J. Clin. Oncol. V. 14. P. 40. https://doi.org/10.1111/ajco.12756
- Shevtsov M., Balogi Z., Khachatryan W., Gao H., Vigh L., Multhoff G. 2020. Membrane-associated heat shock proteins in oncology: from basic research to new teranostic

targets. Cells. V. 9. P. 1263. https://doi.org/10.3390/cells9051263

- Sidi F., Bingham V., Craig S., McQuaid S., James J., Humphries M., Salto-Tellez M. 2021. PD-L1 Multiplex and quantitative image analysis for molecular diagnostics. Cancers. V. 13. P. 29. https://doi.org/10.3390/cancers13010029
- Taube J., Roman K., Engle E., Wang C., Ballesteros-Merino C., Jensen S., McGuire J., Jiang M., Coltharp C., Remeniuk B., Wistuba I., Locke D., Parra E., Fox B., Rimm D., Hoyt C. 2021. Multi-institutional TSA-amplified multiplexed immunofluorescence reproducibility evaluation (MITRE) study. J Immunother Cancer. V. 9. P. e002197. https://doi.org/10.1136/jitc-2020-002197
- Thorsteinsdottir J., Stangl S., Fu P., Guo K., Albrecht V., Eigenbrod S., Erl J., Gehrmann M., Tonn J.C., Multhoff G. 2017. Overexpression of cytosolic, plasma membrane bound and extracellular heat shock protein 70 (Hsp70) in primary glioblastomas. J. Neurooncol. V. 135. P. 443. https://doi.org/10.1007/s11060-017-2600-z
- Uozaki H., Ishida T., Kakiuchi C., Horiuchi H., Gotoh T., Iijima T., Imamura T., Machinami R. 2000. Expression of heat shock proteins in osteosarcoma and its relationship to prognosis. Pathol. Res. Pract. V. 196. P. 665. https://doi.org/10.1016/S0344-0338(00)80118-1
- Vargas-Toscano A., Janiak C., Sabel M., Kahlert U. 2021. A Preclinical Pipeline for Translational Precision Medicine-Experiences from a Transdisciplinary Brain Tumor Stem Cell Project. J. Pers. Med. V. 11. P. 892. https://doi.org/10.3390/jpm11090892

# Assessment of the Colocalization of Heat Shock Protein Hsp70 with Markers of Tumor Stem-Like Cells

# N. M. Yudintceva<sup>a, \*</sup>, A. L. Mikhrina<sup>b</sup>, A. S. Nechaeva<sup>c</sup>, and M. A. Shevtsov<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup>Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Science, St. Petersburg, 194223 Russia

<sup>c</sup>Center for Personalized Medicine of the Almazov National Medical Research Center of the Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, 197341 Russia

\*e-mail: yudintceva@mail.ru

There is an urgent need to identify biomarkers for early diagnosis and as targets for theranostics of multiforme glioblastoma (GBM). In the current study, histological samples of GBM were qualitatively and quantitatively analyzed to detect Hsp70 protein expression and its colocalization with biomarkers of tumor stem-like cells (SLCs) employing the Multiplex analysis system. Cells expressing Hsp70 were evenly distributed in the viable tumor mass and colocalized with SLC markers (Nestin and Sox2). The obtained data suggest the prospects of using Hsp70 as a target for therapy of brain tumors, in particular, the multiforme glioblastoma.

*Keywords:* glioblastoma multiforme, heat shock protein Hsp70, tumor stem-like cells, multiplex analysis, biomarkers, Nestin, Sox2

УДК 611.811.018

# КАТЕХОЛАМИНЕРГИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ СУБФОРНИКАЛЬНОГО ОРГАНА КРЫСЫ

© 2022 г. В. А. Разенкова<sup>1, \*</sup>, Д. Э. Коржевский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия \*E-mail: valeriya.raz@yandex.ru Поступила в редакцию 16.03.2022 г. После доработки 20.04.2022 г. Принята к публикации 20.04.2022 г.

В связи с высокой актуальностью изучения субфорникального органа, его тканевых компонентов и медиаторных систем, целью настоящей работы являлось исследование морфологических особенностей катехоламинергической иннервации данной области. С применением методов иммуногистохимии и конфокальной микроскопии были изучены препараты субфорникального органа крыс на сроках: 14-е, 30-е сут постнатального развития и в возрасте 4—6 мес. Определено главное направление врастания катехоламинергических волокон в субфорникальный орган на ранних сроках. Установлено, что отростки катехоламинергических клеток контактируют с клетками, покрывающими субфорникальный орган, и могут проходить сквозь эпендимный пласт, что позволяет им напрямую контактировать с цереброспинальной жидкостью, и, предположительно, влиять на ее состав. Выявлено, что часть волокон идет параллельно базальным отросткам специализированных эпендимных клеток — таницитов, что позволяет предположить их возможное функционирование в роли скэффолда для развивающейся в процессе онтогенеза катехоламинергической иннервации. В работе впервые получено свидетельство существования в субфорникальном органе собственных катехоламинергических нейронов.

*Ключевые слова*: тирозингидроксилаза, головной мозг, субфорникальный орган, развитие, иммуногистохимия

**DOI:** 10.31857/S004137712204006X

Субфорникальный орган (СФО) представляет собой небольшой, полушаровидной или овальной формы бугорок, вдающийся в просвет третьего желудочка на уровне Монроева (или межжелудочкового) отверстия (Dellmann, Simpson, 1979). В первую очередь эта область мозга примечательна тем, что относится к циркумвентрикулярным органам нервной системы. Такие органы не отделены от периферического кровообращения гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ) из-за наличия в их сосудистой сети фенестрированных капилляров и, таким образом, составляющие их ткани и клетки оказываются чувствительны к изменениям состава крови (McKinlev et al., 2003). Путем обработки поступающих гуморальных сигналов клетки СФО обеспечивают регуляцию энергетического и водно-солевого баланса организма (Pulman et al., 2006; Zimmerman et al., 2016, 2019). В основном, исследования СФО сосредоточены на изучении обеспечения физиологических функций органа, связанных с водно-солевым балансом, и, наряду с этим, исследовании влияния гуморальных факторов крови на клеточные популяции СФО (Hicks et al., 2021). Таким образом, организация отдельных популяций нейронов СФО, их взаимодействие друг с другом, а также с глиальными и васкулярными элементами остаются малоизученными.

Катехоламинергическая система головного мозга представлена дофаминергическими, адренергическими и норадренергическими нейронами и их терминалями, определенным образом пространственно организованными в нервной системе. Традиционно считается, что катехоламинергическая иннервация СФО обеспечивается с помощью отростков дофамин- и норадреналинергических нейронов ядер гипоталамуса (группы A11–A14) (Tanaka, Seto, 1988; Rosas-Arellano et al., 1996), и ядра одиночного пути продолговатого мозга (группа A2) (Tanaka et al., 1997), однако, в связи с недостаточной изученностью как общего строения СФО, так и его структурных единиц, их пространственных и биохимических взаимоотношений, нельзя с уверенностью утверждать, что эта медиаторная система в данной области охарактеризована во всей своей полноте. Как предполагают, основная функция катехоламинов в СФО заключается в поддержании водно-солевого баланса и контроле пищевого поведения: так, вы-

**Принятые сокращения:** ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; СФО – субфорникальный орган; ТГ – тирозингидроксилаза; ЦСЖ – цереброспинальная жидкость.

брос норадреналина происходит в ответ на ангиотензин-зависимую активацию нейронов (Tsukashima et al., 1996; Takahashi, Tanaka, 2017), а дофамин, через постсинаптический D4 рецептор, ингибирует активность нейронов в чувствительных к ангиотензину II (Miyahara et al., 2012), что является причиной подавления ангиотензин-зависимого потребления воды. К сожалению, несмотря на то, что присутствие катехоламинов в СФО не подвергают сомнению, значение и пространственная организация этих структур остаются неясными.

В связи с высокой актуальностью изучения СФО и исследования взаимодействий его тканевых компонентов, целью настоящей работы стало исследование катехоламинергической иннервации СФО с применением методов иммуногистохимии.

# МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве материала для исследования использовали фронтальные срезы, проходящие через область локализации СФО, головного мозга крыс-самцов породы Вистар, полученные на разных сроках постнатального онтогенеза: 14-е (Р14), 30-е (Р30) постнатальные сутки и половозрелые (4-6 мес.) животные (n = 4 для каждого срока). При содержании и умершвлении животных соблюдали основные принципы Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.) и "Правила надлежащей лабораторной практики" (приказ № 199н от 01.04.2016 г. Минздрава России). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ ИЭМ (заключение № 1/22 от 18.02.2022). Материал фиксировали в цинк-этанолформальдегиде (Korzhevskii et al., 2015) и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы толщиной 5 мкм наклеивали на предметные стекла с адгезивным покрытием "Superfrost Ultra Plus" (Menzel Gläser, Германия). После депарафинирования и регидратации препаратов проводили ингибирование эндогенной пероксидазы путем обработки срезов 3%-ным водным раствором перекиси водорода в течение 10 мин. Для выявления катехоламиергических структур использовали кроличьи поликлональные антитела к тирозингидроксилазе (ab112, Abcam, Beликобритания) в разведении 1:1000. В качестве вторичных реагентов использовали козьи антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена из набора Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit (ab236466, Abсат. Великобритания). Для визуализации продукта реакции использовали хромоген З'З-диаминобензидин из набора DAB+ (Agilent, США). Часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином. Полученные препараты анализировали с использованием микроскопа Leica DM750 (Германия) и фотографировали с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия).

Для постановки двойной иммунофлуоресцентной реакции использовали кроличьи поликлональные антитела к тирозингидроксилазе (ab112, Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 500 и мышиные моноклональные антитела к виментину (клон V9, M0725, Agilent, США) в разведении 1 : 100. В качестве вторичных реагентов применяли меченный биотином-SP Fab-фрагмент иммуноглобулина осла против иммуноглобулинов мыши (715-067-003, Jackson ImmunoResearch, США) и козьи антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена из набора Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit (ab236466, Abcam, Великобритания). После инкубации во вторичных антителах срезы обрабатывали конъюгатом стрептавидина с флуорохромом Cy5 (Jackson ImmunoResearch, США; разведение 1 : 100), а также раствором козьих антител против пероксидазы хрена, конъюгированных с флуорохромом Су3 (Jackson ImmunoResearch, США; разведение 1 : 100). Подкраску ядер осуществляли с использованием ДНК-связывающего красителя SYTOX Green в разведении 1 : 100 (Invitrogen, США). Полученные препараты исследовали при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM 800 (Zeiss, Германия). Использовали объективы Plan-Apochromat 20×/0.8 М27 и Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DICM27 (масляная иммерсия). Для возбуждения флуоресценции SYTOX Green применяли лазер с длинной волны 488 нм, для Cy3 – 561 нм, Cy5 – 640 нм. Анализ полученных изображений проводили при помощи компьютерной программы Zen-2012 (Zeiss, Германия).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Чтобы проследить становление катехоламинергической иннервации СФО, было предпринято сравнительно-морфологическое исследование срезов головного мозга крыс на разных сроках постнатального онтогенеза. На 14-е постнатальные сутки ТГ-позитивные волокна наблюдали в основном в латеральных зонах органа. Такие горизонтально расположенные волокна с варикозными утолщениями формируют пучки на краях субфорникального орган и выходят за его пределы в контакте с выстилкой эпендимного слоя (рис. 1а). Отдельные отростки катехоламинергических клеток контактируют и с клетками, покрывающими субфорникальный орган. Немногочисленные тонкие редковетвящиеся волокна располагаются в центральной зоне. Реакцию на ТГ отмечали также вблизи эндотелия капилляров и септальных вен. Также отростки катехоламинергических нейронов присутствуют в близлежащем сосудистом сплетении (рис. 2в).

Интенсивную реакцию на ТГ в латеральных зонах субфорникального органа в связи с расположением в этой области плотного скопления отростков катехоламинергических нейронов в настоящем исследовании отмечали и к концу 1-го мес. постна-



**Рис. 1.** Распределение катехоламинергических волокон в СФО на разных этапах постнатального развития. a - 14-е постнатальные сутки,  $\delta - 30$ -е постнатальные сутки, e - взрослое животное. Иммуногистохимическая реакция на ТГ с подкраской квасцовым гематоксилином. Объектив Plan-Apochromat  $20 \times / 0.45$ . Масштабные отрезки - 50 мкм.

тального развития. Однако на этом сроке различия в распределении катехоламинергических структур между центральной и латеральной зонами выражены не так ярко, как на 14-е постнатальные сутки (рис.  $1\delta$ ). На исследуемом сроке в центральной зоне наблюдали интенсивно ветвящиеся яркоокрашенные волокна с многочисленными четкообразными

утолщениями. Заметно, что часть волокон находится в субэпендимной зоне (рис. 2*a*). В каудальной же части органа отростки сконцентрированы вблизи выстилки желудочка. Отдельно следует отметить ТГ-иммунопозитивные волокна, которые проходят сквозь выстилку желудочка и напрямую контактируют с цереброспинальной жидкостью (ЦСЖ).



**Рис. 2.** Особенности локализации ТГ-положительных волокон в СФО. a - 30-е постнатальные сутки, стрелки указывают на субэпендимные волокна,  $\delta -$  взрослое животное, стрелки указывают на волокна в контакте с цереброспинальной жидкостью,  $e - T\Gamma$ -положительная реакция в сосудистом сплетении. Стрелка указывает на катехоламинергические волокна. Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу с подкраской квасцовым гематоксилином. Объектив Plan-Apochromat  $100 \times /1.25$  Oil (масляная иммерсия). Масштабные отрезки - 20 мкм.

У половозрелых животных плотность распределения катехоламинергических волокон в центральной зоне субфорникального органа сравнима с таковой в латеральной зоне. Возрастает плотность распределения ТГ-положительных волокон центральной зоны, отростки активно ветвятся (рис. 1в). Значительная часть отростков занимает субэпендимное положение. Как и на Р30, отдельные катехоламинергические волокна у взрослых животных находятся в прямом контакте с ЦСЖ (рис. 26). В составе септальных вен отмечены ТГ-иммунопозитивные периваскулярные клетки (рис. 3а). Двигаясь ростральнее, можно заметить, что интенсивность реакции на ТГ снижается, и в этой области наблюдается малое количество катехоламинергических волокон. Однако здесь отмечали наличие слабоокрашенных ТГ-положительных клеток (рис.  $3\delta$ ).

С целью изучить пространственную организацию катехоламинергических волокон в СФО была поставлена двойная иммунофлуоресцентная реакция на виментин и тирозингидроксилазу. В результате иммуногистохимической реакции четко выявляются ТГ-положительные волокна и виментин-положительные эпендимоциты и танициты, и их удлинен-

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

ные отростки (рис. 4). Эти отростки прослеживаются на большом расстоянии и проходят через весь СФО. Часть отростков оканчивается на кровеносных сосудах внутри СФО. ТГ-положительные волокна направляются параллельно отросткам эпендимоцитов и таницитов и часто идут совместно с ними (см. рис.  $4\delta$ ,  $\epsilon$ ).

# ОБСУЖДЕНИЕ

Для того чтобы проследить становление катехоламинергической иннервации и, возможно, установить ее источники, были проанализированы препараты СФО крыс на разных сроках постнатального онтогенеза. Как считается, у крыс формирование СФО продолжается от 17-х сут эмбрионального развития до 5-х постнатальных суток. Предполагается, что к 5-м постнатальных суток. Предполагается, что к 5-м постнатальным суткам все клеточные элементы СФО уже дифференцированы, и дальнейшие структурные изменения носят преимущественно количественный характер (Dellmann, Stahl, 1984). Тем не менее, наши результаты показывают, что на 14-е постнатальные сутки наблюдается довольно скудное обогащение СФО катехоламинергическими волокнами



**Рис. 3.** Клетки в составе СФО, содержащие тирозингидроксилазу. Стрелки указывают на ТГ-положительные клетки, *головка стрелки* – катехоламинергические волокна. *а* – Периваскулярная клетка рядом с септальной веной. Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу. *б* – ТГ-положительная клетка СФО. Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу. *б* – ТГ-положительная клетка СФО. Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу. *б* – ТГ-положительная клетка СФО. Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу. *б* – ТГ-положительная клетка СФО. Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу с подкраской квасцовым гематоксилином. Объектив Plan-Apochromat 100×/1.25 Oil (масляная иммерсия). Масштабные отрезки – 20 мкм.

за исключением латеральной зоны органа, по сравнению с одномесячными и половозрелыми животными. В качестве путей врастания волокон катехоламинергических нейронов на ранних сроках можно предположить три: идущие через свод мозга, белое вещество спайки свода или вдоль кровеносных сосудов. Сообщалось, что на активность нейронов СФО влияют норадренергические волокна, исходящие из ядра одиночного пути (NTS) (Tanaka et al., 1997). Эти волокна идут в составе медиального переднемозгового пучка (Kawai, 2018), в составе которого, как известно, проходят и дофаминергические волокна мезолимбического пути (Moini, Piran, 2020). Показано также, что многие афферентные волокна, идущие к СФО, проходят в субэпендимном пространстве вдоль стенок желудочка через спайку свода (Lind et al., 1982). Таким образом, опираясь на литературные данные, и также на полученные нами результаты, можно предположить, что одним из основных путей катехоламинергических волокон в СФО является ветвь переднемозгового пучка, проходящая через спайку свода.

Поскольку СФО относится к циркумвентрикулрярным органам головного мозга, для него характерно наличие специализированных эпендимных клеток – таницитов – которые отличаются от клеток эпендимы своей морфологией, цитохимической и ультраструктурной организацией (Langlet et al., 2013; Суфиева и др., 2018; Korzh, Kondrychyn, 2020). Одной из морфологических особенностей таких клеток является наличие длинного базального отростка, концами которого танициты оплетают кровеносные сосуды подлежащей нервной ткани и, благодаря этому, могут участвовать в транспорте сигнальных молекул из крови к клеткам СФО, влияя на метаболическую функцию органа. При этом результаты проведенной конфокальной сканирующей микроскопии показали, что ход отдельных катехоламинергических волокон в СФО параллелен виментин-положительным отросткам таницитов. Несмотря на то, что значение этого факта до конца не понятно, можно предположить, что танициты, принимая во внимание их схожесть с радиальной глией (Bolborea, Dale, 2013; Goodman, Hajihosseini, 2015), могут выступать в качестве скаффолда для растущих катехоламинергических нервных волокон.

Что касается отмеченной реакции на ТГ вблизи эндотелия капилляров и септальных вен, то данное наблюдение согласуется с данными Кавано и Масуко (Kawano, Masuko, 2001), полученными при использовании методов электронной микроскопии. Согласно им, окончания ТГ-иммунопозитивных аксонов обращены в сторону перикапиллярных пространств кровеносных сосудов СФО, в том числе фенестрированных капилляров. Данный факт представляется важным рассматривать в совокупности с еще одним результатом нашего исследования, а именно тем, что ТГ-позитивные волокна СФО крыс часто занимают субэпендимное положение, непосредственно под телами таницитов, и направлены вдоль покрывающего СФО слоя, а отдельные отростки проникают сквозь эпендимный слой и контактируют с ЦСЖ. В виду отсутствия данных о наличии на мембране таницитов рецепторов к катехоламинам, можно было бы предположить, что эти клетки напрямую не являются мишенью субэпендимных волокон. Однако, исследование другого циркумвентрикулярного органа – медиобазального гипоталамуса, предпринятое Мейстером с сотрудниками (Meister et al., 1988), показало, что отдельные популяции таницитов экспресируют нейрональный фосфопротеин, регулируемый дофамином и цАМФ



**Рис. 4.** Пространственное распределение виментина и тирозингидроксилазы в тканях субфорникального органа. Двойная иммунофлуоресцентная реакция на виментин и TГ, визуализация с помощью флуорохромов Су3 (голубой цвет) и Су5 (красный цвет) с окраской ядер SYTOX Green (зеленый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. Объектив Plan-Apochromat  $63 \times / 1.40$  Oil DICM27 (масляная иммерсия). *a* – Общий вид. Двухмерная проекция 3х оптических срезов панорамы из 12-ти кадров. Величина Z-серии – 1 мкм. Рамки ограничивают области, представленные на *б*, *в*. Масштабный отрезок – 50 мкм. *б*, *в* – области интереса на большом увеличении. *Стрелки* указывают на совместно расположенные отростки эпендимоцитов СФО и ТГ-положительные волокна. Масштабные отрезки – 20 мкм.

(32-kD dopamine and cAMP regulated phosphoprotein, DARPP-32). Двойное иммуномечение антителами против ТГ и DARPP-32 выявило тесную связь между ТГ-положительными волокнами и DARPP-32-содержащими таницитами, что, в совокупности, дает основание считать, что дофамин контролирует активность таницитов (Hökfelt et al., 1988). Как и мы в СФО, Мейстер с сотрудниками в области медиобазального гипоталамуса выявляли ТГ-иммунопозитивные отростки, проникающие между эпендимными клетками в просвет желудочка. Высказывается предположение, что большинство нервных клеток, контактирующих с ЦСЖ, могут выступать в качестве хеморецепторов и отвечать за несинаптическое восприятие сигналов и дальнейшую их передачу в различные области головного мозга (Vígh et al., 2004). Существует вероятность, что роль этих контактов не ограничивается хеморецепцией. Отмечается, что присутствующие в ликворе моноамины, а именно: дофамин, норадреналин и серотонин, преимущественно имеют нейрональное происхождение, а не поступают из кровотока. Еще одно важное

живаются в ЦСЖ на физиологически активных уровнях (Муртазина и др., 2021). Таким образом, катехоламинергические волокна СФО, по всей видимости, могут выделять в ЦСЖ биологически активные вещества, действующие как нейрогормоны. Из этого следует, что катехоламинергические волокна СФО могут двунаправленно влиять на состав крови и ЦСЖ как напрямую, так и опосредованно, через воздействие на танициты, и могут быть задействованы в регуляции энергетического гомеостаза организма.

наблюдение состоит в том, что эти вещества обнару-

Известно также, что в СФО находится особая популяция нейронов, локализованных на поверхности краевых клеток — супраэпендимные нейроны (Dellmann, Simpson, 1979). Несмотря на то, что, ряд авторов предполагает серотонинергическую медиаторику супраэпендимных клеток (Richards et al., 1981; Lorez, Richards, 1982), это предположение относится к областям, отличным от СФО, а именно к клеткам дна IV-го желудочка. Наше исследование показало, что ТГ-положительные нейроны СФО не находятся

на поверхности, а ТГ-положительные отростки занимают субэпендимное положение, также могут проникать сквозь эпендимоциты и танициты, и контактировать с ЦСЖ. Таким образом, среди супраэпендимных нейронов СФО катехоламинергические не обнаружены.

Еще одним важным структурным компонентом СФО являются периваскулярные клетки – перициты (Hicks et al., 2021). Перициты располагаются снаружи эндотелиального слоя кровеносных сосудов и являются составной частью ГЭБ (Zheng et al., 2020). Мы показали, что в СФО по крайней мере некоторые периваскулярные клетки дают положительную иммуногистохимическую реакцию на ТГ. Располагаются такие клетки вблизи эндотелия крупных сосудов, расположенных в латеральных зонах СФО. Как утверждается в литературе, кровоснабжение СФО в основном обеспечивается системой субфорникальной артерии, ветви передней мозговой артерии. Разветвления субфорникальной артерии формирует в СФО плотное капиллярное сплетение из фенестрированных и нефенестрированных капилляров, которые поступают в крупные тонкостенные сосуды, расположенные латерально - септальные вены, впадающие в систему большой вены Галена (McKinley et al., 2003). Таким образом, ТГ-иммунопозитивные перициты СФО оказываются структурными единицами ГЭБ септальных вен. Было обнаружено, что эндотелиальные клетки и перициты являются первым местом поглощения предшественника катехоламинов – L-ДОФА, а также экспрессируют высокие уровни декарбоксилазы ароматических аминокислот (ДАА) (Bertler et al., 1966; Cenci, 2014). В дополнение к этому, следует упомянуть о наличии в головном мозге моноферментных, ТГ или ДАА-содержащих, нейронов, экспрессирующих только один из ферментов синтеза дофамина (Угрюмов, 2009). Принимая во внимание вышесказанное, можно предположить, что перициты, как и моноферментные нейроны, способны участвовать в комплементарном синтезе дофамина, а в СФО могут оказаться также и сайтом синтеза L-ДОФА.

У взрослого животного в пределах СФО была обнаружена клетка с ТГ-иммунопозитивной реакцией средней интенсивности. До настоящего времени считалось, что в СФО отсутствует собственная популяция катехоламинергических нейронов. Ввиду недостаточной изученности, физиологическая роль этих клеток остается неизвестной. Принимая во внимание то, что в СФО наблюдались лишь одиночные ТГ-положительные клетки и только у взрослых животных, можно говорить о том, что популяция катехоламинергических нейронов в СФО немногочисленна и появляется на более поздних сроках.

Таким образом, в настоящей работе были охарактеризованы катехоламинергические структуры СФО. Исследование препаратов на разных сроках постнатального онтогенеза показало, что существу-

ет главное направление врастания катехоламинергических волокон в СФО и особенно отчетливо это наблюдается на ранних сроках. Полученные данные позволяют полагать, что волокна катехоламинергических нейронов на ранних сроках поступают в СФО от переднемозгового пучка через спайку свода. Параллельный отросткам эпендимоцитов и таницитов ход ТГ-положительных волокон можно трактовать в пользу того, что танициты играют роль таницитов скэффолда для развивающейся в процессе онтогенеза катехоламинергической иннервации. Локализованные в субэпендимном слое катехоламинергические волокна проходят сквозь эпендимный пласт и контактируют напрямую с ЦСЖ. В работе впервые получено свидетельство существования в СФО собственных катехоламинергических нейронов.

# ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00105, https://rscf.ru/project/22-25-00105/).

# СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные принципы использования животных. Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ "ИЭМ" (заключение № 1/22 от 18.02.2022).

# КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Муртазина А.Р., Бондаренко Н.С., Пронина Т.С., Чандран К.И., Богданов В.В., Дильмухаметова Л.К., Угрюмов М.В. 2021. Сравнительный анализ содержания моноаминов как нейрогормонов в ликворе и крови крыс в онтогенезе. Acta Naturae. Т. 13. № 4. С. 89. (Murtazina A.R., Bondarenko N.S., Pronina T.S., Chandran K.I., Bogdanov V.V., Dilmukhametova L.K., Ugrumov M.V. 2021. A comparative analysis of CSF and the blood levels of monoamines as neurohormones in rats during ontogenesis. Acta Naturae. V. 13. № 4. P. 89.) https://doi.org/10.32607/actanaturae.11516
- Суфиева Д.А., Кирик О.В., Коржевский Д.Э. 2018. Нуклеолин и ядрышки в эпендимоцитах и таницитах третьего желудочка головного мозга крысы. Цитология. 2018. Т. 60. № 1. С. 30. (Sufieva D.A., Kirik O.V., Korzhevskii D.E. 2018. Nucleolin and nucleoli in ependymocytes and tanycytes of the third ventricle of the rat brain. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 12. № 2. Р. 167.) https://doi.org/10.31116/tsitol.2018.01.04 https://doi.org/1134/S1990519X18020116
- Угрюмов М.В. 2009. Синтез моноаминов немоноаминергическими нейронами: иллюзия или реальность? Российский физиологический журн. им. И.М. Сеченова. Т. 95. № 3. С. 273. (*Ugrumov M.V.* 2009. Monoamine syn-
thesis by non-monoaminergic neurons: illusion or reality. Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova. V. 95. P. 273.)

- *Cenci M.A.* 2014. Presynaptic mechanisms of 1-DOPA-induced dyskinesia: the findings, the debate, and the therapeutic implications. Front. Neurol. V. 5. Article 242. https://doi.org/10.3389/FNEUR.2014.00242
- Bertler A., Falck B., Owman C., Rosengrenn E. 1966. The localization of monoaminergic blood-brain barrier mechanisms. Pharmacol. Rev. V. 18. P. 369. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5904153/
- Bolborea M., Dale N. 2013. Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. Trends Neurosci. V. 36. P. 91. https://doi.org/10.1016/J.TINS.2012.12.008
- Dellmann H.D., Simpson J.B. 1979. The subformical organ. Int. Rev. Cytol. V. 58. P. 333. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61479-5
- *Dellmann H.D., Stahl S.J.* 1984. Fine structural cytology of the rat subfornical organ during ontogenesis. Brain Res. Bull. V. 13. P. 135.
  - https://doi.org/10.1016/0361-9230(84)90015-7
- *Goodman T., Hajihosseini M.K.* 2015. Hypothalamic tanycytesmasters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. Front. Neurosci. V. 9. P. 387. https://doi.org/10.3389/FNINS.2015.00387/BIBTEX
- Hicks A.I., Kobrinsky S., Zhou S., Yang J., Prager-Khoutorsky M. 2021. Anatomical organization of the rat subformical organ. Front. Cell. Neurosci. V. 15, № 691711. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2021.691711
- Hökfelt T., Foster G., Schultzberg M., Meister B., Schalling M., Goldstein M., Hemmings H.C., Ouimet C., Greengard P. 1988. DARPP-32 as a marker for D-1 dopaminoceptive cells in the rat brain: Prenatal development and presence in glial elements (tanycytes) in the basal hypothalamus. Adv. Exp. Med. Biol. V. 235. P. 65. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2723-1 6
- *Kawai Y.* 2018. Differential ascending projections from the male rat caudal nucleus of the tractus solitarius: an interface between local microcircuits and global macrocircuits. Front. Neuroanat. V. 12. P. 63. https://doi.org/10.3389/FNANA.2018.00063/BIBTEX
- *Kawano H., Masuko S.* 2001. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive projections from the caudal ventrolateral medulla to the subfornical organ in the rat. Brain Res. V. 903. P. 154. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02435-0
- Korzh V., Kondrychyn I. 2020. Origin and development of circumventricular organs in living vertebrate. Semin. Cell Dev. Biol. V. 102. P. 13. https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2019.10.010
- Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O. V., Grigorev I.P. 2015. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. Eur. J. Histochem. V. 59. P. 5. https://doi.org/10.4081/EJH.2015.2530
- Langlet F., Mullier A., Bouret S.G., Prevot V., Dehouck B. 2013. Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. J. Comp. Neurol. V. 521. P. 3389. https://doi.org/10.1002/CNE.23355
- Lind R.W., van Hoesen G.W., Johnson A.K. 1982. An HRP study of the connections of the subfornical organ of the rat. J.

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

Comp. Neurol. V. 210. P. 265. https://doi.org/10.1002/CNE.902100306

- *Lorez H.P., Richards J.G.* 1982. Supra-ependymal serotoninergic nerves in mammalian brain: morphological, pharmacological and functional studies. Brain Res. Bull. V. 9. P. 727. https://doi.org/10.1016/0361-9230(82)90179-4
- McKinley M.J., McAllen R.M., Davern P., Giles M.E., Penschow J., Sunn N., Uschakov A., Oldfield B.J. 2003. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. V. 172. P. 1. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55532-9
- Meister B., Hökfelt T., Tsuruo Y., Hemmings H., Ouimet C., Greengard P., Goldstein M. 1988. DARPP-32, a dopamineand cyclic AMP-regulated phosphoprotein in tanycytes of the mediobasal hypothalamus: distribution and relation to dopamine and luteinizing hormone-releasing hormone neurons and other glial elements. Neuroscience. V. 27. P. 607.

https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90292-8

Miyahara N., Ono K., Hitomi S., Hirase M., Inenaga K. 2012. Dopamine modulates neuronal excitability pre- and postsynaptically in the rat subformical organ. Brain Res. V. 1447. P. 44.

https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2012.01.063

*Moini J., Piran P.* 2020. Limbic, olfactory, and gustatory systems. In: Functional and Clinical Neuroanatomy. London: Academic Press. P. 467.

https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817424-1.00015-X

Pulman K.J., Fry W.M., Cottrell G.T., Ferguson A. V. 2006. The subfornical organ: a central target for circulating feeding signals. J. Neurosci. V. 26. P. 2022.

https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3218-05.2006

- Richards J.G., Lorez H.P., Colombo V.E., Guggenheim R., Kiss D., Wu J.Y. 1981. Demonstration of supra-ependymal 5-HT nerve fibres in human brain and their immunohistochemical identification in rat brain. J. Physiol. (Paris, 1946–1992). V. 77. P. 219. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7026769/
- *Rosas-Arellano M.P., Solano-Flores L.P., Ciriello J.* 1996. Arcuate nucleus inputs onto subfornical organ neurons that respond to plasma hypernatremia and angiotensin II. Brain Res. V. 707. P. 308.

https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01368-7

- *Takahashi M., Tanaka J.* 2017. Noradrenaline receptor mechanisms modulate the angiotensin II-induced water intake in the subfornical organ in rats. Exp. Brain Res. V. 235. P. 833. https://doi.org/10.1007/S00221-016-4844-9
- Tanaka J., Hayashi Y., Shimamune S., Nomura M. 1997. Ascending pathways from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat. Brain Res. V. 777. P. 237. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01211-0
- *Tanaka J., Seto K.* 1988. Neurons in the lateral hypothalamic area and zona incerta with ascending projections to the subfornical organ area in the rat. Brain Res. V. 456. P. 397. https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90247-8
- Tsukashima A., Tsuchihashi T., Abe I., Nakamura K., Uchimura H., Fujishima M. 1996. Angiotensin II increases norepinephrine turnover in the anteroventral third ventricle of spontaneously hypertensive rats. Hypertension. V. 28. P. 224. https://doi.org/10.1161/01.HYP.28.2.224
- Vígh B., Manzano e Silva M.J., Frank C.L., Vincze C., Czirok S.J., Szabó A., Lukáts A., Szél A. 2004. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the

nonsynaptic signal transmission of the brain. Histol. Histopathol. V. 19. P. 607. https://doi.org/10.14670/HH-19.607

Zheng Z., Chopp M., Chen J. 2020. Multifaceted roles of pericytes in central nervous system homeostasis and disease. J. Cereb. Blood Flow Metab. V. 40. P. 1381. https://doi.org/10.1177/0271678X20911331

Zimmerman C.A., Huey E.L., Ahn J.S., Beutler L.R., Tan C.L., Kosar S., Bai L., Chen Y., Corpuz T. V., Madisen L., Zeng H., *Knight Z.A.* 2019. A gut-to-brain signal of fluid osmolarity controls thirst satiation. Nature. V. 568. P. 98. https://doi.org/10.1038/S41586-019-1066-X

Zimmerman C.A., Lin Y.C., Leib D.E., Guo L., Huey E.L., Daly G.E., Chen Y., Knight Z.A. 2016. Thirst neurons anticipate the homeostatic consequences of eating and drinking. Nature. V. 537. P. 680. https://doi.org/10.1038/NATURE18950

# Catecholaminergic Structures of Rat's Subfornical Organ

V. A. Razenkova<sup>*a*, \*</sup> and D. E. Korzhevskii<sup>*a*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia \*e-mail: valeriya.raz@yandex.ru

Due to the fact that the studies of subfornical organ's tissue components and neurotransmitter systems have a high relevance nowadays, the aim of this research was to investigate morphological features of the catecholaminergic innervation of this area. Brain samples of rat's subfornical organ were studied at the different stages: at postnatal days 14 and 30, and at the age of 4–6 months, using immunohistochemical and confocal scanning microscopy methods. The main direction of ingrowing into the subfornical organ catecholaminergic fibers at the early stages of postnatal development was determined. It has been established that the processes of catecholaminergic cells can contact with the cells covering the subfornical organ, and can also pass through the ependymal layer. This allows processes to contact the cerebrospinal fluid directly and, presumably, to influence its compositions. It was revealed that some of the catecholaminergic fibers have a parallel arrangement with the basal processes of specialized ependymal cells – tany-cytes. Such finding suggests possible function of tanycytes as a scaffold for growing catecholaminergic fibers. Previously unidentified catecholaminergic cell population of subfornical organ was obtained.

Keywords: tyrosine hydroxylase, forebrain, subfornical organ, development, immunohistochemistry

УДК 581.17:57.085.23

# ИОННЫЙ ГОМЕОСТАЗ И СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЕ СТАРЕНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. А. Н. Шатрова<sup>1</sup>, А. П. Домнина<sup>1</sup>, Н. А. Пуговкина<sup>1</sup>, И. И. Марахова<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия \*E-mail: iim@incras.ru

Поступила в редакцию 15.03.2022 г. После доработки 14.04.2022 г. Принята к публикации 15.04.2022 г.

В работе охарактеризованы связанные с преждевременным старением изменения ионного гомеостаза в эндометриальных мезенхимных стволовых клетках (эМСК) человека. Методом пламенной фотометрии исследованы изменения внутриклеточного содержания калия и натрия и потоков калия через плазматическую мембрану и установлено, что в процессе индуцированной окислительным стрессом остановки клеточного цикла и развития преждевременного старения эМСК сохраняют высокий ионный гетерогенитет, характерный для функционально активных клеток животных. Преждевременное старение клеток сопровождается возрастанием внутриклеточного содержания натрия и трансмембранных потоков калия, сопряженных с функционированием Na/K-насоса, но не сказывается на пассивном транспорте калия через плазматическую мембрану. Отличительной особенностью стресс-индуцированных остановленных эМСК является сниженное удельное внутриклеточное содержание калия (500–600 мкмоль на 1 г белка) по сравнению с пролиферирующими эМСК (800–900 мкмоль на 1 г белка). Высказывается предположение, что связанное с развитием преждевременного старения снижение внутриклеточного содержания симение внутриклеточного содержания калия. Что связанное с развитием преждевременного старения снижение внутриклеточного содержания калия отражает участие ионов калия в регуляции объема клеток и может свидетельствовать о снижении гидратации стареющих эМСК.

*Ключевые слова*: внутриклеточное содержание калия, входные потоки калия, Na/K насос, окислительный стресс, преждевременное старение, эндометриальные мезенхимные стволовые клетки человека **DOI:** 10.31857/S0041377122040101

Общепризнано, что моновалентные ионы участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки, а также гибели клеток, однако механизмы их участия в этих важных клеточных процессах изучены недостаточно. Ионные каналы и ионные транспортеры плазматической мембраны вовлечены в систему внутриклеточной сигнализации, и такие ионы как калий, натрий, хлор важны для поддержания мембранного потенциала и внутриклеточных концентраций кальция и водорода (рН). Показано, например, что изменение концентрации натрия в клетке контролирует скорость клеточного цикла посредством изменений внутриклеточного рН, что, в свою очередь, влияет на экспрессию циклина В1 и активность cdk2 (Putney, Barber, 2003; Darborg et al., 2007; Pedersen et al., 2007). Предполагается, что внутриклеточный хлор участвует в гиперполяризации плазматической мембраны, которая сопровождает пререпликативную фазу и переход G<sub>1</sub>/S в клеточном цикле (Klausen et al., 2010). Наряду с сигнальной функцией, моновалентные ионы играют важную роль в регуляции объема клетки (Tosteson, Hoffman, 1960; Hoffman et al., 2009; Hoffmann, Pedersen, 2011). Движение ионов через плазматическую мембрану и связанные с ним потоки воды и изменения клеточного объема рассматриваются в качестве важного фактора в регуляции клеточного цикла (Lang et al., 1998, 2005, 2006).

При исследовании трансформированных клеток различного происхождения, а также мезенхимных стволовых клеток человека нами были выявлены изменения внутриклеточного содержания калия, связанные с замедлением пролиферации клеток и приуроченые к фазе  $G_1$  клеточного цикла (Марахова и др., 1985а, 1985б; Marakhova et al., 2019а). Последующий анализ связанных с пролиферацией изменений содержания калия в активированных лимфоцитах человека позволил нам предположить, что калий, являясь основным ионом, который участвует в регуляции содержания воды в клетках, вовлечен в процессы, контролирующие клеточный рост при переходе из состояния покоя (quiescence) к пролиферации (Веренинов и др., 1991; Marakhova et al., 2019b).

**Принятые сокращения:** эМСК – эндометриальные мезенхимные стволовые клетки;  $K_B/Na_B$  – отношение содержания калия к содержанию натрия в клетке; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор.

В последние годы ионные транспортеры, в частности Na/К насос, предлагаются в качестве терапевтических мишеней преждевременного клеточного старения. Преждевременное старение (senescence) клеток определяется как необратимая остановка клеточного цикла в ответ на различные внешние и внутренние воздействия (Fridlyanskava et al., 2015; Hernandez-Segura et al., 2018; Davan-Wetton et al., 2021). Преждевременное старение играет физиологическую роль при нормальном развитии клеток, оно лежит в основе старения стволовых клеток, а также предлагается в качестве механизма подавления злокачественного роста (Ermolaeva et al., 2018; Rhinn et al., 2019; Wang et al., 2020). Такие маркеры старения как повреждение ДНК. повышенная экспрессия ингибиторов клеточного цикла (р53, р16, p21,), а также фенотипические изменения, включая метаболическое репрограммирование и изменения хроматина, используются для идентификации стареющих клеток, хотя и не являются универсальными. Несмотря на глубокие изменения в клеточном метаболизме, нарушение синтеза белка, изменения физиологии митохондрий и лизосом, стареющие клетки длительное время остаются жизнеспособными.

Неизвестно, участвуют ли моновалентные ионы, которые являются важными регуляторами клеточного гомеостаза, в развитии преждевременного старения и поддержании жизнеспособности стареющих клеток. Показано, что стареющие клетки имеют более высокую концентрацию кальция по сравнению с нормальными циклирующими клетками (Fine et al., 2013; Yu et al., 2013). Имеются данные, свидетельствующие об активации Na/H<sup>+</sup>-обменника во время инлуцированной стрессом остановки пролиферации (Pedersen, 2006). С помощью флуоресцентных зондов обнаружено повышенное содержание калия, натрия, кальция в стареющих фибробластах легкого человека IMR90 по сравнению с нормальными фиброблостами (Guerrero et al., 2019). Количественный анализ содержания калия и натрия в клетках во время старения не проводился.

В настоящей работе мы исследовали изменения ионного гомеостаза эндометриальных мезенхимных стволовых клеток (эMCK) человека во время развития преждевременного старения, вызванного сублетальным окислительным стрессом. Используя метод пламенной фотометрии для оценки как содержания калия и натрия в клетках, так и трансмембранных потоков калия, мы обнаружили специфические изменения внутриклеточного содержания калия во время индуцированного стрессом старения эMCK человека.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки, их культивирование и обработка. В работе использовали мезенхимные стволовые клетки, полученные из эндометрия здорового донора (Земелько и др., 2011). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco), содержащей 10% эмбриональной сыворотки (HyClone), в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при  $37^{\circ}$ C, во флаконах 25 см<sup>2</sup>. Для экспериментов клетки рассевали на чашки диаметром 35 мм по 10–15 тыс. клеток на 1 см<sup>2</sup>. В работе использовали клетки 2–15-ого пассажей.

Преждевременное старение клеток индуцировали с помощью окислительного стресса по методике, предложенной ранее (Вигоva et al., 2013). Окислительный стресс вызывали добавлением в среду культивирования  $H_2O_2$  (конечная концентрация 200 мкМ) на 1 ч при 37°С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. После обработки клетки промывали 2 раза раствором PBS и далее культивировали в свежей ростовой среде, проводя ее смену на свежую через 2–3 сут.

Измерение внутриклеточного содержания катионов и входных потоков калия. Содержание калия и натрия в клетках измеряли с помошью метода пламенно-эмиссионной фотометрии (Веренинов и др., 1982). Входной поток калия оценивали по накоплению его физиологического аналога рубидия, добавляя в ростовую среду RbCl на 30 мин в конечной концентрации 2.5 мМ. Поток рубидия, относящийся к переносу с участием Na/K-насоса, детектировали по разнице между общим накоплением рубидия и его входом в клетку в присутствии 0.05 мМ уабаина в течение 20 мин. Для оценки содержания катионов клетки осаждали центрифугированием в течение 3-5 мин при 600 g. Осадок пятикратно промывали охлажденным раствором MgCl<sub>2</sub> (85 мM), не ресуспендируя, и заливали 5%-ой трихлоруксусной кислотой (1 мл). Содержание катионов в надосадочной жидкости определяли на атомно-абсорбционном фотометре Perkin-Elmer AA-306. Далее осадок растворяли в 1 мл 0.1 N NaOH для последующего определения содержания общего белка по методу Лоури. Внутриклеточную концентрацию катионов выражали в мкмолях на 1 г обшего клеточного белка.

Проточная цитофлуориметрия. Для флюориметрического анализа клетки дважды промывали PBS и переводили в суспензию путем трипсинизации, после чего осаждали центрифугированием и суспендировали в PBS. Подготовленные далее по соотетствующему протоколу образцы анализировали с помощью проточного цитометра CytoFLEX или CytoFLEX S (Beckman Coulter, США).

Для определения жизнеспособности клеток использовали окрашивание йодидом пропидия (PI). Непосредственно перед анализом к каждому образцу добавляли PI (50 мкг/мл). Полученные двумерные цитограммы (или диаграммы) (соответствующие точечные графики) позволяли различать PI-отрицательные живые клетки и PI-положительных погибших клеток.

Для анализа клеточного цикла каждый образец клеток суспендировали в 300 мкл PBS среды, содержащей 200 мкг/мл сапонина (Fluka, США), 250 мкг/мл PHKaзы A (Sigma-Aldrich, США) и 50 мкг/мл PI, инкуби-



**Рис. 1.** Окислительный стресс останавливает рост культур эМСК человека. Клетки стимулировали добавлением  $H_2O_2$  на 1 ч, затем отмывали и измеряли их ростовые характеристики. *а* – Рост численности клеток, *б* – изменение удельного содержания массы белка в клетке в процессе культивирования пролиферирующих (кривая *I*) и подвергнутых окислительному стрессу (кривая *2*) эМСК; *в* – доля клеток (%) в культуре, находящихся в фазах  $G_0/G_1$  (*I*), S (*2*) и  $G_2/M$  (*3*), на 5-е сут после стресса. К – контрольные клетки, необработанные  $H_2O_2$ . Приведены средние значения и их ошибки из 4–6 независимых серий экспериментов, проведенных по одной схеме; отличия от К достоверны при *P* < 0.05.

ровали от 30 до 60 мин при комнатной температуре в темноте.

Для оценки изменения размера клеток, которое сопровождает преждевременное клеточное старение, отслеживали сигнал прямого светорассеяния (FS). Для обнаружения накопления липофусцина образцы анализировали на аутофлуоресценцию (AФ, лазер 488 нм). Краситель тетраметилродамин (TMRM; Invitrogen, США) использовали в качестве индикатора потенциала митохондриальной мембраны (Scaduto, Grotyohann, 1999; Creed, McKenzie, 2019). Для приготовления окрашивающего раствора 1-кратный (100 нМ) исходный раствор TMRM (100 мкМ) разбавляли в 1000 раз питательной средой, которую добавляли к клеткам.

В работе использовали уабаин, сапонин, РНКазу, PI (Sigma, США), а также реактивы отечественного производства квалификации "х. ч." или "ос. ч.".

Статистическая обработка данных. Использовали программу Microsoft Excell (Microsoft Corporation, США). Статистическую значимость оценивали с помощью либо критерия ANOVA-Тьюки в случае множественных сравнений, либо *t*-критерия Стьюдента в случае парных сравнений. Данные представлены в виде средних значений и их ошибок из 3–8 независимых серий экспериментов (*n*): суммировали средние значения из трех измерений в каждом эксперименте.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сублетальная доза  $H_2O_2$  индуцирует преждевременное старение в эМСК. Ранее было показано, что сублетальный окислительный стресс вызывает необратимую остановку клеточного цикла эМСК, кото-

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

рая сопровождается такими характерными признаками преждевременного старения, как гипертрофия клеток, усиленное окрашивание клеточной β-галактозидазы, повышенная экспрессия супрессоров клеточного цикла p53, p21, повреждение ДНК (Burova et al., 2013; Borodkina et al., 2016). В настоящем исследовании культуры эМСК человека, которые были обработаны перекисью водорода (200 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 ч), на 3-и сут прекращали рост, останавливаясь в фазах G<sub>2</sub> и М клеточного цикла (рис. 1*а*, *в*). К этому времени увеличивался размер клеток, о чем свидетельствовало как повышение прямого светорассеяния клеток, так и возрастание содержания белка в каждой отдельной клетке (рис. 2а и рис. 1б). В остановленных культурах эМСК отмечали повышение автофлуоресценции, обусловленное накоплением в клетках липофусцина, что является общепризнанным маркером клеточного старения (рис. 26) (Bertolo et al., 2019; Shatrova et al., 2021). У клеток, обработанных H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, мембранный потенциал митохондрий был снижен, о чем свидетельствовало возрастание флуоресценции тетраметилродамина (рис. 2в) (Creed, McKenzie, 2019). Важно, что после обработки сублетальной дозой  $H_2O_2$  эМСК сохраняли высокую жизнеспособность. По данным проточной цитометрии на 5-е сут после окислительного стресса количество жизнеспособных (неокрашенным йодистым пропидием) клеток в остановленной культуре составляло  $91 \pm 7\%$  (*n* = 3), тогда как в растущей пролиферирующей культуре эМСК оно составляло  $96 \pm 5\%$  (n = 3). Совокупность полученных данных позволила далее использовать эМСК человека, обработанные сублетальной дозой H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, в качестве модели для изучения изменений ионного гомеостаза при развитии преждевременного клеточного старения.



**Рис. 2.** Показатели эМСК человека, индуцированных окислительным стрессом (действие  $H_2O_2$ , 1 ч). *а* – Прямое светорассеяние (FS), *б* – автофлюоресценция (АФ), *в* – митохондриальный мембраннй потенциал (ММП). Приведены средние значения и их ошибки из 3-х экспериментов, проведенных по одной схеме; различия по сравнению с контролем (К) считали достоверными при \**P* < 0.005.



**Рис. 3.** Изменение внутриклеточного содержания калия и натрия в эМСК по ходу их преждевременного старения, индуцированного окислительным стрессом. По горизонтали – время культивирования, сут. *a* – Внутриклеточное содержание калия в растущих (*кружки*) и остановленных (светлые столбики) эМСК;  $\delta$  – внутриклеточное содержание натрия в растущих (треугольники) и остановленных (светлые столбики) эМСК. Темные столбики – содержание калия (*a*) и натрия ( $\delta$ ) после обработки клеток H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 1 ч. Приведены средние значения и их ошибки (*n* = 3) из 4–8 экспериментов, проведенных по одной схеме. Достоверность различий между стресс-индуцированными и пролиферирующими клетками рассчитывали с использованием теста Тьюки, \**P* < 0.05.

Изменение внутриклеточного содержания калия и натрия в процессе преждевременного старения эМСК. Короткий кратковременный окислительный стресс (200 мкМ  $H_2O_2$ , 1 ч) вызывает снижает содержание калия и увеличивает содержание натрия в пролиферирующих эМСК (рис. 3, *темные столбики*). В результате реципрокного изменения содержания калия и натрия в клетках, обработанных  $H_2O_2$ , отношение содержания этих катионов ( $K_B/Na_B$ ) снижается с 7–8 до 3–3.5, что свидетельствует о нарушении ионного гетерогенитета, характерного для клеток животных. После замены среды на свежую, не содержащую  $H_2O_2$ , ионные градиенты постепенно восстанавливаются.

В течение первых 2-х сут после окислительного стресса культуры эМСК, находящиеся в полноценной питательной среде, продолжают расти, хотя и медленнее, чем пролиферирующие культуры, не подвергавшиеся стрессу, но к 3-м сут они прекращают пролиферировать и останавливаются, накапливаясь в фазах  $G_2/M$  и S клеточного цикла (рис. 1*a*, *θ*). В течение этого времени содержание калия снижается как в пролиферирующих, так и в стресс-индуцированных клетках (рис. 3*a*). Такое изменение содержания калия отражает общую закономерность, обусловленную тем, что независимо от типа клеток возрастание плотности культуры и снижение ее пролиферативной активности приводит к снижению внут-

риклеточного содержания калия (Марахова и др., 1985а, 19856; Marakhova et al., 2019а). Далее, в стрессиндуцированных клетках содержание калия достигает постоянного уровня, который ниже ( $652 \pm 41$  мкмоль на 1 г белка), чем в пролиферирующих культурах эMCK ( $795 \pm 39$  мкмоль на 1 г белка) (рис. 3a).

Важно отметить, что в наших исследованиях для оценки внутриклеточного содержания катионов измеряемое количество катионов нормировали на массу клеточного белка, определяемого в той же пробе. В клеточной биологии такая оценка изменений содержания внутриклеточных ионов широко используется. Действительно, существуют значительные трудности в оценке внутриклеточных концентраций ионов (когда содержание ионов рассчитывается на содержание воды в клетке) из-за отсутствия надежных методов оценки объемов клеток в асинхронно растущих культурах. Наиболее адекватный метол оценки содержания волы в нативных клетках – измерение плавучей плотности клеток – успешно используется при исследовании клеток, культивируемых в суспензии, но неприменим для клеток, растущих в монослое. Следует заметить, что предпринимаются попытки оценки ионных и других физиологических параметров у клеток в монослойных культурах после их снятия с субстрата, на котором прикрепляются и функционируют клетки.

Наш опыт показал, что клетки, кратковременно обработанные трипсином (0.05%) для отделения их от адгезионной поверхности, сохраняют нормальное, высокое содержания калия ( $624 \pm 28$  мкмоль на 1 г белка), но имеют повышенное содержание натрия (663  $\pm$  23 мкмоль на 1 г белка) и близкое к 1 отношение внутриклеточных катионов K<sub>в</sub>/Na<sub>в</sub>. Выяснилось также, что K<sub>в</sub>/Na<sub>в</sub> сохраняется низким, если клетки отмыть от трипсин-содержащей среды в свежей среде и далее подержать в суспензии 3 ч (более длительные наблюдения не проводили). Примечательно, что только после прикрепления к адгезивной поверхности в клетках постепенно восстанавливается низкое содержание натрия (108 ± 9 мкмоль на 1 г белка) и высокое отношение K<sub>в</sub>/Na<sub>в</sub>. На основании этих данных мы полагаем, что пламенно-эмиссионный метод измерения внутриклеточного содержания ионов является наиболее адекватным для изучения ионного гомеостаза клеток в монослойных культурах (Веренинов, Марахова, 1986). Метод позволяет определять как внутриклеточное содержание катионов в клетках, так и трансмембранные потоки ионов, используя ионы-аналоги (например, рубидий для оценки потоков калия), в монослойных культурах без снятия клеток с субстрата. Важно и то, что нормирование количества ионов на количество белка в каждом образце позволяет получить данные, способствующие пониманию механизма участия ионов (в нашем случае калия) в процессах роста и пролиферации клеток.

После окислительного стресса эМСК сохраняют жизнеспособность в культуре в течение длительного времени. Представлялось важным выяснить, как долго стареющие клетки способны поддерживать нормальные ионные градиенты. Как видно на рис. За, при длительном культивировании (до 22 сут) в стареющих эМСК содержание калия оставалось на постоянном уровне, который соответствовал содержанию калия в "ранних" стареющих клетках.

В течение первых 2-х сут после окислительного стресса внутриклеточное содержание натрия снижалось (рис. *36, столбики*). Однако по ходу культивирования стресс-индуцированных эМСК содержание натрия нарастало, оно увеличивалось от  $120 \pm 10$  до  $160 \pm 19$  мкмоль на 1 г белка, и в "поздних" стареющих эМСК содержание натрия оставалось повышенным. В совокупности, полученные данные свидетельствуют о том, что при длительном культивировании стресс-индуцированные эМСК сохраняют высокое внутриклеточное соотношение K<sub>в</sub>/Na<sub>в</sub>, характерное для функционально активных клеток в культуре, но имеют сниженное удельное содержание калия, рассчитанное на клеточный белок.

Транспорт рубидия (калия) и стресс-индуцированное старение эМСК. Изменения транспорта калия через плазматическую мембрану по ходу преждевременного старения оценивали, измеряя кратковременный вход рубидия в клетки (Marakhova et al., 1998). В пролиферирующих эМСК ингибируемый уабаином поток рубидия, который характеризует перенос калия через Na/K-насос, составляет более половины общего потока рубидия в клетку. Как и в пролиферирующих культурах эМСК, в первые сутки после окислительного стресса в условиях замедленного роста культуры, ингибируемый уабаином поток рубидия снижается (рис. 4*a*, *столбики*).

Как было показано ранее, снижение трансмембранных потоков рубидия (калия) в растущей клеточной культуре обусловлено плотностым торможением размножения клеток (Marakhova et al., 2019а). В первые сутки после стресса снижение ингибируемого уабаином потока рубидия является следствием постепенного замедления роста культуры эМСК. Далее, в процессе старения клеток, поток рубидия начинает нарастать, и на 22-е сут после стресса ингибируемый уабаином вход рубидия составляет 65 ± 4 (n = 4) против 40 ± 4 мкмоль на 1 г белка за 30 мин (n = 6) у клеток в 1-е сут после стресса (рис. 4*a*, *стол*бики). Наблюдаемое увеличение ингибируемого уабаином входа рубидия свидетельствуют о возрастании активности Na/K-насоса по ходу преждевременного старения.

Для того чтобы выяснить, чем обусловлена высокая активность ионного насоса в стареющих клетках, мы оценили коэффициенты скорости активного переноса ионов, которые рассчитывали как отношение ингибируемого уабаином входа рубидия в клетку к внутриклеточному содержанию натрия во время преж-

том 64 № 4 2022

цитология



**Рис. 4.** Изменение уабаин-чувствительного (*a*) и уабаин-резистентного (*б*) входа рубидия в процессе преждевременного старения эМСК, индуцированного окислительным стрессом. *a* – Уабаин-чувствительный поток рубидия в растущих (кружки) и остановленных (столбики) эМСК; *б* – уабаин-резистентный поток рубидия в растущих (треугольники) и остановленных (столбики) культурах эМСК. Приведены средние значения и их ошибки из 4–8 экспериментов, проведенных по одной схеме. Достоверность различий между стресс-индуцированными и пролиферирующими клетками рассчитывали с использованием теста Тьюки, \**P* < 0.05.

девременного старения эМСК (Jakobsson et al., 1980; Lew et al., 1986; Vereninov et al., 2008). Оказалось, что коэффициенты скоростей переноса ионов составляют 0.012–0.013 мин<sup>-1</sup> и не различаются для клеток в ранних и поздних стресс-индуцированных культурах эМСК. Таким образом, повышение входных потоков рубидия в процессе преждевременного старения эМСК не связано с изменением кинетических свойств Na/K-насоса, а является следствием нарастания содержания натрия в стареющих клетках.

В процессе старения, индуцированного окислительным стрессом, не ингибируемый уабаином пассивный транспорт рубидия (калия) через плазматическую мембрану не изменяется (рис. 46).

Сравнительное исследование основных характеристик ионного гомеостаза в процессе индуцированной окислительным стрессом остановки клеточного цикла в эМСК человека показало, что стареющие эМСК сохраняют высокий ионный гетерогенитет, характерный для функционально активных клеток животных. Развитие преждевременного старения сопровождается возрастанием внутриклеточного содержания натрия и трансмембранных потоков калия, сопряженных с функционированием Na/K-насоса. Индуцированная стрессом остановка клеточного цикла не влияет на пассивный транспорта калия через плазматическую мембрану. Отличительной особенностью стареющих эМСК по сравнению с пролиферирующими является сниженное внутриклеточное содержание калия в расчете на массу клеточного белка.

Преждевременное старение клеток связано с остановкой клеточного цикла, и выявляемое в на-

стоящей работе низкое удельное содержания калия в расчете на массу белка в стареющих клетках хорошо согласуется с представлением о том, что снижение этого показателя отражает прекращение клеточной пролиферации (Трошин и др., 1985). Наше недавнее исследование активации лимфоцитов человека показало также, что переход покоящихся клеток к пролиферации сопровождается нарастанием содержания в клетках не только калия, но и воды в расчете на массу клеточного белка (Marakhova et al., 2019b). Такое согласованное изменение содержания в клетках и калия, и воды приводит к тому, что в условиях интенсивного роста лимфоцитов, когда клеточный объем существенно увеличивается, концентрация калия в клетках поддерживается на постоянном уровне. Эти данные позволяют считать, что калий вовлечен в регуляцию пролиферации клеток в качестве того внутриклеточного иона, который, принимая участие в водно-осмотическом балансе клетки, контролирует изменение клеточного объема и способствует сохранению постоянства ионного состава клеток в условиях интенсивного роста при запуске пролиферации клеток или их трансформации.

Принимая во внимание исследования, в которых оценки внутриклеточного содержания калия и воды, а также объема клеток проводились одновременно на суспензионных покоящихся и пролиферирующих клетках (Yurinskaya et al., 2005; Marakhova et al., 2019b) и опираясь на теоретический анализ ионного и водного баланса у животных клеток (Jentsch, 2016; Vereninov et al., 2016; Yurinskaya et al., 2020), мы полагаем, что низкое удельное содержание калия в стрессиндуцированных эМСК свидетельствует о сниженном содержании воды в стареющих клетках. Чтобы проверить данное предположение, необходимо провести надежные измерения изменений объема стареющих клеток в условиях монослойной культуры.

Экспериментальных данных об изменениях гидратации клеток, связанных с пролиферативным статусом клеток, немного. Основываясь на данных о высоком содержании воды в эмбриональных и раковых клетках, повышенная гидратация клеток предложена в качестве важного фактора в поддержании злокачественного роста клеток и канцерогенеза (McIntvre, 2006, 2007). Предполагается, что связь между гидратацией клеток и их пролиферацией может отражать влияние макромолекулярного краудинга на метаболизм клетки и внутриклеточную сигнализацию (Lang et al., 1998; Burg, 2000; Burg et al., 2007; Zhou et al., 2008; Hoffman, Pedersen, 2011; Matsuda et al., 2014; Mourao et al., 2014; Wang et al., 2014; Rana et al., 2020). Данные, которые получены при измерении содержания воды в стареющих эритроцитах, указывают на то, что снижение содержания воды в клетках и макромолекулярный краудинг могут быть общим механизмом клеточного старения (Minton, 2020).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Т.А. Виноградовой за измерения ионного состава клеток методом пламенной фотометрии и обсуждение результатов исследования.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в соответствии с Государственным заданием Института цитологии РАН (FMFU-2021-0005).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Веренинов А.А., Виноградова Т.Т., Ивахнюк И.С., Марахова И.И., Торопова Ф.В. 1982. Применение эмиссионного анализа для исследования транспорта катионов через клеточную мембрану. Цитология. Т. 24. № 1. С. 98. (Vereninov A.A., Vinogradova T.A., Ivakhnyuk I.S., Marakhova I.I., Toropova F.V. 1982. The measurement of alkaline cation fluxes across a cell membrane by flame emission. Tsitologiya. V. 24. P. 98.)
- Веренинов А.А., Гусев Е.А., Казакова О.М., Клименко Е.В., Осипов В.В., Марахова И.И., Торопова Ф.В. 1991. Транспорт и распределение моновалентных катионов при бласттрансформации лимфоцитов периферической крови человека, активированных ФГА. Цитология. Т. 33. № 11. С. 78. (Vereninov A.A., Gusev E.V., Kazakova O.M., Klimenko E.E., Marakhova I.I., Osipov V.V.,

*Toropova F.V.* 1991. Transport and distribution of monovalent cations in human peripheral blood lymphocytes activated by phytohemagglutinin. Tsitologyia. V. 33. P. 78.)

- Веренинов А.А., Марахова И.И. 1986. Транспорт ионов у клеток в культуре. Л., Наука. (Vereninov A.A., Marakhova I.I. 1986. Ion transport in cultured cells. L., Nauka.)
- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А, Бичевая 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.B. 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization, and application as a feader layer for maintenance of human embryonic stem cells. Tsitologiya. V. 53. P. 919.)
- Марахова И.И., Поспелова Т.В., Виноградова Т.А., Веренинов А.А., Игнатова Т.Н. 1985а. Зависимость транспорта ионов через плазматическую мембрану от плотности клеточной культуры. І. Содержание калия и натрия и входной поток рубидия у трех линий клеток СНО. Цитология. Т. 27. № 9. С. 1011. (Marakhova I.I., Pospelova T.V., Vinogradova T.A., Vereninov A.A., Ignatova T.N. 1985a. Cation transport through plasms membrane related to the cell culture density.1.Potassium and sodium contents and cation fluxes in different lines of Chinese hamster ovary cells. Tsitologyia. V. 29. P. 1011.)
- Марахова И.И., Поспелова Т.В., Сальников К.В. 19856. Зависимость транспорта ионов через плазматическую мембрану от плотности клеточной культуры. II. Содержание калия и натрия и потоки рубидия и лития в ходе роста культур клеток L. Цитология. Т. 27. № 10. С. 1156. (Marakhova I.I., Salnikov K.V., Vinogradova T.A. 1985b. Cation transport through plasms membrane related to the cell culture density.2.Active and passive cation fluxes in growing L-cell cultures. Tsitologiya. V. 27. P. 1156.)
- Трошин А.С., Марахова И.И., Веренинов А.А., Виноградова Т.А., Ефимова Е.В., Игнатова Т.Н, Поспелова Т.В., Сальников К.В. 1985. Плотность культуры и транспорт ионов через плазматическую мембрану у трансформированных клеток. ДАН СССР. Т. 282. № 3. С. 1235. (Troshin A.S., Marakhova I.I., Vereninov A.A., Vinogradova T.A., Efimova E.V., Ignatova T.N., Salnikov K.V. 1985. Culture density and ion transport through the plasma membrane in transformed cells. Doklady Akademii nauk SSSR. V.
- Bertolo A., Baur M., Guerrero J., Pötzel T., Stoyanov J. 2019. Autofluorescence is a reliable in vitro marker of cellular senescence in human mesenchymal stromal cells. Sci. Rep. V. 9. P. 2074.
- Borodkina A.V., Shatrova A.N., Deryabin P.I., Griukova A.A., Abushik P.A., Antonov S.M., Nikolsky N.N., Burova E.B. 2016. Calcium alterations signal either to senescence or to autophagy induction in stem cells upon oxidative stress. Aging. V. 12. P. 3400.
- Burg M.B. 2000. Macromolecular crowding as a cell volume sensor. Cell. Physiol. Biochem. V. 10. P. 251.
- Burg M.B., Ferraris J.D., Dmitrieva N.I. 2007. Cellular response to hyperosmotic stresses. Physiol. Rev. V. 87. P. 1441.

- Burova E., Borodkina A., Shatrova A., Nikolsky N. 2013. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. Oxid. Med. Cell. Longev. 474931.
- *Creed S., McKenzie M.* 2019. Measurement of mitochondrial membrane potential with the fluorescent dye tetramethyl-rhodamine methyl ester (TMRM). Methods Mol. Biol. V. 1928. P. 69.
- Darborg B.V., Rentsch M.L., Rasmussen M. 2007. Regulation of mitogen-activated protein kinase pathways by the plasma membrane Na\_/H exchanger, NHE1. Arch Biochem Biophys. V. 462. P 195.
- Davan-Wetton C.S.A., Pessolano E., Perretti M., Montero-Melendez T. 2021. Senescence under appraisal: hopes and challenges revisited. Cell Mol. Life Sci. V. 78. P. 3333.
- *Ermolaeva M., Neri F., Ori A, Rudolph K.L.* 2018. Cellular and epigenetic drivers of stem cell ageing. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. V. 19. P. 594.
- Fine M., Lu F.M., Lin M.J., Moe O., Wang H.R., Hilgemann D.W. 2013. Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for studies of cardiac ion transporters. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. V. 305. P. 481.
- *Fridlyanskaya I., Alekseenko L., Nikolsky N.* 2015. Senescence as a general cellular response to stress: A minireview. Exp. Gerontol. V. 72. P. 124.
- Guerrero A., Herranz N., Sun B., Wagner V., Gallage S., Guiho R., Wolter K., Pombo J., Elaine I.E., Innes A.J., Birch J., Glegola J., Manshaei S., Heide D., Dharmalingam G. et al. 2019. Cardiac glycosides are broad-spectrum senolytics. Nat. Metab. V. 1. P. 1074.
- *Hernandez-Segura A., Nehme J., Demaria M.* 2018. Hallmarks of cellular senescence. Trends Cell Biol. V. 28. P. 436.
- Hoffmann E.K., Lamber I.H., Pedersen S.F. 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. Physiol. Rev. V. 89. P. 193.
- Hoffmann E.K., Pedersen S.F. 2011. Cell volume homeostatic mechanisms: effectors and signalling pathways. Acta Physiol (Oxf). V. 202. P. 465.
- *Jakobsson E.* 1980. Interactions of cell volume, membrane potential, and membrane transport parameters. Am. J. Physiol. Cell Physiol. V. 238. C196.
- *Jentsch T.J.* 2016. VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. V. 17. P. 293.
- Klausen T.K., Preisler S., Pedersen S.F., Hoffmann E.K. 2010. Monovalent ions control proliferation of Ehrlich Lettre ascites cells. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. V. 299. C714.
- Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegge S., Gulbins E., Häussinger D. 1998. Functional Significance of Cell Volume Regulatory Mechanisms. Physiol. Rev. V. 78. P. 247.
- Lang F., Föller M., Lang K. 2005. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. J. Membr. Biol. V. 205. P. 147.
- Lang F., Shumilina E., Ritte M., Gulbins E., Vereninov A., Huber S.M. 2006. Ion channels and cell volume in regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. Contrib. Nephrol. V. 152. P. 142.
- *Lew V.L., Bookchin R.M.* 1986. Volume, pH, and ion-content regulation in human red cells: analysis of transient behavior with an integrated model. J. Membr. Biol. V. 92. P. 57.
- Marakhova I.I., Vereninov A. A., Toropova F.V., Vinogradova T.A. 1998. Na,K-ATPase pump in activated human lymphocytes:

on the mechanisms of rapid and long-term increase in K influxes during the initiation of phytohemagglutinin-induced proliferation. Biochim. Biophys. Acta. V. 1368. P. 61.

- Marakhova I., Domnia A., Shatrova A., Borodkina A., Burova E., Pugovkina N., Zemelko V., Nikolsky N. 2019a. Proliferation-related changes in K<sup>+</sup> content in human mesenchymal stem cells. Sci. Rep. V. 9. P. 346.
- Marakhova I., Yurinskaya V., Aksenov N., Zenin V., Shatrova A., Vereninov A. 2019b. Intracellular K<sup>+</sup> and water content in human blood lymphocytes during transition from quiescence to proliferation. Sci. Rep. V. 9. P. 16253.
- Matsuda H., Putzel G.G., Szleifer I., Szleifer I. 2014. Macromolecular crowding as a regulator of gene transcription. Biophys. J. V. 106. P. 1801.
- *McIntyre G.I.* 2006. Cell hydration as the primary factor in carcinogenesis: A unifying concept. Med. Hypotheses. V. 66. P. 518.
- *McIntyre G.I.* 2007. Increased cell hydration promotes both tumor growth and metastasis: A biochemical mechanism consistent with genetic signatures. Med. Hypotheses. V. 69. P. 1127.
- *Minton A.P.* 2020. Water loss in aging erythrocytes provides a clue to a general mechanism of cellular senescence. Biophys. J. V. 119. P. 2039.
- *Mourao M.A., Hakim J.B., Schnell S.* 2014. Connecting the dots: the effects of macromolecular crowding on cell physiology. Biophys. J. V. 107. P. 2761.
- Pedersen S.F. 2006. The Na/H exchanger NHE1 in stress-induced signal transduction: implications for cell proliferation and cell death. Pflügers Arch. V. 452. P. 249–259.
- Pedersen S.F., Darborg B.V., Rentsch M.L., Rasmussen M. 2007. Regulation of mitogen-activated protein kinase pathways by the plasma membrane Na/H exchanger, NHE1. Arch. Biochem. Biophys. V. 462. P. 195.
- Putney L.K., Barber D.L. 2003. Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G<sub>2</sub>/M entry and transition. J. Biol. Chem. V. 278. P. 44645.
- Rana P.S., Kurokawa M., Model M.A. 2020. Evidence for macromolecular crowding as a direct apoptotic stimulus. J. Cell. Sci. V. 133. P. 243931.
- Rhinn M., Ritschka B., Keye W.M. 2019. Cellular senescence in development, regeneration and disease. Development. V. 146. dev151837. https://doi.org/10.1242/dev.151837
- Putney L.K., Barber D.L. 2003. Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G<sub>2</sub>/M entry and transition.
- J. Biol. Chem. V. 278. P. 44645. Scaduto R.C., Grotyohann L.W. 1999. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. Biophys. J. V. 76. P. 469.
- Shatrova A.N., Burova E.B., Kharchenk M.V., Smirnov I.S., Lyublinskaya O.G., Nikolsky N.N., Borodkina A.V. 2021. Outcomes of deferoxamine action on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced growth inhibition and senescence progression of human endometrial stem cells. Int. J. Mol. Sci. V. 22. P. 6035.
- *Tosteson D.C., Hoffman J.F.* 1960. Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. J. Gen. Physiol. V. 44. P.169.
- Vereninov A.A., Rubashkin A.A., Goryachaya T.S., Moshkov A.V., Rozanov Y.M., Shirokova A.V., Strelkova E.G., Lang F., Yurinskaya V.E. 2008. Pump and channel K<sup>+</sup>(Rb<sup>+</sup>) fluxes

- Vereninov I.A., Yurinskaya V.E., Model M.A., Vereninov A.A. 2016. Unidirectional flux balance of monovalent ions in cells with Na/Na and Li/Na exchange: experimental and computational studies on lymphoid U937 cells. PLoS One. V. 11. e0153284.
- Yu X., Li X., Jiang G., Wang X., Chang H.C., Hsu W.H., Li Q. 2013. Isradipine prevents rotenone-induced intracellular calcium rise that accelerates senescence in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Neuroscience. V. 246. P. 243.
- Yurinskaya V.E., Moshkov A.V., Rozanov Y.M., Shirokova A.V., Vassilieva I.O., Shumilina E.V., Lang F., Volgareva E.V., Vereninov A.A. 2005. Thymocyte K+, Na+ and water balance during dexamethasone- and etoposide-induced apoptosis. Cell. Physiol. Biochem. V. 16. P. 15.
- *Yurinskaya V.E., Vereninov I.A., Vereninov A.A.* 2020. Balance of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Cl<sup>-</sup> unidirectional fluxes in normal and apoptotic U937 cells computed with all main types of cotransporters. Front. Cell Dev. Biol. V. 8. P. 591872.
- Wang R., Ferraris J.D., Izumi Y., Dmitrieva N., Ramkissoon K., Wang G., Gucek M., Burg M.B. 2014. Global discovery of high-NaCl-induced changes of protein phosphorylation. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. V. 307. P. C442.
- Wang B., Kohli J., Demaria, M. 2020. Senescent cells in cancer therapy: friends or foes? Trends Cancer. V. 6. P. 838.
- *Zhou H.-X., Riva G., Minton A.P.* 2008. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. Annu. Rev. Biophys. V. 3. P. 375.

## Ion Homeostasis and Stress-Induced Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells

A. N. Shatrova<sup>a</sup>, A. P. Domnina<sup>a</sup>, N. A. Pugovkina<sup>a</sup>, and I. I. Marakhova<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia \*e-mail: iim@incrus.ru

Human endometrial mesenchymal stem cells (hMESC) subjected to sublethal oxidative stress enter the premature senescence. Here, we studied the changes in ionic homeostasis associated with the premature senescence progression in human eMSCs. Using the method of flame photometry to assess the intracellular content of potassium and sodium as well as the potassium fluxes across the plasma membrane, it is shown that during the oxidative stress-induced cell cycle arrest and the premature senescence progression, eMSCs retain high ionic heterogeneity, which is characteristic of functionally active animal cells. The senescence progression is accompanied by an increase in intracellular sodium content and in potassium fluxes associated with the Na/K pump, but does not affect the passive transport of potassium across the plasma membrane. A peculiar feature of senescent eMSCs is a low intracellular potassium content ( $500-600 \mu mol./g$ ) compared to proliferating eMSCs ( $800-900 \mu mol./g$ ). It is suggested that the decrease in intracellular potassium content associated with the premature senescence progression reflects the involvement of potassium ions in the regulation of cell volume and may indicate a reduced hydration of senescent eMSCs.

*Keywords:* cell potassium content, potassium fluxes, Na/K pump, oxidative stress, premature senescence, human endometrial mesenchymal stem cells

УДК 57.085.23

# АНАЛИЗ ПЕРЕСТРОЕК ФИБРИЛЛЯРНОГО АКТИНА В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ FetMSC С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФРАКТАЛЬНОЙ РАЗМЕРНОСТИ МИНКОВСКОГО

© 2022 г. А. В. Ревитцер<sup>1, \*</sup>, В. И. Чубинский-Надеждин<sup>1</sup>, Ю. А. Негуляев<sup>1</sup>

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

\**E-mail: eetytnet@gmail.com* Поступила в редакцию 15.03.2022 г. После доработки 15.03.2022 г. Принята к публикации 22.03.2022 г.

Квантификация перестроек фибриллярного актина с использованием микрофотографий возможна не только с помощью стандартного измерения относительной интенсивности флуоресценции, но и с помощью разработанного нами нового подхода на базе расчета фрактальной размерности Минковского. Для вычисления фрактальной размерности использовали плагин FracLac для ImageJ. Перестройки фибриллярного актина выявляли в мезенхимных стволовых клетках человека линии FetMSC после воздействия ингибитора полимеризации актина латрункулина Б или предсердного натрийуретического пептида, влияние которого на актиновый цитоскелет мезенхимных стволовых клетках. Полученные размерно пами ранее. Проведенный в данной работе анализ изображений выявил изменения параметра фрактальной размерности, отражающие реорганизацию микрофиламентов в нативных клетках. Полученные результаты демонстрируют, что фрактальная размерность Минковского является удобным инструментом для оценки перестроек фибриллярного актина и может использоваться, дополняя или заменяя результаты измерения относительной интенсивности флуоресценции.

*Ключевые слова*: фибриллярный актин, фрактальная размерность Минковского, мезенхимные стволовые клетки человека

DOI: 10.31857/S0041377122040071

Многие биологические структуры и клеточные органеллы, такие как цитоскелет, комплекс Гольджи, дендриты нейронов, внутренние мембраны митохондрий (кристы) обладают сложной геометрической формой. В ряде случаев количественная морфометрическая оценка таких объектов практически невозможна, что накладывает ограничения на применение сравнительного анализа состояния данных структур, например, при оценке действия различных биологически активных соединений. Одним из решений может быть использование фрактальной геометрии. в рамках которой изображения таких структур рассматриваются как геометрические фигуры, и далее проводится их количественная оценка с применением фрактальной размерности Минковского ( $\Phi$ PM, или box-counting алгоритм; Karperien, 2004). Понятие "фрактал" впервые ввел Бенуа Мандельброт (Mandelbrot, 1983), и по его определению фрактал – это самоподобная структура, а фрактальная размерность - это мера ее геометрической сложности. Для проведения вычислений фрактальной размерности изображений были созданы различные программные продукты, среди которых можно выделить плагин FracLac (Karperien, 2004) как дополнение для свободно распространяемого программного обеспечения ImageJ. Его преимуществами являются бесплатный доступ, понятный интерфейс и настройки, позволяющие точно подобрать параметры вычисления для интересующего набора изображений.

Одним из объектов в клеточной биологии, которые нуждаются в качественной и количественной оценке, является фибриллярный (F) актин. F-актин (состоящий из глобулярного G-актина) и актинсвязывающие белки формируют актиновый цитоскелет клетки (Fletcher, Mullins, 2010). В структуре цитоскелета нативных клеток F- и G-актин находятся в постоянном динамическом балансе: с плюсконца нити происходит сборка филамента, а с минус-конца его разборка (Neuhaus et al., 1983). Актиновый цитоскелет имеет критическое значение для клеточной подвижности и миграционного потенциала немышечных клеток как в норме, так и при различных патологиях, включая метастазирование и

Принятые сокращения: ИФ – интенсивность флуоресценции; ПНП – предсердный натрийуретический пептид; ФРМ – фрактальная размерность Минковского; DMSO – диметилсульфоксид; Lat B – латрункулин Б.

диссеминацию раковых клеток. Наиболее широко распространенным методом выявления F-актина в клетках является флуоресцентная микроскопия. В препаратах клеток F-актин окрашивают специфическими антителами, или с помощью фаллоидина, природного актин-связывающего соединения рода фаллотоксинов, конъюгированного с флуоресцентными красителями. Важно отметить, что фаллоидин специфически связывается с нитями F-актина, и, в то же время, не способен присоединяться к G-актину (Cooper, 1987).

Ранее нами было обнаружено, что предсердный натрийуретический пептид (ПНП) способен влиять на организацию F-актина и подвижность мезенхимных стволовых клеток линии FetMSC (Ревитцер и др., 2019). Цель настоящей работы заключается в проведении количественной оценки состояния структур F-актина в клетках FetMSC, обработанных ПНП или латрункулином Б (Lat B), с помощью вычисления фрактальной размерности Минковского (Revittser et al., 2021).

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Мезенхимные стволовые клетки, выделенные из костного мозга 5-6 недельного эмбриона человека (FetMSC) получены из Центра коллективного пользования ИНЦ РАН (Санкт-Петербург) "Коллекция культур клеток позвоночных" (Соглашение № 075-15-2021-683) (Крылова и др., 2012). Перед экспериментами клетки высевали на покровные стекла, помещенные в чашки Петри, плотность составляла 10<sup>4</sup> клеток/см<sup>2</sup>. В качестве питательной среды использовали DMEM/F12 (Биолот, Россия), содержащую 10% сыворотки плодов коровы (HyClone, США), 2 мМ L-глутамина, смесь пенициллина (50 Ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) (Биолот, Россия). Клетки культивировали в инкубаторе при 37°С, 5% СО<sub>2</sub> и 90%-ной влажности, смену среды проводили каждые 2-3 сут, эксперименты проводили на клетках. достигших субконфлюентности.

Обработка модификаторами актинового цитоскелета. В работе использовали хорошо изученный модификатор актинового цитоскелета токсин биологического происхождения Lat B (Spector et al., 1989). Lat В растворяли в DMSO (25 мг/мл). Механизм действия Lat В на актиновый цитоскелет клетки известен: связываясь с мономерами актина в стехиометрии 1:1 он ингибирует его полимеризацию, что препятствует образованию новых актиновых филаментов. Обработку клеток Lat B в концентрации 10 или 1000 нМ в среде культивирования проводили в течение 30 мин в СО<sub>2</sub>-инкубаторе; в качестве контроля использовали клетки без обработки или клетки после действия 1 мкМ диметилсульфоксида (DMSO, растворителя для Lat B). Во второй серии экспериментов клетки обрабатывали ПНП в концентрации 10 или 1000 нМ в течение 24 ч в СО<sub>2</sub>-инкубаторе; контрольными служили клетки без обработки (растворитель для ПНП – дистиллированная вода).

Выявление F-актина в клетках FetMSC. После культивирования с исследуемыми веществами клетки фиксировали 10 мин при 25°С 5%-ным раствором формальдегида в однократном фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). Затем проводили пермеабилизацию клеточной мембраны с помошью 0.5%-ного раствора Triton X-100 (10 мин в PBS). Для флуоресцентного мечения F-актина образцы инкубировали с фаллоидином, конъюгированным с родамином (TRITC-phalloidin, 1 мкг/мл; Sigma-Aldrich, Германия) в течение 15 мин при 37°С. Ядра окрашивали с помощью красителя Hoechst 33342 (Sigma, США; 2 мкг/мл в PBS). Далее покровные стекла крепили к предметному стеклу, используя среду Vectashield Mounting Media (Vector Labs, США), препятствующую "выгоранию" образцов. Микрофотографии получали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Olympus Corporation, Япония), укомплектованного лазерами с длиной волны возбуждения 561 и 350 нм (для выявления родаминфаллоидина и красителя Hoechst 33342 соответственно). Параметры мощности лазеров, апертурной диафрагмы, свойства регистрирующих фотоумножителей были постоянными при визуализации всех препаратов.

Измерение относительной интенсивности флуоресценции (ИФ) и фрактальной размерности Минковского. Использовали программу ImageJ (NIH, США). Предварительно в меню Analyze  $\rightarrow$  Set measurements устанавливали измерение "среднее значение серого" (Mean gray value). Далее в микрофотографии выделяли слой, содержащий изображение F-актина, и переводили его в 8-битный формат, содержащий только оттенки серого (функция Image  $\rightarrow$  Type  $\rightarrow$  8-bit). После этого с помощью курсора выделяли область клетки "свободное выделение" (Freehand selection) и получали значение ИФ выделенного участка с помощью функции Analyze → Measure. Данные заносили в таблицу Microsoft Excel (Microsoft Ofiice, США), итоговые значения ИФ представлены средними из 10 измерений (*n*) и их стандартной ошибки, достоверность различий оценивали с помощью дисперсионного анализа с уровнем значимости P < 0.05.

Измерение ФРМ проводили с помощью плагина FracLac (NIH, США). Предварительно в плагине устанавливали тип измерений Box-counting. Далее с помощью функции Image → Color → Split Channels в микрофотографии выделяли канал, содержащий изображение F-актина. После этого полученное изображение F-актина. После этого полученное изображение переводили в черно-белый формат с помощью функции Process → Binary → Make Binary и возвращали "скелет" фигуры с помощью Process → → Binary → Skeletonize. Затем с помощью курсора (Freehand selection) выделяли область клетки и в плагине FracLac проводили расчет ФРМ с помощью функции Scan. Полученные данные вносили в таб-



**Рис. 1.** Флуоресценция F-актина (красный цвет) клеток FetMSC, окрашенных родамин-фаллоидином в контроле (*a*) и после 30-минутного действия Lat B в концентрации 50 нМ (*в*) и 1000 нМ (*г*). *б* – После 30-минутного действия 1000 нМ DMSO (растворителя Lat B). Ядра окрашены Hoechst (синий цвет). Масштабная линейка: 50 мкм.

лицу Excel, итоговые значения ФРМ представлены средними из 10 измерений (n = 10) и их стандартной ошибки, достоверность различий оценивали с помощью дисперсионного анализа с уровнем значимости P < 0.05.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Окрашивание F-актина в клетках FetMSC после лействия Lat B. Известно, что фаллоилин специфично связывается с F-актином, поэтому качественная и количественная оценка окрашенных нитей актина может отражать сборку или разборку актинового цитоскелета (Cooper, 1987). Мы окрашивали F-актин клеток FetMSC родамин-фаллоидином в контроле (рис. 1*a*), и в образцах, обработанных 1000 нМ DMSO (растворителем Lat B; рис. 1б) и Lat B в концентрации 50 нМ (рис. 1в) и 1000 нМ (рис. 1г). В контрольных условиях, как и в присутствии DMSO или 50 нМ Lat В все клетки имеют фибробластоподобную морфологию и выраженные стресс-фибриллы, что типично для меземхимных стволовых клеток. Как и следовало ожидать, после обработки клеток 1000 нМ Lat В мы не наблюдали выраженных стресс фибрилл, а само окрашивание было дисперсным и не имело четко выраженной организации. Полученные результаты согласуются с описанным ранее в литературе действием Lat B: при малых концентрациях (менее 50 нМ) вещество не оказывает влияния на актиновые структуры, а при концентрациях 500 нМ и выше ингибирует сборку актиновых фибрилл в клетке (Wakatsuki et al., 2001), что приводит к паттерну флуоресцентного окрашивания, схожему с наблюдаемым нами в FetMSC. Процессы формирования нитей актина в клетке динамичны, а именно включают в себя постоянную сборку нити с одного конца и ее разборку с другого; по этой причине ингибирование сборки нитей при инкубации Lat В вызывает ее последующую разборку (Spector et al., 1989).

Численная оценка разборки F-актина после действия Lat B. Оценку (в каждой крупе было по 10 клеток) проводили двумя методами: с помощью вычисления ИФ или ФРМ (рис. 2 и табл. 1). Применяя дисперсионный анализ, мы не выявили отличий между контрольной группой клеток и группой, обработанной 1000 нМ DMSO ни по параметру ИФ, ни по параметру ФРМ, что указывает на отсутствие влияния растворителя DMSO на F-актин FetMSC. Кроме того, не было выявлено различий между контрольной группой и группой, обработанной 10 нМ Lat B. Мы предполагаем, что этой концентрации вещества, по-видимому, недостаточно для детектируемого ингибирования полимеризации актина и разрушения цитоскелета за 30 мин действия. Наши результаты согласуются с данными из литературы. Так, показано, что при воздействии Lat В в концентрации 10 нМ на клетки линии NIH/3T3 в течение 30 мин перед фиксацией не выявлено значимых различий в структуре F-актина по сравнению с контролем ни с помощью визуального анализа микрофотографий, ни с помощью сравнения значений ИФ (Liu et al., 2020). Другие авторы также не наблюдали изменений свойств клеток при воздействии Lat В в концентрациях ниже 50 нМ (Wakatsuki et al., 2001). Мы обнаружили достоверные различия средних значений  $И\Phi$  и  $\Phi PM$  между контрольной группой и группой, обработанной 1000 нМ Lat B, что совпадает с визу-



**Рис. 2.** Интенсивность флуоресценции (ИФ) (*a*) и фрактальная размерность Минковского (ФРМ) (*b*) F-актина в контроле и при действии Lat B в разной концентрации. Представлены средние значения и стандартная ошибка среднего. Отличия от контроля (K) достоверны при \*P < 0.05 или \*\* $P < 5 \times 10^{-7}$ .

альной оценкой микрофотографий окрашенного F-актина (рис. 1).

Таким образом, наблюдаемые изменения структуры F-актина были подтверждены при численной оценке как с помощью измерений ИФ, так и при расчете ФРМ, при этом уровни достоверной значимости различий составили P < 0.05 для ИФ и  $P < 5 \times 10^{-7}$  для ФРМ, которые свидетельствуют о том, что оценка значений ФРМ является более чувствительным показателем, чем ИФ в данной серии экспериментов.

Оценка изменений структуры F-актина в FetMSC после действия ПНП. В настоящей работе, как и ранее (Ревитцер и др., 2019), мы наблюдали сборку F-актина при воздействии ПНП в концентрации 10 нМ в течение 24 ч перед фиксацией (рис. 3a-e). Эти результаты подтверждаются анализом литературы: показано, что добавление 10 нМ ПНП в культуральную среду эндотелиальных клеток аорты вызывает сборку F-актина (Kook et al., 2003; Chen et al.,

Таблица 1. Значения показателей ИФ и ФРМ в клетках FetMSC контрольных и после обработки Lat В или ПНП в различных концентрациях

Условия	ИФ, отн. ед.	ФРМ, отн. ед.					
Lat В в течение 30 мин							
Контроль	$1624\pm438$	$1.54\pm0.06$					
DMSO, 1000 нМ	$1633 \pm 336$	$1.52\pm0.08$					
Lat B, 10 нМ	$1625 \pm 325$	$1.57\pm0.08$					
Lat B, 1000 HM	$*1177 \pm 350^{a}$	$1.40\pm0.07^6$					
ПНП в течение 24 ч							
Контроль	$1824\pm237$	$1.45 \pm 0.05$					
10 нМ ПНП	$2408\pm292^{\rm a}$	$1.56\pm0.05^{\mathrm{a}}$					
1000 нМ ПНП	$1751 \pm 201$	$1.43 \pm 0.04$					

**Примечание**. Приведены средние значения и их стандартные ошибки. Различия по сравнению с контролем достоверны при  ${}^{a}P < 0.05 \text{ и} {}^{6}P < 5 \times 10^{-7} (n = 10 \text{ в каждой группе}). Значения ИФ при действии ПНП взяты из: Ревитцер и др. 2019.$ 

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

2008). В то же время мы не обнаружили различий организации F-актина между контрольными клетками и клетками, обработанными 1000 нМ ПНП, что тоже согласуется с нашими предыдущими результатами (Ревитцер и др., 2019). Этот факт вызывает особый интерес, а анализ литературы позволяет обнаружить, что существует несколько примеров веществ, которые оказывают действие только в малых концентрациях, а при ее повышении эффекта нет. Среди таких веществ можно выделить трансформирующий фактор роста  $\beta$ 1 (Реррег et al., 1993) и бортезамиб (Veschini et al., 2007). Подобный тип влияния называется U-образным (u-shape) или bell-образным (bell-shape) (Reynolds et al., 2010).

Численная оценка перестроек F-актина после действия ПНП. Мы оценили ФРМ F-актина для клеток, обработанных ПНП в различных концентрациях в течение 24 ч перед фиксацией и окрашиванием (рис. 3, табл. 1). В табл. 1 показано сопоставление значений ФРМ, полученных в настоящей работе, со значениями ИФ, рассчитанными нами ранее (Ревитцер и др., 2019). Выявленные в настоящей работе значения ФРМ составили для контрольной группы  $1.45 \pm 0.05$  отн. ед.; для клеток, обработанных 10 или 1000 нМ ПНП,  $1.56 \pm 0.05$  и  $1.43 \pm 0.04$  отн. ед. соответственно.

Применяя дисперсионный анализ, мы выявили различия значений как ФРМ, так и в ИФ между контрольной группой и группой клеток, обработанных 10 нМ ПНП. Однако мы не выявили различий между контролем и группой клеток, обработанных ПНП в большей концентрации (1000 нМ). Уровни значимости составили P < 0.05 как для ИФ, так и для ФРМ, что указывает на схожий уровень чувствительности используемых методов и оценок в данной серии экспериментов. Полученные результаты согласуются с визуальной оценкой микрофотографий и данными, опубликованными ранее (Ревитцер и др., 2019), в том числе показывающими изменение подвижности FetMSC при воздействии только 10 нМ ПНП.

Качественная оценка изменений F-актина не всегда является надежным методом, так как во мно-



**Рис. 3.** Флуоресцентное окрашивание F-актина клеток FetMSC в контроле и после 24-часового действия ПНП. *a* – Контроль (К);  $\delta$  – 10нМ ПНП; *s* – 1000 нМ ПНП; *c* – ФРМ изображений F-актина, приведены средние значения и стандартная ошибка среднего, различия достоверны при \**P* < 0.05. Масштабная линейка: 100 мкм.

гом зависит от личного мнения исследователя, осуществляющего эту оценку. Чтобы обеспечить объективность оценки результатов экспериментов, следует прибегнуть к количественным методам. В настоящей работе были рассмотрены два метода квантификации: измерение относительной ИФ и ФРМ. Оба метода показали себя способными выявлять и подтверждать изменения организации F-актина при действии биологически активных веществ (Lat B и ПНП), причем в случае с Lat В достоверность измеряемых значений различий была существенно выше в случае ФРМ, чем ИФ. В настоящее время чаще оценивают ИФ, чем ФРМ для квантификации изменений, что можно связать с простотой регистрации в ходе расчета ИФ. Однако необходимо заметить, что ФРМ, в отличие от ИФ, позволяет учитывать не саму интенсивность свечения флуоресцентных изображений Fактина, а именно форму и расположение актиновых фибрилл. Таким образом, разные принципы получения численных значений делают ФРМ и ИФ взаимодополняющими методами при квантификации изображений F-актина.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д.б.н. Морачевской Е.А. за обсуждение результатов и чтение рукописи.

Клетки FetMSC получены из Центра Коллективного Пользования "Коллекция культур клеток позвоночных" Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), поддержанного Минобрнауки РФ (Соглашение № 075-15-2021-683).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Крылова Т.А., Кольцова А.М., Зенин В.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2012. Сравнительные характеристики новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и крайней плоти человека. Цитология. Т. 54. С. 5. (Krylova T.A., Koltsova A.M., Zenin V.V., Musorina A.S., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2012. Comparative characteristics of new mesenchymal stem cell lines derived from human embryonic stem cells, bone marrow and foreskin. Tsitologiya. V. 54. P. 5.)
- Ревитцер А.В., Чубинский-Надеждин В.И., Негуляев Ю.А. 2019. Влияние предсердного найтрийуретического пептида на реорганизацию актинового цитоскелета и миграцию мезенхимных стволовых клеток человека. Цитология. Т. 61. С. 817. (Revittser A.V., Chubinsky-Nadezhdin V.I., Neguliaev Yu.A. 2018. The Effect of Atrial Natriuretic Peptide on Reorganization of Actin Cytoskeleton and Migration of Human Mesenchymal Stem Cells. Tsitologiya. V. 61. P. 817.)
- Chen H., Levine C., Golan E., Michel T., Lin J. 2008. Atrial natriuretic peptide-initiated cGMP pathways regulate vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and angiogenesis in vascular endothelium. J. Biol. Chem. V. 283. P. 4439.
- *Cooper J.A.* 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. J. Cell Biol. V. 105. P. 1473.
- Fletcher D.A., Mullins R.D. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. Nature. V. 7280. P. 485.

- *Karperien A.* 2004. Defining microglial morphology: Form, function, and fractal dimension. Melbourne: Charles Sturt University.
- Kook H., Itoh H., Choi B., Sawada N., Doi K., Hwang T., Kim K., Arai H., Baik Y., Nakao K. 2003. Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration in vitro. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. V. 284. P. H1388.
- Liu Y., Mollaeian K., Shamim M.H., Ren J. 2020. Effect of F-actin and microtubules on cellular mechanical behavior studied using atomic force microscope and an image recognition-based cytoskeleton quantification approach. Int. J. Mol. Sci. V. 21. P. 392.
- Neuhaus J.-M., Wanger M., Keiser T., Wegner A. 1983. Treadmilling of actin. J. Muscle Res. Cell Motil. V. 4. P. 507.
- *Mandelbrot B. B.* 1983. The irregular and fragmented nature in the fractal geometry of nature. N.Y.: Macmillan Publishers.
- Pepper M.S., Vassalli J.D., Orci L., Montesano R. 1993. Biphasic effect of transforming growth factor-beta 1 on *in vitro* angiogenesis. Exper. Cell Res. V. 204. P. 356.
- *Reynolds A.R.* 2010. Potential relevance of bell-shaped and ushaped dose-responses for the therapeutic targeting of angiogenesis in cancer. Dose-Response. V. 8. P. 253.
- Revittser A., Selin I., Negulyaev Y., Chubinskiy-Nadezhdin V. 2021. The analysis of F-actin structure of mesenchymal stem cells by quantification of fractal dimension. PloS One. V. 16. P. e0260727.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260727

- Spector I., Shochet N.R., Blasberger D., Kashman Y. 1989. Latrunculins-novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. Cell Motil. Cytoskeleton. V. 13. P. 127.
- Veschini L., Belloni D., Foglieni C., Cangi M.G., Ferrarini M., Caligaris-Cappio F., Ferrero E. 2007. Hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha determines sensitivity of endothelial cells to the proteosome inhibitor bortezomib. Blood. V. 109. P. 2565.
- Wakatsuki T., Schwab B., Thompson N.C., Elson E.L. 2001. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. Journal of cell science. V. 114. P. 1025.

# The Analysis of F-Actin Rearrangement in FetMSC Human Mesenhymal Stem Cell Line Using Minkovsky Fractal Dimension

#### A. V. Revittser<sup>a, \*</sup>, V. I. Chubinskiy-Nadezhdin<sup>a</sup>, and Y. A. Negulyaev<sup>a</sup>

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

\*e-mail: eetytnet@gmail.com

Quantification of fibrillar actin rearrangements using cell microphotographs is possible not only with the routine measurement of the relative fluorescence intensity, but also using Minkowski's fractal dimension. Here, the FracLac plugin for ImageJ was used to calculate the fractal dimension. Fibrillar actin rearrangements were detected in FetM-SC human mesenchymal stem cell line after incubation of the cells with actin polymerization inhibitor latrunculin B or atrial natriuretic peptide, whose effect on the actin cytoskeleton was recently revealed. The analysis of the images allowed us to reveal the changes in fractal dimension that reflected the reorganization of microfilaments in the native cells. The results have demonstrated that the Minkowski fractal dimension is a convenient tool for evaluating the changes in F-actin structure, and can be successfully used as supplement or replacement for measuring the relative fluorescence intensity.

Keywords: fibrillar actin, Minkowski fractal dimension, human mesenchymal stem cells

УДК 57.085.23:57.043

# КРИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛЕТОК С ФЕНОТИПОМ, ПОДОБНЫМ МЕЗЕНХИМНЫМ СТВОЛОВЫМ, ВЫДЕЛЕННЫМ ИЗ ПОДКОЖНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. И. П. Савченкова<sup>1, \*</sup>, Е. А. Савченкова<sup>1</sup>, М. И. Гулюкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Москва, 109428 Россия

> \**E-mail: s-ip@mail.ru* Поступила в редакцию 17.03.2022 г. После доработки 20.04.2022 г. Принята к публикации 25.04.2022 г.

В медицине, в том числе ветеринарной, интенсивно развивается направление, которое рассматривает применением низких температур в лечении различных заболеваний человека и животных. Конкретные механизмы устойчивости различных типов клеток к холоду до сих пор остаются неясными и требуют дальнейшего изучения. Ранее была получена линия клеток с фенотипом, подобным мезенхимным стволовым клеткам (MCK), из подкожно-жировой ткани (ПЖТ) человека, замороженной без криопротектора ( $-70^{\circ}$ C). Представляло интерес сравнить *in vitro* реакцию этих клеток на действие низких температур ( $-70 \text{ u} - 196^{\circ}$ C при времени экспозиции 15, 30 и 60 с), с реакцией МСК, выделенными из свежеизолированной ПЖТ. Анализ результатов продемонстрировал, что МСК из ПЖТ устойчивы к воздействию изученных параметров низких температур. Температура  $-70^{\circ}$ C не оказывала отрицательного действия на клетки обоих вариантов ни в одном из указанных временных параметров. После пребывание в жидком азоте и оттаивания во всех вариантах наблюдали разрыв монослоя и высокую долю клеток с поврежденной цитоплазматической мембраной. Клетки формировали монослой, но с различной скоростью, размножались, сохраняли иммунофенотип (CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD49a<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA ABC<sup>+</sup>) и способность при индукции формировать клетки жировой ткани *in vitro*. Наиболее устойчивыми к действию низких температур являются MCK, выделенные ранее из замороженной ПЖТ человека. Полученные результаты могут быть полезными для дальнейшего изучения процессов и механизмов, лежащих в основе адаптации клеток млекопитающих к холоду.

*Ключевые слова*: подкожно-жировая ткань, человек, собака, мезенхимные стволовые клетки, низкие температуры, жизнеспособность, влияние на функцию

DOI: 10.31857/S0041377122040095

Изучение действия низких температур на молекулярно-клеточные изменения биологических объектов и их функцию позволяет создать новейшие криотехнологии и внедрять в медицину методы улучшения здоровья людей и животных. Исследования патофизиологических, биохимических, морфологических и иммунологических процессов на клеточном, тканевом и организменном уровнях позволили научно обосновать применение криохирургии, криотерапии и гипотермии в медицинской практике, а также обеспечить развитие нового направления в современной медико-биологической науке — биомедицинские клеточные продукты и их потенциальные возможности для медицины (Федеральный закон № 180-ФЗ от 23 июня 2016 г. "О биомедицинских клеточных продуктах").

Все существующие подходы к лечению болезней с помощью криохирургии и криотерапии сформировались на основе данных классической криобиологии и методов, разработанных для криоконсервации клеток (Ревишвили и др., 2019). Криобиология обеспечила длительное хранение клеток и тканей различного происхождения (Грищенко, 2008). Вместе с тем конкретные механизмы, лежащие в основе разной устойчивости клеток и тканей организма к действию низких температур, остаются невыясненными до сих пор и требуют дальнейшего изучения. Вопрос о реакшии клеток раннего гистогенеза (эмбрионального, плодового), стволовых и их потомков на охлаждение и криоконсервирование и характере изменений в биологических структурах разного срока развития при этом остается недостаточно изученным. Использование лечебного действия холода на организм невозможно без углубленного понимания явлений и процессов, которые происходят в охлаждаемых и замо-

*Принятые сокращения:* МСК – мезенхимные стволовые клетки; ПЖТ – подкожно-жировая ткань; СК – стволовые клетки;

раживаемых клетках и тканях (Gao, Crister, 2000; Fowler, Toner, 2005).

В криотерапии воспаления забрюшинной (парапанкреатической) жировой ткани, которая окружает поджелудочную железу, используют обработку жидким азотом. Ранее мы показали, что в жировой ткани человека, подвергнутой низкотемпературному шоку ( $-70^{\circ}$ С без криопротектора) сохраняется клеточная популяция со свойствами мезенхимных стволовых клеток (MCK) (Савченкова, Коржикова, 2009). Поэтому мы предположили, что после криотерапии жировой клетчатки поджелудочной железы в ней могут сохраняться популяции клеток, подобные полученной нами, которые не теряют свои свойства, в том числе способность к регенерации.

Представляло интерес предварительно изучить действие низких температур, в том числе жидкого азота, на клетки с фенотипом мезенхимных стволовых, выделенных из подкожно-жировой ткани (ПЖТ) человека *in vitro*. Клетки, выделенные из стромальной фракции ПЖТ человека обладают свойствами, схожими с МСК, полученными из костного мозга человека (Тепляшин и др., 2005). В настоящий момент МСК из ПЖТ человека рассматриваются как перспективный материал для регенеративной и восстановительной медицины, который требует стандартизации и безопасности. Не менее важным является изучение молекулярно-генетических свойств МСК в условиях хранения при низких температурах, которые могут оказывать существенное влияние на качество клеточного материала (Erol et al., 2021).

Кроме того, использование низких температур представляет собой усовершенствованный подход к краткосрочному сохранению для обеспечения готовых источников клеток для стремительно развивающейся клеточной медицины и биоинженерии (Huang et al., 2020). Биологический метаболизм в живых клетках резко снижается при низких температурах, что позволяет долгосрочно сохранять живые клетки и ткани in vitro, как для научных исследований, так и для многих медицинских и промышленных применений, например, переливания крови, трансплантации костного мозга, искусственного оплодотворения. Выживаемость клеток связана с физическими реакциями всей клетки в ответ на физико-химические события, вовлеченные в процесс действия низких температур (Cusker, 2020). Поэтому адаптация клеток к холоду, в том числе стволовых, представляет интерес.

Цель данной работы заключалась в изучении реакции клеток с фенотипом, подобным мезенхимным стволовым, выделенным из подкожно-жировой ткани млекопитающих, в том числе ранее подвергнутой низкотемпературному шоку, на быстрое охлаждение в отсутствие криопротектора.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки и культивирование. Эксперименты проводили на клетках с фенотипом, подобным МСК, которые были выделены из стромально-васкулизированной фракции свежеизолированной ПЖТ человека и собак, а также из ПЖТ, подвергнутой ранее низкотемпературному шоку (—70°С без криопротектора). Клетки были взяты из криобанка лаборатории стволовых клеток при ФНЦ ВИЭВ РАН.

Все МСК культивировали в среде DMEM с низким (1 г/л) содержанием глюкозы, с 10% сыворотки крови плодов коровы (СКПК) (HyClone, Perbio, Бельгия) и с однократным раствором заменимых аминокислот и антибиотиков. Конечная концентрация стрептомицина в среде составляла 50 мкг/мл, а пенициллина — 50 ед/мл. Для культивирования клетки пассировали в плотности 5 × 10<sup>3</sup> кл./см<sup>2</sup>. Все перечисленные реактивы от фирмы ПанЭко (Россия).

Быстрое охлаждение клеток. Для изучения действия низких температур один из двух культуральных флаконов (площадь  $25 \text{ см}^2$ ) с монослоем одних и тех же клеток на 3-м пассаже, помещали в холодильник при  $-70^{\circ}$ С (Haier, Китай), а второй — в жидкий азот при  $-196^{\circ}$ С. Время нахождения клеток при указанных температурах составляло 15, 30 и 60 с. Оценку клеток проводили сразу после оттаивания (при комнатной температуре), через 24 ч, 3, 5, 7 и 9 сут культивирования. Эксперименты повторяли трижды.

**Жизнеспособность и морфология клеток.** Жизнеспособность (целостность мембраны) определяли по стандартной методике окраской трипановым синим (0.02% раствор), который проникает в клетки с поврежденной плазматической мембраной и окрашивает их в синий цвет. Неокрашенные клетки считали жизнеспособными и оценивали их как отношение числа жизнеспособных клеток к общему числу клеток в суспензии (в %). Далее МСК оценивали визуально по морфологии, адгезии к дну культурального пластика, скорости и качеству формируемого клеточного монослоя, способности клеток к размножению.

Проточная цитометрия. Наличие поверхностных антигенов анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на цитометре Epics Elite Coulter (США). Для этого МСК человека на 2-ом пассаже после воздействия низких температур снимали с субстрата 0.25%-ным раствором трипсина, подсчитывали, отмывали и аликвоты по 2 × 10<sup>5</sup> клеток инкубировали с мышиными антителами против следуюших антигенов человека: CD29, CD31, CD34, CD44, CD49a, CD90, CD105, CD166, HLA ABC (Becton Dickinson, США), в разведении 1 : 30 (фосфатно-солевой раствор, дополненный 2% СКПК) при 4ºС в течение 45 мин в темноте. В качестве вторых антител использовали анти-мышиные IgG, меченые фикоэритрином (Becton Dickinson, США). Анализ повторяли несколько раз. Контролем были

МСК из ПЖТ человека без воздействия низких температур.

Дифференцировка МСК. Способность МСК человека к индукционной дифференцировке в адипогенном направлении *in vitro* изучали с использованием набора StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit фирмы Gibco, США. Для этого МСК на 2-ом пассаже высевали в 6-луночные планшеты в плотности  $10^5$  клеток на лунку. По достижении клетками 80%-ного монослоя, рабочую питательную среду удаляли и добавляли индукционную среду по рекомендации производителя. Индукционную среду меняли каждые 4 сут. Анализ дифференцировки МСК человека и собаки проводили на 21-е сут культивирования. Клетки фиксировали метанолом при  $-20^{\circ}$ С в течение 10 мин и окрашивали специфическим красителем жировым красным O (Oil Red O; Sigma-Aldrich, США).

Клетки визуализировали с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Axio Observer D.1 (Carl Zeiss, Германия), используя объектив с увеличением 10, 20, 40 и 63× и программное обеспечение AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Германия).

Статистическая обработка. Результаты выражали значениями среднего арифметического и его стандартной ошибки. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента при *P* < 0.05.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Помешение всех экспериментальных клеток в холодильник при -70°С не оказывало отрицательного действия ни на один из указанных параметров. Во всех экспериментальных группах наблюдали целостность клеточного монослоя. Окраска образцов полученных клеточных суспензий трипановым синим выявила высокую витальность, которая при самой длительной экспозиции (1 мин) составляла 98.5 ± 0.3; 99.5 ± 0.01; 99.1 ± 0.01 для МСК из ПЖТ человека, MCK из ранее замороженной (-70°C без криопротектора) ПЖТ человека и МСК-ПЖТ собак соответственно. Окраска клеток продемонстрировала целостность плазматической мембраны после воздействия холода во всех образцах. Клетки оставались не только жизнеспособными, но и сохраняли способность к делению и размножались после низкотемпературного воздействия не зависимо от времени охлаждения до 3-го пассажа включительно, после чего они были заморожены. Морфологических изменений в клетках после воздействия холодом и при пассировании не было выявлено. При помещении их в среду с индукторами через 21 сут культивирования все МСК человека и собаки сохраняли способность к дифференцировке в адипогенном направлении.

После изъятия клеток из жидкого азота на 15, 30 или 60 с сразу после оттаивания наблюдали разрыв монослоя во всех культуральных флаконах. Большая часть клеток отделялась от субстрата клеточными

пластами, переходя в суспензионное состояние. Другая часть клеток (меньшая) оставалась прикрепленной к поверхности культурального флакона. На рис. 1 представлены результаты реакций МСК-ПЖТ человека (рис. 1а), МСК из ранее замороженной ПЖТ человека (рис. 16) и МСК из ПЖТ собак (рис. 1в) в ответ на самое длительное криовоздействие (60 с). Окраска трипановым синим клеток, которые нахолились в суспензии. продемонстрировала наличие среди них большой доли клеток с криотравмой плазматической мембраны при воздействии холодом в течение 15, 30 и 60 с, которая составляла соответственно 70  $\pm$  0.1, 76  $\pm$  0.01 и 79.5  $\pm$  0.3 для МСК-ПЖТ человека,  $77 \pm 0.6$ ,  $80 \pm 0.2$  и  $88.5 \pm 0.1$  для МСК ПЖТ человека с предварительным низкотемпературным шоком ( $-70^{\circ}$ С без криопротектора) и 67 ± 0.5, 69 ± 0.01, и 83.1 ± 0.04 для МСК-ПЖТ собак соответственно. Известно, что клеточная выживаемость в низкотемпературных условиях, в первую очередь, зависит от целостности ее мембраны после оттаивания – основного места криотравмы.

Очевидно, что целостность плазматической мембраны необходима для функционального выживания клеток. Однако во многих случаях, например, для гранулоцитов (Armitage, Mazur, 1984), неповрежденной плазматической мембраны недостаточно для клеточной витальности с сохранением функциональных особенностей. В пределах плазматической мембраны находятся другие связанные с ней структуры и органеллы, необходимые для функций клетки. Мало что известно о том, как эти внутриклеточные структуры и органеллы реагируют на холод и замораживание из-за сложности оценки их состояния и функции in situ (McGann et al., 1988; Reardon et al., 2015). Поэтому важно оценить способность клеток после низкотемпературного шока к последующему росту и развитию. Для этого культуральные флаконы после оттаивания и подсчета числа жизнеспособных клеток в суспензии переносили для дальнейшего культивирования в инкубатор при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> без смены срелы.

На третьи сутки в культуральных матрасах с клетками, подвергнутых обработкой жидким азотом, визуализировались живые прикрепленные ко дну культурального пластика клетки, которые размножались (рис. 1r - e). Как видно (оценивали спонтанно выбранные по диагоналям 10 полей зрения микроскопа в трех повторах), наибольшее число клеток было в популяции МСК, которые были выделены из ПЖТ человека, претерпевшей заморозку ранее (-70°C без криопротектора). Оставшиеся жизнеспособными клетки формировали монослой, но с различной скоростью. На 5-е сут культивирования МСК, выделенные из ПЖТ собак и ПЖТ человека (-70°С без криопротектора) формировали субконфлуентный монослой (рис. 1з, и), в то время как МСК, выделенные из ПЖТ человека (рис. 1ж) достигали 30%-ного монослоя. В МСК собак визуализировали клетки, которые округлялись и откреплялись (рис. 1u), но

2022



**Рис. 1.** Монослои клеточных популяций, подвергшихся воздействию низких температур ( $-196^{\circ}$ C) в течение 1 мин. *a* – MCK из ПЖТ человека. *b* – MCK из ПЖТ человека, ранее подвергнутой низкотемпературному шоку при – $70^{\circ}$ C без криопротектора. *b* – MMCK из ПЖТ собаки сразу после оттаивания. *e*, *d*, *e* – эти же клетки на 3 сут (*e*), на 5 сут (*ж*, *з*, *u*) и на 7 сут (*к*, *л*, *m*) после оттаивания соответственно. Увел. об.:  $20 \times .$ 

оставались жизнеспособными. Сравнительный анализ скорости формирования монослоя клетками представлен на рис.  $1\kappa - m$  и демонстрирует незначительное отставание МСК из ПЖТ человека, которые формировали монослой на 9-е сут (рис.  $1\kappa$ ), в то время как МСК из ПЖТ человека, ранее подвергшейся низкотемпературному шоку и из ПЖТ собак формировали его на 7 сут.

Следует отметить, что доля клеток, открепившихся от субстрата и перешедших в суспензию (окрашиваемых трипановым синим), была выше у клеток, выделенных из ранее замороженной ПЖТ, чем из свежеизолированного жира человека и собаки. С одной стороны, этот факт может свидетельствовать о недостаточной оценке жизнеспособности клеток только по окраске трипановым синим; оценивать жизнеспособность надо дополнительно еще другими методами, в том числе по способности размножаться в культуре. С другой стороны, это наблюдение можно объяснить тем, что окрашивали трипановым синим только клетки, которые были в суспензии (т.е. открепились после нахождения в жидком азоте). А

#### САВЧЕНКОВА и др.

	Доля положительно окрашенных клеток, %						
Антиген	из свежеизолированной ПЖТ			из ранее замороженной ПЖТ без криопротектора (–70°С)			
-	контроль	-70°C	−196°C	контроль	-70°C	-196°C	
CD29	$97.9\pm0.2$	$98.8\pm0.01$	$79.7\pm07$	$97.6\pm0.1$	$99.2 \pm 0.2$	$77.3 \pm 0.5$	
CD31	$4.3\pm0.5$	$3.0\pm0.4$	$2.0\pm0.1$	$0.6\pm0.02$	0.0	$0.1\pm0.01$	
CD34	$8.2\pm0.7$	$4.2 \pm .01$	$3.9\pm0.1$	$0.8\pm0.01$	$0.1\pm0.01$	$0.8\pm0.01$	
CD44	$99.1\pm0.4$	$98.2\pm0.5$	$98.9\pm0.3$	$99.0\pm0.2$	$98.8\pm0.6$	$98.6\pm0.5$	
CD49a	$96.2\pm0.2$	$94.1\pm0.6$	$45.2\pm0.3$	$95.9\pm0.2$	$96.2\pm0.6$	$30.1 \pm 0.5$	
CD90	$99.4\pm0.5$	$98.4\pm0.3$	$99.8\pm0.1$	$99.3\pm0.6$	$99.1\pm0.4$	$99.5\pm0.7$	
CD105	$98.8\pm0.1$	$99.8\pm0.2$	$99.2\pm0.7$	$98.5\pm0.3$	$97.5\pm0.01$	$92.8\pm0.2$	
HLA ABC	$99.6 \pm 0.8$	$99.6\pm0.3$	$99.4\pm0.5$	$99.3\pm0.1$	$98.4\pm0.2$	$98.3\pm0.5$	

Таблица 1. Поверхностные антигены МСК, выделенных из ПЖТ человека до (контроль) и после воздействия низких температур

Даны средние значения и их стандартные ошибки (n = 3).

визуальный анализ показал, что число клеток, не открепившихся от культурального пластика после экстремального охлаждения в группе МСК из замороженной ПЖТ человека, было выше во всех вариантах воздействия холодом. Чтобы лучше понять влияние низких температур на фенотип МСК-ПЖТ человека. мы исследовали присутствие некоторых антигенов на их поверхности до и после воздействия холода. В табл. 1 представлены результаты окраски МСК из ПЖТ человека с помошью антител против 8-ми антигенов. Цитофлуориметрический анализ (данные по 3-м образцам) показал, что клетки положительно окрашивались на слелующие антигены: CD29, CD44, CD49a, CD90, CD105, HLA ABC. Ha клетках не были выявлены CD34 (маркер клеток крови) и CD31 (маркер эндотелиальных клеток).

Считается, что МСК, выделенные из костного мозга, а также других соединительных тканей человека, характеризуются высокой экспрессией антигенов СD29, CD44, CD49a-f, CD51, CD73, CD105, CD106, CD166 и Stro-1 (Tepliashin et al., 2005; Dominici et al., 2006). Наши результаты показывают, что нет статистически значимой разницы (P>0.1) между контрольными клетками и клетками, подвергшимися воздействию заданных низких температур (-70 или -196°С) по доле клеток положительно окрашенных против этих антигенов (табл. 1). Однако в клеточной популяции, подвергшейся обработке жидким азотом в течение 1 мин, снижалась доля клеток, окрашенных против CD29 (интегрин β) и CD49a (интегрин  $\alpha$ -1) по сравнению с контролем (табл. 1). Это может свидетельствовать о влиянии холода на адгезивные способности МСК человека (Савченкова, Савченкова, 2015).

Представляло интерес изучить влияние холода на одну из функциональных характеристик этих клеток — способность при индукции образовывать клетки других тканей, имеющих то же происхождение. В качестве контроля использовали эти же клетки без воз-

действия низких температур. Результаты представлены на рис. 2. Окраска жировым красным демонстрирует обильные липиды в МСК-ПЖТ человека и собак при индукции (рис. 2а-в). Все клетки, подвергшиеся охлаждению, также были способны формировать клетки жировой ткани *in vitro* (рис. 2r-e). При культивировании в среде, индуцирующей адипогенную дифференцировку, морфологические изменения в клетках, выделенных как из ПЖТ человека, так и из ПЖТ собаки, наблюдали на 21 сут. Адипогенная дифференцировка сопровождалась появлением клеток округлой формы с липидными везикулами в цитоплазме, которые выявлялись окраской специфическим красителем жировым красным О. Как видно из результатов, представленных на рис. 2г, МСК, полученные из свежеизолированной ПЖТ человека, помещенные в жидкий азот (-196°С в течение 1 мин), демонстрируют способность к дифференцировке, но степень дифференцировки была снижена по сравнению с другими группами (рис. 2*д*, *е*). Нельзя исключить, что процессы и степень дифференцировки стволовых клеток также регулируются другими факторами, такими как уровень напряжения кислорода или микросреда культивирования.

Анализ данных по вопросу о влиянии низких температур на реакцию клеток в культуре, представленных в научной литературе, показывает, что их не так много. Возможно, это связано с тем, что резистентность клетки к холоду зависит от многих факторов и, в первую очередь, от особенностей метаболизма клетки в ткани, в том числе в зависимости от степени дифференцировки и анатомотопографических свойств. Райданом с соавторами (Райдан и др., 2011б) были описаны фенотипические изменения в МСК, выделенных из костного мозга крыс, в процессе обработки их парами азота до 5 мин с максимальной температурой охлаждения (—40°С). Наши данные согласуются с данными, полученными этой группой исследователей, которые выявили устойчи-

400



**Рис. 2.** Сохранение МСК, выделенными из ПЖТ, способности к дифференцировке в адипогенном направлении. a – ММСК из ПЖТ человека;  $\delta$  – ММСК из ПЖТ человека ранее подвергнутой низкотемпературному шоку при –70°С без криопротектора; a – МСК из ПЖТ собаки до воздейстия; e – те же клетки после воздействия –196°С в течение 1 мин соответственно. Увел. об.: 20×.

вость недифференцированных стволовых клеток костного мозга (СК-КМ) к действию низких температур до и после их направленной дифференцировки в адипо- и остеогенном направлениях и продемонстрировали, что степень дифференцировки у клеток СК-КМ играет важную роль в их устойчивости к кратковременному воздействию низких температур.

Ранее было обнаружено, что СК и транзиторные кератиноциты обладают большей устойчивостью к действию низких температур по сравнению с кератиноцитами и клетками постоянной линии А431, полученной из эпидермоидной карциномы человека, а также с клетками, выделенными из саркомы мыши (Райдан и др., 2011а). В отличие от этих работ мы подвергали кратковременному воздействию холодом клетки в монослое в питательной среде, а не подвергали клетки дополнительному стрессу, чтобы снять их с субстрата ферментативной обработкой и перевести в суспензию, или в осадок низкоскоростным центрифугированием. Имеется сообщение о сохранении СК, полученных из ПЖТ человека, при глубоком переохлаждении (до низких температур без замораживания) для длительного хранения (Huang et al., 2020). Авторами показано, что клеточная суспензия может храниться в жидком состоянии при температуре -13 и  $-16^{\circ}$ С в течение 7 сут, сохраняя высокую жизнеспособность, адгезивные способности и мультипотентность in vitro. Авторы предполагают, что проблема для клеток во время замораживания заключается не в сохранении ими способности к долгому выдерживанию очень низких температур (менее  $-180^{\circ}$ C), а скорее, в летальном действии промежуточной температурной зоны (от -15 до  $-60^{\circ}$ C), которую клетка должна пройти дважды – один раз

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

во время охлаждения и второй раз во время нагревания (Huang et al., 2020).

Таким образом, в ходе проведенных нами исследований было обнаружено, что наиболее устойчивыми к действию низких температур являются МСК, которые были выделены нами из ПЖТ человека, замороженной при -70°С без криопротектора (Савченкова, Коржикова, 2010) по сравнению с МСК, выделенными из нормальной ПЖТ человека. Их устойчивость была сопоставима со степенью криорезистентности МСК, выделенных из ПЖТ собак (Савченкова и др., 2019). Собаки по сравнению с человеком легко переносят низкие температуры, поэтому МСК из ПЖТ этого вида были включены в наши эксперименты. МСК из ПЖТ человека и собак обладают схожими свойствами: сильной адгезией к поверхности дна культурального флакона, высокой клонообразующей способностью, наличием или отсутствием на поверхности клеточной мембраны определенных поверхностных молекул и способностью при индукции формировать в культуре клетки костной, жировой и хрящевой ткани. Все эти параметры согласуется с критериями, которым должны соответствовать МСК млекопитающих в культуре (Dominici et al., 2006; Murray et al., 2014).

Полученные результаты по изучению комплекса морфо-функциональных особенностей МСК, выделенных из ПЖТ человека при кратковременных холодовых воздействиях, особенно ранее подвергшихся криошоку, могут подтвердить наше предположение о возможности сохранения в жировой ткани человека после криотерапии клеточной популяции с фенотипом, подобным МСК. Полученные новые данные могут быть полезными для дальнейшего изучения процессов и механизмов, лежащих в основе адаптации клеток млекопитающих к холоду и быть рекомендованы к использованию при дальнейшей разработке вопросов экологической физиологии, а также в качестве обоснования роли холодового фактора в стимуляции терморегуляционной функции организма. Эти клетки могут иметь и особое значение для идентификации генов (гена), ответственных за гипотермию клеток млекопитающих.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по теме Федерального научного центра – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН (FGUG-2022-0010).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не включала эксперименты с участием животных или людей.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕАТУРЫ

- *Грищенко В.И.* 2008. Достижения криобиологии и криомедицины во имя здоровья нации. Проблемы криобиол. T. 18. C. 269. (*Grischenko V.I.* 2008. Achievements in cryobiology and cryomedicine for national. Problems Cryobiol. V. 18. P. 269.)
- Райдан М., Шубин Н.А., Блинова М.И., Прохоров Г.Г., Пинаев Г.П. 2011а. Влияние охлаждения до низких температур на жизнеспособность кератиноцитов кожи человека, находящихся на разных стадиях дифференцировки. Цитология. Т. 53. С. 22. (Raydan M., Shubin N.A., Blinova M.I., Pinaev G.P., Prokhorov G.G. 2010. Effect of cooling to low temperatures on viability of human skin keratinocytes at different stages of differentiation. Cell Tiss. Biol. V. 4. P. 529.)
- Райдан М., Шубин Н.А., Николаенко Н.С., Блинова М.И., Прохоров Г.Г., Пинаев Г.П. 2011б. Устойчивость к действию низких температур стромальных клеток костного мозга при их дифференцировке. Цитология. Т. 53. С. 221. (Raydan M., Shubin N.A., Nikolaenko N.S., Blinova M.I., Pinaev G.P., Prokhorov G.G. 2011. Stability of bone marrow stromal cells to low temperatures depending on degree of differentiation. Cell Tiss. Biol. V. 5. P. 294.)
- *Ревишвили А., Чжао А., Ионкин Д. (Ред.)* 2019. Криохирургия. Руководство. М.; ГЭОТАР-Медиа. 376 с. (*Revishvili A., Zhao A., Ionkin D.* (Eds.). 2019. Cryosurgery. Moscow: GEOTAR-Media. 376 pp.)
- Савченкова И.П., Коржикова С.В. 2009. Линия мультипотентных мезенхимных стволовых клеток подкожножировой клетчатки человека (panniculus adiposus homo sapiense) для клеточной и тканевой инженерии. Патент на изобретение: RU 2354693 C2, 10.05.2009. Заявка № 2007122713/13 от 19.06.2007.

- Савченкова И.П., Коржикова С.В. 2010. Подкожно-жировая ткань человека, подвергнутая низкотемпературному шоку, как источник жизнеспособной клеточной популяции с характеристиками мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. Цитология. Т. 52. С. 621. (Savchenkova I.P., Korzhikova S.V. 2010. Human subcutaneous adipose tissue subjected to cold shock as source of viable cell population with characteristics of multipotent mesenchymal stromal cells. Cell Tiss. Biol. V. 4. P. 539.)
- Савченкова И.П., Савченкова Е.А. 2015. Влияние интегринов на адгезию мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, выделенных из жировой ткани человека, к белкам внеклеточного матрикса. Цитология. Т. 57. С. 650. (Savchenkova I.P., Savchenkova E.A. 2015. The effect of integrins on the adhesion of multipotent mesenchymal stromal cells isolated from human adipose tissue to extracellular matrix proteins. Tsitologiya. V. 57. P. 650.)
- Савченкова И.П., Васильева С.А., Коровина Д.Г., Шабейкин А.А., Гулюкин А.М. 2019. Мезенхимные стволовые клетки из жировой ткани кошек и собак в культуре. Сельскохоз. биол. Т. 54. С. 395. (Savchenkova I.P., Vasilyeva S.A., Korovina D.G., Shabeikin A.A., Gulyukin A.M. 2019. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from feline and canine adipose tissue. S-kh. Agric. Biol. V. 54. P. 395.)
- Тепляшин А.С., Коржикова С.В., Шарифуллина С.З., Чупикова Н.И., Ростовская М.С., Савченкова И.П. 2005. Характеристика мезенхимальных стволовых клеток человека, выделенных из костного мозга и жировой ткани. Цитология. Т. 47. С. 130. (Tepliashin A.S., Korzhikova S.V., Sharifullina S.Z., Chupikova N.I., Rostovskaia M.S., Savchenkova I.P. 2005. Characteristics of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. Tsitologiya. V. 47. P. 130.)
- Armitage W.J., Mazur P. 1984. Toxic and osmotic effects of glycerol on human granulocytes. Am. J. Physiol. V. 247. P. C382.

https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.5.C382

- *Cusker D. Mc.* 2020. Cellular self-organization: generating order from the abyss. Mol. Biol. Cel. V. 31. P. 143. https://doi.org/10.1091/mbc.E19-04-0207
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. V. 8. P. 315. https://doi.org/10.1080/14653240600855905
- *Erol O.D., Pervin B., Seker M.E., Aerts-Kaya F.* 2021. Effects of storage media, supplements and cryopreservation methods on quality of stem cells. World J. Stem Cells. V. 13. P. 1197. https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i9.1197
- *Fowler A., Toner M.* 2005. Cryo-injury and biopreservation. Ann N.Y. Acad. Sci. V. 1066. P. 119. https://doi.org/10.1196/annals.1363.010
- Gao D., Critser J.K. 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. ILAR J. V. 41. P. 187. https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187
- Huang H., Rey-Bedón C., Yarmush M.L., Usta O.B. 2020. Deep-supercooling for extended preservation of adiposederived stem cells. Cryobiology. V. 1. P. 67. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.11.004

403

# McGann L.E., Yang H.Y., Walterson M. 1988. Manifestations of cell P. 13

damage after freezing and thawing. Cryobiol. V. 25. P. 178. https://doi.org/10.1016/0011-2240(88)90024-7

Murray I.R., West C.C., Hardy W.R., James A.W., Park T.S., Nguyen A., Tawonsawatruk T., Lazzari L., Soo C., Peault B. 2014. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. Cell Mol. Life Sci. V. 71. P. 1353.

https://doi.org/10.1007/s00018-013-1462-6

*Reardon A.J.F. Elliott J.A.W., McGann L.E.* 2015. Investigating membrane and mitochondrial cryobiological responses of HUVEC using interrupted cooling protocols. Cryobiol. V. 71. P. 3067. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.004

# Cryoresistance of Mesenchymal Stromal Cells Isolated from Human Subcutaneous Adipose Tissue

КРИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛЕТОК С ФЕНОТИПОМ

## I. P. Savchenkova<sup>a</sup>, \*, E. A. Savchenkova<sup>a</sup>, and M. I. Gulyukin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (FSC VIEV), Moscow, 109428 Russia \*e-mail: s-ip@mail.ru

In medicine, including veterinary medicine, a direction is intensively developing, which considers the use of low temperatures in the treatment of various diseases in humans and animals. The specific mechanisms of resistance of various cell types to cold are still unclear and require further study. Previously, cells with the phenotype of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) were obtained from human subcutaneous adipose tissue (SAT) frozen without cryoprotectant ( $-70^{\circ}$ C). It was of interest to compare the *in vitro* response of these cells to low temperatures (-70 and  $-196^{\circ}$ C, exposure time: 15, 30 and 60 s) with MMSC isolated from freshly isolated SAT. Analysis of the results showed that MMSCs are resistant to the influence of the studied parameters of low temperatures. Placement of all cells at  $-70^{\circ}$ C did not have a negative effect in any of these time parameters. In liquid nitrogen, monolayer rupture and a high proportion of cells with a damaged cytoplasmic membrane after thawing were observed. The cells formed a monolayer, but at different rates, divided, retained the immunophenotype (CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD49a<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> HLA ABC<sup>+</sup>) and the ability to form adipose tissue cells *in vitro* upon induction. The most resistant to low temperatures are MMSCs previously isolated from frozen human SAT. The results obtained may be useful for further study of the processes and mechanisms underlying the resistance of mammalian cells to cold.

*Keywords:* subcutaneous adipose tissue, human, dog, mesenchymal stromal cells, low temperatures, viability, effect on function

УДК 612.816:612.815.2:576.5:577.25

# МУСКАРИНОВЫЕ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ПОДТИПОВ М1–М5 В СОМАТИЧЕСКОЙ МУСКУЛАТУРЕ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ Lumbricus terrestris

© 2022 г. Л. Ф. Нуруллин<sup>1, 2, \*</sup>, Е. М. Волков<sup>1, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Казанский государственный медицинский университет, Казань, 420012 Россия <sup>2</sup>Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра КазНЦ РАН, Казань, 420111 Россия

\**E-mail: lenizn@yandex.ru* \*\**E-mail: euroworm@mail.ru* Поступила в редакцию 07.04.2022 г. После доработки 17.04.2022 г. Принята к публикации 19.04.2022 г.

Методами иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии исследовали наличие и распределение семейства мускариновых ацетилхолиновых рецепторов M1—M5 подтипов в соматических мышечных клетках и холинергических синапсах кожно-мускульного мешка дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Установлено, что рецепторы всех подтипов неравномерно распределены в экстрасинаптических зонах мышечных клеток, а также присутствуют в зоне концевых пластинок. Рецепторы подтипов M2, M3, M4 и M5, за исключением подтипа M1, определяются и на пресинаптических мембранах двигательных нервных окончаний.

*Ключевые слова*: мускариновые ацетилхолиновые рецепторы, соматическая мускулатура, холинергические синапсы, аннелиды

**DOI:** 10.31857/S0041377122040034

Двигательная иннервация соматической мускулатуры аннелид имеет холинергическую природу (Rozkova, 1973; Walker et al., 1993). Аппликация ацетилхолина (AX) на мембрану соматических клеток кожно-мускульного мешка дождевого червя вызывает ее деполяризацию. В то же время применение Н-холиноблокаторов (d-тубокурарина, α-бунгаротоксина, гексаметония), а также М-холинолитиков (атропина) не препятствует деполяризующему эффекту экзогенного АХ (Volkov et al., 2001). Последнее указывает на некоторые фармакологические особенности постсинаптических АХ-рецепторов соматических клеток (Walker et al., 1993; Volkov et al., 2007). При этом их принадлежность к каноническим АХ-рецепторам никотинового или мускаринового типов остается до конца неясной. Также известно, что квантовая секреция в холинергических нервномышечных синапсах позвоночных модулируется при участии АХ-рецепторов М-типа (Minic et al., 2002; Nikolsky et al., 2004).

В этой связи, несомненный интерес представляет задача по идентификации мускариновых рецепторов семейства подтипов М1–М5 в соматических мышечных клетках и двигательных холинергических нервно-мышечных синапсах аннелид на примере клеток кожно-мускульного мешка дождевого червя с учетом принципиально важного обстоятельства, что данная соматическая двигательная мускулатура является эволюционно-первичной в длинном филогенетическом ряду животных.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объект и приготовление препаратов. Выделенные препараты фрагментов кожно-мускульного мешка дождевого червя Lumbricus terrestris закрепляли с помощью иголок на дне чашек Петри, залитых смолой Sylgard, и перфузировали раствором Древеса-Пакса (состав (мМ): 77 NaCl, 4 KCl, 43 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 CaCl<sub>2</sub>, 2 триса и 167 сахарозы; рН 7.4) около 30 мин при комнатной температуре ( $22 \pm 1^{\circ}$ C). Далее в течение 30 мин препараты фиксировали в 2%-ном растворе р-формальдегида, отмывали 3 раза по 30 мин в фосфатно-солевом буфере (ФБ, состав (мМ): 137 NaCl, 2.7 КСl, 4.3 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.4 КH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2). Мышцы последовательно инкубировали: 30 мин в 0.5%-ном растворе Triton X-100; 15 мин в растворе, содержащем 5% козьей сыворотки, 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0.5% Triton X-100; 15 мин в

**Принятые сокращения:** AX – ацетилхолин; БСА – бычий сывороточный альбумин; TMR – тетраметилродамин; TMR-α-Б – тетраметилродамин-α-бунгаротоксин; ΦБ – фосфатно-солевой буферный раствор.



**Рис. 1.** Флуоресцентное тройное окрашивание препарата соматических мышечных волокон дождевого червя *Lumbricus terrestris. а* – Окрашивание антителами к M1-мускариновому AX-рецептору;  $\delta$  – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину; e – окрашивание TMR- $\alpha$ -Б никотиновых AX-рецепторов. Здесь и на рис. 2–5: e – программно-обработанное изображение, полученное при совмещении изображений a и  $\delta$  (мускариновый рецептор и синаптофизин), демонстриующее только совпадающие при наложении изображений светлые пиксели; d – программно-обработанное изображении изображений a и e (мускариновый рецептор и синаптофизин), демонстриующее только совпадающие при наложении изображений светлые пиксели; d – программно-обработанное изображении изображений a и e (мускариновый рецептор и TMR- $\alpha$ -Б), показывающее только совпадающие при наложении a и e (мускариновый рецептор и тМС- $\alpha$ -Б), показывающее только совпадающие при наложении a и e (мускариновый рецептор и тМС- $\alpha$ -Б), показывающее только совпадающие при наложении a и e (мускариновый рецептор и тМС- $\alpha$ -Б), показывающее только совпадающие при наложений a и e (мускариновый рецептор и тМС- $\alpha$ -Б), показывающее только совпадающие при наложении изображений a и e (мускариновый рецептор и тМС- $\alpha$ -Б), показывающее только совпадающие при наложении изображений a и e (мускариновый рецептор и тМС- $\alpha$ -Б), показывающее только совпадающие при наложении изображений a и e (мускариновый рецептор и тМС- $\alpha$ -Б), показывающее только совпадающие при наложении изображений светлые пиксели. При наложении двух изображений, светлые пиксели, присутствующие только на одном из изображений, на итоговых изображениях не учитывались. Таким образом, можно увидеть места совпадения окрашивания на указанные маркеры. Масштабная линейка на рис. 1–5: 10 мкм.

растворе 1% БСА и 0.5% Triton X-100 (раствор А). Все эти растворы были приготовлены на основе ФБ.

Окрашивание препаратов. Препараты инкубировали в течение 12 ч при температуре 4°C в растворе А с поликлональными антителами к мускариновым АХрецепторам подтипов M1, M2, M3, M4, M5 (1:200) и синаптофизину (1:200). Препараты отмывали в растворе А 3 раза по 30 мин и инкубировали 1 ч при комнатной температуре с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с Alexa 488 или 647 (1:800) в растворе А. Окрашивание постсинаптических никотиновых АХ-рецепторов производили с помощью тетраметилродамин-α-бунгаротоксина (TMR-α-Б, 20 мкг/мл; время инкубации 30 мин). Для полтвержления специфичности связывания поликлональных антител с соответствующими белками проводили контрольные эксперименты. Для негативного контроля препарат инкубировали с вторичными антителами без предшествующей инкубации с первичными антителами. Для позитивного контроля производили инкубацию препарата с первичными антителами в присутствии иммуногенного пептида, на который вырабатывались первичные антитела. Отсутствие окрашивания в контрольных экспериментах указывает на специфичность связывания антител с соответствующими пептидами.

Микроскопия. После отмывки в ФБ, препараты помещали в раствор ФБ с глицерином (1:1) и размещали на предметном стекле для проведения микроскопического исследования на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, CША). Использовали масляный иммерсионный объектив  $63 \times / 1.4$ . Для возбуждения эмиссии флуорофоров применялся аргоновый и гелий-неоновый лазеры. Длины волн возбуждения для флуорофоров: Alexa 488 – 488 нм, TMR – 543 нм, Alexa 647 – 633 нм. Анализ полученных конфокальных изображений проводили в программе ImageJ (NIH, США).

Реактивы. В работе использовали *p*-формальдегид, трис, Тритон X-100, нормальную козью сыворотку, БСА, ТМR- $\alpha$ -Б, глицерин (Sigma-Aldrich); первичные поликлональные антитела и соответствующие им иммуногенные пептиды (Santa Cruz Biotechnologies, США); антитела вторичные Alexa 488 и Alexa 647 (Invitrogen, США).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для локализации двигательных нервных окончаний использовали окрашивание на синаптофизин интегральный мембранный гликопротеин синаптических везикул (Valtorta et al., 2004; Kwon, Chapman, 2011), а для маркирования никотиновых AX-рецепторов постсинаптической мембраны — TMR-α-Б (Krause, Wernig, 1985; Nurullin et al., 2011).

Иммуногистохимическое окрашивание фрагментов соматической мускулатуры дождевого червя с целью выявления АХ-рецепторов М1-подтипа носит диффузный характер, встречаясь по всей поверхности мембран соматических клеток (рис. 1*a*), сочетаясь с наличием ограниченных мест более интенсивного окрашивания (рис. 1а). При этом необходимо отметить, что данные зоны не перекрываются с районами окрашивания, маркированными на присутствие белка синаптофизина (рис.  $1a, \delta, c$ ). В то же время окрашивание на АХ-рецепторы М1-подтипа совпадает с локальным окрашиванием TMR-α-Б никотиновых AX-рецепторов (рис. 1*а*, *в*, *д*). Полученные данные позволяют считать, что мускариновые АХ-рецепторы М1подтипа присутствуют как в синаптических, так и во внесинаптических зонах мембран соматических мышечных клеток. Наличие АХ-рецепторов М1-подтипа в двигательных нервных окончаниях не подтверждается.

Иммуногистохимическое определение АХ-рецепторов подтипа М2 показало неоднородное окрашивание всей поверхности мембран соматических мышечных клеток (рис. 2*a*). При этом участки с вы-



**Рис. 2.** Присутствие M2-мускариновых AX-рецепторов при флуоресцентном тройном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. *a* — Окрашивание антителами к M2-мускариновому AX-рецептору; *δ* — окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину; *в* — окрашивание никотиновых рецепторов к AX при помощи TMRα-Б. *г*, *д*: см. подпись к рис. 1.



**Рис. 3.** Выявление М3-мускариновых АХ-рецепторов при тройном флуоресцентном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. *a* — Окрашивание антителами к М3-мускариновому АХ-рецептору; *δ* — окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину; *в* — окрашивание никотиновых рецепторов к АХ при помощи TMRα-Б. *г*, *д*: см. подпись к рис. 1.

явленным присутствием синаптофизина (рис. 2a,  $\delta$ , e) и TMR- $\alpha$ -Б (рис. 2a, e, d) совпадали с наличием метки на AX-рецепторы M2-подтипа. Полученные результаты показывают присутствие в соматических мышечных клетках мускариновых AX-рецепторов M2-подтипа, причем последние присутствуют как на постсинаптической мембране, так и, возможно, в двигательных нервных окончаниях.

Идентификация АХ-рецепторов подтипа МЗ выявила их неравномерное окрашивание по всей поверхности мышечных клеток (рис. 3*a*). В ряде районов окрашивание на МЗ-рецепторы перекрывалось с зонами выявления белка синаптофизина (рис. 3a, b, c), а также постсинаптических никотиновых АХ-рецепторов (рис. 3a, b, d). Можно думать, что АХ-рецепторы подтипа МЗ присутствуют как в двигательных

нервных окончаниях, так и во вне- и постсинаптических регионах мембраны мышечных клеток кожномускульного мешка.

Иммунофлуоресцентная идентификация мускариновых АХ-рецепторов подтипа М4 показала их присутствие в экстрасинаптической зоне мембран мышечных клеток (рис. 4*a*). При этом М4-рецепторы четко фиксировались в областях окрашивания на синаптофизин (рис. 4*a*, *б*, *г*) и никотиновые АХ-рецепторы (рис. 4*a*, *в*, *д*). Полученные результаты позволяют считать, что рецепторы М4-подтипа присутствуют как на пре-, так и на постсинаптических мембранах нервно-мышечных синапсов.

Мускариновые АХ-рецепторы М5-подтипа обнаруживаются в виде протяженных структур свечения



**Рис. 4.** Наличие М4-мускариновых АХ-рецепторов при тройном флуоресцентном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. *a* — Окрашивание антителами к М4-мускариновому АХ-рецептору; *б* — окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину; *в* — окрашивание никотиновых рецепторов к АХ при помощи TMR-α-Б. *г*, *д*: см. подпись к рис. 1.



**Рис. 5.** Обнаружение M5 мускариновых AX-рецепторов при флуоресцентном тройном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. a — Окрашивание антителами к M5-мускариновому AX-рецептору;  $\delta$  — окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину; e — окрашивание никотиновых рецепторов к AX при помощи TMR- $\alpha$ -Б. e, d: см. подпись к рис. 1.

(рис. 5a), которое в некоторых районах сопряжено олновременно с окрашиванием на белок синаптофизин (рис. 5a, b, c) и никотиновые АХ-рецепторы (рис. 5a, a, d). При этом окрашивание на M5-рецепторы наблюдается и в экстрасинаптических зонах (рис. 5а). Также отмечается окрашивание на АХ-рецепторы М5-подтипа, совпадающее только с зонами выявления TMR- $\alpha$ -Б (рис. 5*a*, *b*,  $\partial$ ). Таким образом. мускариновые АХ-рецепторы М5-подтипа широко представлены на вне-, пре- и постсинаптических мембранах мышечных клеток. Можно предполагать, что существуют два типа синапсов. Первые – имеют на пресинаптической мембране рецепторы типа М5, тогда как вторые – нет. Либо это одни и те же двигательные терминали, но находящиеся на разных стадиях своего формирования. Однако данные гипотезы требуют экспериментального подтверждения.

Проведенные исследования позволяют сделать следующее заключение. Мембраны соматических мышечных клеток кожно-мускульного мешка дождевого червя Lumbricus terrestris содержат семейство мускариновых АХ-рецепторов подтипов М1-М5. При этом мускариновые АХ-рецепторы всех подтипов присутствуют как во внесинаптических зонах, имея при этом неоднородный характер распределения, так и в мембранах концевых пластинок двигательных нервно-мышечных холинергических синапсов, тогда как никотиновые АХ-рецепторы локализуются исключительно в зоне нервно-мышечного контакта (Нуруллин, Волков, 2020). АХ-рецепторы подтипов M2, M3, M4 и M5, за исключением подтипа М1, определяются и в нервных двигательных терминалях.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках плановой темы исследований Казанского государственного медицинского университета и государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют, что все манипуляции с животными соответствовали нормам российского законодательства, а так-

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 4 2022

же рекомендациям Guide for the Care and Use of Laboratory Animals http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309053773.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Нуруллин Л.Ф., Волков Е.М.* 2020. Иммунофлуоресцентная идентификация изоформ субъединицы  $\alpha$ 1 потенциал-зависимых Ca<sup>2+</sup>-каналов семейств Ca<sub>V</sub>1, Ca<sub>V</sub>2 и Ca<sub>V</sub>3 в зонах холинергических синапсов соматической мускулатуры дождевого червя *Lumbricus terrestris*. Цитология. Т. 62. № 2. С. 141. (*Nurullin L.F., Volkov E.M.* 2020. Immunofluorescent identification of  $\alpha$ 1 isoform subunits of voltage-gated Ca<sup>2+</sup>-channels of Ca<sub>V</sub>1, Ca<sub>V</sub>2, and Ca<sub>V</sub>3 families in areas of cholinergic synapses of somatic muscles in earthworm *Lumbricus terrestris*. Cell Tiss. Biol. V. 14. P. 316.

https://doi.org/10.1134/S1990519X20040070) https://doi.org/10.31857/S0041377120020042

Krause M., Wernig A. 1985. The distribution of acetylcholine receptors in the normal and denervated neuromuscular junction of the frog. J. Neurocytol. V. 14. P. 765. https://doi.org/10.1007/BF01170827

Kwon S.E., Chapman E.R. 2011. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. Neuron. V. 70. P. 847. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.001

- *Minic J., Molgó J., Karlsson E., Krejci E.* 2002. Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase. Eur. J. Neurosci. V. 15. P. 439. https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01875.x
- Nikolsky E.E., Vyskocil F., Bukharaeva E.A., Samigullin D., Magazanik L.G. 2004. Cholinergic regulation of the evoked quantal release at frog neuromuscular junction. J. Physiol. V. 560. P. 77. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.065805
- Nurullin L.F., Mukhitov A.R., Tsentsevytsky A.N., Petrova N.V., Samigullin D.V., Malomouzh A.I., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E., Vyskočil F. 2011. Voltage-dependent P/Q-type calcium channels at the frog neuromuscular junction. Physiol. Res. V. 60. P. 815. https://doi.org/10.33549/physiolres.932219

Rozkova E.K. 1973. Pharmacology of cholinergic systems in annelids. In: International encyclopedia of pharmacology and therapeutics. Sect. 85. Elsevier, Oxford, New York. V. 1. P. 169.

Valtorta F., Pennuto M., Bonanomi D., Benfenati F. 2004. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? Bioessays. V. 26. P. 445. https://doi.org/10.1002/bies.20012

Volkov E.M., Nurullin L.F., Volkov M.E., Nikolsky E.E., Vyskočil F. 2011. Mechanisms of carbacholine and GABA action on resting membrane potential and Na+/K+-ATPase of Lumbricus terrestris body wall muscles. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. V. 158. P. 520. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.12.016

Volkov E.M., Nurullin L.F., Nikolsky E., Vyskocil F. 2007. Miniature excitatory synaptic ion currents in the earthworm *Lumbricus terrestris* body wall muscles. Physiol. Res. V. 56. P. 655.

https://doi.org/10.33549/physiolres.931269

Walker R.J., Holden-Dye L., Franks C.J. 1993. Physiological and pharmacological studies on annelid and nematode body wall muscle. Comp. Biochem. Physiol. C. Comp. Pharmacol. Toxicol. V. 106. P. 49. https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90253-h

# Muscarinic Acetylcholine Receptors of M1–M5 Subtypes in the Somatic Muscle of the Earthworm *Lumbricus terrestris*

L. F. Nurullin<sup>*a*, *b*, \* and E. M. Volkov<sup>*a*, \*\*</sup></sup>

<sup>a</sup>Kazan State Medical University, Kazan, 420012 Russia <sup>b</sup>Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Kazan, 420111 Russia \*e-mail: lenizn@yandex.ru \*\*e-mail: euroworm@mail.ru

The presence and distribution of the family of muscarinic acetylcholine receptors M1-M5 subtypes in somatic muscle cells and cholinergic synapses of a body wall of earthworm *Lumbricus terrestris* was studied using immunofluorescent confocal microscopy. It has been established that receptors of all subtypes are non-uniform distributed in the extrasynaptic zones of muscle cells, and are also present in the zone of end plates. Receptors of the subtypes M2, M3, M4 and M5, with the exception of the M1 subtype, are determined on the presynaptic membranes of motor nerve endings.

Keywords: muscarinic acetylcholine receptors, somatic muscles, cholinergic synapses, annelids

408