СОДЕРЖАНИЕ

Том 64, номер 5, 2022

Получение и характеристика разных популяций мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эмбриональных стволовых клеток человека линии SC7 <i>А. Кольцова, В. Зенин, В. И. Турилова, А. Н. Шатрова,</i>	
Т. К. Яковлева, Г. Г. Полянская Существует ни кансула кариосферы в общитах траваной нагущики?	411
Критический анализ проблемы	
Д. С. Боголюбов, А. О. Травина, И. О. Боголюбова	427
Локализация теломерсвязывающего белка TRF2 в сперматогенных клетках зимующих лягушек <i>Rana temporaria</i>	
А. О. Травина, П. К. Швец, Г. Н. Почукалина, О. И. Подгорная	448
Гено- и цитотоксическое действие динитрозильного комплекса железа с меркаптосукцинатом на клетки MCF-7	
В. А. Тронов, Н. А. Ткачев, Е. И. Некрасова, А. Ф. Ванин	457
Клеточная подвижность и структура цитоскелета под влиянием активатора и ингибитора малой ГТФазы RhoA в процессе репликативного старения линии MCK, выделенной из кожи век взрослого донора	
Д. Е. Бобков, А. В. Полянская, А. С. Мусорина, Е. В. Ломерт, Г. Г. Полянская	466
Подавление экспрессии молекулярных шаперонов как фактор повышения эффективности противоопухолевой терапии	
М. А. Микеладзе, Е. Р. Михайлова, Б. А. Маргулис, И. В. Гужова	478
Строение и динамика количества гемопоэтических клеток костного мозга крыс после введения магнитолипосом	
И. В. Мильто, Н. М. Шевцова, В. В. Иванова, О. Н. Серебрякова, Р. М. Тахауов, И. В. Суходоло	485
Ультраструктурный и иммуногистохимический анализ полипозной ткани при хроническом полипозном риносинусите	
А. Н. Горшков, Е. А. Варюшина, Е. В. Безрукова, М. А. Афлитонов, А. С. Симбирцев	495
Особенности действия экстрактов семян грейпфрута, листьев облепихи и чаги на свойства модельных липидных мембран	
С. С. Ефимова, А. А. Захарова, Д. Н. Чернышова, О. С. Остроумова	511

Vol. 64, No. 5, 2022

The derivation and characterization of different populations of mesenchymal stem cells, isolated from embryonic stem cells line - SC7 A. M. Koltsova, V. V. Zenin, V. I. Turilova, A. N. Shatrova, T. K. Yakovleva, G. G. Poljanskaya Karyosphere capsule in oocytes of the grass frog: To be or not to be? A critical view D. S. Bogolyubov, A. O. Travina, I. O. Bogolyubova Localization of telomere-binding protein Trf2 in spermatogenic cells of hibernating frogs Rana temporaria A. O. Travina, P. K. Shvets, G. N. Pochukalina, O. I. Podgornava Cytotoxicity and genotoxicity of dinitrosyl iron complex with mercaptosuccinate in MCF-7 cell line assessed using comet assay V. A. Tronov. N. A. Tkachev. E. I. Nekrasova. A. F. Vanin Cell motility and cytoskeleton structure under the influence of activator and inhibitor of small GTPase RhoA in the process of replicative senescence of the MSC line isolated from skin of evelids of an adult donor D. E. Bobkov, A. V. Polvanskava, A. S. Musorina, E. V. Lomert, G. G. Poljanskava Suppression of the molecular chaperones expression as a factor of increasing the antitumor therapy efficiency M. A. Mikeladze, E. R. Mikhaylova, B. A. Margulis, I. V. Guzhova The structure and dynamics of the number of hematopoietic cells of rat bone marrow after intravenous administration of magnetoliposomes I. V. Milto, N. M. Shevtsova, V. V. Ivanova, O. N. Serebrjakova, R. M. Takhauov, I. V. Suhodolo Ultrastructural and immunohistochemical analysis of polyposis tissue in chronic polyposis rhinosinusitis A. N. Gorshkov, E. A. Varyushina, E. V. Bezrukova, M. A. Aflitonov, A. S. Simbirtsev Extracts of grapefruit seeds, sea buckthorn leaves and chaga affect properties of model lipid membranes and reconstituted ion channels S. S. Efimova, A. A. Zakharova, D. N. Chernyshova, O. S. Ostroumova

УДК 57.085.23

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ SC7

© 2022 г. А. М. Кольцова^{1, *}, В. В. Зенин¹, В. И. Турилова¹, А. Н. Шатрова¹, Т. К. Яковлева¹, Г. Г. Полянская^{1, **}

> ¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия *E-mail: koltsova.am@mail.ru **E-mail: gpolanskaya@gmail.com Поступила в редакцию 23.06.2022 г. После доработки 17.07.2022 г. Принята к публикации 20.07.2022 г.

Проведен сравнительный анализ трех клеточных популяций, выделенных независимо из эмбриональных стволовых клеток человека линии SC7. Анализ характеристик проводили на 6-м и более поздних пассажах. Полученные результаты по ростовым характеристикам и репликативному старению показали, что две популяции (SC7-MSC-1 и SC7-MSC-2) имеют низкий индекс пролиферации, раннее репликативное старение и быструю гибель клеток. Эти 2 варианта можно было охарактеризовать только на 6-м пассаже. В отличие от них, третья клеточная популяция SC7-MSC-3 активно пролиферирует (индекс пролиферации высокий) и позже стареет, что позволило провести анализ клеточных характеристик на поздних пассажах. Так, обнаружены различия дифференцировочного потенциала у клеток SC7-MSC-3 между 6-м и 13-м пассажами. Кариотипический анализ трех полученных клеточных популяций выявил различия по кариотипической стабильности. На пассаже 6 показаны различия между тремя популяциями по доле клеток, несущих маркеры CD90 и CD105, по наличию маркеров ранней дифференцировки ЭСК и по дифференцировочному потенциалу в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. Причины межпопуляционных различий могут быть связаны с процессом дифференцировки МСК из ЭСК. Таким образом, из трех независимых популяций МСК, выделенных из линии SC7, только одна популяция соответствует определению полноценной линии МСК с наличием статусных характеристик, которая названа нами SC7-MSC.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки человека, репликативное старение, пролиферация, поверхностные клеточные маркеры, кариотип, дифференцировка **DOI:** 10.31857/S0041377122050054

Мезенхимные стволовые клетки человека (МСК) широко используются для фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований. Линии МСК человека, будучи неиммортализованными, диплоидными клеточными популяциями, являются удобной моделью для изучения биологических процессов, как в здоровом организме, так и при его патологических состояниях. В настоящее время значительно расширяется использование МСК человека разного происхождения в биомедицинских исследованиях, охватывающих широкий спектр заболеваний (Shin et al., 2020; Adak et al., 2021; Albu et al., 2021; Taei et al., 2021; Vasudevan et al., 2021; Wang et al., 2021; Wangler et al., 2022; Oh, Lee, 2021; Zhang et al., 2022).

Согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, статус МСК разного происхождения определяется рядом характеристик (Dominici et al., 2006; Sensebé et al., 2010). Тем не менее, есть некоторые различия между линиями МСК, выделенными из разных источников, по характеристикам определяющим статус МСК, и по другим, важным для жизнедеятельности клеток. В частности, обнаружены межлинейные различия по дифференцировочному потенциалу, секреции цитокинов, ростовым характеристикам, характеру репликативного старения (РС), кариотипической нестабильности. Функциональная гетерогенность МСК может зависеть от многих факторов, в частности от происхождения, от индивидуальных характеристик донора, условий культивирования, неконтролируемых внешних факторов (Montesinos et al., 2009; Brown et al., 2014; Stanko et al., 2014; Воронкина и др., 2016, 2020; Li et al., 2018; Полянская, 2018; Jin et al., 2019; Yang et al., 2019;

Принятые сокращения: ИП – индекс пролиферации; МСК – мезенхимные стволовые клетки; РС – репликативное старение; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

Кольцова и др., 2020; Costa et al., 2021; Semenova et al., 2021; Shin et al., 2021; Tai et al., 2021; Yigitbilek et al., 2021, Zhang et al., 2021). Помимо межлинейных различий, имеют место клональные различия внутри одной линии по разным признакам.

Причиной этому является, в основном, гетерогенность клеточных популяций разных клеточных линий, включая МСК, обычно выделенных из массовой культуры (Полянская и др., 1981; Muraglia et al., 2000; Somosa et al., 2008; Russell et al., 2010; Sworder et al., 2015; Kobavashi et al., 2020). Показано, что изначально выделенная популяция МСК состоит из разнообразных субпопуляций, различающихся различными классами регуляторных белков. Так, анализ взрослых МСК, полученных из костного мозга человека, показал биохимическую внутрипопуляционную гетерогенность по содержанию разных биологически активных веществ, способных изменять микроокружение поврежленной ткани и, таким образом, улучшать тканевую репарацию. Многие из описанных авторами субпопуляций могут быть более предпочтительными в лечении определенных заболеваний (Caplan, Dennis, 2006; Phinney, 2007).

Известно, что при переводе клеток в состояние in vitro существенно нарушаются условия их существования, прежде всего, исключается контроль со стороны систем организма. Основными типами клеточного взаимодействия в культуре становятся физический контакт между клетками, клеток с субстратом, а также химическая связь через метаболиты в культуральной среде. Эти взаимодействия объединяют клетки, составляющие клеточную популяцию in vitro, в автономную единую систему (Poljanskaya, Vakhtin, 2003; Полянская, 2008). Но эта система не является такой устойчивой, как организм в целом. Сам процесс перевода клеток в условия in vitro является для них стрессом, способствующим эпигенетическим и генетическим изменениям. А отсутствие организменного (интегрального) контроля, включая стабилизирующий отбор, приводит к образованию гетерогенности внутри их новой системы. В результате, в выделенной культуре МСК выявляются клетки с разными свойствами, но, поскольку они образовались из одного типа клеток и из одной локализации, т.е. одного источника, различия в большинстве случаев носят единичный и непринципиальный характер для общей характеристики МСК. В большинстве случаев они различаются только по отдельным характеристикам. Все различия изначально носят клональный характер, но в процессе культивирования могут возникнуть популяции измененных клеток, которые будут сосуществовать в общей культуре МСК. Таким образом, представляет определенный интерес проведение анализа разных популяций МСК, выделенных из одного источника при соблюдении максимально одинаковых условий культивирования.

Одним из широко используемых типов клеток для получения МСК являются эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). ЭСК являются иммортализованными плюрипотентными клеточными популяшиями, обладающими способностью, как к самообновлению, так и к дифференцировке во все типы клеток. ЭСК человека являются адекватной моделью для проведения многосторонних фундаментальных исследований. Тем не менее, для использования их в клеточной терапии, необходимо преодолеть ряд препятствий (Полянская, Мусорина, 2018). Одним из препятствий является высокий уровень геномной нестабильности по сравнению с другими стволовыми клетками. В ЭСК часть геномных изменений носит адаптивный характер, способствуюший не только самообновлению клеток, но и малигнизации (Полянская, 2014). Тем не менее, ЭСК могут быть удобной моделью для получения на их основе МСК, обладающих гораздо меньшей геномной нестабильностью и позволяющих получить большую клеточную массу МСК без использования инвазивных процедур.

Ранее нами получены 3 линии, выделенные из ЭСК: SC5, SC6 и SC7, которые имели все характеристики, необходимые для подтверждения статуса ЭСК. Все 3 линии имели нормальный кариотип (Кольцова и др., 2011). Из линий SC5, SC6 были получены линии MCK: первая линия SC5-MSC оказалась нормальной, а вторая – SC6-MSC – имела преобладающий кариотип 46, X0 и изменения по ряду характеристик, несмотря на нормальный кариотип в исходной линии SC6 (Крылова и др., 2012; Кольцова и др., 2015).

В настоящей работе, основываясь на выше описанных данных о наличие гетерогенности в линиях МСК по ряду признаков, мы выделили несколько независимых популяций МСК из линии ЭСК человека SC7, полагая, что каждая является отдельной популяцией с конкретными характеристиками, отражающими, в частности, возможные отклонения от нормы. Такая постановка работы в некоторой степени соответствует проведенному в других исследованиях клональному анализу при учете, что изначально изменение происходит в одной клетке с последующим образованием клеточной популяции.

Задачи данной работы состояли в следующем: 1) получить из клеток линии SC7 три популяции фибробластоподобных клеток; 2) определить статус этих популяций на 6-м и более поздних пассажах; 3) провести сравнительный количественный анализ активности фермента β -галактозидазы, характеризующей процесс PC; 4) охарактеризовать MCK при длительном культивировании по основным показателям, подтверждающим статус MCK.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделение клеток. Для получения МСК из линии ЭСК человека SC7, колонии ЭСК диссоциировали до единичных клеток при помощи 0.05%-ной смеси трипсина и версена (Tripsin/EDTA, Invitrogen, США), переводили на гидрофобную (неадгезионную) поверхность пластиковой чашки и культивировали в среде для ЭСК без добавления основного фактора роста фибробластов (bFGF, Sigma, CША). В этих условиях клетки культивировали в течение 10 сут до образования эмбриоидных телец (ЭТ). Через 10 сут образовавшиеся ЭТ переносили на гидрофильную (адгезионную) поверхность чашки и последующее культивирование проводили в среде DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, HyClone, США). Через несколько суток вокруг прикрепившихся ЭТ выявляли зону роста дифференцированных клеток. Из полученной популяции выделяли однородные зоны пролиферирующих фибробластоподобных клеток, аккуратно изолировали их, контролируя под микроскопом, и после диссоциации до единичных клеток переносили на новые пластиковые чашки. В результате длительного культивирования получили популяцию фибробластоподобных клеток. Описанную процедуру выполняли 3 раза. В результате было получено 3 отдельных варианта популяций МСК, названные SC7-MSC-1, SC7-MSC-2 и SC7-MSC-3. Полученные клеточные популяции постоянно культивировали в условиях 5% CO₂ при 37°C и 90% влажности. Криоконсервацию проводили в кондиционированной среде, содержащей 10% криопротектора диметилсульфоксида (DMSO; Биолот, Россия).

Все основные характеристики, подтверждающие статус МСК, получали на пассажах 6, 10, 13 и 18 после выделения фибробластоподобных клеток.

Репликативное старение клеток. Оценивали активность фермента β -галактозидазы. Клетки выращивали в чашках Петри (3.5 мм: Nunc, Дания) до образования субконфлюента. Затем среду удаляли и окрашивали клетки с помощью набора реактивов (Senescence β -galactosidase staining kit; Cell Signaling, CША) согласно инструкции. У клеток, вступающих в фазу PC, цитоплазма окрашивается в ярко синий цвет. Анализ проводили с помощью инвертированного микроскопа (NICON, Япония) на пассажах 6, 10, 13 и 18. Долю окрашенных клеток (в %) определяли при подсчете не менее 1000 клеток в разных полях зрения на одну временную точку.

Эффективность клонирования варианта клеточной линии определяли в чашках Петри в условиях редкого посева – 2–3 кл./см² (50 клеток на 1 чашку 60 мм). Через 14 сут клетки окрашивали 1%-ным водным раствором кристалл-виолета и считали колонии. Эффективность клонирования определяли в % как отношение числа выросших колоний (клонов) к числу посеянных клеток. Учитывали колонии, состоящие из не менее 20 клеток. Анализировали по 8 экспериментов на ранних и поздних пассажах.

Характеристика пролиферативной активности. Оценивали индекс пролиферации (ИП) – отноше-

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

ние числа клеток в текущий момент к исходному числу посеянных клеток и строили кривые роста клеточных популяций. Для измерения среднего времени удвоения клеточной популяции каждый экспериментальный вариант повторяли 3 раза, ежедневно считали клетки в течение 6 сут (144 ч). Среднее время одного удвоения клеточной популяции (*a*_o) определяли по формуле (Седова, 2008):

$$a_{\rm o} = t \ln 2 / \ln (M_t / M_{\rm o}),$$

где M_t – число клеток в момент времени t; M_o – начальное число клеток; t – время логарифмической фазы роста клеточной культуры. Анализ проводили на пассажах 6, 13 и 18.

Кариотипический анализ полученных клеточных популяций. Для получения препаратов метафазных хромосом за 4 ч до фиксации в культуру вводили колцемид (KaryoMAX, 0.1 мкг/мл; GIBCO, США), снимали клетки с субстрата смесью трипсина и версена (1:3), проводили гипотоническую обработку смесью 0.075 М раствора КСІ и 1%-ного раствора цитрата натрия. Клетки фиксировали смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3:1). Для количественного кариотипического анализа препараты метафазных хромосом окрашивали водным раствором Гимза (1:50). Модальное число хромосом и пределы изменчивости клеток по числу хромосом определяли при анализе 100 метафазных пластинок; долю полиплоидных клеток оценивали при анализе 1000 метафазных пластинок для клеточных популяций SC7-MSC-1 и SC7-MSC-2 и 700 для SC7-MSC-3.

Для структурного кариотипического анализа проводили дифференциальное G-окрашивание хромосом в соответствии с ранее описанной методикой (Ozkinay, Mitelman, 1979). Анализировали 100 метафаз в каждом варианте. Клетки вариантов SC7-MSC-1 и SC7-MSC-2 анализировали только на пассаже 6 в связи с низкой пролиферацией; клетки варианта SC7-MSC-3 – на пассажах 6 и 13. Кариотипы анализировали с помощью микроскопа Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, ФРГ) с системой автоматического кариотипирования Ikaros 4 Кагуотурing System (MetaSystems, Germany) и описывали в соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека ISCN (McGovan-Jordan et al., 2016).

Иммунофлуоресцентный анализ. Для иммунофлуоресцентного анализа экспрессии поверхностных маркеров, характерных для ЭСК, и экспрессии маркеров ранней дифференцировки в производные 3-х зародышевых листков использовали антитела против SSEA-4, TRA-1-60 (Chemicon, США) и транскрипционного фактора Oct-4 (Santa Cruz, США), а также против α -актинина (тест на мезодерму), α -фетопротеина (тест на энтодерму) (Sigma, США) и нестина (тест на эктодерму) (Chemicon, США). Клетки фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 20 мин при комнатной температуре, блокировали 0.1%-ным раствором BSA (Sigma, США) в течение 1 ч, пермеабилизовали 0.1%-ным раствором Тритона X100 в течение 15 мин при комнатной температуре и инкубировали в течение ночи при 4°С с первыми антителами. Все антитела разводили в соотношении 1 : 50. Вторые антитела (FITC; Chemicon, США) разводили в соотношении 1 : 500 и инкубировали с ними препараты в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре. После 3-х отмывок препараты докрашивали ядерным красителем DAPI (0.1 мкг/мл; Sigma, США) в течение 10 мин при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, меченные только вторыми антителами. Визуализацию проводили с помощью микроскопа Olympus FV3000 (Япония). Анализ проводили на пассаже 6.

Определения статуса МСК с помощью проточной нитофлуориметрии. Анализировали наличие поверхностных антигенов с помощью проточной цитофлуориметрии на цитометре Beckman Coulter (США). Экспрессию каждого маркера оценивали по результатам 3-х экспериментов для клеток, находящихся на 6-м пассаже для клеточных популяций SC7-MSC-1 и SC7-MSC-2 и на пассажах 6 и 13 для клеточной популяции SC7-MSC-3. Иммунофенотипирование полученных клеточных линий проводили с помощью панели конъюгатов CD-маркерных моноклональных антител с флуорохромами. В работе использовали моноклональные антитела против CD-34, HLA-ABC и HLA-DR (Caltac, США), CD-44, CD-73, CD-105 (Beckman Coulter, CIIIA), CD-90 (Chemicon, США), а также виментина (BD Pharmigen, США). В качестве негативного контроля использовали очишенные мышиные антитела IgG1/FITC и IgG1/RFE (DAKO, Дания). Клетки снимали с поверхности чашки с помощью 0.05%-ного раствора трипсина с версеном (Gibco, США) и отмывали от него раствором PBS, не содержащем ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (Биолот, Россия). Полученную суспензию клеток (1 млн/мл) в PBS делили на пробы по 30 мкл, добавляли к каждой из них по 3 мкл антител и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Далее пробы доводили до оптимального объема (0.3-0.4 мл) буфером FACS (PBS, содержащий 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 0.05% азида натрия).

Индукция остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировки для определения статуса МСК. Использовали модифицированный метод (Reyes et al., 2001). Клетки (10000 кл./см²) высевали в остеогенную и адипогенную дифференцировочные среды (HyClone Thermo Scientific HyClone Product, США). Хондрогенную дифференцировку проводили в культуре микромасс в хондрогенной дифференцировочной среде (HyClone Thermo Scientific HyClone Prodисt, США). Индукцию проводили в течение трех недель, меняя среду каждые 3 сут.

Для идентификации хондрогенной дифференцировки из сформированных микромасс готовили мазки на трех предметных стеклах, фиксировали их содержимое 4%-ным раствором параформальдегида в течение 20 мин и далее каждый из мазков окрашивали в течении 30 мин при комнатной температуре 1%ным раствором толуидинового синего в 50%-ном изопропаноле, или 0.1%-ным водным раствором сафранина, или 1%-ным раствором альцианового синего в 3%-ной уксусной кислоте (Sigma, США). Окрашенные мазки промывали дистиллированной водой, высушивали и монтировали под покровное стекло.

Для идентификации остеогенной дифференцировки использовали реакцию Вон Косса. Для этого клетки фиксировали 2 мин в метаноле при -20°С и окрашивали 2%-ым раствором нитрата серебра (Вектон, Россия) в течение 1 ч под лампой мощностью 60 Вт. Окрашенные клетки промывали дистиллированной водой и помещали на 5 мин в 2.5%-ный раствор тиосульфата натрия. Затем клетки снова промывали водой и заливали 70%-ным глицерином.

Для идентификации адипогенной дифференцировки клетки промывали PBS без ионов Ca^{2+} и Mg²⁺, фиксировали в метаноле в течение 2 мин при -20° С. Фиксированные клетки промывали 50%-ным этанолом и окрашивали красным масляным (Oil Red) в течение 10 мин. Далее клетки промывали 50%-ным этанолом, затем дистиллированной водой и заливали 70%-ным глицерином. Идентификацию дифференцировок для всех вариантов проводили на 6-м пассаже, а для варианта SC7-MSC-3 – и на пассаже 13.

Результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы P < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологический анализ. Выделение клеток из линии ЭСК человека SC7 было проведено трижды. В результате были получены 3 отдельные клеточные популяции (варианты). Морфологический анализ этих вариантов на 6-м пассаже показал однородность клеточных популяций, представленных средними по размеру вытянутыми фибробластоподобными клетками (рис. 1). На 13- и 10-м пассаже обе клеточные популяции (SC7-MSC-1 и SC7-MSC-2) увеличивают размеры и степень распластанности клеток. Клеточный вариант SC7-MSC-3, в отличие от предыдущих популяций, на 13-м пассаже имеет ту же морфологию, что и на 6-м. Увеличение размеров и степени распластанности клеток в этом варианте проявляется только на 18-м пассаже. Таким образом, обнаружены различия между популяциями по морфологическим характеристикам.

Репликативное старение клеток. Старение клеток SC7-MSC-1, SC7-MSC-2 и SC7-MSC-3 оценивали по активности β -галактозидазы в клеточных популяциях (табл. 1).

Анализ PC показал, что уже на 6-м пассаже в вариантах SC7-MSC-1 и SC7-MSC-2 имеет место по-





Рис. 1. Прижизненные фотографии клеток SC7-MSC-1, SC7-MSC-2 и SC7-MSC-3 на на пассажах 6, 13 (или 10 для SC7-MSC-2) и 18. Инвертированный световой микроскоп Nicon Eclipse TS100, Япония. Масштабная линейка: 200 мкм.

вышенная частота стареющих клеток, которая существенно увеличивается к пассажу 10; популяции входят в стадию активного PC. Клетки варианта SC7-MSC-1 на 13 пассаже погибают. Клеточная популяция SC7-MSC-2, имеющая значительно большее количество стареющих клеток, после 10 пассажа прекращает деления и погибает. Анализ PC клеточного варианта SC7-MSC-3 свидетельствует о более длительном процессе PC. На 6-м пассаже наблюдается повышенная частота стареющих клеток, подобно первым двум популяциям. Затем имеет место постепенное увеличение частоты этих клеток, переходящее в стадию активного PC на 13-м пассаже (P < 0.05) и продолжающееся до пассажа 18. На 20-м пассаже клетки перестают делиться и быстро погибают. Таким образом, все 3 популяции различаются по характеру PC, определяемому по уровню активности лизосомального фермента β -галактозидазы в клеточных популяциях в процессе длительного культивирования. Наибольшие отличия от 2-х других популяций имеет вариант SC7-MSC-3.

Ростовые характеристики. Клоногенная активность не выявлена во всех 3-х клеточных популяциях на ранних и поздних пассажах, что позволяет считать, что пролиферативный потенциал снижен по сравнению с большинством линий МСК человека.

Пассаж	SC7-MSC-1		SC7-MSC-2		SC7-MSC-3	
	число клеток	окрашенные клетки, %	число клеток	окрашенные клетки, %	число клеток	окрашенные клетки, %
6	1881	20.3 ± 0.9	1435	22.0 ± 0.2	1424	21.7 ± 1.1
10	1336	40.0 ± 1.3	1064	79.1 ± 1.2		
13					1497	33.6 ± 1.2
18					1576	36.7 ± 1.2

Таблица 1. Доля клеток популяций SC7-MSC-1 и SC7-MSC-2 с выраженной активностью (окраской) β-галактозидазы на разных пассажах в процессе культивирования

Примечание. Показаны средние значения и их ошибки при подсчете не менее 1000 клеток.

Характеристика пролиферативной активности клеток SC7-MSC-1, SC7-MSC-2 и SC7-MSC-3 в процессе длительного культивирования свидетельствуют о различиях между вариантами; кривые роста представлены на рис.2.

Анализ пролиферативной активности в варианте SC7-MSC-1 на 6-м пассаже свидетельствует о том, что логарифмическая фаза роста составляет 24 ч (от 48 до 72 ч), затем имеет место незначительное снижение ИП. Среднее время удвоения популяции составляет 27.5 \pm 2.4 ч. У клеток SC7-MSC-2 логарифмическая фаза роста составляет 24 ч (от 72 до 96 ч), далее ИП не увеличивается; среднее время удвоения 27.5 \pm 1.4 ч. Таким образом, оба варианта сходны по характеру пролиферативной активности и среднему времени удвоения. Следует подчеркнуть, что обе популяции характеризуются низким уровнем пролиферации. Так, средние индексы пролиферации, согласно кривым роста, составляют 1.85 и 1.58 соответственно.



Рис. 2. Кривые роста клеток SC7-MSC-1 на пассаже 6 (кривая *1*), SC7-MSC-2 на пассаже 6 (кривая *2*) и SC7-MSC-3 на пассажах 6 (кривая *3.1*), 13 (кривая *3.2*) и 18 (кривая *3.3*).

Анализ пролиферативной активности у клеток третьего варианта SC7-MSC-3 (рис. 2) свидетельствует о том, что логарифмическая фаза роста составляет на 6-м пассаже 96 ч (от 0 до 96 ч), далее ИП не увеличивается. Время удвоения -36.0 ± 0.5 ч. В отличие от клеток 1-й и 2-й популяций, наблюдается активный рост клеточной популяции при длительном культивировании до 13 пассажа. Анализ пролиферативной активности на 13-ом пассаже также показал активную пролиферацию. Логарифмическая фаза роста длится 72 ч (от 24 до 96 ч). Время удвоения составляет 28.4 ± 0.4 ч. т.е. укорачивается по сравнению с ранним пассажем. ИП при культивировании в течение 144 ч незначительно снижается по сравнению с 6-м пассажем (средние ИП: 4.57 и 3.96 на пассажах 6 и 13 соответственно). Дальнейшее культивирование до 18-ого пассажа показало значительное снижение пролиферативной активности, т.е. наступление активной стадии РС. Логарифмическая фаза роста составляет 24 ч (от 48 до 72 ч, затем ИП не изменяется). Средний ИП – 2.42 значительно ниже, чем на предыдущих сроках (пассажи 6 и 13). Среднее время удвоения — 16.6 ± 0.8 ч, что также меньше, чем на предыдущих пассажах.

Таким образом, в отличие от большинства линий МСК, полученных нами из разных источников, для которых показано увеличение времени удвоения в процессе РС, в этом варианте клеток показано укорочение среднего времени удвоения в процессе РС. Надо подчеркнуть, что в клетках линии МСК, выделенной из пульпы молочного зуба ребенка (MSC-DP), ранее было показано одинаковое среднее время удвоения клеток в процессе РС на раннем и позднем пассажах (Кольцова и др., 2018). В настоящей работе обнаружено укорочение времени удвоения, несмотря на присутствие признаков активной стадии РС: значительного снижения пролиферативной активности на пассаже 18, морфологических изменений, повышенного уровеня активности β-галактозидазы, остановки пролиферации на 20-ом пассаже и быстрой последующей гибели клеток.

Основываясь на формуле расчета среднего времени удвоения клеточной популяции, можно полагать, что причиной отсутствия различий по данному па-

раметру является несоответствие длительности логарифмической фазы и величины ИП. Для увеличения времени удвоения популяции при данной длительности логарифмической фазы, ИП должен быть еще ниже, чем показанный на рис. 2. По-видимому, результаты исследования, а также данные, полученные ранее (Кольцова и др., 2018), свидетельствуют о том, что не все соотношения длительности логарифмической фазы роста и величины ИП приводят к увеличению среднего времени удвоения. По-видимому, среднее время удвоения клеточной популяции не является обязательным признаком РС, хотя во многих работах, включая и собственные исследования, показано увеличение этого параметра в процессе длительного культивирования MCK (Garcia et al., 2016; de Witte et al., 2017; Кольцова и др., 2017, 2018).

Анализируя результаты по ростовым характеристикам и РС в трех выделенных клеточных популяциях, надо сказать, что для вариантов SC7-MSC-1 и SC7-MSC-2 ростовые характеристики получены только на пассаже 6 в связи с низким ИП, ранним РС и быстрой гибелью клеток. В этих вариантах в процессе культивирования не происходит значительного увеличения клеточной массы за счет активно делящихся клеток. В отличие от них, вариант SC7-MSC-3 показывает активную пролиферацию, высокий ИП, более позднее старение, что сходно с другими линиями МСК. Исходя из строгого определения клеточной линии, согласно которому клеточной линией называется культура, прошедшая 1-й пересев, все 3 популяции можно назвать линиями. Но поскольку наша задача состояла в получении линий именно МСК из одного источника, то две выделенные нами популяции не соответствуют по характеру ростовых характеристик линиям МСК.

Согласно статусу, МСК должны обладать высокой пролиферативной активностью, что позволяет исследовать их характеристики при длительном культивировании. Такая характеристика соответствует определению диплоидных клеточных линий (Dominici et al., 2006; Пинаев, 2008; Sensebé et al., 2010). В связи с полученными ростовыми характеристиками, очевидно, что варианты SC7-MSC-1 и SC7-MSC-2 не соответствуют этому критерию, а вариант SC7-MSC-3 соответствует. Поэтому мы условно назвали варианты SC7-MSC-1 и SC7-MSC-2 клеточными популяциями, а не сублиниями, а вариант SC7-MSC-3, по-видимому, можно назвать линией, но для окончательного подтверждения необходимо провести исследование всех статусных характеристик МСК полученных вариантов.

Кариотипический анализ. Анализ метафазных пластинок во всех трех клеточных популяциях показал соответствие кариотипу исходной линии ЭСК человека SC7 согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, которые исключают клеточные культуры, имеющие 10% и более клональных хромосомных нарушений при анализе

не менее 20 метафаз для использования их в регенеративной медицине. Тем не менее, выделенные клеточные популяции показали различия по кариотипической стабильности. Так, клеточный вариант SC7-MSC-1 на пассаже 6 имеет нормальный диплоидный кариотип 46, XY ($100 \pm 1\%$); не выявлено количественных или структурных изменений хромосом (рис. 3); доля полиплоидных клеток составляет $0.6 \pm 0.2\%$. В клеточной популяции SC7-MSC-2 на пассаже 6 имеет место значительная кариотипическая нестабильность, несмотря на преобладание нормального кариотипа — 46, XY (98.0 \pm 1.4%) с долей полиплоидных клеток 1.2 ± 0.3%. В этом варианте обнаружено 15% клеток, имеющих отклонения от нормального кариотипа (рис. 3). Так, в двух клетках с числом хромосом 47 выявлена численная клональная перестройка – трисомия по хромосоме 8 (47, ХҮ,+8); в восьми клетках с числом хромосом 46 обнаружена структурная клональная перестройка – транслокация хромосом 6 и 7. t(6:7)(p21.3~22:q11.2): в пяти клетках наблюдали различные неклональные структурные перестройки: транслокацию хромосом 1 и 7, t(1;7)(q12;q35); транслокацию хромосом 4 и 15, t(4;15)(q13;q26); дицентрическую хромосому dic(15;15)(p11.2;p11.2); делецию длинного плеча хромосомы 18, del(18)(q21.1). Транслокации t(1;7)(q12;q35) и t(15;15)(p11.2;p11.2) приводили к хромосомному дисбалансу в клетках - трисомии по длинному плечу хромосомы 1 и хромосомы 15 соответственно. В одной клетке обнаружили нарушение структуры хромосом 5 и 6 с образованием двух аномальных хромосом add(5)(q11.1) и del(6)(q23) и двух ацентрических фрагментов; хроматидный разрыв в том же локусе 5q11.1 был выявлен в одной клетке (рис. 36). Следует подчеркнуть, что имеет место корреляция между наличием существенной кариотипической нестабильности, сниженным дифференцировочным потенциалом (рис. 6), низкой пролиферативной активностью, преждевременным РС и ранней гибелью клеток. Тем не менее, возможны варианты, когда и при нормальном кариотипе в варианте SC7-MSC-1 имеют место изменения других характеристик. Повидимому, возможны не только кариотипические изменения, но и генные нарушения, выявляемые молекулярно-генетическим анализом.

Проведение кариотипического анализа в процессе длительного культивирования оказалось возможным только для клеточной популяции SC7-MSC-3. Кариотипический анализ показал, что в этом варианте сохраняется нормальный кариотип 46,ХҮ (99 ± 1%), как на раннем 6-м пассаже, так и на позднем 13-м пассаже, соответствующем началу активной стадии PC (рис. 4). Доля полиплоидных клеток в популяции составляет 5.7 ± 0.9% на пассаже 6 и 3.1 ± 0.6% на пассаже 13.

Единственная клетка с дицентрической хромосомой в кариотипе 45,XY, dic(5;15)(q31;q22~24) была выявлена в этом варианте на пассаже 6.



Рис. 3. Кариотипы клеточных популяций SC7-MSC-1 и SC7-MSC-2 на 6-м пассаже. Клетки SC7-MSC-1: нормальный кариотип, 46,ХҮ; клетки SC7-MSC-2: нормальный кариотип 46,ХҮ. На врезке показаны аномалии хромосом, выявленные в отдельных клетках популяции SC7-MSC-2; в верхнем ряду – трисомия по хромосоме 8; транслокация хромосом 6 и 7 t(6;7)(p21.3~22;q11.2): дериваты хромосом б и 7 der(6)(7qter→7q11.2::6p21.3~22→6qter), der(7)(7pter→7q11.2::6p21.3~22→6pter); структурная перестройка хромосом 1 и 7, приводящая к трисомии по длинному плечу хромосомы 1: дериват хромосомы 7 der(7)(7pter \rightarrow 7q35::1q12 \rightarrow 1qter); *в нижнем ряду* – транслокация хромосом 4 и 15 t(4;15)(q13;q26): дериваты хромосом 4 и 15 der(4)(4pter \rightarrow 4q13::15q26 \rightarrow 15qter), der(15)(15pter \rightarrow 15q26::4q13 \rightarrow 4qter); хроматидный разрыв хромосомы 5 chtb(5)(q11.1); структурные перестройки хромосом 5 и 6: add(5)(pter→q11.1::?), ацентрический фрагмент хромосомы 5 асе(5)(:q11.1→qter), парный $del(6)(pter \rightarrow q23:)$ неидентифицированный фрагмент; дицентрическая хромосома И dic(15;15)(15qter→15p11.2::15p11.2→15qter) в клетке с кариотипом 46,ХҮ,dic(15;15)(p11.2;p11.2); делеция длинного плеча хромосомы 18 del(18)(pter->q21.1:). Стрелками указаны структурно перестроенные хромосомы, ацентрические фрагменты и хроматидный разрыв; звездочкой отмечены клональные перестройки хромосом.

Анализ поверхностных антигенов для определения статуса МСК. Проведен анализ поверхностных маркеров на 6-м пассаже 3-х клеточных вариантов SC7-MSC-1, SC7-MSC-2 и SC7-MSC-3 (табл. 2).

Из этих результатов следует, что в обоих вариантах присутствуют характерные для МСК маркеры (Полянская, 2018). Тем не менее, обнаружен ряд количественных отличий от других линий. Так, маркер CD90 в вариантах SC7-MSC-1 и SC7-MSC-2 присутствует на низком уровне. Причем, если в варианте SC7-MSC-1 его мало, но он присутствует, то в варианте SC7-MSC-2 его выраженность крайне слаба, близка к отсутствию. В третьем варианте SC7-MSC-3 наблюдается высокий, не отличающийся от большинства других линий, уровень CD90, но наблюдается значительно пониженный уровень маркера CD105.

Возможно, что сниженный уровень этих поверхностных антигенов отражает иное физиологическое состояние клеточной популяции по сравнению с остальными монослойными клеточными культурами. Так, для того чтобы получить МСК из ЭСК, необходимо провести ЭСК через стадию клеточных сфероидов (3D) (Крылова и др., 2012). Ранее было показано снижение уровня СD90 в клеточных сфероидах по сравнению с монослойной культурой (Крылова и др., 2015). Данные других авторов также свидетельствуют о том, что уровень поверхностных маркеров зависит от условий культивирования (Frith et al., 2010; Alimperti et al., 2014). Таким образом, колебания уровня поверхностных маркеров могут быть, в частности, связаны с эпигенетическими изменениями. Нами ранее было показано, что содержание маркера CD90 может изменяться в актив-



Рис. 4. Кариотипы клеточной популяции SC7-MSC-3 на 6-м и 13-м пассажах. Пассаж 6: нормальный кариотип, 46,ХҮ. На *врезке* показана дицентрическая хромосома dic(5;15)(5pter—5q31::15q22~24—15pter) (*стрелка*) и сопутствующий парный фрагмент (*стрелка*) в клетке с кариотипом 45,ХҮ,dic(5;15)(q31;q22~24). Пассаж 13: нормальный кариотип 46,ХҮ.

ной стадии PC, а также зависеть от локализации источника получения MCK в одном органе (Кольцова и др., 2020). Надо подчеркнуть, что функционально CD90 и CD105 связаны с важнейшими клеточными процессами, такими как межклеточные взаимодействия, миграция, клеточная пролиферация и дифференцировка (Maleki et al., 2014). Тем не менее, пока сложно установить коррелятивные отношения между количеством поверхностных маркеров и другими характеристиками MCK. В представленном случае наблюдаются различия между исследуемыми популяциями.

Результаты иммунофлуоресцентного анализа. Присутствие маркеров ранней дифференцировки ЭСК в производные трех зародышевых листков в клетках SC7-MSC-1, SC7-MSC-2 и SC7-MSC-3 на 6-м пассаже показано на рис. 5. Идентифицированы следующие маркеры: нестин (маркер эктодермы), альфафетопротеин (маркер энтодермы) и альфа-актинин (маркер мезодермы). Имеют место различия между популяциями. Так, в популяции SC7-MSC-1 присутствуют все маркеры; в популяции SC7-MSC-2 присутствует маркер альфа-фетопротеина, тогда как маркеры нестина и альфа-актинина выражены крайне слабо; в линии SC7-MSC-3 отсутствует нестин, остальные 2 маркера присутствуют. Возможно, что с присутствием маркеров ранней дифференцировки ЭСК связана дифференцировочная пластичность MCK (Riekstina et al., 2009; Huang et al., 2010;

Таблица 2.	Поверхностные марке	ры в клеточных популяциях	SC7-MSC-1	, SC7-MS	C-2 и SC7-MSC-3
------------	---------------------	---------------------------	-----------	----------	-----------------

Маркер	SC7-MSC-1, пассаж 6	SC7-MSC-2, пассаж 6	SC7-MSC-3, пассаж 6	SC7-MSC-3, пассаж 13
CD44	99.43 ± 0.24	99.78 ± 0.13	96.27 ± 1.23	99.90 ± 0.04
CD73	98.70 ± 0.47	82.67 ± 0.63	97.74 ± 0.30	96.00 ± 0.88
CD90	21.95 ± 0.20	3.21 ± 0.41	95.50 ± 2.38	99.78 ± 0.07
CD105	98.28 ± 0.95	99.13 ± 0.10	8.40 ± 0.70	13.19 ± 1.72
Виментин	38.43 ± 1.76	44.27 ± 7.69	36.03 ± 1.48	55.19 ± 0.72
CD34	0.98 ± 0.08	0.82 ± 0.32	0.05 ± 0.03	0.79 ± 0.36
CD45	3.00 ± 0.67	0.77 ± 0.25	0.03 ± 0.01	0.39 ± 0.01
HLA-ABC	80.95 ± 2.90	51.47 ± 1.40	99.75 ± 1.40	99.80 ± 0.05
HLA-DR	1.06 ± 0.22	0.51 ± 0.16	0.51 ± 0.16	0.42 ± 0.04

Примечание. Показаны средние значения и их ошибки из 3-х экспериментов. Данные проточной цитометрии с использованием соответствующих антител.



Рис. 5. Флуоресценция маркеров ранней дифференцировки мезенхимных стволовых клеток человека вариантов SC7-MSC-1, SC7-MSC-2, SC7-MSC-3 на 6-м пассаже. Показаны маркеры эктодермы (нестина), мезодермы (α-актинина) и энтодермы (α-фетопротеина). Окраска соответствующими моноклональными антителами. Масштабная линейка: 50 мкм.

Antonucci et al., 2011; Mamidi et al., 2011; Wu et al., 2013).

Существенно отметить, что на пассаже 6 во всех 3-х вариантах отсутствуют клетки, несущие маркеры недифференцированных ЭСК: SSEA-4, Oct-4, TRA-1-60, SOX2 (данные не представлены). Информация по наличию этих маркеров в разных МСК противоречива. Есть исследования, свидетельствующие об их отсутствии, или присутствии некоторых из них. Есть данные, подтверждающие их участие в процессах пролиферации и дифференцировки МСК (Крылова и др., 2012; Полянская, 2018).

Индукция остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировки для определения статуса МСК. Результаты анализа дифференцировочного потенциала в клеточных вариантах SC7-MSC-1, SC7-MSC-2 и SC7-MSC-3 на 6-м пассаже представлены на рис. 6 и 7. Так, в варианте SC7-MSC-1 наблюдается ослабленная дифференцировка в адипогенном направлении: наблюдается незначительное количество жировых капель. В этом варианте присутствует остеогенная дифференцировка, выражающаяся в формировании минеральных комплексов, идентифицированных с помощью реакции Вон Косса, выявляющей нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве. Обнаружено также наличие хондрогенной дифференцировки, идентифицированной с помощью окрашивания толуидиновым синим, выявляющим сульфатированные гликозаминогликаны, и сафранином, выявляющим протеогликаны; не обнаружены кислые гликозаминогликаны, выявляющиеся при окрашивании альциановым синим.

В отличие от варианта SC7-MSC-1, в варианте SC7-MSC-2 отсутствуют адипогенная и остеогенная



Рис. 6. Дифференцировка клеток вариантов SC7-MSC-1, SC7-MSC-2 в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлении на 6-м пассаже; дифференцировка в этих же направлениях варианта SC7-MSC-3 на 6-м и 13-м пассажах. Показаны окрашивание жировых включений масляным красным (адипогенез), реакция Вон Косса, выявляющая нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве (остеогенез) и окрашивание толуидиновым синим сульфатированных гликозаминогликанов, сафранином – протеогликанов или альциановым синим – кислых гликозаминогликанов (хондрогенез). Масштабная линейка: 100 мкм.

дифференцировки. Хондрогенная дифференцировка проявляется подобно SC7-MSC-1. В связи с тем, что в обоих вариантах не обнаружены кислые гликозаминогликаны, выявляющиеся при окрашивании альциановым синим, можно предположить, что эта дифференцировка проявляется в обоих вариантах не полностью, т.е. дифференцировка ослаблена. В клеточном варианте (линии) SC7-MSC-3 присутствуют все 3 дифференцировки в полном объеме. Адипогенная дифференцировка представлена в виде крайне мелких капель жира, на первый взгляд схожих с агрегатами красителя Масляного красного, неспецифически оседающего на монослой клеток. Однако при большем увеличении (с некоторой потерей четкости из-за оптических свойств культурального пластика, на котором ведется съемка) видно, что это именно капли жира, расположенные внутри клеток (рис. 7).

Таким образом, можно утверждать, что 3 выделенные клеточные популяции принципиально различаются между собой по дифференцировочному потенциалу.

Продолжение культивирования линии SC7-MSC-3 до 13 пассажа выявило изменения в дифференцировочном потенциале. На этом пассаже отсутствуют адипогенная и остеогенная дифференцировки; обнаружена только хондрогенная дифференцировка (рис. 6). На 13-м пассаже, согласно активности β -галактозидазы, наступает PC, но, по-видимому, находящееся в начале этого процесса, т. к. существенного снижения ИП не происходит; согласно кривым роста, снижение ИП наблюдается только через 120– 144 ч культивирования. Значительное снижение ИП имеет место на 18 пассаже (рис. 2). Полученные данные о снижения активности β -галактозидазы и изменении дифференцировочного потенциала свиде-



Рис. 7. Подтверждение дифференцировки клеток варианта SC7-MSC-3 в адипогенном направлении на 6-м пассаже при большем увеличении. Убедительно показано наличие жировых включений, окрашенных масляным красным, внутри клеток. Масштабная линейка: 30 мкм.

тельствует о начале процесса активного РС на пассаже 13.

В заключение рассмотрим наблюдающиеся корреляции между полученными характеристиками 3-х клеточных популяций. Так, анализ РС показал, что во всех вариантах на 6-м пассаже имеет место повышенная частота стареющих клеток. Но в SC7-MSC-1 и SC7-MSC-2 наблюдается быстрое значительное увеличение стареющих клеток, способствующее их гибели. Тогда как в SC7-MSC-3 процесс старения идет медленнее. Есть данные, указывающие, что степень старения клеточной популяции связана с характером дифференцировочного потенциала (Park et al., 2005; Bonab et al., 2006; Lo Surgo et al., 2013; Bianchi et al., 2017; Кольцова и др., 2017; 2020; Крылова и др., 2018; Мусорина и др., 2019). Возможно, что повышенный уровень стареющих клеток на 6-м пассаже и дальнейшее быстрое старение способствует сниженному уровню дифференцировочного потенциала. Особенно ярко это проявляется в варианте SC7-MSC-2, у которого к пассажу 10 уже накапливается около 80% старых клеток и при этом отсутствуют адипогенная и отеогенная дифференцировки, а хондрогенная дифференцировка снижена. В клетках SC7-MSC-3, у которых старение идет медленнее, дифференцировочный потенциал развит полностью. Кроме корреляции между этими двумя признаками, обнаружена корреляция между сниженным уровнем поверхностного маркера CD90 и уровнем дифференцировки; особенно ярко это выражено в варианте SC7-MSC-2. Подобные данные описаны и в других работах (например: Brown et al., 2014).

Следует подчеркнуть, что причина получения нами клеточных популяций, различных по ряду свойств, может быть связана с процессом дифференцировки МСК из ЭСК. Как указывалось выше, процесс получения МСК из ЭСК человека может иметь ряд особенностей по сравнению с получением других МСК. В результате в процессе дифференцировки ЭСК в МСК из-за существенных изменений условий культивирования могут образоваться новые геномные варианты, или увеличиваться немногочисленные геномные изменения уже имеющиеся в ЭСК, которые не всегда можно выявить цитогенетическими методами. В некоторых случаях необходим молекулярно-биологический анализ (Полянская, 2014). Возникшие изменения могут дестабилизировать некоторые статусные или существенные для клеточной жизнедеятельности характеристики МСК.

Таким образом, проведенный анализ клеточных характеристик трех независимых популяций МСК, выделенных из линии SC7, свидетельствует о том, что только одна популяция (SC7-MSC-3) соответствует определению полноценной линии МСК с наличием статусных характеристик, которая названа нами SC7-MSC.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе было использовано оборудование ЦКП "Коллекция культур клеток позвоночных", поддержанного грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-683).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания (№ АААА-А19-119020-190093-9) Института цитологии РАН и поддержана Министерством науки и высшего образования РФ по проекту 15.БРК.21.0011 (Соглашение № 075-15-2021-1063).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не было экспериментов с участием животных и людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Воронкина И.В., Смагина Л.В., Бильдюг Н.Б., Мусорина А.С., Плянская Г.Г. 2020. Динамика активности матриксных металлопротеиназ и содержание белков внеклеточного матрикса в процессе репликативного старения линий мезенхимных стволовых клеток человека. Цитология. Т. 62. № 3. С. 210. (Voronkina I.V., Smagina L.V., *Bildyug N.B., Musorina A.S., Poljanskaya G.G.* 2020. Dynamics of matrix metalloproteinase activity and extracellular matrix proteins content in the process of replicative senescence of human mesenchymal stem cells. Cell Tiss. Biol. V. 14. P. 349.)

https://doi.org/10.31857/S0041377120030086

- Воронкина И.В., Смагина Л.В., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Полянская Г.Г. 2016. Сравнительный анализ динамики активности матриксных металлопротеиназ в процессе дифференцировки мезенхимных стволо вых клеток человека, выделенных из разных тканей одного донора. Цитология. Т. 58. № 11. С. 865. (Voronkina I.V., Smagina L.V., Krylova T.A., Musorina A.S., Poljanskaya G.G. 2017. Analysis of matrix metalloproteinase activity during differentiation of mesenchymal stem cells isolated from different tissues of one donor. Cell Tiss. Biol. V. 11. P. 95.)
- Кольцова А.М., Гордеева О.Ф., Крылова Т.А., Лифанцева Н.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2011. Сравнительные характеристики новых линий эмбриональных стволовых клеток человека SC5, SC6, SC7 и SC3a. Онтогенез. Т. 42. № 4. С. 249. (Koltsova A.M., Gordeeva O.F., Krylova T.A., Lifantseva N.V., Musorina A.S., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2011. Comparative characteristics of new human embryonic stem cell lines SC5, SC6, SC7, and SC3a. Ontogenez. V. 42. № 4. Р. 249.)
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2015. Характеристика новой линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эмбриональных стволовых клеток человека. Цитология. Т. 57. № 11. С. 761. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2016. Characterization of a novel mesenchymal stem cell line derived from human embryonic stem cells. Cell Tiss. Biol. V. 10. P. 1.)
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Петросян М.А., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2020. Получение и характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из разных областей плаценты одного донора. Цитология. Т. 62 № 9. С. 713. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Petrosyan M.A., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2021. Isolation and characterization of Mesenchymal Stem Cell Line Derived from different regions of the placenta of the same donor. Cell Tiss. Biol. V. 15. Р. 356.) https://doi.org/10.31857/S0041377120090035
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2018. Получение и характеристика линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из пульпы молочного зуба человека. Цитология. Т. 60. № 12. С. 955. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2018. The derivation and characterization of mesenchymal stem cell line, isolated from human pulp of a deciduous tooth. Tsitologiya. V. 60. P. 955.) https://doi.org/10.1134/S0041377118120015
- Кольцова А.М. Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2017. Динамика свойств двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека, при длительном культивировании. Цитология. Т. 59. С. 574. (Koltsova A.M., Krylova T.A., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2017. Dynamics properties of two lines of mesenchymal stem cells, derived from the Wharton' jelly of the human umbilical cord, during long-term cultivation. Tsitologiya. V. 59. P. 574.)

- 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. № 1. 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 cells lines derived from human embryonic stem cells, bone marrow, and foreskin. Tsitologiya. V. 54. Р. 5.)
- Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Полянская Г.Г. 2015. Характеристика клеточных сфероидов, полученных из линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и зачатка конечности раннего эмбриона человека. Цитология. Т. 57. № 7. С. 480. (Krylova T. A., Musorina A.S., Zenin V.V., Poljanskaya G.G. 2015. Cellular spheroids obtained from mesenchymal stem cells derived from bone marrow and limb muscle of early human embryo. Tsitologiya. V. 57. № 7. Р. 480).
- Крылова Т.А., Мусорина А.С., Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2018. Получение и сравнительная характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из крайней плоти двух доноров одного возраста. Цитология. Т. 60. № 4. С. 262. (Krylova T.A., Musorina A.S., Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2018. The derivation and comparative characterization of mesenchymal stem cell lines, isolated from the foreskin of two donors of the same age. Tsitologiya. V. 60. P. 262). https://doi.org/10.31116/tsitol.2018.04.04
- Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2019. Характеристика неиммортализованной линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эпикардиальной жировой ткани человека. Цитология. Т. 61. № 4. С. 272. (*Musorina A.S., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G.* 2019. Characterization of a nonimmortalized mesenchymal stem cell line isolated from human epicardial adipose tissue. Cell Tiss. Biol. V. 13. P. 247.)
- Пинаев Г.П. 2008. Клеточные культуры в фундаментальных и прикладных исследованиях (обзор). В кн. "Методы культивирования клеток". СПб. Изд-во Политехн. Ун-та. С. 7–21. (*Pinaev G.P.* 2008. Cell cultures in fundamental and applied research (review). In: Methods of cell cultivation. St. Petersburg: Publishing house of the Polytechnic University. P. 7.
- Полянская Г.Г. 2008. Типы клеточных культур. Образование, основные характеристики и изменчивость клеточных линий (обзор). В кн. Методы культивирования клеток. СПб. Изд-во Политехн. Ун-та. С. 22–40. (*Poljanskaya G.G.* 2008. Types of cell cultures. Formation, main characteristics and variability of cell lines. In: Methods of cell cultivation. St. Petersburg: Publishing house of the Polytechnic University. P. 22–40.
- Полянская Г.Г. 2014. Проблема нестабильности генома культивируемых стволовых клеток человека (обзор). Цитология. Т. 56. № 10. С. 697. (*Poljanskaya G.G.* 2014. The problem of genomic instability of cultivated human stem cells. (review). Tsitologiya. V. 56. Р. 697.)
- Полянская Г.Г. 2018. Сравнительный анализ характеристик линий мезенхимных стволовых клеток человека, полученных в коллекции культур клеток позвоночных (обзор). Сб. "Клеточные культуры", вып. 34. С. 3.

(*Poljanskaya G.G.* 2018. Comparative analysis of the lines of human mesenchymal stem cells derived in the collection of cell cultures of vertebrates (review). Collection "Cell cultures". V. 34. P. 3).

- Полянская Г.Г., Абрамян Д.С., Глебов О.К. 1981. Кариотипическая структура клоновых популяций клеток китайского хомячка при длительном культивировании. Цитология. Т. 23. № 7. С. 818. (*Poljanskaya G.G., Abramyan D.S., Glebov O.K.* 1981. The karyotypic structure of clonal population of Chinese hamster cells during a prolonged cultivation. Tsitologiya. V. 23. P. 818.)
- Полянская Г.Г., Baxmun Ю.Б. (Poljanskaya G.G., Vakhtin Yu.B). 2003. Кариотипическая структура клеточных популяций in vitro как целостная система (The karyotypic structure of cell populations *in vitro* as integral system) (обзор). Цитология. Т. 45. С. 115. (Tsitologiya. V. 45. P. 115).
- Полянская Г.Г., Мусорина А.С. 2018. Коллекция культур клеток позвоночных: создание, деятельность, каталог. СПб.: Изд-во Политехнического ун-та. 184 с. (*Poljanskaya G.G., Musorina A.S.* 2018. Collection of vertebrate cell cultures: creation, activity, catalogue. SPb.: Polytechnic Univ. Publishing House. 184 p.)
- Седова Г.П. 2008. Количественные аспекты злокачественного роста. Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журн. Т. 7. URL: Http://www.smolensk.ru/user/sgma/ mmorph/n-18-html/cont.htm (Sedova G.P. 2008. Quantitative aspects of malignant body height. Mathematical morphology. Electronic Math. Medicobiol. J. V. 7. URL: http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/n-18-html/cont.htm)
- Adak S., Magdalene D., Deshmukh S., Das D., Jaganathan B. 2021. A review on mesenchymal stem cells for treatment of retinal diseases. stem cell reviews and reports. V. 6. P. 1. https://doi.org/10.1007/s12015-020-10090-x
- Albu S., Kumru H., Coll R., Vives J., Vallés M., Denito-Penalva J., Rodriguez L., Codinach M., Hernández J., Navarro X., Vidal J. 2021.Clinical effects of intrathecal administration of expanded Wharton jelly mesenchymal stromal cells in patients with chronic complete spinal cord injury: a randomized controlled study. Cytotherapy. V. 23. P. 146. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.08.008
- Alimperti S., Lei P., Wen Y., Tian J., Campbell A.M., Andreadis S.T. 2014. Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. Biotechnol. Prog. V. 30. P. 974. https://doi.org/10.1002/btpr.1904
- Antonucci I., Stuppia L., Kaneko Y., Yu S., Tajiri N., Bae E.C., Chheda S.H., Weinbren N.L., Borlongan C.V. 2011. Amniotic fluid as rich source of mesenchymal stromal cells for transplantation therapy. Cell Transplant. V. 20. P. 789. https://doi.org/10.3727/096368910X539074
- *Bianchi M.V., Awaja F., Altankov G.* 2017. Dynamic adhesive environment alters the differentiation potential of young and ageing mesenchymal stem cells. Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. V. 78. P. 467.
- Bonab M.M., Alimoghaddam K., Talebian F., Ghaffari S.H., Ghavamzadeh A., Nikbin B. 2006. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. BMC Cell Biol. V. 7. P. 14. https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-14
- Brown P.T., Squire M.W., Li W.J. 2014. Characterization and evaluation of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells and bone marrow. Cell Tissue Res.

V. 358. P. 149.

https://doi.org/10.1007/s00441-014-1926-5

- Caplan A., Dennis J.E. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J. Cell Biochem. V. 98. P. 1076.
- *Chi Y., Han Z.-B., Xu F.-Y., Wang Y.-W., Feng X.-M., Chen F., Ma F.-X., Du W.-J., Han Z.-C.* 2014. V. 22. P. 588. https://doi.org/10.7534/j.iccn.1009-2137.2014.03.003
- Costa L., Eiro N., Fraile M., Gonzalez L., Saá J., Garcia-Portabella P., Vega B., Schneider J., Vizoso F. 2021. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. Cell Mol. Life Sci. V. 78. P. 447. https://doi.org/10.1007/s00018-020-03600-0
- De Witte S.F.H., Lambert E.E., Merino A., Strini T., Douben H.J.C.W., O'Flynn L., Elliman S.J., de Klein A.J.E.M.M., Newsome P.N., Baan C.C., Hoogduijn M.J. 2017. Aging of bone marrow- and umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells during expansion. Cytotherapy. V. 19. P. 798. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.02.074
- 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. Int. Soc. Cell. Ther. position statement. Cytother. V. 8. P. 315.
- Frith J.E., Thomson B., Genever P.G. 2010. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. Tissue Eng. (C) Methods. V. 16. P. 735. https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2009.0432
- Garcia J., Wright K., Roberts S., Kuiper J.H., Mangham C., Richardson J., Mennan C. 2016. Characterisation of synovial fluid and infrapatellar fat pad derived mesenchymal stromal cells: The influence of tissue source and inflammatory stimulus. Sci. Rep. V. 6. P. 24295. https://doi.org/10.1038/srep24295
- Guo M., Li D., Feng Y., Li Mu., Yang Bo. 2022. Adipose-derived stem cell-derived extracellular vesicles inhibit neuroblastoma growth by regulating GABBR1 activity through LINC00622-mediated transcription factor AR. J. Leukoc. Biol. V. 111. P. 19. https://doi.org/10.1002/JLB.1MIA0321-164R
- Jin Q., Yuan K., Lin W., Niu C., Ma R., Huang Z. 2019. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and adipose tissue for bone regeneration potential. Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. V. 47. P. 1577.

https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1594861

- Huang H.I., Chen S.K., Ling Q.D., Chien C.C., Liu H.T., Chan S.H. 2010. Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. Tiss. Eng. (A). V. 16. P. 1491. https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0431
- Kobayashi T., Torii D., Iwata T., Izumi Y., Nasu M., Tsutsui T.W. 2020. Characterization of proliferation, differentiation potential, and gene expression among clonal cultures of human dental pulp cells. Hum. Cell. V. 33. P. 490. https://doi.org/10.1007/s13577-020-00327-9
- Li J., Xu S.-Q., Zhao Y.-M., Yu S., Ge L.-H., Xu B.-H. 2018. Comparison of the biological characteristics of human mesenchymal stem cells derived from exfoliated deciduous teeth, bone marrow, gingival tissue, and umbilical cord.

Mol. Med. Rep. V. 18. P. 4969.

https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9501

- Lo Surdo J.L., Millis B.A., Bauer S.R. 2013. Automated microscopy as a quantitative method to measure differences in adipogenic differentiation in preparations of human mesenchymal stromal cells. Cytotherapy. V. 15. P. 1527.
- Maleki M., Ghanbarvand F., Reza Behvarz M., Ejtemaei M., Ghadirkhomi E. 2014. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. Int. J. Stem Cells. V. 7. P. 118.

https://doi.org/10.15283/ijsc.2014.7.2.118

- Mamidi M.K., Pal R., Mori N.A., Arumugam G., Thrichelvam S.T., Noor P.J., Abdullah H.M., Gupta P.K., Das A.K., Zakaria Z., Bhonde R. 2011. Co-culture of mesenchymal-like stromal cells derived from human foreskin permits long term propagation and differentiation of human embryonic stem cells. J. Cell Biochem. V. 112. P. 1353. doi.org/ https://doi.org/10.1002/jcb.23052
- McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M. 2016. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger. 140 p.
- Montesinos J., Flores-Figueroa E., Castillo-Medina S., Flores-Guzman P., Hermandez-Estevez E., Fajard0-Orduna G., Orozco S., Mayani H. 2009. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. V. 11. P. 163. https://doi.org/10.1080/14653240802582075
- *Muraglia A., Cancedda R., Quarto R.* 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro accoding to a hierarchical model. J. Cell Sci. V. 7. P.1161.

https://doi.org/10.1242/jcs.113.7.1161

Oh J., Lee R. 2021. Mesenchymal stromal cells for the treatment of ocular autoimmune diseases. Prog.Retin.Eye Res. V. 85.

https://doi.org/10.1016/jpreteyeres.2021.100967

- Ozkinay C., Mitelman F. 1979. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. Hereditas. V. 90. P. 1.
- Park J.S., Kim H.Y., Kim H.W., Chae G.N., Oh H.T., Park J.Y., Shim H., Seo M., Shin E.Y., Kim E.G., Park S.C., Kwak S.J. 2005. Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells. Mech. Ageing Dev. V. 126. P. 551.
- Phinney D.G. 2007. Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy. Cell Cycle. V. 6. P. 2884.
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C.M. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. Blood. V. 98. P. 2615.
- Riekstina U., Cakstina I., Parfejevs V., Hoogduijn M., Jankovskis G., Muiznieks I., Muceniece R., Ancans J. 2009. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. Stem Cell Rev. V. 5. P. 378. https://doi.org/10.1007/s12015-009-9094-9
- Russell K.C., Phinney D.G., Lacey M.R., Barrilleaux B.L., Meyertholen K.E., O'Connor K.C. 2010. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierar-

chy of lineage commitment. Stem cells. V. 28. P. 788. https://doi.org/10.1002/stem.312

- Sensebé L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P., Giordano R. 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. Vox Sang. V. 98. P. 93.
- Shin S., Lee J., Kwon Y., Park K.-S., Jeong J.-H., Choi S.-J., Bang S., Chang J., Lee C. 2021. Comparative proteomic analysis of the mesenchymal stem cells secretome from adipose, bone marrow, placenta and Wharton's jelly. Int. J. Mol. Sci. V. 22. P. 845. https://doi.org/10.3390/ijms22020845
- Shin J., Ryu C-.M., Ju H., Yu H., Song S., Hong K.-S., Chung H.-M., Park J., Shin D.-M., Choo M.-S. 2020. Therapeutic efficacy of human embryonic stem cells-derived multipotent stem/stromal cells in diabetic detrusor underactivity: A preclinical study. J. Clin. Med. V. 9. P. 2853. https://doi.org/10.3390/jcm.9092853
- Semenova E., Grudniak M.P., Machaj E.K., Bocian K., Chroscinska-Krawczyk M., Trochonowicz M., Stepaniec I.M., Murzyn M., Zagorska K.E., Boruczkowski D., Kolanowski T.J., Oldak T., Rozwadowska N. 2021. Mesenchymal stromal cells from different parts of umbilical cord: Approach to comparison & characteristics. Stem Cell Rev. Rep. https://doi.org/10.1007/s12015-021-10157-3
- Somoza R., Conget P., Rubio F. 2008. Neuropotency of human mesenchymal stem cell cultures: clonal studies reveal the contribution of cell plasticity and cell contamination. Biol. Blood Marrow Transplant. V. 14. P. 546. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.02.017
- Stanko P., Kaiserova K., Altanerova V., Altaner C. 2014. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub. V. 158. P. 373. https://doi.org/10.5507/bp.2013.078
- Sworder B.J., Yoshizawa S., Mishra P.J., Cherman N., Kuznetsov S.A., Merlino G., Balakumaran A., Robey P.G. 2015. Molecular profile of clonal strains of human skeletal stem/progenitor cells with different potencies. Stem Cell Res. V. 14. P. 297.

https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.02.005

Taei A., Dargahi L., Nasoohi S., Hassanzadeh G., Kadivar M., Farahmandfar M. 2021. The conditioned medium of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells alleviates neurological deficits and improves synaptic recovery in experimental stroke. J. Cell Physiol. V. 236. P.1967.

https://doi.org/10.1002/jcp.29981

Tai C., Wang L., Xie Y., Gao T., Huang F., Wang B. 2021 Analysis of key distinct biological characteristics of human placenta-derived mesenchymal stromal cells and individual heterogeneity attributing to donors. P. 1. Online ahead of print

https://doi.org/10.1159/000513038

- Vasudevan A., Bruining D., Loftus E., Faubion W., Ehman E., Raffals L. 2021. Approach to medical therapy in perianal Crohn's disease. V. 27. P. 3693. https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i25.3693
- Wang J., Shi P., Chen D., Wang S., Wang P., Feng X., Zhang L. 2021. Research status of the safety and efficacy of mesenchymal stem cells in the treatment of COVID-19-related pneumonia: a systematic review and meta-analysis. Stem

КОЛЬЦОВА и др.

Cells Dev. V. 30. P. 947. https://doi.org/10.1089/scd.2021.0179

- Wangler S., Kamali A., Wapp C., Wuertz-Kozak K., Häckel S., Fortes C., Lorin M., Benneker L.M., Haglund L., Richards R.G., Alini M., Peroglio M., Grad S. 2021. Uncovering the secretome of mesenchymal stromal cells exposed to healthy, traumatic, and degenerative intervertebral discs: a proteomic analysis. Stem Cell Res. Ther. V. 12. P. 11. https://doi.org/10.1186/s13287-020-02062-2
- Wu R., Gu B., Zhao X., Tan Z., Chen L., Zhu J., Zhang M. 2013. Derivation of multipotent nestin(+)/CD271(-STRO-1(-) mesenchymal-like precursors from human embryonic stem cells in chemically defined conditions. Hum. Cell. V. 26. P. 19.

https://doi.org/10.1007/s13577-011-0022-3

- Xiao Z., Lei T., Liu Y., Yang Y., Bi W., Du H. 2021. The potential therapy with dental tissue-derived mesenchymal stem cells in Parkinson's disease. Stem Cell Res. Ther. V. 12. P. 5. https://doi.org/10.1186/s13287-020-01957-4
- Yang C., ChenY., Zhong L., You M., Ya Z., Luo M., Zhang B., Yang B., Chen Q. 2019. Homogeneity and heterogeneity of biological characteristics in mesenchymal stem cells from human umbilical cords and exfoliated deciduous teeth. V.98. P. 415. https://doi.org/10.1139/bcb.2019.0253

https://doi.org/10.1139/bcb-2019-0253

- Yigitbilek F, Conley S.M., Tang H., Saadiq I.M., Jordan K.L., Lerman L.O., Taner T. 2021. Comparable in vitro function of human liver-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells: Implications for cell-based therapy. Front. Cell Dev. Biol. V. 9. eCollection 2021. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.641792
- Yu H.Y., Shin J.H., Yun H., Ryu C.-M., Lee S., Heo J., Park J., Hong K.-S., Chung H.-M., Shin D.-M., Choo M.-S. 2021. A preclinical study of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells for treating detrusor underactivity by chronic bladder ischemia. Stem Cell Rev. Rep. V. 17. P. 2139.

https://doi.org/10.1007/s12025-021-10204-z

- Zhang K., Li F., Yan B., Xiao D.-J., Wang Y.-S., Liu H. 2021. Comparison of the cytokine profile in mesenchymal stem cells from human adipose, umbilical cord and placental tissues. Cell Reprogram. V. 23. P. 336. https://doi.org/10.1089/cell.2021.0043
- Zhang X., Wang N., Huang Y., Li Y., Li G., Lin Y., Atala A., Hou J., Zhao W. 2022. Extracellular vesicles from three dimensional culture of human placental mesenchymal stem cells ameliorated renal ischemia/reperfusion injury. Int. J. Artif. Organs.

https://doi.org/10.1177/0391398820986809

The Derivation and Characterization of Different Populations of Mesenchymal Stem Cells, Isolated from Embryonic Stem Cells Line SC7

A. M. Koltsova^a, *, V. V. Zenin^a, V. I. Turilova^a, A. N. Shatrova^a, T. K. Yakovleva^a, and G. G. Poljanskaya^a, **

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

*e-mail: koltsova.am@mail.ru

**e-mail: gpolanskaya@gmail.com

A comparative analysis of three cell populations independently isolated from the ESC-SC7 line was carried out. The analysis of different characteristics was carried out on the 6th and later passages. The results obtained on the growth characteristics and replicative senescence (RS) of the three isolated cell variants showed that SC7-MSC-1 and SC7-MSC-2 have low proliferation index (PI), earlier RS and cell death. These 2 variants could be characterized only on the 6th passage. In contrast, the third cellular variant, S7-MSC-3, shows active proliferation, high PI, later RS, which allowed the analysis of cellular characteristics at the late passages. Thus, differences in differentiation potential were found in the SC7-MSC-3 variant between the 6th and 13th passages. Karyotypic analysis showed differences in the karyotypic stability of the derived cell populations. The 6th passage shows differences between populations in the proportion of cells carrying CD90 and CD105 markers, in the presence of markers of early differentiation of ESCs and in the differentiation potential in the adipogenic, osteogenic and chondrogenic directions. The reasons for the interpopulation differences may be related to the process of differentiation of MSCs from ESCs. Thus, only one (SC7-MSC-3) of the three populations isolated independently from line SC7 of ESC corresponds to conception of complete MSCs; it was called SC7-MSC.

Keywords: human mesenchymal stem cells, replicative senescence, proliferation, cell surface markers, karyotype, differentiation

УДК 576.354.4:576.315.43

СУЩЕСТВУЕТ ЛИ КАПСУЛА КАРИОСФЕРЫ В ООЦИТАХ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ? КРИТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОБЛЕМЫ

© 2022 г. Д. С. Боголюбов^{1,} *, А. О. Травина¹, И. О. Боголюбова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия *E-mail: dbogol@mail.ru

Поступила в редакцию 12.05.2022 г. После доработки 25.05.2022 г. Принята к публикации 29.05.2022 г.

Кариосфера (кариосома) – мейоз-специфическая эволюционно консервативная структура, представляюшая собой конденсированные биваленты, которые на стадии диплотены профазы мейоза собраны вместе в ограниченном пространстве крупного ядра. У некоторых организмов кариосфера дополнительно отделена от окружающей нуклеоплазмы надструктурным экстрахромосомным компартментом, называемым капсулой кариосферы (КК). Традиционно считают, что КК – специализированный элемент ядра ооцита (зародышевого пузырька, ЗП), который поддерживает кариосферу за счет присутствия структурных белков. прежде всего F-актина. Мы представляем новый взгляд на КК, которая, как считали прежде, формируется в ЗП травяной лягушки *Rana temporaria*. Кариосфера *R. temporaria* представляет собой простой "клубок" хромосом, или кариосому. ЗП *R. temporaria* в высокой степени обогащен филаментами F-актина, которые формируют обширную сеть в ядре, но не концентрируются в особой зоне (капсуле) вокруг конденсированных хромосом. В этом смысле структура ЗП R. temporaria существенно не отличается от таковой Xenopus laevis, у которого кариосфера и, соответственно, ее капсула не выражены. Легко идентифицируются типичные для 3П *R. temporaria* немембранные тяжи (прежде называемые "псевдомембранами"), а также "колечки" (annuli), которые, как считали ранее, представляют собой автономные поровые комплексы. Однако annuli не содержат нуклеопорина 35 (Nup35) и, следовательно, не могут рассматриваться в качестве аналогов ядерных поровых комплексов. Электронно-плотные тяжи, которые связывают *annuli*. не содержат ни F-актина, ни ламина В и не образуют покрова вокруг кариосферы. Структурные белки, такие как ламины, присутствуют в нуклеоплазме и концентрируются в локальных электронно-плотных сгустках – специфических биомакромолекулярных конденсатах полимерных молекул – белков и, возможно, РНК. Таким образом, кариосфера R. temporaria не имеет фиброзного скаффолда. Для сравнения использован материал КК жука Tribolium castaneum, в ЗП которого действительно формируется стабильный и обширный слой (оболочка, или shell), состоящий из F-актина. Мы полагаем, что структурная роль КК в ЗП *R. temporaria* несколько преувеличена. Однако кариосфера *R. temporaria* заключена в большое скопление сотен свободных амплифицированных ядрышек, напоминающее КК. Это скопление ядрышек весьма стабильно и легко может быть изолировано под обычным бинокулярным стереомикроскопом. Поскольку ядрышки представляют собой отдельные жидкие капли, их нельзя рассматривать в качестве структур, формирующих типичную КК, которая по определению имеет фиброзную структуру. Сходная ситуация характеризует 3П жука Tenebrio molitor, в котором отсутствуют ядрышки, но кариосома может располагаться внутри фиброгранулярного материала, который не содержит F-актина.

Ключевые слова: ядерные компартменты, кариосфера, капсула кариосферы, кариосома, ядерный F-актин, электронная микроскопия, ядро ооцита, зародышевый пузырек, *Rana temporaria* **DOI:** 10.31857/S0041377122050029

В самом начале XX в. американский энтомолог Молсби Уилетт Блэкмэн, изучая сперматогенез некоторых многоножек, описал своеобразную ядерную структуру, которую назвал кариосферой (Blackman, 1903, 1905). Согласно современному определению, кариосфера – мейоз-специфическая и эволюционно консервативная структура, образованная конденсированными хромосомами, объединенными вместе в ограниченном пространстве крупного ядра на стадии диплотены профазы мейоза (Bogolyubov, 2018). Блэкмэн (Blackman, 1903) предложил различать кариосферу и кариосому; последняя представляет собой простой "клубок" хромо-

Принятые сокращения: ЗП – зародышевый пузырек (germinal vesicle, ядро ооцита); ИЭМ – иммуноэлектронная микроскопия; КК – капсула кариосферы; ЛЩ – хромосомы типа ламповых шеток; СК – синаптонемный комплекс; ЭМ – электронная микроскопия; ЯО – ядерная оболочка; ЯПК – ядерный поровый комплекс; ВАF – barrier-to-autointegration factor; LEM-D – lamina-associated polypeptide 2–Emerin–MAN1 domain.

сом, в то время как кариосфера организована более сложно, фактически представляя собой "миниатюрное ядро".

У многих организмов хромосомы ооцита, собранные в кариосферу, дополнительно ограничены сложной многокомпонентной структурой, называемой капсулой кариосферы (КК), что создает еще большее впечатление о существовании "ядра в ядре" (Gruzova, 1988), или Innenkern по-немецки (Vejdovský, 1911–1912; цит. по: Gruzova, Parfenov, 1993). Термин "капсула" (Kapsel) был введен Вагнером (Wagner, 1923), чтобы различать волокнистую субстанцию, которая, как он считал, отделяет хромосомы от периферической области, занимаемой ядрышками в ядре ооцитов (зародышевом пузырьке, 3П) лягушек. В настоящее время считают, что ключевым компонентом КК служат филаменты полимеризованного ядерного актина (F-актина), который играет главную структурную роль и может рассматриваться в качестве маркерного белка КК (Bogolyubov, 2018).

В течение многих лет после открытия Блэкмэна кариосферу описывали у многих организмов, от гидры до человека, особенно в ЗП и менее часто – в ядре сперматоцитов (Gruzova, Parfenov, 1993). Если в мужском мейозе хромосомы и формируют кариосферу (кариосому), она никогда не имеет КК.

Несмотря на большое морфологическое разнообразие кариосфер, наблюдаемых в ооцитах беспозвоночных и позвоночных животных, можно выделить 3 основных их типа (Bogolyubov, 2018): 1) кариосферу с внешней КК; 2) кариосому, т. е. кариосферу без КК, и 3) "инвертированную" кариосферу. Последнее из перечисленных понятий является весьма формальным, охватывая морфологически различные типы кариосфер, когда хромосомы присоединены к наружной стороне "центрального тела" (Gruzova, 1988), такого как центромерное белковое тело птиц (Гагинская, 1972; Krasikova et al., 2004) или атипичное ядрышко (ядрышкоподобное тело) мыши и человека (Parfenov et al., 1989; De La Fuente et al., 2004).

Если у какого-либо организма в течение определенного периода продолжительной диплотены существует стадия ламповых щеток (ЛЩ), кариосфера формируется после этой стадии, когда хромосомы-ЛЩ теряют латеральные петли, сокращаются и имеют тенденцию к локализации в ограниченном пространстве ЗП (Bogolyubov, 2018). Формирование кариосферы обычно сопровождается затуханием транскрипционной активности хромосом. У травяной лягушки *R. temporaria* полностью сформированная кариосфера, представляющая собой рыхлый клубок хромосом, сохраняет заметный уровень остаточной транскрипционной активности, в то время как позже, в более компактной кариосфере, транскрипция прекращается полностью (Ilicheva et al., 2018).

У многих амфибий, включая R. temporaria, конденсированные хромосомы, собранные в кариосферу, заключены в компактный агломерат размером примерно 150 мкм, сформированный многочисленными амплифицированными ядрышками и занимающий примерно 1/1000 объема ЗП (Durvee, 1950). На протяжении многих десятилетий считали, что кариосфера R. temporaria имеет типичную KK (Gruzova. Parfvonov, 1973; Gruzova, Parfenov, 1977, 1993; Почукалина, Парфенов, 1994; Bogolyubov, 2018) - сложную многослойную структуру, состоящую из фиброзного эластичного материала и амплифицированных ядрышек (Парфенов, 1995). Считают, что в вителлогенных ооцитах R. temporaria KK появляется вокруг ЛШ в осеннее-зимний период и достигает максимального развития весной, перед овуляцией (Gruzova, Parfyonov, 1973), при этом хромосомы прикреплены к КК теломерами (Парфенов, 1995).

Постоянно сообщалось, что КК весьма стабильная структура и может быть легко изолирована из ЗП *R. temporaria* GVs, сохраняя целостность после обработок концентрированными растворами солей (1.5 M NaCl), неионными детергентами и нуклеазами (Engelhardt et al., 1982). Это позволило считать КК специализированным компонентом ядерного матрикса (Gruzova, Parfenov, 1993). Однако противоречивая теория ядерного матрикса, популярная в конце XX в., в настоящее время признана несостоятельной (Razin et al., 2014). Относительная устойчивость кариосферного комплекса, по-видимому, обеспечивается огромным количеством амплифицированных ядрышек, окутывающих кариосферу лягушки наподобие массивного облака, которое, по-видимому, стабилизируется сетью актиновых филаментов (Parfenov et al., 1995). Однако такие скопления, изолированные в физиологических растворах, довольно быстро рассыпаются на отдельные ядрышки.

В этом году мы начали работу над исследовательским проектом, посвященным дальнейшему исследованию кариосферы *R. temporaria*, надеясь в первую очередь проверить, может ли КК участвовать в мейоз-специфической пространственной организации диплотенных хромосом. В частности, мы собирались исследовать, могут ли некоторые ключевые белки, обеспечивающие динамические взаимодействия хромосом с ядерной оболочкой (ЯО) в митотическом цикле соматических клеток (Foisner, 2003; Segurra-Totten, Wilson, 2004), участвовать в формировании и поддержании КК.

Начиная работу над проектом, мы сначала предприняли ультраструктурное исследование, в том числе с помощью иммуноэлектронной микроскопии (ИЭМ), чтобы ответить на вопросы: 1) формируют ли актиновые филаменты КК? 2) являются ли другие структурные белки, такие как ядерные ламины, компонентами КК? 3) действительно ли характерные *annuli* в КК *R. temporaria*, демонстрирующие морфологическое сходство с ядерными поровыми комплексами (ЯПК), являются "автономными" поровыми комплексами, принимая во внимание возможность неканонического механизма их образования в ооплазме *Drosophila* (Hampoelz et al., 2019)?

Мы ожидали, что ответы на эти вопросы могут служить морфологической основой дальнейших исследований. Однако в ЗП весенних лягушек мы к своему удивлению обнаружили отсутствие заметной капсулы Вагнера (Wagner, 1923). Вместо этого ядро заполнено сетью актиновых филаментов, которые заметным образом не концентрируются в области, содержашей хромосомы, как и в 3П Xenopus (Kiseleva et al., 2004; Maslova, Krasikova, 2012). Эта сеть, очевидно, придает структурную стабильность скоплению ядрышек с находящейся внутри кариосомой (Ilicheva et al., 2019), однако F-актин не концентрируется в структуре, напоминающей КК. Сходное поведение демонстрируют филаменты, содержащие ламин В, которые тоже там не концентрируются. Кроме того, мы не подтвердили, что annuli – это аналоги ЯПК, поскольку они не содержат, по крайней мере, нуклеопорина Nup35.

Эти и другие морфологические особенности, заставляющие пересмотреть классические представления о КК в ооцитах травяной лягушки, обсуждаются в свете представлений о кариосфере амфибий, накопленных с середины XIX в. (Schultze, 1887) до наших дней. С целью дополнительного обсуждения мы также представили данные по структуре кариосферы двух видов жуков-чернотелок (Tenebrionidae): *Tribolium castaneum*, у которого кариосфера имеет типичную КК, и *Tenebrio molitor*, у которого кариосфера (кариосома) не имеет типичной КК, содержащей F-актин.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Самок травяной лягушки *Rana temporaria* L. в возрасте 2–3 г отбирали из естественной среды обитания в окрестностях Санкт-Петербурга в апреле месяце. Лягушек декапитировали и немедленно разрушали спинной мозг. Яичники и ооциты изолировали в среде OR2 (Wallace et al., 1973), содержащей 82.5 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, 1.0 мМ CaCl₂, 1.0 мМ MgCl₂, 1.0 мМ Na₂HPO₄, 5.0 мМ HEPES, pH ~7.8. 3П изолировали в растворе "5 : $1 + PO_4$ " (Gall et al., 1981), содержащем 83.0 мМ KCl, 17.0 мМ NaCl, 6.5 мМ Na₂HPO₄, 3.5 мМ KH₂PO₄, 1.0 мМ MgCl₂, 1.0 мМ MgCl₂, 1.0 мМ KCl, 17.0 мМ NaCl, 6.5 мМ Na₂HPO₄, 3.5 мМ KH₂PO₄, 1.0 мМ MgCl₂, 1.0 мМ MgCl₂, 1.0 мМ KCl, 17.0 мМ KCl, 1.0 мМ KCl, 17.0 мМ NaCl, 6.5 мМ Na₂HPO₄, 3.5 мМ KH₂PO₄, 1.0 мМ MgCl₂, 1.0 мМ MgCl₂, 1.0 мМ KCl, 17.0 мМ KCl, 1.0 мМ KCl, 128.3 мМ NaCl, 4.7 мМ KCl, 1.9 мМ CaCl₂).

Для выявления F-актина образцы, фиксированные в 2%-ном формальдегиде на PBS, окрашивали фаллоидин-родамином (2 мкг/мл) в течение 1 ч во влажной камере при комнатной температуре, отмывали в PBS и заключали в среду Vectashield (Vector

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

Laboratories), содержащую 1 мкг/мл DAPI для выявления ДНК. Препараты просматривали в конфокальном микроскопе Leica TCS SP5.

Для стандартной трансмиссионной ЭМ образцы фиксировали 2.5%-ным глутаральдегидом, затем 1.0%-ным OsO4 и заключали в Epon-Araldite. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Для ИЭМ образцы префиксировали в течение 2 ч в 4%-ном формальдегиде, свежеприготовленном из параформальдегида, и 0.5%-ном глутаральдегиде на PBS, затем фиксировали в 2%-ном формальдегиде при 4°С в течение ночи. После промывки в PBS, содержащем 0.05 М NH₄Cl, и легилратации в серии спиртов возрастающей концентрации образцы заключали в смолу LR White. Ультратонкие срезы инкубировали в течение 10 мин в блокирующем буферном растворе (PBS с добавлением 0.5% желатина из кожи холодноводных рыб (Sigma) и 0.02% Тween-20, pH 7.4). После этого срезы инкубировали в растворе первичных антител во влажной камере в течение ночи при 4°С. Использованные первичные антитела: мышиные моноклональные антитела к двухцепочечной ДНК (Hemicon, MAB 030, разведение от 1:200 до 1:300), козьи поликлональные антитела к Nup35 (Santa Cruz, sc-74762, разведение от 1 : 20 до 1:50), мышиные моноклональные антитела к Nup93 (Santa Cruz sc-374399, разведение 1 : 20)¹, козьи поликлональные антитела к ламину В (Santa Cruz, sc-6217, разведение от 1: 20 до 1 : 50) и кроличьи поликлональные антитела к N-концу молекулы актина (Sigma, A2103, разведение 1 : 20-1 : 50). После отмывки в PBS. содержашем 0.1% желатина и 0.02% Tween-20, срезы инкубировали в растворе вторичных антител (козьих к иммуноглобулинам кролика, ослиных к иммуноглобулинам кролика или козьих к иммуноглобулинам кролика), конъюгированных с частицами коллоидного золота размером 10 нм, во влажной камере в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Срезы контрастировали уранилацетатом и исследовали с помощью электронного микроскопа Leica 120 при 80 KB.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данное исследование посвящено ультраструктурному анализу кариосферы в ЗП травяной лягушки *Rana temporaria* с особым вниманием к КК, которая, по идее, должна формироваться в поздних вителлогенных ооцитах. Несмотря на целый век, прошедший с первого подробного описания КС этого вида (Wagner, 1923), после чего последовали электронно-микроскопические (Gruzova, Parfenov, 1977; Почукалина, Парфенов, 1994), биохимические (Engelhardt et al., 1982; Podgornaya et al., 2000) и иммунофлуорес-

¹ При использовании этих антител интенсивность ИЭМ-мечения была недостаточной.

центные исследования (Ильичева и др., 2016; Ilicheva et al., 2018, 2019), мы представляем новые данные, полученные с помощью электронной и иммуноэлектронной микроскопии, которые заставляют усомниться в существовании КК как специализированного ядерного компартмента ЗП *R. temporaria* (Gruzova, Parfenov, 1993). В то же время обширная КК, в высокой степени обогащенная F-актином, формируется в ЗП других организмов, например модельного насекомого *Tribolium castaneum*.

Кариосфера в зародышевом пузырьке травяной лягушки. В своей работе мы не обнаружили каких-то значимых структурных особенностей 3П *R. temporaria* по сравнению с теми, которые были ранее описаны у зимующих и пробуждающихся лягушек этого вида (Gruzova, Parfyonov, 1973; Gruzova, Parfenov, 1977). ЗП лягушек, собранных в естественных местообитаниях в апреле месяце, содержит развитую кариосферу в виде более или менее компактного клубка хромосом, собранных вместе в ограниченном объеме ядра, что соответствуют стадии, завершающей стадию ЛШ. Кариосфера расположена внутри большого (более 150 мкм) компактного скопления сотен амплифицированных ядрышек и занимает в нем центральное положение (рис. 1а). Область, содержащая хромосомы, выглядит на срезах прозрачной, поскольку в значительной степени лишена ядрышек. О формировании подобного рода скопления ядрышек в центре ЗП амфибий постоянно сообщали, начиная с конца XIX в.² (Schultze, 1887; Born, 1894; Carnoy, Lebrun, 1898; Wagner, 1923; Durvee, 1950), и уже ранние цитологии наблюдали в центре этого скопления почти лишенное ядрышек пространство с расположенными в нем хромосомами (рис. $16-\partial, \omega$).

В середине XX в. американский цитолог Уильям Дюрьи предложил периодизацию стадий роста ЗП *R. temporaria*, уделяя особое внимание структуре диплотенных хромосом (Duryee, 1950). Наиболее поздняя стадия, представленная в этой работе (стадия 6) соответствует полностью развитой кариосфере (кариосоме), представляющей собой поздние ЛЩ, собранные в центре скопления ядрышек (рис. 1d-e) – "хромосомном каркасе" (chromosomal frame). В этой важной работе Дюрьи не проиллюстрировал более поздние стадии развития кариосферы, следующие за стадией 6, на которых хромосомы, утратившие структуру ЛЩ, представляли бы собой более или менее компактный клубок, описанный ранее Вагнером (Wagner,1923) (рис. $1 \frac{3}{2} - 3$)³. В нашем материале присутствовали 3Π с обеими конфигурациями кариосферы (рис. 1e, 3).

Немецкий зоолог Карл Вагнер был первым, кто предложил термин "капсула" (Kapsel) в работе, посвяшенной развитию ооцитов лягушек. включая *R. temporaria*, в которой акцент был сделан на особенностях сезона и возрастных особенностях размножения лягушек (Wagner, 1923). Он отметил, что ранней весной, во время формирования хромосомного клубка (Chromosomenknäuel), известного теперь как кариосфера, вокруг поздних ЛЩ обнаруживается фиброзная субстанция (faserigen Substanz), окрашивающаяся кислыми красителями (рис. 1ж). Согласно Вагнеру (Wagner, 1923), "фибриллы" (Fasern) этой субстанции (капсулы) наиболее хорошо заметны после фиксации по Жильсону с последующим окрашиванием железным гематоксилином Хайденгайна (Heidenhain's iron hematoxylin), но не детектируются после окрашивания гематоксилином Делафильда.

Капсула Вагнера (капсула кариосферы, КК), окружающая поздние ЛЩ, собранные в кариосферу, была также изображена в работе Дюрьи (Duryee, 1950) (рис. 1*д*, *стрелки*). Он отмечал, что кариосфера "окружена более плотной субстанцией", так что хромосомы, расположенные в "центральном облаке ядрышек", встроены в "гель", физически изолирующий их "внутри хромосомного каркаса". Однако фотографии нефиксированных ЗП, представленные в работе, включая "изолированные центральные ядрышки и хромосомный каркас", не позволяют различить какие-либо детали структуры КК.

Хромосомы ооцитов травяной лягушки, собранные в кариосферу, демонстрируют довольно рыхлую ультраструктуру даже на финальных этапах диплотены, в поздних вителлогенных ооцитах (рис. $1u-\kappa$). Использование антител к ДНК (рис. 1κ) позволяет отличить хромосомы от, например, структур, возникающих в результате слияния ядрышек (не показано). Кроме того, на ультраструктурном уровне вокруг хромосом мы не наблюдали заметного "каркаса" или фиброзной структуры, которую можно было бы трактовать как капсулу Вагнера. Особенно убедительно это видно при малом увеличении электронного микроскопа (рис. 1u). Эти данные противоре-

² Центральное скопление ядрышек изначально называли "центральным телом" (нем. Centralkörper или Binnenkörper, фр. corps central), однако, по современной терминологии, "внутреннее тело" (Binnenkörper) – особый тип телец Кахаля в ЗП некоторых насекомых (Gall et al., 1995), а центральное тело – белковый скаффолд хромосом в случае различных "инвертированных" кариосфер (Gruzova, 1988; Bogolyubov, 2018), такой как атипичное ядрышко мыши и человека (Parfenov et al., 1989; Росhukalina et al., 2016; Fulka et al., 2019) или центромерное белковое тело птиц (Gaginskaya et al., 2009).

³ В отношении стадий ЗП *R. temporaria* в литературе имеются некоторые разногласия. Например, стадии 5 и 6, проиллюстрированные в нескольких работах, посвященных кариосфере *R. temporaria* (например, Ilicheva et al., 2018, 2019), на самом деле относятся к более позднему периоду развития кариосферы, чем стадия 6 по номенклатуре Дюрьи (Duryee, 1950). Использование же номенклатуры Дюмона (Dumont, 1972), предложенной в отношении стадий развития ооцитов *Xenopus*, в отношении ооцитов *Rana* (Почукалина, Парфенов, 1994; Ильичева и др., 2016) представляется неоправданной, поскольку структура ЗП *X. laevis* и *R. temporaria* несколько различается, а кариосфера слабо выражена в ЗП *Xenopus*.



Рис. 1. Морфологические особенности кариосферы амфибий. a - Полутонкий срез ядра ооцита*Rana temporaria*на стадии компактной кариосферы (*стрелка* $), которая локализована в центре скопления амплифицированных ядрышек; окраска метиленовым синим. <math>\delta - \partial$, $\mathcal{K} - И$ сторические рисунки скоплений ядрышек с расположенными внутри хромосомами (кариосферой) в ооцитах различных амфибий по данным Шульце (Schultze, 1887 – δ), Карнуа и Леблона (Carnoy, Leblond, 1898 – e-e), Дюрьи (Duryee, 1950 – ∂) и Barнера (Wagner, 1923 – \mathcal{K}); *стрелки* на фрагменте ∂ указывают капсулу Barнера; Biodiversity Heritage Library (https://www.biodiversitylibrary.org/), в свободном доступе согласно лицензии ССО 1.0 Public Domain Dedication. е, з – Ранняя (e) и поздняя (з) кариосфера *R. temporaria*, соответствующие стадии 6 по Дюрьи (Duryee, 1950 – ∂) и хромосомаму узлу (*Chromosomenknäuel*) по Вагнеру (Wagner, 1923 – \mathcal{K}); окраска DAPI. u – Кариосфера *R. temporaria* при малом увеличении электронного микроскопа, заметно отсутствие капсулы; хр – хромосомы, яш – ядрышко. κ – Хромосома ооцита *R. temporaria* на стадии кариосфера ИК (частицы разметронного мечения антителами к двухцепочечной ДНК (частицы размером 10 нм).

чат более ранним наблюдениям Почукалиной и Парфенова (1994), которые на полутонких срезах показывали присутствие грубых тяжей, интерпретированных как филаментозная КК *R. temporaria*.

О так называемых "псевдомембранах". Согласно ранним ЭМ-наблюдениям (Gruzova, Parfenov, 1977), собранные в кариосферу хромосомы ооцитов *R. temporaria* ассоциированы с филаментозным материа-

лом, главные морфологические элементы которого названы псевдомембранами⁴. Эти характерные образования представляют ряды структур (*annuli*), морфологически напоминающие "автономные" по-

⁴ Этот термин представляется неудачным, и мы предлагаем больше его не использовать. Вместо этого данные структуры могут быть названы "пучками", "тяжами" и т.п. Здесь мы будем использовать слово "тяжи" (strands).



Рис. 2. Ультраструктурные особенности кариосферы *Rana temporaria. a* – Грубофибриллярный материал (*стрелки*), локализованный в области, содержащей хромосомы (хр). δ – Электронно-плотные тяжи (*стрелки*), ассоциированные с тонкофибриллярным материалом; яш – фрагмент ядрышка. *в* – Срез, проходящий через тяжи, на котором видны "колечки" (*annuli*) (*головки стрелок*). *г* – Продольный срез через ядерную оболочку (ЯО), демонстрирующий морфологическое сходство между ядерными поровыми комплексами (*головки стрелок*) и "колечками", показанными на (*в*); Я и Ц – соответственно ядерная и цитоплазматическая стороны.

ровые комплексы (ЯПК), связанные фибриллярным материалом; в результате формируются электронноплотные тяжи⁵. Авторы считали, что они наблюдают на ультраструктурном уровне капсулу Вагнера. Подобные тяжи были также описаны в составе КК комаров (Fiil, Moens 1973; Fiil, 1974, 1976). В нашем материале мы наблюдали все эти экстрахромосомные образования ЗП *R. temporaria* (тяжи и *annuli*), описанные ранее (Gruzova, Parfenov, 1977), включая расположенные в непосредственной близости от хромосом и ядрышек (рис. $2a-\delta$). Кроме того, мы наблюдали внутриядерные мембранные структуры, такие как внутриядерные позырьки, трубчатые конструкции и внутриядерные пористые пластинки (intranuclear *annulata lamellae*) (Парфенов, 1995), в том числе на периферии участков ЗП *R. temporaria*, содержащих кариосферу (не показано). Обнаружено, что вышеупомянутые электронно-плотные искривленные тяжи занимают весьма ограниченные

⁵ Мы пока будем использовать историческое слово "annuli", поскольку природа этих структур остается непонятной и, по крайней мере, большинство из них, не является "автономными поровыми комплексами". В дальнейшем необходимо подобрать более подходящий термин.



Рис. 3. Фибриллярные тяжи кариосферы *Rana temporaria* после ультраструктурного иммуномечения антителами к нуклеопорину Nup35. Подавляющее большинство *annuli (головки стрелок)* не мечены и, следовательно, не могут рассматриваться в качестве "автономных поровых комплексов".

участки в ЗП. Как показал анализ серийных срезов, этот материал никогда не формирует что-либо напоминающее капсулу⁶.

Характерные *annuli* в этом материале (рис. 2*в*), по нашему мнению, хотя они морфологически напоми-

нают ЯПК (Gruzova, Parfenov, 1977) (рис. 2*г*), нельзя считать аналогами ЯПК, поскольку большинство их них не содержит нуклеопорина Nup35 — ключевого белка ЯПК, что отчетливо видно при помощи ИЭМ (рис. 3, *головки стрелок*; рис. 4*a*). ИЭМ-мечение ядерной оболочки (ЯО) служило в качестве позитивного контроля (рис. 4*б*).

⁶ Лат. *capsula* означает "коробочка" или "футляр".



Рис. 4. Особенности распределения Nup35 в ядре ооцита *Rana temporaria* по данным иммуноэлектронной микроскопии. (*a*) Нуклеопорин Nup35 накапливается в заметных биомолекулярных конденсатах (*стрелки*), но не в тяжах (тя). (*б*) Срез через ядерную оболочку (ЯО), использованный в качестве контроля мечения антителами к Nup35; Я и Ц – соответственно ядерная и цитоплазматическая стороны.

В то же самое время довольно много метки обнаруживается над материалом экстрахромосомных тяжей, расположенных в центральной, кариосферосодержащей области ЗП. Кроме того, посреди этого материала обнаруживаются заметные биомолекулярные конденсаты, интенсивно меченные антите-

лами к Nup35 (рис. 4a, стрелки). Известно, что внутренне неупорядоченные (intrinsically disordered) нуклеопорины, богатые остатками фенилаланина и глицина (FG-Nups), способны к фазовому разделению (Nag et al., 2022), что является фундаментальным процессом, лежащим в основе формирования биомолекулярных конденсатов (Banani et al., 2017). Nup35 не является FG-нуклеопорином, но некоторые такие нуклеопорины (non-FG-Nups), включая Nup35, взаимодействуют с определенным набором FG-Nups и усиливают взаимодействия с другими FG-Nups в ходе самосборки нуклеопориновых частиц (Konishi, Yoshimura, 2020). Это может приводить к формированию крупных биомолекулярных конденсатов, принимая во внимание возможный избыток нуклеопоринов в ЗП.

Наши наблюдения показывают, что Nup35 и, возможно, другие нуклеопорины, несомненно, присутствуют в кариосферосодержащем участке ЗП *R. temporaria*, что ранее было показано с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии (Ilicheva et al., 2018). Однако пока остается неясным вопрос, имеют ли *annuli* и ЯПК какие-либо общие признаки, кроме морфологических.

В соматических клетках Nup35 необходим для сборки ЯО, но напрямую не участвует в ее ассоциации с хромосомами. Однако он взаимодействует с другими нуклеопоринами, включая хроматинсвязывающий Nup93, с которым образует стабильные комплексы (Ródenas et al., 2009). В свою очередь Nup93, участвуя в связывании хроматина с ЯО, вовлечен в эпигенетическое подавление некоторых генов (Labade et al., 2016). В частности, взаимодействия Nup93 с хроматином влияют на экспрессию генов, связанных с ремоделированием актинового цитоскелета (Bersini et al., 2020). К сожалению, пока мы не можем установить, является ли Nup93 компонентом тяжей и (или) annuli, поскольку антитела к нему продемонстрировали низкую эффективность на ультраструктурном уровне, несмотря на то, что Nup93 был выявлен в центральной части 3П *R. tem*poraria с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии (Ilicheva et al., 2018).

Принимая во внимание, что Nup35 взаимодействует с ламинами типа В (Ródenas et al., 2009), что ламин III (ламин В3 амфибий) в большом количестве присутствует в кариосферосодержащей части ЗП *R. temporaria* (Парфенов, 1995) и что антитела к ламинам А/С и В на иммунофлуоресцентном уровне метят участки ЗП в области кариосферы (Ильичева и др., 2016; Ilicheva et al., 2018), мы проверили, являются ли ламины компонентами тяжей, связанных с *annuli*.

К сожалению, имевшиеся в нашем распоряжения антитела к ламинам А/С млекопитающих не метили ЯО на ЭМ-уровне (не показано) и в дальнейшем не использовались. Однако антитела к ламину В, ранее успешно протестированные на материале эволюционно далеких друг от друга организмов, например насекомых (Bogolyubov et al., 2013), метили фибриллярный материал в 3Π лягушки (Fig. 5), но не тяжи, связывающие *annuli* (рис. 6*a*). В 3Π , в том числе вблизи тяжей, часто наблюдали заметные биомолекулярные конденсаты, интенсивно меченные антителами к ламину В (рис. 6*б*).

F-актин – ключевой структурный белок зародышевого пузырька. Наконец мы проверили, связан ли ядерный актин с филаментозным материалом ЗП *R. temporaria* и можно ли считать F-актин главным компонентом КК. Давно известно, что актин – наиболее распространенный белок ЗП амфибий, количество которого составляет примерно 6% от общего количества белков в ЗП *Хепориs* в концентрации более чем 2 мг/мл (Clark, Merriam, 1977; Clark, Rosenваит, 1979). Такое высокое значение превышает критическую концентрацию, необходимую для полимеризации актина, что приводит к быстрому гелеобразованию при нарушениях целостности ЗП (Gall, 2006).

В ЗП Хепориз полимерный актин составляет примерно 37% или даже больше от общего количества ядерного актина (Clark, Merriam, 1979); таким образом, F-актин – превалирующая форма актина в ЗП (Bohnsack et al., 2006). Установлено (Bohnsack et al., 2006), что столь значительное накопление F-актина в ЗП X. laevis достигается за счет отсутствия экспортина-6 – специфического фактора экспорта ядерного актина (Stüven et al., 2003). В ЗП амфибий и птиц F-актин легко выявляется с помощью обычного окрашивания флуоресцентно меченым фаллоидином (Морозова, Киселева, 2008; Maslova, Krasikova, 2012; Ilicheva et al., 2019).

В ЗП *X. laevis* на ультраструктурном уровне ядерный F-актин формирует сеть, состоящую из пучков и разветвленных филаментов толщиной примерно 12-100 нм (в среднем примерно 40 нм), которая простирается от ЯПК через все ядро. Это отчетливо показано с помощью сканирующей ЭМ с использованием эмиссии под действием электрического поля (полевой эмиссии) — field emission scanning EM (Kiseleva et al., 2004). Считают, что сеть F-актина играет архитектурную роль и заякоривает органеллы, такие как тельца гистоновых локусов⁷, спеклы (кластеры интерхроматиновых гранул) и ядрышки, а также, возможно, участвует в координации ядерноцитоплазматических взаимоотношений и транспорте ядерных компонентов (Kiseleva et al., 2004).

Советско-российский клеточный биолог и эмбриолог Владимир Николаевич Парфенов и его коллеги были одними из первых, кто подтвердил наличие микрофиламентов и пучков полимерного актина в ЗП

⁷ В течение десятилетий эти ядерные органеллы в ЗП амфибий рассматривали как тельца Кахаля (Nizami et al., 2010).



Рис. 5. Ультраструктурное иммуномечение антителами к ламину В, демонстрирующее присутствие ламинсодержащего фибриллярного материала (*стрелки*) в ядре ооцита *Rana temporaria*.

R. temporaria, в том числе на ультраструктурном уровне (Parfenov et al., 1995). Ими показано, что в поздних ооцитах короткие фрагменты пучков F-актина обнаруживаются в центральной части ЗП, в основном в ассоциации с ядрышками. Хотя в этой работе не упоминаются ни кариосфера, ни КК, с этого времени утвердилась точка зрения о том, что F-актин является одним из главных компонентов КК *R. temporaria* (Ильичева и др., 2016; Bogolyubov, 2018; Ilicheva et al., 2018, 2019).

С помощью стандартной ЭМ мы подтвердили, что ЗП *R. temporaria* заполнен обширной сетью филаментов, некоторые из которых тесно ассоциированы с хромосомами (рис. 7*a*) и ядрышками (рис. 7*b*). ЗП *R. temporaria* интенсивно окрашивается фаллоидинродамином, однако это окрашивание довольно равномерное, в том числе в перинуклеолярных областях и участке, содержащем кариосферу (рис. 8). Мы пока не можем объяснить грубое окрашивание фаллоидин-родамином области, содержащей кариосферу, и выявление заметных F-актиновых "колец" вокруг ядрышек, о чем сообщалось ранее в результате иммунофлуоресцентных исследований (Ilicheva et al., 2018, 2019) и что было интерпретировано как выявление КК *R. temporaria*. В нашем материале мы никогда не наблюдали подобных картин. После окрашивания фаллоидин-родамином и обработки антителами к актину заметные тяжи F-актина не выявляются на световом уровне, что напоминает характер окрашивания ЗП *X. laevis* (Морозова, Киселева, 2008; Maslova, Krasikova, 2012). По нашему мнению, распределение F-актина в ЗП *R. temporaria* существенно не отличается от такового в ЗП шпорцевой лягушки, у которой слабо выражена кариосфера.

Ультраструктурное (ИЭМ) исследование показало, что антитела к актину действительно выявляют филаментозную сеть в $3\Pi R.$ temporaria, подтверждая присутствие в нем филаментов актина (рис. 9*a*). Эти



Рис. 6. Особенности распределения ламина В в ядре ооцита *Rana temporaria. a* – Характерные тяжи (тя) в кариосферосодержащей части ядра полностью лишены меток, в то время как белок, выявляемый антителами к ламину В, выявляется в аморфных локальных областях (*стрелка*). *б* – Срез через ядерную оболочку (ЯО), использованный в качестве контроля мечения антителами к ламину В; Я и Ц – соответственно ядерная и цитоплазматическая стороны.

филаменты заполняют нуклеоплазму, но не концентрируются ни в кариосферосодержащей области, ни вокруг ядрышек. Во всяком случае, вышеупомянутые тяжи, "претендующие" на роль элементов КК, не содержат актина, а антитела к актину маркируют ассоциированный фибриллярный материал, но не сами



Рис. 7. Ядерные филаменты (*стрелки*) в ассоциации с хромосомой (*a*) и ядрышком (*b*), выявляемые с помощью стандартной трансмиссионной электронной микроскопии. хр – хроматин, яш – ядрышко.



Рис. 8. Окрашивание ядра ооцита *Rana temporaria* родамин-фаллоидином для выявления F-актина (*красный цвет*) и DAPI (*синий цвет*); конфокальная микроскопия, максимальная проекция.

тяжи (рис. 96). В то же время некоторое количество актинсодержащего материала находится в физической ассоциации с этими тяжами (рис. 96).

Следует подчеркнуть, что за пределами амфибий, а именно у насекомых, ядерный F-актин действительно может рассматриваться в качестве маркерного белка КК (Bogolyubov, 2018) — конечно, у тех видов, у которых развивается надструктурный комплекс "кариосфера—КК". Наиболее впечатляющим примером служит ЗП некоторых сетчатокрылых (Rübsam, Büning, 2001) и некоторых жуков (Świątek, 1999; Bogolyubov, 2018), у которых КК интенсивно и избирательно окрашивается с помощью флуоресцентно меченого фаллоидина. В ЗП булавоусого мучного хрущака *Tribolium castaneum* F-актин формирует обширный "кожух" (рис. 10*a*), который также хорошо виден на ультраструктурном уровне как электронно-плотная оболочка (shell) кариосферы (рис. 10*б*). У *T. castaneum* эта "оболочка" часто ассоциирована с тяжами, которые, в отличие от тяжей в кариосферосодержащей области ЗП *R. temporaria*, содержат ламин B (Bogolyubov et al., 2013).

Что актин, особенно F-актин, делает в ядре? Времена, когда само существование актина в ядре вызывало изрядную долю скептицизма, закончились более чем 20 лет тому назад, породив бурно развивающуюся область исследований (Pederson, Aebi, 2002, 2005; Pederson, 2008). Теперь нет уже никаких со-



Рис. 9. Иммуноэлектронное мечение ядра ооцита *Rana temporaria* антителами к N-концу молекулы актина. *a* – Актиновые филаменты (*стрелки*) в участке ядра, содержащем кариосферу. *б* – Тяжи (тя) не содержат актина. *в* – Фрагмент актинового пучка (*стрелка*), находящегося в физической ассоциации с тяжом (тя).

мнений, что актин в ядре выполняет множество функций и, помимо всего прочего, широко вовлечен в регуляцию экспрессии генов и поддержание целостности генома (Visa, Percipalle, 2010; Kyheröinen, Vartiainen, 2020), что напрямую связано с оогенезом и формированием кариосферы. Ядерный актин так-



Рис. 10. Кариосфера в ядре ооцита булавоусого мучного хрущака *Tribolium castaneum*, представленная здесь для демонстрации существенных различий в ее строении по сравнению с кариосферой лягушки. *а* – Окраска родамин-фаллоидином (*красный цвет*), демонстрирующая присутствие типичной капсулы кариосферы, богатой F-актином (*стрелка*), ДНК (собственно кариосфера) окрашена DAPI (*синий цвет*); конфокальная микроскопия, максимальная проекция. *б* – Ультраструктура капсулы кариосферы *T. castaneum*; *стрелки* указывают актиновые филаменты (Bogolyubov et al., 2013), ассоциированные с мощно развитой стенкой (shell) капсулы, окружающей хроматин (хр), иммуноэлектронное мечение антителами к ДНК; ят – ядерное тельце (кластер интерхроматиновых гранул), впп – внутриядерные пористые пластинки (intranuclear *annulata lamella*).

же важен в процессах определения судьбы клеток в ходе дифференцировки тканей, а также эмбрионального развития (Kloc et al., 2021).

Актин в ядре входит в состав хроматинремоделирующих комплексов и связан со всеми тремя РНК- полимеразами, а также РНП-комплексами процессинга и экспорта мРНК; при этом ядерный F-актин также обладает специфическими функциями (Gieni, Hendzel, 2009), участвуя, например, в репарации разрывов двухцепочечной ДНК и в ответе на репли-

кационный стресс (Lamm et al., 2020). Нарушения функций ядерного актина, в том числе в результате нарушений его полимеризации/деполимеризации, имеют отношение к этиологии многих заболеваний человека, включая рак (Hyrskyluoto, Vartiainen, 2020) и ламинопатии (Bera, Sengupta, 2020). В последнем случае нарушения взаимодействия ядерного актина (и миозина) с ламиновой сетью, поврежденной в результате мутаций *LMNA*, но в норме обеспечивающей механическую жесткость хромосом, нарушают хромосомный ландшафт и экспрессию генов.

Специфические ядерные функции полимеров актина особенно важны для ооцитов, в которых полимеризация актина играет ключевую роль в сегрегации хромосом (Dunkley et al., 2022). Однако фундаментальные механизмы функционирования мономерного актина и актиновых филаментов в ядре все еще недостаточно изучены и служат предметом дискуссий (Ulferts et al., 2021).

Механизмы, посредством которых F-актин вовлечен в формирование кариосферы и ее капсулы, также еще предстоит расшифровать. Не вызывает, однако, сомнений тот факт, что актинсодержащие филаменты являются важнейшими компонентами ЗП (Морозова, Киселева, 2008). Эксперименты с агентами, деполимеризующими актин, такими как латрункулин и цитохалазин D, убедительно доказывают ключевую роль F-актина в поддержании структурной целостности надмолекулярных комплексов ЗП. У шпорцевой лягушки X. laevis, у которой хромосомы не формируют выраженную кариосферу, разрушение актиновых филаментов приводит к коллапсу хромосом и их "слипанию" в компактную кариосомоподобную массу (Maslova, Krasikova, 2012).

В качестве необходимого уточнения стоит отметить, что в конце диплотены хромосомы ооцита X. laevis "короткие и ретрагированные" (short and retracted) и вместе с амплифицированными ядрышками "формируют массу в центре ядра" (Dumont, 1972). С формальной точки зрения это описание соответствует описанию кариосферы, однако, как показано на рис. 16 в статье Дюмона (Dumont, 1972), на этой стадии хромосомы ооцита Xenopus не образуют компактного клубка. Вокруг хромосом не наблюдается филаментозного материла, который мог бы рассматриваться в качестве КК. Довольно странно, что заключительные стадии роста ооцита у такого распространенного модельного организма, которым является X. laevis, до сих пор исследованы недостаточно, а подавляющее большинство исследований касается предшествующих стадий хромосом-ЛШ.

В ЗП *R. temporaria*, в котором уже сформирована более или менее компактная кариосфера, воздействие цитохалазином D существенно не влияет на хромосомы и транскрипцию, приводя лишь к некоторому сжатию кариосферы (Ilicheva et al., 2019). При этом цитохалазин D полностью разрушает окружающее скопление ядрышек, что приводит к их слиянию в единую гигантскую каплю. Авторы полагают, что в этом случае цитохалазин D разрушает КК. Однако на самом деле мы имеем дело с разрушением всей сети актиновых филаментов в 3П.

Заключающие уточнения. Считают, что кариосфера и ее капсула – специализированные ядерные структуры ооцитов, участвующие в создании специфической структурно-функциональной компартментализации ЗП (Gruzova, Parfenov, 1993; Bogolyubov, 2018). Наши наблюдения над ЗП R. temporaria показали, что кариосфера (хромосомный аппарат вителлогенных ооцитов) травяной лягушки представляет собой простой клубок хромосом, что полностью соответствует оригинальному определению кариосомы (Blackman, 1903). В то же время мы не полтвердили присутствия вокруг этого "хромосомного клубка" заметной фиброзной капсулы Вагнера (Wagner, 1923), в то время как в 3П других организмов. особенно насекомых. подобного рода КК действительно существует. Центральные скопления ядрышек, характерные для ЗП различных амфибий, по нашему мнению, не могут считаться настоящими КК. поскольку они образованы отдельными жидкими каплями (ядрышками), которые отделены друг от друга и в нормальных условиях не сливаются в единую массу, хотя картины слияния отдельных ядрышек в 3П *R. temporaria* наблюдаются довольно часто.

Присутствие экстрахромосомного материала, который иногда охватывает хромосомы, собранные в кариосому, продемонстрировано, например, в ЗП большого мучного хрущака *Tenebrio molitor*. Этот фиброгранулярный материал, в частности, содержит избыток PHK-полимеразы II, факторов сплайсинга пре-мPHK и другие молекулярные компоненты, не участвующие в синтезе/процессинге PHK в транскрипционно инертных поздних ооцитах (Bogolyubov, Parfenov, 2008) (рис. 11). Однако этот материал, по-видимому, лишен структурных белков, таких как F-актин, и потому не может считаться KK.

КК насекомых не является полностью замкнутым барьером, изолирующим кариосферу, и отдельные фрагменты конденсированного хроматина могут находиться за ее пределами, по крайней мере, на некоторых стадиях роста ооцита сетчатокрылого насекомого — златоглазки *Chrysopa carnea* (Rübsam, Büning, 2001). КК насекомых аккумулирует значительные количества F-актина, который можно считать маркерным (signature) компонентом КК (Bogolyubov, 2018).

ЗП лягушек также содержит невероятные количества распределенного по нуклеоплазме F-актина независимо от того, формируется ли компактная кариосфера или нет. У травяной лягушки структурную стабильность комплексу "кариосфера—ядрышки" также в первую очередь придает обширная сеть F-актиновых филаментов и их пучков, которая заполняет ЗП. Ключевая структурная роль F-актина в под-



Рис. 11. Кариосфера в ядре ооцита большого мучного хрущака *Tenebrio molitor. а* — Иммунофлуоресцентное окрашивание с помощью антител к фактору сплайсинга пре-мРНК SRSF2 (зеленый цвет), которые локализован в фиброгранулярном материале (фгм), окружающем хроматин (хр), ДНК (красный цвет) окрашена TO-PRO-3. δ — Фиброгранулярный материал окружает хроматин, но оболочка (shell) или филаментозные тяжи, напоминающие капсулу кариосферы у другого жука-тенебриониды *Tribolium castaneum* (рис. 10), отсутствуют (Боголюбов и др., 2012, с изменениями).

держании стабильности структур ЗП неоспоримо доказана в экспериментах с соединениями, деполимеризующими актин (Maslova, Krasikova, 2012), в том числе на ЗП травяной лягушки (Ilicheva et al., 2019). Однако в этом случае мы говорим о ядерной сети F-актина в целом, а не о специализированной ее части, которая могла бы представлять КК. В этом отношении структура ЗП *R. temporaria* принципиально не отличается от структуры ЗП *X. laevis*.

В то время как фундаментальные принципы формирования кариосферы (кариосомы) в основном расшифрованы, по крайней мере в отношении *Drosophila melanogaster* (Cullen et al., 2005; Ivanovska et al., 2005; Lancaster et al., 2007, 2010; Singh et al., 2018; Kenny et al., 2021), меньше известно о биологическом значении KK.

Формирование кариосомы в ЗП дрозофилы, повидимому, не зависит от белков синаптонемных комплексов (СК), а мутанты с нарушениями формирования СК не имеют дефектов формирования кариосомы (Takeo et al., 2011). С другой стороны, мутации различных генов, которые необходимы для правильного завершения мейоза и оогенеза, приводят к аномалиям кариосомы, включая такие, когда хромосомы неправильно конденсируются и остаются связанными с ЯО (Morris et al., 2003).

Главными "участниками" формирования кариосомы Drosophila являются ферменты, модифицирующие гистоны (Flora et al., 2017), такие как консервативная нуклеосомная киназа гистонов 1 (nucleosomal histone kinase-1, NHK-1, она же Vrk-1 дрозофилы) (Cullen et al., 2005; Ivanovska et al., 2005; Lancaster et al., 2007, 2010). Согласно предложенной схеме, фосфорилирование ВАF киназой NHK-1 позволяет хромосомам отсоединиться от ЯО, что приводит к формированию нормальной кариосомы. Однако при нарушении фосфорилирования ВАГ – хорошо известного связующего звена между хроматином и ЯО благодаря его взаимодействиям с ДНК и LEM-D-белками ядерной оболочки (Jamin, Wiebe, 2015) - хромосомы остаются связанными с ЯО (Lancaster et al., 2007). Весьма вероятно, что это эволюционно консервативный механизм, принимая во внимание консерватизм ВАГ и NHK-1.

"Сгустки" электронно-плотных тяжей – единственные структуры, которые потенциально могли бы претендовать на роль элементов КК. Эти тяжи связывают "колечки" (annuli), демонстрирующие большое морфологическое сходство с "автономными" поровыми комплексами (Gruzova, Parfenov, 1977), и ассоциированы с тонкофибриллярным актинсодержащим материалом. По-видимому, annuli в действительности не являются аналогами ЯПК, поскольку они не содержат по крайней мере одного необходимого нуклеопорина – Nup35. Более того, тяжи не содержит ни актина, ни ламина В и потому не могут считаться КК-подобными структурами, в особенности потому, что они формируют только "сгустки", но не протяженные образования. Интересно, что у озерной лягушки Pelophylax ridibundus (panee R. ridibunda) хромосомы в составе кариосферы присоединены к наружной стороне центрального тела, которое состоит из материала, морфологически сходного с тяжами и annuli ЗП R. temporaria (Parfenov, 1979).

Резонно предполагалось, что тяжи являются производными СК, прежде всего их центральных элементов (Gruzova, Parfenov, 1993). В ЗП некоторых двукрылых насекомых, таких как малярийный комар *Aedes aegypti*, формируется сложная КК, которая, как считают, образована несколькими слоями множественных аномальных СК, называемых поликомплексами. Кроме того, на ультраструктурном уровне в КК комаров подробно охарактеризованы внутриядерные пористые пластинки (intranuclear *annulata lamellae*), которые содержат *annuli*, напоминающие по своей структуре автономные ЯПК (Fiil, Moens, 1973; Fiil, 1974, 1976). Природу всех типов этого специфического экстрахромосомного материала еще предстоит установить.

В заключение, наши знания о клеточном ядре, особенно ЗП, несомненно, еще далеко не полные даже на уровне морфологии клетки. Приведенные здесь данные следует обязательно учитывать как основу для дальнейших исследований ЗП амфибий, широко используемого в качестве экспериментальной модели.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы весьма признательны Г.Н. Почукалиной, предоставившей нам материал ооцитов *R. temporaria*, подготовленный для электронной и иммуноэлектронной микроскопии. Считаем необходимым посвятить данную работу памяти М.Н. Грузовой и В.Н. Парфенова, которые внесли неоценимый вклад в исследования кариосферы в России.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00380).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с отечественными и международными правилами, включая Европейскую конвенцию о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Исследование одобрено Комитетом по этике при работе с животными Института цитологии РАН (лицензия F18-00380). В исследовании не использовали исчезающие или охраняемые виды; все образцы были собраны за пределами охраняемых территорий в пределах России.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, имеющего отношение к содержанию этой статьи. Авторы не имеют финансовых или имущественных интересов в отношении какого-либо материала, обсуждаемого в этой статье.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Концепция и дизайн исследования, ультрамикротомия, иммуномечение и просвечивающая электронная микроскопия, а также подготовка изображений и написание первого варианта рукописи – Д.С. Боголюбов; переработка рукописи – И.О. Боголюбова, А.О. Травина;

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

конфокальная микроскопия, анализ и интерпретация данных — И.О. Боголюбова, Д.С. Боголюбов; сбор материала и содержание животных — А.О. Травина; изоляция ооцитов и ядер — А.О. Травина, И.О. Боголюбова. Все авторы прочитали и одобрили окончательную версию рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Боголюбов Д.С., Киселев А.М., Шабельников С.В., Парфенов В.Н. 2012. Полиаденилированные РНК и факторы экспорта мРНК в связи с экстрахромосомными ядерными доменами вителлогенных ооцитов насекомого *Tenebrio molitor*. Цитология. Т. 54. № 6. С. 497. (*Bogolyubov D.S., Kiselyov A.M. Shabelnikov S.V., Parfenov V.N.* 2012. Polyadenylated RNA and mRNA export factors in extrachromosomal nuclear domains of vitellogenic oocytes of the insect, *Tenebrio molitor*. Cell Tissue Biol. V. 6. P. 412.) https://doi.org/10.1134/S1990519X12050045
- Гагинская Е.Р. 1972. Ядерные структуры в ооцитах половозрелых птиц. II. Белковые тела и кариосфера. Цитология. Т. 14. № 5. С. 568. (*Gaginskaya E.R.* 1972. The nuclear structures in oocytes of adult birds. II. Protein bodies and the karyosphere. Tsitologiia. V. 14. P. 568.)
- Ильичева Н.В., Кирюшина Д.Ю., Баскаков А.В., Подгорная О.И., Почукалина Г.Н. 2016. Капсула кариосферы ооцитов зимующих лягушек Rana temporaria содержит актин, ламины и белки малых ядерных РНП. Цитология. Т. 58. № 6. С. 451. (Ilicheva N.V., Kiryushina D.Y., Baskakov A.V., Podgornaya O.I., Pochukalina G.N. 2016. The karyosphere capsule in oocytes of hibernating frogs Rana temporaria contains actin, lamins, and SnRNP. Cell Tissue Biol. V. 10. P. 422.) https://doi.org/10.1134/S1990519X16050059
- Морозова К.Н., Киселева Е.В. 2008. Изменение организации ядра и цитоплазмы ооцитов ксенопуса после разрушения актиновых филаментов латрункулином. Цитология. Т. 50. № 5. С. 394. (*Morozova K.N., Kiseleva E.V.* 2008. Nuclear and cytoplasmic organization in *Xenopus* oocytes after disruption of actin filaments by latrunculin. Cell Tissue Biol. V. 2. P. 300.) https://doi.org/10.1134/S1990519X08030115
- Парфенов В.Н. 1995. Преобразования ядерных структур в оогенезе некоторых позвоночных (к вопросу о морфогенезе капсулы кариосферы). Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Санкт-Петербург. 51 с. (*Parfenov V.N.* 1995. Transformations of nuclear structures during oogenesis of some vertebrates (on the morphogenesis of the karyosphere capsule). D. Sci. Thesis, St. Petersburg, 51 pp.)
- Почукалина Г.Н., Парфенов В.Н. 1994. Организация кариосферы с капсулой перед созреванием ооцитов травяной лягушки. Цитология. Т. 36. № 11. С. 1027. (*Pochukalina G.N., Parfenov V.N.* 1994. Organization of karyosphere with the capsule in oocytes of *Rana temporaria* before maturation. Tsitologiia. V. 36. Р. 1027.)
- Banani S.F., Lee H.O., Hyman A.A., Rosen M.K. 2017. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. V. 18. P. 285. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7

- *Bera M., Sengupta K.* 2020. Nuclear filaments: role in chromosomal positioning and gene expression. Nucleus. V. 11. P. 99. https://doi.org/10.1080/19491034.2020.1769445
- Bersini S., Lytle N.K., Schulte R., Huang L., Wahl G.M., Hetzer M.W. 2020. Nup93 regulates breast tumor growth by modulating cell proliferation and actin cytoskeleton remodeling. Life Sci. Alliance. V. 3. e201900623. https://doi.org/10.26508/lsa.201900623
- Blackman M.W. 1903. The spermatogenesis of the myriapods. II. On the chromatin in the spermatocytes of Scolopendra heros. Biol. Bull. V. 5. P. 187. https://doi.org/10.2307/1535736
- *Blackman M.W.* 1905. The spermatogenesis of the myriapods. IV. On the karyosphere and nucleolus in the spermatocytes of *Scolopendra subspinipes*. Proc. Am. Acad. Arts Sci. V. 41. P. 331.

https://doi.org/10.2307/20022075

Bogolyubov D.S. 2018. Karyosphere (karyosome): a peculiar structure of the oocyte nucleus. Int. Rev. Cell Mol. Biol. V. 337. P. 1.

https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.12.001

Bogolyubov D., Parfenov V. 2008. Structure of the insect oocyte nucleus with special reference to interchromatin granule clusters and Cajal bodies. Int. Rev. Cell Mol. Biol. V. 269. P. 59.

https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)01002-2

- Bogolyubov D.S., Batalova F.M., Kiselyov A.M., Stepanova I.S. 2013. Nuclear structures in *Tribolium castaneum* oocytes. Cell Biol. Int. V. 37. P. 1061. https://doi.org/10.1002/cbin.10135
- Bohnsack M.T., Stüven T., Kuhn C., Cordes V.C., Görlich D. 2006. A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes. Nat. Cell Biol. V. 8. P. 257. https://doi.org/10.1038/ncb1357
- Born G. 1894. Die Struktur des Keimbläschens im Ovarialei von Triton taoniatus. Arch. Mikrosk. Anat. Bd. 43. S. 1. https://doi.org/10.1007/BF02933867
- Carnoy J.B., Lebrun H. 1898. La vésicule germinative et les globules polaires chez les Batraciens. Cellule. V. 14. P. 113.
- Clark T.G, Merriam R.W. 1977. Diffusible and bound actin nuclei of Xenopus laevis oocytes. Cell. V. 12. P. 883. https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90152-0
- *Clark T.G, Rosenbaum J.L.* 1979. An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes. Cell. V. 18. P. 1101. https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90223-x
- Cullen C.F., Brittle A.L., Ito T., Ohkura H. 2005. The conserved kinase NHK-1 is essential for mitotic progression and unifying acentrosomal meiotic spindles in Drosophila melanogaster. J. Cell Biol. V. 171. P. 593. https://doi.org/10.1083/jcb.200508127
- De La Fuente R., Viveiros M.M., Burns K.H., Adashi E.Y., Matzuk M.M., Eppig J.J. 2004. Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. Dev. Biol. V. 275. P. 447.

https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.028

- Dumont J.N. 1972. Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. J. Morphol. V. 136. P. 153. https://doi.org/10.1002/jmor.1051360203
- *Dunkley S., Scheffler K., Mogessie B.* 2022. Cytoskeletal form and function in mammalian oocytes and zygotes. Curr. Opin. Cell Biol. V. 75. 102073. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2022.02.007
- *Duryee W.R.* 1950. Chromosomal physiology in relation to nuclear structure. Ann. N.Y. Acad. Sci. V. 50. P. 920. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1950.tb39892.x
- Engelhardt P., Plagens U., Zbarsky I.B., Filatova L.S. 1982. Granules 25–30 nm in diameter: basic constituent of the nuclear matrix, chromosome scaffold, and nuclear envelope. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 79. P. 6937. https://doi.org/10.1073/pnas.79.22.6937
- Fiil A. 1974. Structural and functional modifications of the nucleus during oogenesis in the mosquito Aedes aegypti. J. Cell Sci. V. 14. P. 51. https://doi.org/10.1242/jcs.14.1.51
- *Fiil A.* 1976. Polycomplexes and intanuclear annulate lamellae in mosquito oocytes. Hereditas. V. 84. P. 117. https://doi.org/10.1111/J.1601-5223.1976.TB01200.X
- *Fiil A., Moens P.* 1973. The development structure and function of modified synaptonemal complexes in mosqito oocytes. Chromosoma. V. 41. P. 37. https://doi.org/10.1007/BF00284073
- Flora P., McCarthy A., Upadhyay M., Rangan P. 2017. Role of chromatin modifications in *Drosophila* germline stem cell differentiation. Results Probl. Cell Differ. V. 59. P. 1. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44820-6 1
- *Foisner R.* 2003. Cell cycle dynamics of the nuclear envelope. Scientific World Journal. V. 3. 450586. https://doi.org/10.1100/tsw.2003.06
- Fulka J.J., Benc M., Loi P., Langerova A., Fulka H. 2019. Function of atypical mammalian oocyte/zygote nucleoli and its implications for reproductive biology and medicine. Int. J. Dev. Biol. V. 63. P. 105. https://doi.org/10.1387/ijdb.180329jf
- Gaginskaya E., Kulikova T., Krasikova A. 2009. Avian lampbrush chromosomes: a powerful tool for exploration of genome expression. Cytogenet. Genome Res. V. 124. P. 251. https://doi.org/10.1159/000218130
- *Gall J.G.* 2006. Exporting actin. Nat. Cell Biol. V. 8. P. 205. https://doi.org/10.1038/ncb0306-205
- Gall J.G., Stephenson E.C., Erba H.P., Diaz M.O., Barsacchi-Pilone G. 1981. Histone genes are located at the sphere loci of newt lampbrush chromosomes. Chromosoma. V. 84. P. 159. https://doi.org/10.1007/BF00399128
- Gall J.G., Tsvetkov A., Wu Z., Murphy C. 1995. Is the sphere organelle/coiled body a universal nuclear component? Dev Genet. V. 16. P. 25. https://doi.org/10.1002/dvg.1020160107
- *Gruzova M.N.* 1988. The nucleus during oogenesis with special reference to extrachromosomal structures. In Oocyte Growth and Maturation. N.Y.: Consultants Bureau. P. 77.
- Gruzova M.N., Parfenov V.N. 1977. Ultrastructure of late oocyte nuclei in Rana temporaria. J. Cell Sci. V. 28. P. 1. https://doi.org/10.1242/jcs.28.1.1
- Gruzova M.N., Parfenov V.N. 1993. Karyosphere in oogenesis and intranuclear morphogenesis. Int. Rev. Cytol. V. 144. P. 1. https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61512-0
- Gruzova M.N., Parfvonov V.N. 1973. The karvosphere in late oogenesis of frogs. Monit. Zool. Ital. V. 7. P. 225. https://doi.org/10.1080/00269786.1973.10736215
- Hampoelz B., Schwarz A., Ronchi P., Bragulat-Teixidor H., Tischer C., Gaspar I., Ephrussi A., Schwab Y., Beck M. 2019. Nuclear pores assemble from nucleoporin condensates during oogenesis. Cell. V. 179. P. 671.e17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.022
- Hyrskyluoto A., Vartiainen M.K. 2020. Regulation of nuclear actin dynamics in development and disease. Curr. Opin. Cell Biol. V. 64. P. 18.

https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.01.012

Ilicheva N., Podgornaya O., Bogolyubov D., Pochukalina G. 2018. The karyosphere capsule in Rana temporaria oocytes contains structural and DNA-binding proteins. Nucleus. V. 9. P. 516.

https://doi.org/10.1080/19491034.2018.1530935

- Ilicheva N.V., Pochukalina G.N., Podgornava O.I. 2019. Actin depolymerization disrupts karyosphere capsule integrity but not residual transcription in late oocvtes of the grass frog Rana temporaria. J. Cell. Biochem. V. 120. P. 15057. https://doi.org/10.1002/jcb.28767
- Ivanovska I., Khandan T., Ito T., Orr-Weaver T.L. 2005. A histone code in meiosis: the histone kinase, NHK-1, is required for proper chromosomal architecture in Drosophila oocytes. Gen. Dev. V. 19. P. 2571. https://doi.org/10.1101/gad.1348905

Jamin A., Wiebe M.S. 2015. Barrier to Autointegration Factor (BANF1): interwoven roles in nuclear structure, genome integrity, innate immunity, stress responses and progeria. Curr. Opin. Cell Biol. V. 34. P. 61. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.05.006

Kenny A., Morgan M.B., Mohr S., Macdonald P.M. 2021. Knock down analysis reveals critical phases for specific oskar noncoding RNA functions during Drosophila oogenesis. G3 (Bethesda). V. 11. jkab340.

https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab340

Kiseleva E., Drummond S.P., Goldberg M.W., Rutherford S.A., Allen T.D., Wilson K.L. 2004. Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in Xenopus oocyte nuclei. J. Cell Sci. V. 117. P. 2481.

https://doi.org/10.1242/jcs.01098

- Kloc M., Chanana P., Vaughn N., Uosef A., Kubiak J.Z., Ghobrial R.M. 2021. New insights into cellular functions of nuclear actin. Biology (Basel). V. 10. 304. https://doi.org/10.3390/biology10040304
- Konishi H.A., Yoshimura S.H. 2020. Interactions between nonstructured domains of FG- and non-FG-nucleoporins coordinate the ordered assembly of the nuclear pore complex in mitosis. FASEB J. V. 34. P. 1532. https://doi.org/10.1096/fj.201901669R2020

Krasikova A., Kulikova T., Saifitdinova A., Derjusheva S., Gaginskava E. 2004. Centromeric protein bodies on avian lampbrush chromosomes contain a protein detectable with an antibody against DNA topoisomerase II. Chromosoma. V. 113. P. 316.

https://doi.org/10.1007/s00412-004-0321-5

- Kyheröinen S., Vartiainen M.K. 2020. Nuclear actin dynamics in gene expression and genome organization. Semin. Cell Dev. Biol. V. 102. P. 105. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.10.012
- Labade A.S., Karmodiya K., Sengupta K. 2016. HOXA repression is mediated by nucleoporin Nup93 assisted by its interactors Nup188 and Nup205. Epigenetics Chromatin. V. 9. 54.

https://doi.org/10.1186/s13072-016-0106-0

Lamm N., Read M.N., Nobis M., Van Ly D., Page S.G., Masamsetti V.P., Timpson P., Biro M., Cesare A.J. 2020. Nuclear Factin counteracts nuclear deformation and promotes fork repair during replication stress. Nat. Cell Biol. V. 22. P. 1460.

https://doi.org/10.1038/s41556-020-00605-6

- Lancaster O.M., Cullen C.F., Ohkura H. 2007. NHK-1 phosphorylates BAF to allow karyosome formation in the Drosophila oocvte nucleus. J. Cell Biol. V. 179. P. 817. https://doi.org/10.1083/jcb.200706067
- Lancaster O.M., Breuer M., Cullen C.F., Ito T., Ohkura H. 2010. The meiotic recombination checkpoint suppresses NHK-1 kinase to prevent reorganisation of the oocyte nucleus in Drosophila. PLoS Genet. V. 6. e1001179. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001179
- Maslova A., Krasikova A. 2012. Nuclear actin depolymerization in transcriptionally active avian and amphibian oocytes leads to collapse of intranuclear structures. Nucleus. V. 3. P. 300.

https://doi.org/10.4161/nucl.20393

- Morris J.Z., Navarro C., Lehmann R. 2003. Identification and analysis of mutations in bob. Doa and eight new genes required for oocyte specification and development in Drosophila melanogaster. Genetics. V. 164. P. 1435. https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1435
- Nag N., Sasidharan S., Uversky V.N., Saudagar P., Tripathi T. 2022. Phase separation of FG-nucleoporins in nuclear pore complexes. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res. V. 1869. 119205.

https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119205

Nizami Z., Deryusheva S., Gall J.G. 2010. The Cajal body and histone locus body. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. V. 2. a000653.

https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000653

- Parfenov V.N. 1979. The karyosphere during late oogenesis in Rana ridibunda. Eur. J. Cell Biol. V. 19. P. 102.
- Parfenov V., Potchukalina G., Dudina L., Kostyuchek D., Gruzova M. 1989. Human antral follicles: oocyte nucleus and the karyosphere formation (electron microscopic and autoradiographic data). Gamete Res. V. 22. P. 219. https://doi.org/10.1002/mrd.1120220209
- Parfenov V.N., Davis D.S., Pochukalina G.N., Sample C.E., Bugaeva E.A., Murti K.G. 1995. Nuclear actin filaments and

цитология Nº 5 2022 том 64

their topological changes in frog oocytes. Exp. Cell Res. V. 217. P. 385.

https://doi.org/10.1006/excr.1995.1101

Pederson T. 2008. As functional nuclear actin comes into view, is it globular, filamentous, or both? J. Cell Biol. V. 180. P. 1061.

https://doi.org/10.1083/jcb.200709082

- *Pederson T., Aebi U.* 2002. Actin in the nucleus: what form and what for? J. Struct. Biol. V. 140. P. 3. https://doi.org/10.1016/s1047-8477(02)00528-2
- Pederson T., Aebi U. 2005. Nuclear actin extends, with no contraction in sight. Mol. Biol. Cell. V. 16. P. 5055. https://doi.org/10.1091/mbc.e05-07-0656
- Podgornaya O.I., Bugaeva E.A., Voronin A.P., Gilson E., Mitchell A.R. 2000. Nuclear envelope associated protein that binds telomeric DNAs. Mol. Reprod. Dev. V. 57. P. 16. https://doi.org/10.1002/1098-2795(200009)57:1<16::AID-MRD4>3.0.CO;2-8
- *Razin S.V., Iarovaia O.V., Vassetzky Y.S.* 2014. A requiem to the nuclear matrix: from a controversial concept to 3D organization of the nucleus. Chromosoma. V. 123. P. 217. https://doi.org/10.1007/s00412-014-0459-8
- Ródenas E., Klerkx E.P.F., Ayuso C., Audhya A, Askjaer P. 2009. Early embryonic requirement for nucleoporin Nup35/NPP-19 in nuclear assembly. Dev. Biol. V. 327. P. 399. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.12.024
- *Rübsam R., Büning J.* 2001. F-actin is a component of the karyosome in neuropteran oocyte nuclei. Arthropod Struct. Dev. V. 30. P. 125.

https://doi.org/10.1016/s1467-8039(01)00026-3

Schultze O. 1887. Untersuchungen über die Reifung und Befruchtung des Amphibieneies. Z. Wiss. Zool. Bd. 45. S. 177.

Segura-Totten M., Wilson K.L. 2004. BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. Trends Cell

Biol. V. 14. P. 261.

https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.03.004

- Singh A., Dutta D., Paul M.S., Verma D., Mutsuddi M., Mukherjee A. 2018. Pleiotropic functions of the chromodomaincontaining protein Hat-trick during oogenesis in Drosophila melanogaster. G3 (Bethesda). V. 8. P. 1067. https://doi.org/10.1534/g3.117.300526
- Stüven T., Hartmann E., Görlich D. 2003. Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin-actin complexes. EMBO J. V. 22. P. 5928. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg565
- Świątek P. 1999. Formation of the karyosome in developing oocytes of weevils (Coleoptera, Curculionidae). Tissue Cell. V. 31. P. 587. https://doi.org/10.1054/tice.1999.0073
- Takeo S., Lake C.M., Morais-de-Sá E., Sunkel C.E., Hawley R.S. 2011. Synaptonemal complex-dependent centromeric clustering and the initiation of synapsis in *Drosophila* oocytes. Curr. Biol. V. 21. P. 1845. https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.044
- *Ulferts S., Prajapati B., Grosse R., Vartiainen M.K.* 2021. Emerging properties and functions of actin and actin filaments inside the nucleus. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. V. 13. a040121.

https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040121

- *Visa N., Percipalle P.* 2010. Nuclear functions of actin. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. V. 2. a000620. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000620
- Wagner K. 1923. Über die Entwicklung des Froscheies. Arch. Zellforsch. Bd. 17. S. 1.
- Wallace R.A., Jared D.W., Dumont J.N., Sega M.W. 1973. Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. III. Optimum incubation conditions. J. Exp. Zool. V. 184. P. 321. https://doi.org/10.1002/jez.1401840305

Karyosphere Capsule in Oocytes of the Grass Frog: To Be or not to Be? A Critical View

D. S. Bogolyubov^{a, *}, A. O. Travina^a, and I. O. Bogolyubova^a

^aInstitute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia *e-mail: dbogol@mail.ru

The karyosphere (karyosome) is a meiosis-specific and evolutionarily conserved structure that represents condensed bivalents assembled together in a limited volume of the large nucleus at the diplotene stage of meiotic prophase. In some organisms, the karyosphere is additionally separated from the rest of the nucleoplasm by a suprastructural extrachomosomal compartment called the karyosphere capsule (KC). It is traditionally assumed that the KC is a specialized element of the oocyte nucleus (germinal vesicle, GV), which supports the karyosphere due to the presence of structural proteins, especially filamentous actin (F-actin). We present here new insights into the KC previously thought to form in the GV of the European common (grass) frog *Rana temporaria*. The *R. temporaria* karyosphere is a simple knot of chromosomes (karyosome). The *R. temporaria* GV is highly enriched in F-actin filaments, which form a global meshwork in the nucleus but are not concentrated in a special zone (capsule) around condensed chromosomes. In this respect, the structure of the *R. temporaria* GV does not differ significantly from that in *Xenopus laevis*, in which the karyosphere and, accordingly, its capsule are not expressed. The membraneless strands (formerly called "pseudomembranes"), typical for the *R. temporaria* GV, and the so-called "annuli", thought to represent autonomous pore complexes, are readily identified. However, the annuli were not found to contain nucleoporin 35 (Nup35) and therefore, in our opinion, cannon be regarded to as counterparts of the nuclear pore complexes. The electron-dense strands linking the "annuli" contain neither F-actin nor lamin B and do not form a continuous cover sheath around the karyosphere. The structural proteins such as lamins enrich the nucleoplasm and also appear in

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

446

СУЩЕСТВУЕТ ЛИ КАПСУЛА КАРИОСФЕРЫ В ООЦИТАХ

local electron-dense clumps that apparently represent specific biomolecular condensates of polymeric molecules– proteins and perhaps RNAs. A fibrous scaffold for the karyosphere is therefore absent in the *R. temporaria* GV. For comparison, we used material of the KC of the beetle *Tribolium castaneum*, in which a stable and extensive layer (frame or shell) consisting of F-actin does exist. We believe that the structural significance of KC in the *R. temporaria* GV is somewhat exaggerated. However, the *R. temporaria* karyosphere is submerged in a large assemblage consisting of hundreds of free amplified nucleoli, which resembles formation of a KC. This nucleolar assemblage with chromosomes inside is rather stable and can be easily isolated under a conventional binocular microscope. Since the nucleoli are separate liquid droplets, they cannot be considered as structures forming a typical KC, which by definition is a fibrous structure. A similar situation is also characteristic of the GV of the beetle *Tenebrio molitor*, in which the nucleoli are absent, but the karyosome can be located inside a special fibrogranular material lacking F-actin.

Keywords: nuclear compartments, karyosphere, karyosphere capsule, karyosome, nuclear F-actin, electron microscopy, oocyte nucleus, germinal vesicle, Rana temporaria УДК 576.4;591.6

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ТЕЛОМЕРСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА TRF2 В СПЕРМАТОГЕННЫХ КЛЕТКАХ ЗИМУЮЩИХ ЛЯГУШЕК *RANA TEMPORARIA*

© 2022 г. А. О. Травина^{1, *}, П. К. Швец², Г. Н. Почукалина¹, О. И. Подгорная^{1, 3}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Санкт-Петербургский государственный технологический институт, Санкт-Петербург, 190013 Россия ³Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра цитологии и гистологии,

Санкт-Петербург, 199034 Россия *E-mail: alotra 1@yandex.ru Поступила в редакцию 18.04.2022 г. После доработки 23.06.2022 г. Принята к публикации 23.06.2022 г.

Теломерная ДНК связана с комплексом белков, который называется шелтерин. Есть данные, свидетельствующие о том, что функции шелтеринового комплекса шире, чем просто защита концов хромосом. Известны примеры необычного распределения компонента шелтерина, теломерсвязывающего белка TRF2, в ооцитах мыши и травяной лягушки *Rana temporaria* и в сперматозоидах мыши. В настоящей работе исследовали распределение TRF2 в клетках сперматогенного ряда травяной лягушки. Для подтверждения специфичности антител к TRF2 травяной лягушки использовали Вестерн-блот-анализ препаратов семенников. Антитела, отобранные с помощью иммуноблотинга, использовали для определения локализации TRF2 в сперматогониях и сперматозоидах с помощью иммунноэлектронной микроскопии. Показано, что в сперматогониях TRF2 равномерно распределен по ядру. Присутствие TRF2 выявлено в цитоплазме сперматогоний в составе электронноплотных структур. В сперматозоидах часть TRF2 находится в акросоме, что подтверждает универсальность явления для позвоночных.

Ключевые слова: TRF2, сперматогенез, акросома, nuage, *Rana temporaria* **DOI:** 10.31857/S004137712205008X

Теломеры относят к классу тандемных повторов (ТП). С многократно повторяющимися мономерами ТТАGGG связан специфический комплекс теломерсвязывающих белков, который называется шелтерин. Шелтерин млекопитаюших состоит из белков TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 и RAP1 (de Lange, 2018). Белки TRF1, TRF2 и POT1 непосредственно взаимодействуют с теломерной ДНК (de Lange. 2018). Белок TRF2 обладает высокой степенью гомологии с TRF1. В состав TRF2 входит домен с неизвестными функциями udTRF2, которого нет в составе TRF1. Косвенные данные свидетельствовали о гомологии между доменом udTRF2 и некоторыми участками rod-доменов белков ламинов (Voronin et al., 2003). Работа зарубежных авторов подтвердила взаимодействие между ламином A/C и TRF2 in vivo (Wood et al., 2014).

Мы предполагали, что именно домен udTRF2 отвечает за взаимодействие TRF2 и теломер с ядерной мембраной. С помощью ко-иммунопреципитации рекомбинантного udTRF2 с ядерным экстрактом и последующего масс-спектрометрического анализа мы показали, что TRF2 взаимодействует с ламинами A/C именно через домен udTRF2 (Travina et al., 2021). Масс-спектрометрический анализ также позволил идентифицировать еще 23 белка, связывающих udTRF2 (Travina et al., 2021). Обилие белков свидетельствует либо о неожиданных функциях TRF2, либо о неожиданных функциях всего теломерного комплекса. Определение локализации TRF2 может помочь обосновать предположения об этих функциях.

В последнее время появляются данные, свидетельствующие о несвязанных с теломерами функциях различных компонентов шелтерина, как в соматических, так и в половых клетках. Например, компоненты шелтерина, TRF2 и Rap1 действуют как факторы транскрипции многих генов (Mendez-Bermudez et al., 2018). Известно необычное распределение TRF2 во время гаметогенеза. Почукалина с соавторами показали, что в преовуляторных ооцитах мыши TRF2 демонстрирует динамичное распределение по мере формирования кариосферы (Pochukalina

Принятые сокращения: ТП – тандемные повторы; ЦТ – центральное тело кариосферы.

et al., 2016). Авторы выделили 3 стадии формирования кариосферы в соответствии с общепринятой классификацией (Bouniol-Baly et al., 1999). На стадии NSN (non-surrounded nucleolus – не окруженное ядрышко) TRF2 находится в кластерах интерхроматиновых гранул, которые еще называют ядерными спеклами или доменами SC35, и колокализуется с белком SC35 (SRSF2) (Pochukalina et al., 2016). На стадиях pSN (partly surrounded nucleolus – частично окруженное ядрышко) и SN (surrounded nucleolus – окруженное ядрышко) TRF2 перемещается в центральное тело (ЦТ) кариосферы (Pochukalina et al., 2016) или атипичное ядрышко (Fulka, Langerova, 2019).

TRF2 обнаружен в ядерной оболочке и ядерных спеклах ооцита лягушки *R. temporaria* (Bugaeva, Podgornaya, 1997; Ilicheva et al., 2018a). TRF2 выявлен в акросоме сперматозоидов мыши (Dolnik et al., 2007). Однако работы о роли TRF2 в гаметогенезе остаются единичными. Исследование, посвященное изучению локализации TRF2 в сперматогенезе мыши, оставляет открытым вопрос о том, является ли необычное положение TRF2 в акросоме сперматозоидов характерным для млекопитающих или носит общий характер.

Для определения локализации TRF2 в настоящей работе использовали семенники лягушки. В процессе сперматогенеза можно наблюдать разные стадии развития и созревания половых клеток. Сперматогенез *R. temporaria* относится к прерывистому типу, в значительной степени не зависит от факторов внешней среды (Witschi, 1924) и регулируется сложной системой, включающей сезонные колебания секреции гонадотропинов и циклическое изменение чувствительности зародышевого эпителия к этим гормонам (van Oordt, 1956; van Oordt et al., 1968). Мы использовали зимних лягушек (конца февраля и начала марта), семенники которых обогащены сперматогониями и сперматозоидами, и определяли локализацию теломерсвязывающего белка TRF2 в этих клетках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объект. Взрослые самцы лягушек *R. temporaria* отловлены в Ленинградской области. Объектом исследования служили семенники, полученные из зимующих лягушек в конце февраля—начале марта.

Электрофорез и иммуноблотинг. Белки клеток семенников разделяли с помощью SDS-электрофореза по Лэммли (Laemmli, 1970), а затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану, используя метод полусухого переноса (Towbin et al., 1979). Мембрану обрабатывали раствором 5%-ного обезжиренного молока, приготовленного на PBS, содержащем 0.5% Tween20 (PBS-Tween), после чего инкубировали в течение 1.5 ч в растворе первичных антител против TRF2 (sc9143 и sc52968, Santa Cruz Biotechnology,

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

США; ab13579, Abcam, Великобритания в разведении 1 : 1000; а также ранее полученные антитела против домена udTRF2 (Ilicheva et al., 2018b) в разведении 1 : 500) и против TRF1 (sc5596, Santa Cruz Biotechnology, США; разведение 1 : 1000). После отмывки мембрану инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой. Выявление щелочной фосфатазы проводили с помощью систем детекции BCIP/NBT (Sigma, США).

Электронная микроскопия. Для общеморфологических исследований кусочки семенников фиксировали в 2.5%-ном глутаральдегиде на 0.05 М какодилатном буфере, содержащем 53.4 мг/мл сахарозы в течение 1 ч при 4°С. Материал отмывали в растворе какодилатного буфера с добавлением 41 мг/мл сахарозы и постфиксировали в растворе 4%-ного тетраоксида осмия (OsO₄) на какодилатном буфере в течение 1 ч при 4°С. Фиксированный материал обезвоживали в растворах этанола возрастающей концентрации, ацетоне и заключали в Ероп-Araldite (Polyscience, США).

Клеточный состав семенных канальцев предварительно визуализировали на полутонких срезах 2 мкм толщиной, окрашенных толуидиновым синим (0.2% с добавлением 2.5% Na₂CO₃). Наблюдение и фотосъемку проводили на микроскопе ZEISS Axio Scope.A1 (Германия). Ультратонкие срезы толщиной 70 нм получали на ультратоме Reichert Ultracut-E (Австрия). Контрастирование срезов проводили 2%-ным уранилацетатом на 70%-ном этаноле в течение 20 мин с последующей отмывкой дистиллированной водой.

Для иммуноэлектронного мечения ультратонких срезов кусочки семенников фиксировали в течение l ч при 4°C в 3.7%-ном растворе формальдегида на lкратном фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), отмывали в l-кратном PBS в течение ночи при 4°C. Постфиксацию проводили 4%-ным OsO4 на l-кратном PBS l ч при 4°C, после чего материал отмывали в нескольких сменах дистиллированной воды. Затем материал обрабатывали в течение l0 мин в 0.5 M растворе NH₄Cl. Фиксированный материал обезвоживали в растворах этанола, контрастировали в насыщенном растворе уранилацетата на этаноле и заключали в смолу LR White (Polyscience, CША).

Ультратонкие срезы обрабатывали в течение 30 мин в фильтрованном блокирующем буферном растворе (0.05% Tween-20, 0.5% желатина из кожи рыб, 1-кратный PBS), после чего инкубировали в растворе первичных антител во влажных камерах при 4°C в течение ночи. Первичные антитела разводили 1 : 100 в отмывочном буферном растворе (0.05% Tween-20, 0.1% желатина из кожи рыб, 1-кратный PBS). Для вымывания первичных антител, не связавшихся с целевым антигеном исследования, сетки промывали в четырех сменах отмывочного раствора, после чего



Рис. 1. Электрофорез семенников лягушки (*a*) и иммуноблоттинг с использованием различных антител к TRF2 семенников (*б*). *М* – белковый маркер. *a*: Дорожка 1 – семенник лягушки. *б* – Дорожки: 1 – мышиные антитела ab13579 (Abcam, Beликобритания); 2 – мышиные антитела sc52968 (Santa Cruz, CША); 3 – кроличьи антитела sc9143 (Santa Cruz, CША); 4 – кроличьи антитела sc5596 (Santa Cruz, CША); 5 – ранее полученные антитела морской свинки к домену udTRF2 (Ilicheva et al., 2018b).

инкубировали в растворе вторичных антител в разведении 1: 20 1.5 ч при комнатной температуре. Ультратонкие срезы исследовали на электронном микроскопе Carl Zeiss Libra 120 (Германия) при 80 кВ. Изображения получены с помощью программы Adobe Photoshop.

Реактивы. В работе использовали: поликлональные антитела против TRF2 sc9143 (Santa Cruz Biotechnology, CША); моноклональные антитела против TRF2 ab13579 (Abcam, Великобритания) и sc52968 (Santa Cruz Biotechnology, CША); поликлональные антитела против домена udTRF2 (Ilicheva et al., 2018b); поликлональные антитела против TRF1 sc5596 (Santa Cruz Biotechnology, CША); антитела козы против иммуноглобулинов кролика, морской свинки или мыши, конъюгированные с щелочной фосфатазой; антитела козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с коллоидным золотом 10 нм; смолы LR White, и Epon-Araldite; 5бром-4-хлор-3-индолилфосфат BCIP, тетразолий голубой NBT (Sigma, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Специфичность антител к TRF2 для лягушки. Для определения локализации белка в клетках необходимы специфичные для вида антитела. Доступные коммерческие антитела к TRF2 получены к аминокислотной последовательности TRF2 человека, поэтому могут не обладать достаточной специфичностью по отношению к TRF2 травяной лягушки. Для выбора антител к TRF2 травяной лягушки провели имунноблоттинг на препаратах семенников (рис. 1).

Антитела Anti-TRF2 Rabbit antibody Santa Cruz sc9143 (рис. 16, дорожка 3) распознают один белок с кажущейся молекулярной массой около 56 кДа, что

соответствует расчетной молекулярной массе изоформы X1 теломерсвязывающего белка TRF2 травяной лягушки *R. temporaria* (56.27 кДа). Неспецифическое окрашивание в районе 15 кДа, наблюдаемое и на *дорожках 1, 3* и *5*, вероятно, соответствует остаткам деградировавших белков. Для дальнейшего исследования локализации белка в семенниках лягушки использовали антитела sc9143 к TRF2.

Морфологический анализ. Семенники лягушки обладают морфологическими признаками, характерными для начала марта. Клеточный состав семенных канальцев лягушки в это время года представлен только сперматогониями, расположенными на периферии семенных канальцев, небольшим количеством удлиненных сперматид и большим количеством зрелых сперматозоидов, пучки которых заполняют цисты внутри канальца (рис. 2а). В семенниках лягушки наблюдали два типа сперматогониальных клеток. Они обозначены как первичные и вторичные типы сперматогоний. Сперматогонии первичного, или типа А, являются наименее дифференцированными зародышевыми клетками, в то время как вторичные сперматогонии, или типа В, более дифференцированы; последнее поколение сперматогоний типа В образует первичные сперматоциты (Clermont, Bustos-Obregon, 1968). Термины "первичные" и "вторичные" сперматогонии являются обобщающими и могут включать различные по морфологии типы клеток. У разных видов описаны морфологически и/или функционально разные типы сперматогоний типов А и В. Однако общими чертами всех типов вторичных сперматогоний у амфибий считаются незавершенные цитокинезы и образование клеточных мостиков (Haczkiewicz et al., 2017). В настоящей работе мы обозначали одиночные сперматогонии



Рис. 2. Клеточный состав семенных канальцев лягушки. *а* – Поперечное сечение семенных канальцев, полутонкий срез, окраска толуидиновым синим, *C*² – первичный сперматогоний, *C* – клетка Сертоли, *C*² – вторичные сперматогонии, *Cn*³ – сперматозоиды в семенных канальцах; световая микроскопия, об: 40×. *б* – Первичный сперматогоний: *я* – ядро, *яд* – ядрош-ко, *яо* – ядерная оболочка, *ц* – цитоплазма. *в* – Вторичный сперматогоний, соединенный цитоплазматическим мостом (*цм*) с соседней клеткой. *г* – Сперматогоний в метафазе, *xp* – хромосомы. *д* – Сперматогоний, плотный материал пиаge (*звездоч-ка*), в толщу которого встроены митохондрии (*м*), который появляется в околоядерном пространстве.

как первичные, а сгруппированные сперматогонии названы вторичными.

Первичные сперматогонии распределены поодиночке и располагаются на периферии семенных канальцев, каждая клетка окружена одной или несколькими уплощенными клетками Сертоли неправильной формы (рис. 2a). На светооптическом уровне первичные сперматогонии представляют собой клетки овальной формы с крупным центрально расположенным ядром сферической формы, содержащим одно или несколько заметных ядрышек и редкие пятна гетерохроматина. Близко расположенные сгруппированные клетки встречались редко, и были определены как вторичные сперматогонии (рис. 2a).

На ультраструктурном уровне ядро первичных сперматогоний содержит отдельные блоки гетерохроматина, разбросанные по ядру, и одно или несколько ядрышек (рис. 26). Ядерная оболочка имеет в целом сферические очертания (рис. 26), но иногда наблюдали неглубокие инвагинации. Ультратонкая структура вторичных сперматогоний сходна (рис. 26). Между вторичными сперматогониями наблюдали

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

цитоплазматические мостики, удерживающие клетки связанными (рис. 2*в*). Иногда наблюдали митотически делящиеся сперматогонии (рис. 2*г*).

В цитоплазме некоторых первичных сперматогоний, в прилежащих к ядерной оболочке участках, наблюдали крупные скопления электронно-плотного материала, ассоциированного с агрегатами митохондрий (рис. 2*д*). Эти структуры известны как nuage (Eddy, 1975), и считается, что этот плотный материал состоит из рибонуклеопротеинов и PHK-процессирующих белков (Saffman, Lasko, 1999; Houston, King, 2000; Knaut et al., 2000; Houwing et al., 2007).

Локализация TRF2 в сперматогенных клетках лягушки. Для определения локализации TRF2 использовали метод иммуномечения на ультраструктурном уровне. После обработки антителами митотических клеток золотые частицы избирательно локализуются на конденсированном хроматине метафазных хромосом (рис. 3*a*), что соответствует ожидаемому положению TRF2. В ядре первичного сперматогония наблюдали равномерное распределение белка по ядру, в том числе и в ядрышке (рис. 3*b*). Хотя TRF2 локализуется в виде чашеобразных структур на наруж-



Рис. 3. Иммунноэлектронное мечение TRF2 в первичных сперматогониях. *a* – Первичный сперматогоний в метафазе, *xp* – хромосомы. *б* – Первичный сперматогоний в интерфазе, *яд* – ядрышко, *яо* – ядерная оболочка. *в*, *e* – Локализация TRF2 в пиаде (*звездочка*). Мечение первичными антителами к TRF2 (sc9143, Santa Cruz, CША), связанными с вторичными антителами, конъюгированными с частицами золота размером 10 нм (*черные точки*).



Рис. 4. Иммунноэлектронное мечение TRF2 в сперматозоидах. a – Локализация TRF2 в ядре (n) и акросоме ($a\kappa$) сперматозоида; δ – поперечный срез, локализация TRF2 в ядре (n); e – поперечный срез, локализация TRF2 в акросоме ($a\kappa$). Мечение первичными антитеами к TRF2 (sc9143, Santa Cruz, США), связанными с вторичными антителами, конъюгированными с частицами золота размером 10 нм (*черные точки*).

ной поверхности ядерной оболочки ооцита лягушки (Podgornaya et al., 2000), мы не обнаружили селективного мечения ядерной оболочки сперматогоний (рис. 3δ).

Неожиданно мечение золотом наблюдали в цитоплазме в составе крупных аморфных участков электронно-плотного материала, определенными по морфологии как nuage (рис. 2*г*, 3*в*, *г*).

В сперматозоидах ядро все еще содержит TRF2, в основном на периферии ядра (рис. 4a, δ). Метка TRF2 обнаруживается также в акросоме (рис. 4a, c). Таким образом, подтверждается универсальное (акросомное) расположение TRF2 у позвоночных — лягушки (данная работа) и мыши (Dolnik et al., 2007).

ОБСУЖДЕНИЕ

Локализация TRF2, как компонента шелтерина, ожидается в связи с теломерами. В случае митоза

метка TRF2 локализуется на конденсированных хромосомах (рис. 3a). В интерфазе TRF2 равномерно распределен по ядру (рис. 3б). Первоначально TRF2 был выделен из ядерной оболочки ооцита лягушки R. temporaria (Podgornaya et al., 2000). Предполагалось, что этот белок играет ключевую роль во взаимодействии теломер с ядерной мембраной (Ilicheva et al., 2015). Для получения препарата ядерной оболочки использовали ооциты на стадии диплотены. Мы не наблюдали TRF2 в ядерной оболочке сперматогоний. Известно, что в пре-мейотических клетках (сперматогониях) теломеры разбросаны по всему ядру и не имеют физического контакта с ядерной оболочкой (Scherthan et al., 1996). Поэтому отсутствие TRF2 в ядерной оболочке сперматогоний ожидаемо. В настоящей работе мы использовали семенники зимних лягушек и наблюдали только сперматогонии и сперматозоиды. Стадии профазы мейоза I, когда теломеры мигрируют к периферии и прикрепляются к ядерной оболочке (Loidl, 1990; Zickler, Kleckner, 1998), требуют отдельного изучения.

Некоторое количество метки TRF2 наблюдали в ядрышках. В сперматогенезе мыши локализация TRF2 в ядрышке никогда не наблюдали (Dolnik et al., 2007). Известно, что TRF2 может находиться в ядрышке в некоторых клеточных линиях человека на определенных стадиях клеточного цикла (Zhang et al., 2004). TRF2 удерживается в ядрышке за счет взаимодействия с ядрышковым белком NOLC1 (Yuan et al., 2017). Своевременные высвобождение TRF2 из ядрышка и последующее связывание с теломерами имеют решающее значение для целостности хромосом (Zhang et al., 2004). Сперматогонии интенсивно делятся митотически, прежде чем начать мейоз. Поэтому сохранение избытка TRF2 в ядрышке возможно и этом случае.

Связь TRF2 с ядрышком показана и для оогенеза мыши. На поздних этапах оогенеза мыши TRF2 может накапливаться в ЦТ кариосферы (Pochukalina et al., 2016) или в атипичном ядрышке (Fulka et al., 2019). У млекопитающих ЦТ кариосферы образуется в результате последовательных трансформаций ядрышка развивающегося ооцита и содержит несколько ядрышковых белков (Bogolyubov, 2018). TRF2 локализуется в SC35-содержащих ядерных тельцах до конца диплотены и только затем начинает накапливаться в ЦТ кариосферы (Pochukalina et al., 2016). В ооцитах лягушки иммуноокрашивание против TRF2 было намного более интенсивным в SC35-содержащих ядерных тельцах, а не в капсуле кариосферы, предполагая, что домены SC35 являются основными сайтами для накопления TRF2 в ядре поздних ооцитов R. temporaria (Ilicheva et al., 2018а). Таким образом, показано динамичное распределение TRF2 на разных стадиях оогенеза. При сперматогенезе лягушки также наблюдали перемещение TRF2, как в те же (ядрышко), так и в другие компартменты (в акро-COMV).

В зрелых сперматозоидах лягушки значительная часть TRF2 находится в акросоме (рис. 4a, c). В сперматогенезе мыши TRF2 присутствует в акросоме с начальных стадий ее формирования (Dolnik et al., 2007). В ходе спермиогенеза у позвоночных хроматин подвергается конденсации, которая начинается на ранней или средней стадии сперматид и достигает кульминации в сперматозоидах (Ward, Coffey, 1991). Конденсация является универсальным признаком почти всех животных, хотя специфические паттерны упаковки хроматина сильно различаются у разных видов (Ward, Coffey, 1991; Fuentes-Mascorro et al., 2000). Объем ядра значительно уменьшается во время спермиогенеза, количество и вариабельность белков снижаются. Акросома сперматозоида содержит компоненты, необходимые для проникновения в оболочку ооцита (Ramalho-Santos et al., 2002), а

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

также некоторые ДНК-связывающие белки (Herrada, Wolgemuth, 1997; Aul, Oko, 2002).

Сперматозоид представляет собой высокодифференцированную и транскрипционно молчащую клетку, тем не менее, он содержит некоторые факторы транскрипции (Herrada, Wolgemuth, 1997; D'Cruz et al., 2001; Bastián et al., 2007). Среди них Stat1 был обнаружен в сперматозоидах человека, тогда как Stat4 был обнаружен в сперматозоидах как человека, так и мыши; мышиный Stat4 был локализован в перинуклеарной теке (Herrada, Wolgemuth, 1997; D'Cruz et al., 2001). Очевидно, сперматозоиды доставляют в яйцеклетку не только мужской геном, но и важные молекулы, необходимые для оплодотворения и развития эмбриона (Ostermeier et al., 2004; Miller et al., 2005). TRF2 в акросоме, возможно, принципиально важен для выравнивания геномов в зиготе.

Интересным оказалось присутствие TRF2 в пиage. Ранее с помощью масс-спектрометрии среди интерактантов udTRF2-домена мы идентифицировали ряд РНК-связывающих белков, включая представителей семейства DEAD-box АТФ-зависимых РНК-хеликаз, некоторые гетерогенные ядерные нуклеопротеины (hnRNP) и факторы сплайсинга (Travina et al., 2021). Клетки зародышевой линии различных организмов эукариот содержат электронноплотные структуры, которые известны как nuage (Eddy, 1975). Структуры nuage характеризуются аморфной формой, отсутствием окружающих мембран, обилием РНК и РНК-связывающих белков и могут находится в тесной ассоциации с кластерами митохондрий или (и) непосредственно примыкать к ядерной оболочке. Многочисленные структуры пиаде обнаруживаются как в оогенезе, так и в сперматогенезе (Nguyen-Chi, Morello, 2011). Предложено несколько названий для различных электронноплотных структур конкретных зародышевых линий для описания их морфологических особенностей, внутриклеточной локализации и предполагаемых функций (Russell, Frank, 1978; Hamaguchi, 1993; Yokota, 2012).

Согласно одной из номенклатур, просперматогонии, сперматогонии и сперматоциты обладают формой nuage, временно связанной с митохондриями, называемой межмитохондриальным цементом ІМС (IMC - inter-mitochondrial cement) (Chuma et al., 2009). Многообразные типы nuage могут значительно различаться по своей морфологии у различных видов. Тем не менее эти структуры у разных видов имеют много гомологичных компонентов, что указывает на то, что все они участвуют в регуляции РНК и, вероятно, имеют сходные механизмы действия (Chuma et al., 2009). Охарактеризовано около десяти консервативных белков, локализованных в nuage, среди которых PHK-хеликазы (MVH/DDX4, DDX25), Tudor-домен-содержащие белки (TDRD1/MTR, TDRD6, TDRKH/TDRD2) и белки семейства Piwi (Mili, Miwi и Miwi2) (Chuma et al., 2009; Arkov, Ramos, 2010; Yokota, 2012; Wang et al., 2020). Белки, обнаруженные в структурах nuage, участвуют в трансляционном контроле мРНК и в подавлении экспрессии мобильных элементов.

Транскрипты ТП недавно обнаружены в nuage ооцитов человека (Dobrynin et al., 2020; Enukashvily et al., 2021). Транскрипт теломерного ТП TERRA, возможно, имеет принципиальное значение для эмбрионального развития и старения (Libertini et al., 2021). В дальнейшем мы предполагаем получить данные о других белковых компонентах nuage в гаметах травяной лягушки и проверить в них наличие транскриптов TERRA.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность М.И. Сулацкому (ИНЦ РАН) за помощь при работе с электронным микроскопом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-34-90067) и Российского научного фонда (проект № 19-74-20102).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание лягушек и манипуляции с ними проведены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных".

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Arkov A.L., Ramos A. 2010. Building RNA-protein granules: insight from the germline. Trends Cell Biol. V. 20. P. 482.
- *Aul R.B., Oko R.J.* 2002. The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B variant associated with the forming acrosome during spermiogenesis. Dev. Biol. V. 242. P. 376.
- *Bastián Y., Zepeda-Bastida A., Uribe S., Mújica A.* 2007. In spermatozoa, Stat1 is activated during capacitation and the acrosomal reaction. Reproduction. V. 134. P. 425.
- Bogolyubov D.S. 2018. Karyosphere (Karyosome). A peculiar structure of the oocyte nucleus. Int. Rev. Cell Mol. Biol. V. 337. P. 1.

https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.12.001

Bouniol-Baly C., Hamraoui L., Guibert J., Beaujean N., Szöllösi M.S., Debey P. 1999. Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. Biol. Reprod. V. 60. P. 580.

- Bugaeva E.A., Podgornaya O.I. 1997. Telomere-binding protein from the nuclear envelope of oocytes of the frog Rana temporaria. Biochemistry (Mosc). V. 62. P.1311.
- *Chuma S., Hosokawa M., Tanaka T., Nakatsuji N.* 2009. Ultrastructural characterization of spermatogenesis and its evolutionary conservation in the germline: germinal granules in mammals. Mol. Cell Endocrinol. V. 306. P. 17.
- *Clermont Y., Bustos-Obregon E.* 1968. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted in toto. Am. J. Anat. V. 122. P. 237.
- D'Cruz O.J., Vassilev A.O., Uckun F.M. 2001. Members of the Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway are present and active in human sperm. Fertil. Steril. V. 76. P. 258.
- *De Lange T.* 2018. Shelterin-mediated telomere protection. Ann. Rev. Genet. V. 52. P. 223.
- Dobrynin M.A., Korchagina N.M., Prjibelski A.D., Shafranskaya D., Ostromyshenskii D.I., Shunkina K., Stepanova I., Kotova A.V., Podgornaya O.I., Enukashvily N.I. 2020. Human pericentromeric tandemly repeated DNA is transcribed at the end of oocyte maturation and is associated with membraneless mitochondria-associated structures. Sci. Rep. V. 10. P. 19634.
- Dolnik A.V., Pochukalina G.N., Parfenov V. N., Karpushev A.V., Podgornaya O.I., Voronin A.P. 2007. Dynamics of satellite binding protein CENP-B and telomere binding protein TRF2/MTBP in the nuclei of mouse spermatogenic line. Cell Biol. Int. V. 31. P. 316. https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.01.017
- *Eddy E.M.* 1975. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. Int. Rev. Cytol. V. 43. P. 229.
- *Enukashvily N.I., Dobrynin M.A, Chubar A.V.* 2021. RNA-seeded membraneless bodies: Role of tandemly repeated RNA. Adv. Protein Chem. Struct. Biol. V. 126. P. 151.
- Fuentes-Mascorro G., Vergara-Onofre M., Mercado E., Hernández-Pérez O., Rosado A. 2000. Participation of DNA structure on sperm chromatin organization. Arch. Androl. V.45. P. 61.
- *Fulka H., Langerova A.* 2019. Nucleoli in embryos: A central structural platform for embryonic chromatin remodeling? Chromosome Res. V. 27. P. 129.
- Haczkiewicz K., Rozenblut-Kościsty B., Ogielska M. 2017. Prespermatogenesis and early spermatogenesis in frogs. Zoology (Jena). V. 122. P. 63.
- Hamaguchi S. 1993. Alterations in the morphology of nuages in spermatogonia of the fish, *Oryzias latipes*, treated with puromycin or actinomycin D. Reprod. Nutr. Dev. V. 33. P. 137.
- *Herrada G., Wolgemuth D.J.* 1997. The mouse transcription factor Stat4 is expressed in haploid male germ cells and is present in the perinuclear theca of spermatozoa. J. Cell Sci. V. 110. P. 1543.

- Houston D.W., King M.L. 2000. Germ plasm and molecular determinants of germ cell fate. Curr. Top Dev. Biol. V. 50. P. 155.
- Houwing S., Kamminga L.M., Berezikov E., Cronembold D., Girard A., van den Elst H., Filippov D.V., Blaser H., Raz E., Moens C.B., Plasterk R.H., Hannon G.J., Draper B.W., Ketting R.F. 2007. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish. Cell. V. 129. P. 69.
- Ilicheva N., Podgornaya O., Bogolyubov D., Pochukalina G. 2018a. The karyosphere capsule in *Rana temporaria* oocytes contains structural and DNA-binding proteins. Nucleus. V. 9. P. 516.
- Ilicheva N.V., Travina A.O., Voronin A.P., Podgornaya O.I. 2018b. Development and characterization of polyclonal antibodies against thelinker region of the telomere-binding protein TRF2. Electronic J. Biotechnol. V. 32. P. 1–5. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.12.001
- Ilicheva N.V., Podgornaya O.I, Voronin A.P. 2015. Telomere repeat-binding factor 2 is responsible for the telomere attachment to the nuclear membrane. Adv. Protein Chem. Struct. Biol. V. 101. P. 67
- Knaut H., Pelegri F., Bohmann K., Schwarz H., Nüsslein-Volhard C. 2000. Zebrafish vasa RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. J. Cell Biol. V. 149. P. 875.
- *Laemmli U.K.* 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. V. 227. P. 680.
- Libertini G., Shubernetskaya O., Corbi G., Ferrara N. 2021. Is evidence supporting the subtelomere-telomere theory of aging? Biochemistry (Mosc.). V. 86. P. 1526.
- *Loidl J.* 1990. The initiation of meiotic chromosome pairing: The cytological view. Genome. V. 33. P. 759.
- Mendez-Bermudez A., Lototska L., Bauwens S., Giraud-Panis M.J., Croce O., Jamet K., Irizar A., Mowinckel M., Koundrioukoff S., Nottet N., Almouzni G., Teulade-Fichou M. P., Schertzer M., Perderiset M., Londoño-Vallejo A. et al. 2018. Genomewide control of heterochromatin replication by the telomere capping protein TRF2. Mol. Cell. V. 70. P. 449. e5. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.036
- *Miller D., Ostermeier G.C., Krawetz S.A.* 2005. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. Trends Mol. Med. V. 11. P. 156.
- Nguyen-Chi M., Morello D. 2011. RNA-binding proteins, RNA granules, and gametes: is unity strength? Reproduction. V. 142. P. 803.
- Ostermeier G.C., Miller D., Huntriss J.D., Diamond M.P., Krawetz S.A. 2004. Reproductive biology: Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. Nature. V. 429. P. 154.
- Podgornaya O.I., Bugaeva E.A., Voronin A.P., Gilson E., Mitchell A.R. 2000. Nuclear envelope associated protein that binds telomeric DNAs. Molecular reproduction and development: incorporating gamete research. V. 57. P. 16.
- Pochukalina G.N., Ilicheva N.V., Podgornaya O.I., Voronin A.P. 2016. Nucleolus-like body of mouse oocytes contains

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

lamin A and B and TRF2 but not actin and topo II. Mol. Cytogenet. V. 9. P. 50.

- *Ramalho-Santos J., Schatten G., Moreno R.D.* 2002. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. Biol. Reprod. V. 67. P. 1043.
- *Russell L., Frank B.* 1978. Ultrastructural characterization of nuage in spermatocytes of the rat testis. Anat. Rec. V. 190. P. 79.
- Saffman E.E., Lasko P. 1999. Germline development in vertebrates and invertebrates. Cell Mol. Life Sci. V. 55. P. 1141.
- Scherthan H., Weich S., Schwegler H., Heyting C., Härle M., Cremer T. 1996. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. J. Cell Biol. V. 134. P. 1109.
- *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 76. P. 4350.
- Travina A.O., Ilichev N.V., Mittenberg A.G., Shabelnikov S.V., Kotova A.V., Podgornaya O.I. 2021. The Long linker region of telomere-binding protein TRF2 is responsible for interactions with lamins. Int. J. Mol. Sci. V. 22. P. 3923.
- Van Oordt P.G. 1956. The role of temperature in regulating the spermatogenetic cycle in the common frog (*Rana temporaria*). Acta Endocrinol. (Copenh). V. 23. P. 251.
- Van Oordt P.G., van Dongen W.J., Lofts B. 1968. Seasonal changes in endocrine organs of the male common frog, Rana temporaria. I. The pars distalis of the adenohypophysis. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. V. 88. P. 549.
- Voronin A.P., Lobov I.B., Gilson E., Podgornaya O.I. 2003. A telomere-binding protein (TRF2/MTBP) from mouse nuclear matrix with motives of an intermediate filament-type rod domain. J. Anti Aging Med. V. 6. P. 205.
- Wang X., Lv C., Guo Y., Yuan S. 2020. Mitochondria associated germinal structures in spermatogenesis: piRNA pathway regulation and beyond. Cells. V. 9. P. 399.
- Ward W.S., Coffey D.S. 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells. Biol. Reprod. V. 44. P. 569.
- Witschi E. 1924. Die entwicklung der keimzellen der Rana temporaria 1. erster teil: urkeimzellen und spermatogenese. Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat. V. 1. P. 523.
- Wood A.M., Rendtlew Danielsen J.M., Lucas C.A., Rice E.L., Scalzo D., Shimi T., Goldman R.D., Smith E.D., Le Beau M.M., Kosak S.T. 2014. TRF2 and lamin A/C interact to facilitate the functional organization of chromosome ends. Nat. Commun. V. 5. P. 5467.
- *Yokota S.* 2012. Nuage proteins: Their localization in subcellular structures of spermatogenic cells as revealed by immunoelectron microscopy. Histochem. Cell Biol. V. 138. P. 1. https://doi.org/10.1007/s00418-012-0962-z
- *Yuan F., Li G., Tong T.* 2017. Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 (NOLC1) regulates the nucleolar retention of TRF2. Cell Death Discov. V. 3. P. 17043.
- Zhang S., Hemmerich P., Grosse F. 2004. Nucleolar localization of the human telomeric repeat binding factor 2 (TRF2). J. Cell Sci. V. 117. P. 3935.
- Zickler D., Kleckner N. 1998. The leptotene-zygotene transition of meiosis. Annu. Rev. Genet. V. 32. P. 619.

Localization of Telomere-Binding Protein Trf2 in Spermatogenic Cells of Hibernating Frogs Rana temporaria

A. O. Travina^{a, *}, P. K. Shvets^b, G. N. Pochukalina^a, and O. I. Podgornaya^{a, c}

^aInstitute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia ^bSaint Petersburg State Institute of Technology, St. Petersburg, 190013 Russia ^cDepartment of Biology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia *e-mail: alotra 1@vandex.ru

Telomeric DNA is associated with a protein complex called shelterin. There is evidence showing that the functions of the shelterin complex are broader than just a chromosome ends protecting. There are examples of an unusual distribution of the telomere-binding protein TRF2 in mouse and common frog *Rana temporaria* oocytes and mouse spermatozoa. In this research we studied the TRF2 distribution in spermatogenic cells of the common frog. To confirm the specificity of antibodies to common frog TRF2, immunobloting analysis were performed with total testis. Antibodies verified by immunoblotting were used to localize TRF2 in spermatogonia and spermatozoa using immunoelectron microscopy. In spermatogonia, TRF2 was evenly distributed throughout the nucleus. TRF2 staining in the cytoplasm of spermatogonia in the electron-dense structures was revealed. In spermatozoa, a part of TRF2 is located in the acrosome, confirming the universality of the phenomenon for vertebrates.

Keywords: telomere-binding protein TRF2, spermatogenesis, acrosome, nuage, Rana temporaria

УДК 57.085.23

ГЕНО- И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С МЕРКАПТОСУКЦИНАТОМ НА КЛЕТКИ МСF-7

© 2022 г. В. А. Тронов^{1, *}, Н. А. Ткачев¹, Е. И. Некрасова², А. Ф. Ванин¹

¹Федеральный научный центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, 119991 Россия ²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119991 Россия

> **E-mail: vtronov@yandex.ru* Поступила в редакцию 29.04.2022 г. После доработки 31.05.2022 г. Принята к публикации 03.06.2022 г.

Цитотоксическое действие динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ) с меркаптосукцинатом (MC) на опухолевые клетки человека MCF-7 в 2 раза выше цитотоксического эффекта смеси предшественников его синтеза (MC + Fe^{2+}). Методом щелочных комет показано, что смесь (MC + Fe^{2+}) индуцировала в клет-ках однонитевые разрывы (OP) ДНК. Эти повреждения полностью репарировались спустя 24 ч. Хотя комплекс ДНКЖ-MC индуцировал в ДНК клеток меньше OP, часть из них сохранялась нерепарированными в 19% клеток спустя 24 ч. Методом нейтральных комет показано, что эти разрывы являются двунитевыми (ДР) и локализованы в 17% клеток. Качественная корреляция генотоксичности по выходу нерепарированных OP в ДНК с цитотоксичностью, определенной по MTT-тесту, на клетках MCF-7 говорит о том, что токсичность динитрозильного комплекса по отношению к клеткам MCF-7 может быть частично ассоциирована с возникающими ДР в ДНК. Потенциально летальные ДР могут ворзникать в результате атаки клеточными эндонуклеазами однонитевых участков и АП-сайтов в ДНК, которые фомируются как интермедиаты механизма репарации NER, активируемого в ответ на появление в ДНК сложных аддуктов оснований под действием ДНКЖ-МС.

Ключевые слова: клетки MCF-7, динитозильный комплекс железа, повреждение ДНК, репарация, цитотоксичность, метод комет

DOI: 10.31857/S0041377122050091

Известны заболевания, ассоциированные с дефицитом оксида азота в тканях больных. К ним относятся сахарный диабет (Giacco, Brownlee 2010; Du et al., 2001), гипертоническая болезнь (Török, 2008), глаукома (Reina-Torres et al., 2021), эндометриоз (Burgova et al., 2019), онкологические заболевания (Carmeliet, Jain, 2011; Huang, et al., 2017). В исследованиях in vitro и in vivo показано, что синтетические динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), обеспечивая доставку NO в ткани, открывают возможность терапии таких заболеваний и (или) снижают их патологические проявления (Wu et al., 2016; Kelsey, 2014). В экспериментах на крысах химические доноры оксида азота оказывали нейропротекторное действие при ишемическом инсульте (Godínez-Rubí, 2013). Ранее на клетках аденокарциномы человека MCF-7 мы показали, что цитотоксический эффект синтетического комплекса ДНКЖ- МС опосредован ионом нитрозония (NO⁺), высвобождающимся при распаде комплекса в клетках (Vanin et al., 2021). Цитотоксический эффект выражался в виде апоптоза, который регистрировали спустя 24 ч после добавления комплекса к клеткам. В этой же работе было показано, что время полу-жизни комплекса ДНКЖ-МС в водной среде при комнатной температуре составляет 2 ч. Этот факт ставит вопрос о связи цитотоксического эффекта с самим комплексом или с продуктами его распада в клетке (Vanin et al., 2021).

В настоящей работе мы, используя метод ДНКкомет, оценили гено- и цитотоксическое действие комплекса ДНКЖ-МС и смеси предшественников его синтеза – МС и ферросульфата (FeSO₄) – на клетки MCF-7, а также их влияние на репарацию ДНК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Синтез ДНКЖ-МС. Динитрозильный комплекс железа (ДНКЖ) с меркаптосукцинатом (МС) (ДНКЖ-МС) синтезирован из ферросульфата и МС по разработанному нами протоколу (Vanin et al.,

Принятые сокращения: АП-сайты – апуриновые и апиримидиновые сайты; ДР – двунитевые разрывы; ДНКЖ – динитрозильный комплекс железа; МС – меркаптосукцинат; ОР – однонитевые разрывы; ЩЛС – щелочелабильные сайты; ВЕК – эксцизионная репарация оснований; NER – эксцизионная репарация нуклеотидов; NO – оксид азота.

2021). В водном растворе ДНКЖ-МС присутствует в моноядерной (1) и биядерной (2) формах:

$$\left[\left(\mathrm{RS}^{-}\right)_{2}\mathrm{Fe}^{2+}\left(\mathrm{NO}\right)_{2}\right],\tag{1}$$

$$\left[\left(\mathbf{RS}^{-}\right)_{2}\mathbf{Fe}_{2}^{2+}\left(\mathbf{NO}\right)_{4}\right],$$
(2)

где (RS^{-}) — тиол-содержащий лиганд, в данной работе работе $RS^{-} - MC$ (3):

$$HOOC-CH(SH)CH_2-COOH.$$
(3)

Образование стабильного комплекса ДНКЖ-МС регистрировали спектрофотометрически. Концентрацию комплекса определяли по оптической плотности на длине волны 360 нм, исходя из коэффициента экстинкции 3700 M^{-1} см⁻¹ на один атом железа (Vanin et al., 2011). Следует отметить, что в экспериментах с использованием эквимолярной смеси (MC + Fe²⁺) концентрация компонентов этой смеси не превышала 0.3 мМ. При большей их концентрации, особенно при щелочном варианте метода ДНК-комет, ионы железа в заметном количестве включались в водонерастворимые гидроокисные комплексы (FeOH)_n, затруднявшие визуализацию комет и искажавшие результаты.

Культура клеток. Клетки аденокарциномы молочной железы человека линии МСF-7 были получены из коллекции лаборатории экспериментальной терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Москва). Клетки культивировали в атмосфере 5% СО₂ при 37°С в среде DMEM (ThermoFisherScientific, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина и 10 Ед/мл смеси пенициллина и стрептомицина (ПанЭко, Россия).

цитотоксичности. Цитотоксичность Опенка ДНКЖ-МС и эквимолярной смеси компонентов комплекса (MC + Fe²⁺) оценивали по снижению жизнеспособности клеток MCF-7 после воздействия препаратов. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста. Клеточную суспензию в культуральной среде (~10⁵ кл./0.2 мл) вносили в лунку 96-луночного планшета. Спустя 24 ч (время адаптации и прикрепления клеток), в каждую лунку добавляли раствор тестируемых соединений в стерильном фосфатно-солевом буфере (PBS) в различном разведении (не более 0.1 общего объема в лунке). Клетки культивировали 48 ч в СО₂-инкубаторе при 37°C, после чего в каждую лунку добавляли 20 мкл раствора МТТ-реагента (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5 дифенил тетразолия бромид) (Appli-Chem. Германия). до конечной концентрации в лунке 0.5 мг/мл. Клетки продолжали культивировать в присутствии МТТ-реагента 3 ч, затем отбирали среду и к оставшимся в лунках клеткам добавляли по 200 мкл ДМСО, растворяющего кристаллы формазана (37°С, 10 мин со встряхиванием). С помощью анализатора MultiscfnFC (ThermoScientific, США) измеряли оптическую плотность раствора формазана в лунке (при длине волны 570 нм), которая прямо пропорциональна количеству жизнеспособных клеток. В каждом эксперименте контрольные и экспериментальные лунки в планшетах повторялись 4кратно.

Оценка генотоксичности методом комет. Использовали щелочной и нейтральный варианты метода комет (Olive, Banath, 2006) с некоторыми модификациями (Тронов, Некрасова, 2020). Их сочетание позволяет определять в разрывы в ДНК однонитевые (ОР), двунитевые (ДР), щелочелабильные сайты (ЩЛС) и строго их дискриминировать. Клетки (3 × × 10⁵/0.3мл) высевали в 6-луночные плашки для культивирования в течение 24 ч при 37°С в атмосфере 5% СО₂ для адгезии клеток на дно лунок. К прикрепленным клеткам добавляли тестируемые соединения, предварительно растворенные в культуральной среде до требуемой концентрации. Время совместного культивирования составляло 5 ч (время максимальной генотоксичности) и 24 ч (время эффективной репарации повреждений ДНК в клетках) По завершении совместного культивирования клетки снимали с подложки трипсинизацией, промывали холодным PBS, ресуспендировали в телячьей сыворотке, содержащей 10% ДМСО, разливали на аликвоты и замораживали в жидком азоте. Замороженные аликвоты хранили при -70°С. Размороженную суспензию клеток центрифугировали (400 g, 5 мин). Осадок суспендировали в 0.7%-ном растворе легкоплавкой агарозы (тип IV, Sigma) в PBS (ПанЭко, Россия). Из суспензии готовили слайд на предметном стекле по стандартной процедуре метода комет (Тронов и др., 2012). Стекла с застывшим гелем погружали в нейтральный лизирующий раствор: 0.5 M Na₂EDTA, 2% Na-лауроилсаркозила, 0.3 мг/мл протеиназы К, pH 8, 37°С. После лизиса в течение 12-14 ч слайды либо подвергали нейтральному электрофорезу в ТАЕ-буфере рН 8 (0.8 В/см, 24 мин, 8°С), либо погружали в щелочной диссоциирующий раствор (1.2 M NaCl, 100 мМ Na₂EDTA, 0.1% Na-лаурилсаркозината, 0.26 М NaOH, pH > 13) на 1 ч, при 8°С. В этих условиях хроматин диссоциирует, а ДНК расплетается в области разрывов, вызванных как тестируемыми агентами, так и под действием репарирующих ферментов клетки. Процедура завершалась погружением слайдов в электрофоретический буфер (0.03 M NaOH, 2 мМ Na₂EDTA, pH ~ 12.3, 8°C, 1 ч). Электрофорез проводили в горизонтальной камере при 8°С в течение 25 мин и напряжении 0.8 В/см. После электрофореза слайды трижды по 5 мин ополаскивали нейтрализующим раствором (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5), сушили на воздухе и дегидратировали в метаноле. Слайды окрашивали раствором ДНК-интеркалирующего красителя SYBR GreenI (Sigma), 2-4 мкг/мл в антифейде (20 мМ Tris-HCl pH 7.5, 20 мг/мл DABCO, 60% глицерина). Визуализацию комет осуществляли на флуоресцентном микроскопе МИКМЕД-2 (АО ЛОМО, Россия). Повреждение



Рис. 1. Репрезентативные микрофотографии щелочных ДНК-комет из интактных (*a*) и обработанных комплексом ДНКЖ-МС (δ) клеток МСF-7, а также гистограммы распределения клеток по поврежденности ДНК в них. Показатель цитотоксичности (*mt*) представлен как доля клеток (комет) с высокой поврежденностью ДНК, для которых *mt* \geq 20 (8%, δ).

ДНК анализировали по изображениям ДНК-комет, используя программу CASP 1.2.2, оценивали повреждение по моменту хвоста комет *mt* (Końca et al., 2003).

Репрезентация результатов и статистика. Полученные данные представляли в виде распределений комет по параметру *mt* (рис. 1a, δ), из которых находили усредненную поврежденность ДНК в клетках (генотоксичность, $mt \pm SD$) и mt-цитотоксичность. Используемый в работе показатель *mt*-цитотоксичность определяли через 24 ч культивирования, в течение которой протекала и в основном завершалась репарация ДНК. Сохранившиеся к этому времени повреждения ДНК с большой вероятностью индуцировали в делящихся клетках апоптоз, т.е., прямо или опосредованно были связаны с жизнеспособностью клеток. Параметр *mt*-цитотоксичность представляет собой долю клеток/комет с высокой поврежденностью ДНК для шелочных ($mt \ge 20$) и для нейтральных ($mt \ge 10$) комет. Эти значения mt приняты в качестве пороговых для оценки mt-цитотоксичности, поскольку в распеделениях по mt интактных клеток более 95% комет имели значение mt ниже этих значений для щелочных и нейтральных условий электрофореза соответственно (рис. $1a, \delta$). Эксперименты проводили независимо и повторяли трижды;

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

результаты представлены средними значениями и их стандартными отношениями (SD); сравнение экспериментальных распределений осуществлялось с помощью непараметрической статистики Колмогорова—Смирнова, считая различия достоверными при P < 0.05. Все статистические расчеты проведены с помощью программного обеспечения OriginPro 8.1. (Originlab Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитотоксичность комплекса ДНКЖ-МС и смеси предшественников его синтеза. Для сравнения цитотоксичностей комплекса ДНКЖ-МС и смеси предшественников его синтеза (MC + Fe²⁺) мы выравнивали их концентрации по Fe²⁺, полагая, что на 1 моль ДНКЖ-МС приходится 1 моль Fe²⁺, связанного с комплексом. Кроме того, в отличие от свободного Fe²⁺, способного вступать в реакцию Фентона, цитотоксичность МС в исследуемом диапазоне концентраций близка к нулю.

Рис. 2 демонстрирует жизнеспособность клеток MCF-7 (определенной по MTT-тесту) после культивирования их в течение 48 ч с различными концентрациями комплекса ДНКЖ-МС и эквимолярной



Рис. 2. Дозовая зависимость жизнеспособности клеток MCF-7 через 48-ч культивирования с эквимолярной смесью меркаптосукцината (MC) с Fe²⁺(кривая 1) и с комплексом ДНКЖ-МС (кривая 2). Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста. По вертикали: доля живых клеток, %.

смеси предшественников его синтеза – (MC + Fe²⁺). Два факта, наблюдаемые на рисунке, обращают на себя внимание: дозозависимое увеличение жизнеспособности клеток в диапазоне концентраций комплекса ДНКЖ-МС 0–40 мкМ и более чем 2-кратное увеличение цитотоксичности комплекса по сравнению с цитотоксичностью смеси (MC + Fe²⁺) – значение концентрации, при которой гибнет половина клеточной популяции (IC50), составляет 0.85 мМ против 2.0 мМ соответственно.

Первый факт полностью соответствует общепризнанной точке зрения, согласно которой при различных концентрациях оксида азота (его химических доноров) проявляются различные физиологические функции NO (Khan et al., 2020). На опухолевых клетках показано, что в диапазоне средних концентраций NO, создаваемых донорами NO в клетке (100-350 мкМ) наблюдается генетическая нестабильность, репарация ДНК, снижение апоптоза (Yakovlev, 2013; Huerta, 2008). Эти реакции соответствуют клеточному адаптивному ответу, который включает в себя возрастание пролиферации, что демонстрирует рис. 2 (кривая 2). В ответ на более высокие концентрации NO (500-1000 мкМ) увеличивается повреждение ДНК, активируется ATM/ATRсигналинг, фосфорилирующий белок р53, который тормозит пролиферацию и активирует апоптоз (Уаkovlev et al., 2010). Что касается второго факта, то поскольку цито- и генотоксичность смеси (MC + Fe^{2+}) в большой степени обусловлена свободным Fe²⁺, включение его в комплекс ДНКЖ уводит его из токсического эффекта комплекса.

На циркулярной ДНК плазмиды показано (Lewandowska et al., 2015), что включение железа в комплекс ДНКЖ предотвращает реакцию Фентона и тем самым защищает ДНК плазмиды от деградации под действием окислительного стресса. Полученный нами результат (рис. 2) на первый взгляд противоречит результатам этой работы. Поэтому мы оценили генотоксический эффект этих соединений в клетках MCF-7, т.е. их способность индуцировать повреждения ДНК. Эти повреждения могут возникать как под действием продуктов распада комплекса ДНКЖ (NO, NO⁺ и свободного Fe²⁺), так и в результате активации процессов репарации в ответ на повреждение ДНК (разрывы и апуриновые и апиримидиновые сайты (АП) сайты), которые в щелочных условиях лизиса клеток трансформируются в разрывы).

Влияние комплекса ДНКЖ-МС и его компонентов на ДНК и ее репарацию.

В отличие от результатов по параметру цитотоксичности с помощью MTT-теста (рис. 2), наш результат по генотоксичности клеток MCF-7 через 5 ч совпадает с данными по повреждению ДНК in vitro, полученными в упомянутой выше работе (Lewandowska et al., 2015): *тt*-генотоксичность свободного железа выше таковой комплекса (рис. 3а). Однако культивирование клеток в присутствии агентов в течение 24 ч, помимо того, что снижает дозовые зависимости, но и меняет их местами: повреждения, индуцированные смесью $(MS + Fe^{2+})$, практически полностью репарируются (рис. 36); в случае с комплексом к 24 ч, как видно, сохраняются нерепарированные повреждения в субпопуляции клеток, составляющей 19%. В клетках, обработанных смесью (MC + Fe²⁺), объем такой субпопуляции составляет 6% от общей численности клеток в распределении (более 400 клеток). Рис. 4 наглядно демонстрирует это и достоверную разницу между *mt*-распределениями сравниваемых популяций клеток через 24 ч обработки агентами. Различия между распределениями достоверны при уровне значимости Р < 0.05 (статистика Колмогорова-Смирнова). Как видно, *тt*-цитотоксичности смеси $MC+ Fe^{2+} 0.3 mM$ и комплекса ДНКЖ-MC. 1 мM. найденные из полученных распределений, составляют 6 (рис. 4а) и 19% (рис. 4б) соответственно. Рис. 5 представляет объединенный результаты оценки цитотоксичности по МТТ-тесту и *mt*-распределению клеток, культивируемых с тестируемыми агентами 48 и 24 ч соответственно. Цитотоксичность комплекса, более высокая по результатам МТТ-теста, по сравнению с оценкой этого параметра по моменту хвоста комет mt. Это может быть связано с более длительным культивированием клеток с агентами при МТТ-тестировании.

Следует подчеркнуть, что представленная на рис. 5 цитотоксичность, определенная по значениям *mt* (*черные столбики*) базируется на измерении разрывов ДНК через 24 ч, которые включают в себя ОР, ДР и ЩЛС в ДНК. Но известно, что ОР является наиболее частым и легкоустраняемым дефектом в



Рис. 3. Генотоксичность через 5 ч (*a*) и цитотоксичность через 24 ч (*б*) действия смеси (MC + Fe²⁺) (*кривая 1*) и комплекса ДНКЖ-МС (*кривая* 2) на клетки MCF-7. Генотоксичность, *mt*, определяли как среднюю поврежденность ДНК в клетке через 5 ч обработки агентами. Цитотоксичность оценивали как долю клеток (%) с поврежденной ДНК через 24 ч обработки агентами.

геноме клетки, а потому сам по себе не является летальным. Стало быть, длительное его пребывание в клетке может быть связано либо с NO-инициированной инактивацией ферментов репарации, либо с тем, что он представляет собой потенциально летальный ДР, обусловливающий цитотоксический эффект (Roos, Kaina, 2012). Поэтому мы провели проверку клеток MCF7, обработанных агентами в течение 24 ч, на наличие в их ДНК двунитевых разрывов, используя для этого метод нейтральных ДНК-комет. Результат суммирован в табл. 1 в виде распределения клеток по повреждению ДНК. Каждое из 3-х представленных в таблице распределений получено путем объединения результатов 3–4-х независимых экспериментов.

Из табл. 1 видно, что 24-часовая обработка клеток смесью предшественников комплекса практически не оставляет в клеточной ДНК двунитевых разрывов: вид распределения и средние показатели поврежденности клеток не отличаются от таковых для ин-

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022



Рис. 4. Гистограммы распределений МСF-7 клеток по повреждению ДНК (по показателю *mt*) после воздействия в течение 24×0.3 мМ смеси (МС + Fe²⁺) (*a*) и 1 мМ комплекса ДНКЖ-МС (*б*). Цитотоксичность смеси и комплекса составляет 6 и 19% соответственно (число клеток в каждом распределении более 400). Гистограммы построены по результатам 3–4 экспериментов.

тактных клеток. Комплекс ДНКЖ-МС через 24 ч оставляет существенные повреждения в ДНК в виде двунитевых разрывов. Эти разрывы локализованы в 17% клеток, и их число практически совпадает со значением цитотоксичности (19%), найденной в аналогичных экспериментах со щелочными кометами (рис. 4)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

NO включен во многие внутри- и межклеточные сигнальные пути, регулирующие физиологические процессы клетки. В то же время, в силу высокой реакционной способности, NO повреждает ДНК в клетке, вызывая модификацию оснований (дезаминирование, окисление), формирование апуриновых и апиримидиновых сайтов, разрывы цепей ДНК, внутри- и межцепочечные сшивки (см. обзоры: Szabo, Ohshima, 1997; Burney et al., 1999). Как следствие таких повреждений, продемонстрирован мутагенный эффект NO на культивируемых лимфобластах человека ТК6 по выходу мутаций в репортерных ге-



Рис. 5. Цитотоксичность комплекса ДНКЖ-МС (1 мМ) и 0.3 мМ смеси (МС + Fe²⁺), оцененная по *mt*-распределению (*черные столбики*) и МТТ-тесту (*серые столбики*) клеток МСF-7; * различия недостоверны, **различия статистически достоверны при P < 0.05 (см. рис. 4).

нах *HPRT* и *TK* (Nguyen et al., 1992): частота NO-индуцированных мутаций в 15–18 раз превышала частоту спонтанного мутирования этих локусов.

В другой работе (Tamir et al., 1996) в качестве мишени для NO использовали кольцевую суперскрученную ДНК плазмиды in vitro. Оказалось, что во внеклеточной среде NO-обработанная ДНК плазмиды не подвергалась никированию, т.е. не содержала разрывов. Но после трансфекции NO-обработанной плазмиды в клетки СНО плазмида подвергалась никированию (релаксации). Другими словами, при наличии активной системы репарации в клетке в NO-поврежденной ДНК появляются разрывы. Эти результаты говорят о том, что первичным повреждением ДНК под действием NO[•] является безразрывное дезаминирование пуринов в ксантин и гипоксантин, которые либо подвергаются спонтанной депуринизации, либо активно удаляются гликозилазами, гидролизирующими N-гликозидную связь между химически модифицированным основанием и дезоксирибозой. В обоих случаях удаление основания оставляет безразрывный пропуск в виде апуринового и апиримидинового (АП) сайта. АП-сайт является субстратом для АП-эндонуклеазы 1, которая гиролизует в нем фосфодиэфирную связь, формируя разрыв цепи ДНК с 3'ОН- и 5'dRP-концами. Далее ДНК-полимераза β удаляет 5'dRP-конец разрыва и на его место присоединяет один нуклеотид, комплементарный противолежащему нуклеотиду, тем самым заполняя пробел в АП-сайте. ДНК-лигазы І или III завершают процесс восстановления целостности ДНК по механизму BER. Следует отметить, что АП-сайт сам по себе не является разрывом в цепи ДНК, но гидролизуется при щелочном рН и потому относится к группе повреждений, называемых ШЛС.

В случае действия смеси (MC + Fe²⁺) протекает реакция Фентона со свободным Fe²⁺, в результате которой либо окисляются основания, либо гидролизуется фосфодиэфирная связь в цепи ДНК. В обоих случаях активируется механизм BER, который удаляет и поврежденные основания, и однонитевые разрывы, как это показано на рис. 5 (различие с контролем статистически не достоверно).

В отличие от разрывов под действием смеси $(MC + Fe^{2+})$, разрывы, возникшие в ответ на обработку клеток комплексом ДНКЖ-МС, репарируются медленнее, и через 24 ч наблюдается заметная доля клеток, сохраняющих высокий уровень повреждений в ДНК (рис. 5). Отсутствие репарации разрывов ДНК в NO-обработанных лимфобластах человека отмечали ранее другие авторы (Nguyen et al., 1992). Наши опыты с нейтральными ДНК-кометами показали, что эти разрывы скорее всего являются двунитевыми. В пользу этого предположения говорит тот факт, что доли клеток, имеющих в ДНК однонитевые и двунитевые разрывы, оцененные методами щелочных и нейтральных ДНК-комет, почти совпадают — 19 и 17% соответственно (рис. 46 и табл. 1). Это совпадение говорит о том, что возможно ДР появились на месте ОР в результате атаки однонитевого участка клеточной эндонуклеазой.

Такое событие вполне вероятно в ходе репарации сложных аддуктов оснований. Показано, что такие аддукты образуются в результате прямой атаки ДНК азотистым ангидридом N_2O_3 (Tannenbaum et al., 1994), который, в свою очередь, накапливается в клетке в результате реакции оксила азота с молекулярным кислородом (Lewis et al., 1995). Взаимодействие N₂O₃ с гуанином приводит к дезаминированию с образованием диазониевого катиона. Если таковые соседствуют в ДНК, то образуется межспиральный димер (сшивка) (Burney et al., 1999). Репарация таких аддуктов в клетке осуществляется механизмом NER (nucleotide excision repair). Важной особенностью NER является то, что размер выщепляемого участка ДНК, содержащего аддукт, у клеток млекопитающих составляет ~30 нуклеотидов (Shivii, 1995) (в механизме BER он ≤ 3 нуклеотидов в случае репарации АП-сайта и ОР, и не превышает 10 при репарации окси-модифицированных оснований).

Кроме того, обширное повреждение ДНК чревато разбалансировкой этапов репарационного процесса (Тронов, Некрасова, 2020). К рассогласованию этапов репарации может приводить и NO-индуцированная пост-трансляционная модификация белков NER, снижающая их активность и эффективность репарации в целом, (Graziewicz et al., 1996; Jaiswal et al., 2001). Именно с этим связан результат работы, в которой показано, что арсенит, экзогенный донор NO и пероксинитрита, увеличивал продукцию NO и одновременно с этим наблюдали подавление NER-эксцизии аддуктов ДНК в фибробластах человека, индуцированных УФ-излучением, циспла-

Обработка клеток	Распределение клеток по повреждению двунитевой ДНК, <i>mt</i>	Параметры распределения		
		Ν	$\langle mt \rangle \pm SD$	ЦТ, %
– (Интактные)	25 8 20 15 10 5 0 10 10 20 30 40 50 Повреждение ДНК, <i>mt</i>	299	2.7 ± 2.4	2.3
(MC + Fe ²⁺) 0.3 мМ, 24 ч	30 УС 20 10 0 10 0 10 20 30 40 50 Повреждение ДНК, <i>mt</i>	281	2.2 ± 2.5	1
(ДНКЖ-МС) 1 мМ, 24 ч	20 8 15 10 5 0 0 10 0 10 20 30 40 50 Повреждение ДНК, <i>mt</i>	332	8.2 ± 14	17

Таблица 1. Поврежденность двунитевой ДНК (днДНК) в клетках MCF-7 в ответ на воздействие 0.3 мМ смеси (MC + Fe²⁺) и 1 мМ комплекса ДНКЖ-МС в течение 24 ч

Примечание. N – число клеток, входящих в распределение; *<mt>* – средняя поврежденность двунитевой ДНК, найденная из распределения; ЦТ –цитотоксичность – доля клеток (%) с высокой поврежденностью ДНК (*mt* > 10).

тином, митомицином и бензопиреном (Chien, 2004). В механизм NER у млекопитающих вовлекаются более 30 различных белков, которые являются мишенью для NO-опосредованной модификации.

Таким образом, в результате незавершенной репарации увеличивается время существования таких интермедиатов процесса NER, как АП-сайты и протяженные однонитевые участки в ДНК-дуплексе; будучи атакованы эндонуклеазами, они переходят в двунитевые разрывы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет бюджетного финансирования Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с участием животных или людей в качестве объектов не проводились.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

В.А. Тронов: экспериментальная разработка идеи, планирование и проведение экспериментов, написание текста; Н.А. Ткачев: репрезентация результатов, статистика; Е.И. Некрасова: культивирование клеток, микроскопия, обсчет результатов измерений; А.Ф. Ванин: идея, планирование эксперимента, написание текста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Тронов В.А., Виноградова Ю.В., Поплинская В.А., Островский М.А. 2012. Механизмы радиорезистентности терминально дифференцированных клеток зрелой сетчатки глаза. Цитология. Т. 54. С. 261. (Tronov V.A., Vinogradova U.V., Loginova M.U., Poplinskaya V.A., Ostrovsky M.A. 2012. Mechanisms of radioresistance in terminally differentiated cells of mature retina. Cell Tiss. Biol. V. 6. P. 219.)
- *Тронов В.А., Некрасова Е.И.* 2020. Повреждение ДНК и белок Р53 ограничивают пролиферацию клеток Мюллера в сетчатке мышей в ответ на действие метилнитрозомочевины. Биофизика. Т. 65. С. 543. (*Tronov V.A., Nekrasova E.I.* 2020. DNA Damage and p53 restrict proliferation of Muller cells in mouse retina in response to the influence of *n*-methyl-n-nitrosourea. Biophysics (Russ.).
- Burgova E.N., Khristidis Y.I., Kurkov A.V., MikoyanV.D., Shekhter A.B., Adamyan L.V., Timashev P.S., Vanin A.F. 2019. The inhibiting effect of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands on the growth of endometrioid tumours in rats with experimental endometriosis. Cell Biochem. Biophys. V. 77. P. 69.
- Burney S., Caulfield J.L., Niles J.C., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. 1999. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. Mutat. Res. V. 424. P. 37.
- *Carmeliet P., Jain R.K.* 2011. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. Nat. Rev. Drug Discov. V. 10. P. 417.
- *Chien Y.-H., Bau D.-T., Jan K.-Y.* 2004. Nitric Oxide inhibits DNA-adducts excision in nucleotide excision repair. Free Rad. Biol. Med. V. 36. P. 1011.
- *Du X.L., Edelstein D., Dimmeler S., Ju Q., Sui C., Brownlee M.* 2001. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. J. Clin. Invest. V. 108. P. 1341.
- *Giacco F., Brownlee M.* 2010. Oxidative stress and diabetic complications. Circ. Res. V.107. P. 1058.
- Godínez-Rubí M., Rojas-Mayorquín A.E., Ortuño-Sahagún D. 2013. Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction. Oxid. Med. Cell. Long. Article ID 297357. https://doi.org/10.1155/2013/297357
- *Graziewicz M., Wink D.A., Laval F.* 1996. Nitric oxide inhibits DNA ligase activity: Potential mechanisms for NO-mediated DNA damage. Carcinogenesis. V. 17. P. 2501.
- Huang Z., Fu J., Zhang Y. 2017. Nitric oxide donor-based cancer therapy: Advances and prospects. J. Med. Chem. V. 60. P. 7617.
- Huerta S., Chilka S., Bonavida B. 2008. Nitric oxide donors: novel cancer therapeutics iew) (review). Int. J. Oncol. V. 33. P. 909.
- Jaiswal M., LaRusso N.F., Shapiro R.A., Billiar T.R., Gores G.J. 2001. Nitric oxide-mediated inhibition of DNA repair potentiates oxidative DNA damage in cholangiocytes. Gastroenterol. V. 120. P. 190.
- *Kelsey M.S., Kwon M-Y., Chung S.W., Kim E.* 2014. Coordinationtriggered NO release from a dinitrosyl iron complex leads to anti-inflammatory activity. Chem. Sci. V. 5. P. 2374.
- Khan F.H., Dervan E., Bhattacharyya D.D., McAuli_J.D., Miranda K.M., Glynn S.A. 2020. The role of nitric oxide in cancer: master regulator or NOt? Int. J. Mol. Sci. V. 21. P. 9393. https://www.mdpi.com/1422-0067/21/24/9393

- Końca K., Lankoff, A., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Goźdź, S., Koza Z. Wojcik, A. 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. Mutat. Res. V. 534. P. 15.
- Lewandowska H., Sadło J., Męczyńska S., Stępkowski T.M., Wójciuk G., Kruszewsk M. 2015. Formation of glutathionyl dinitrosyl iron complexes protects against iron genotoxicity. Dalton Trans. V. 44. P. 12640.
- Lewis R.S., Tannenbaum S.R., Deen W.M. 1995. Kinetics of Nnitrosation in oxygenated nitric oxide solutions at physiological pH: role of nitrous anhydride and effects of phosphate and chloride. J. Am. Chem. Soc. V. 117. P. 3933.
- Nguyen T., Brunson D., Crespi C. L., Penman B.W., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. 1992. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 89. P. 3030.
- *Olive P.L, Banath J.P.* 2006. The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. Nature Protocol. V. 1. P. 23.
- Reina-Torres E., De Ieso M.L., Pasquale L.R., Madekurozwa M., van Batenburg-Sherwood J., Overby D.R., Stamer W.D. 2021. The vital role for nitric oxide in intraocular pressure homeostasis. Prog. Retin Eye Res. V. 83. P. 1.
- *Roos W.P., Kaina B.* 2012. DNA damage-induced apoptosis: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. Cancer Letters. V. 332. P. 237. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.007
- Shivji M.K., Podust V.N., Hubscher U., Wood R.D. Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. 1995. Biochemistry. V. 34. P. 5011.
- Szabo C., Ohshima H. 1997. DNA damage induced by peroxynitrite: Subsequent biological effects, nitric oxide: Biol. Chem. V. 1. P. 373.
- *Tamir S., Burney S., Tannenbaum S.R.* 1996. DNA damage by nitric oxide. Chem. Res. Toxicol. V. 9. P. 821.
- Tannenbaum S.R., Tamir S., deRojas-Walker T., Wishnok J.S. 1994. DNA damage and cytotoxicity by nitric oxide. In: Nitrosamines and related *n*-nitroso compounds. Washington: American Chemical Society. V. 10. P. 120.
- *Török J.* 2008. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. Physiol. Res. V. 57. P. 813.
- Vanin A.F., Poltorakov A.P., Mikoyan V.D., Kubrina L.N., Burbaev D.Sh. 2011. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione: electron paramagnetic resonance and optical studies. Nitric Oxide Biol. Chem. V. 23. P. 136.
- Vanin A.F., Tronov V.A., Borodulin R.R. 2021. Nitrosonium cation as a cytotoxic component of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands (based on the experimental work on MCF7 human breast cancer cell culture). Cell Biochem. Biophys. V. 7. P. 93.
- Wu S.C., Lu C.Y., Chen Y.L., Lo F.C., Wang T.Y., Chen Y.J., Yuan S.S., Liaw W.F., Wang Y.M. 2016. Water-soluble dinitrosyl iron complex (DNIC): A nitric oxide vehicle triggering cancer cell Death via apoptosis. Inorg. Chem. V. 55. P. 9383.
- *Yakovlev V.A.* 2013. Nitric oxide-dependent down regulation of *BRCA1* expression promotes genetic instability. Cancer Res. V. 73. P. 706.
- Yakovlev V.A., Bayden A.S., Graves P.R., Kellogg G.E., Mikkelsen R.B. 2010. Nitration of the tumor suppressor protein p53 at tyrosine 327 promotesp 53 oligomerization and activation. Biochemistry. V. 49. P. 5331.

Cytotoxicity and Genotoxicity of Dinitrosyl Iron Complex with Mercaptosuccinate in MCF-7 Cell Line Assessed Using Comet Assay

V. A. Tronov^{a, *}, N. A. Tkachev^a, E. I. Nekrasova^b, and A. F. Vanin^a

^aSemenov Federal Research Centre of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia ^bEmanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia *e-mail: vtronov@vandex.ru

Cytotoxic effect of dinitrosyl iron complex with mercaptosuccinate (DNIC-MS) in human tumor cells MCF-7 was 2-fold higher compared to cytotoxicity of mixture of precursors ($MS + Fe^{2+}$) for the complex synthesis *in vitro*. Using alkaline comet assay we show that the mixture induced DNA single-strand breaks (SSBs) in MCF-7 cells. SSBs were repaired completely by 24h. Although the complex induced less number of SSBs compared with the mixture, they remained in 19% of the cells by 24 h after the treatment. We found by neutral comet assay that these DNA lesions are double-strand breaks (DSBs). The qualitative correlation between genotoxicity by yield of unrepaired DNA SSBs and MTT-cytotoxicity indicates that cytotoxicity of dinitrisyl iron complex may be, in part, associated with DSBs induced in DNA. Potentially lethal DSBs could be formed as a result of cellular endonucleases attack on single strand sites and AP-sites in DNA that produced as intermediates by the nucleotide excision repair (NER) of base adducts initiated by the DNIC-MS complex.

Keywords: human cells MCF-7, dinitrisyl iron comlex, DNA damage, DNA repair, cytotoxicity, comet assay

УДК 576.5

КЛЕТОЧНАЯ ПОДВИЖНОСТЬ И СТРУКТУРА ЦИТОСКЕЛЕТА ПОД ВЛИЯНИЕМ АКТИВАТОРА И ИНГИБИТОРА МАЛОЙ ГТФазы RhoA В ПРОЦЕССЕ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ ЛИНИИ МСК, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ КОЖИ ВЕК ВЗРОСЛОГО ДОНОРА

© 2022 г. Д. Е. Бобков^{1,} *, А. В. Полянская¹, А. С. Мусорина¹, Е. В. Ломерт¹, Г. Г. Полянская¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

**E-mail: bobkov@incras.ru* Поступила в редакцию 03.06.2022 г. После доработки 22.06.2022 г. Принята к публикации 03.07.2022 г.

Широкое применение MCK человека в биомедицинских технологиях и важная роль клеточной миграции в биомедицинских процессах приводят к необходимости углубления фундаментальных исследований подвижности этих клеток в процессе репликативного старения (PC). В настоящей работе выполнен сравнительный анализ строения актинового цитоскелета и характеристик подвижности клеток линии DF-2 в присутствии активатора (LPA) или ингибитора (Y-27632) малой ГТФазы RhoA на разных стадиях PC. Получены следующие результаты: 1) показано наличие PC в процессе длительного культивирования (8– 28 пассажи) контрольных клеток; 2) на поздней стадии PC присутствие 10 нг/мл LPA в течение 24 ч не вызывало изменений в структуре актинового цитоскелета, тогда как ингибитор активности малой ГТФзы RhoA способствовал значительному снижению количества стресс-фибрилл; 3) изменения скорости и извилистости клеточных движений в присутствии LPA или Y-27632 зависят от стадии PC: в частности, LPA снижает, а Y-27632 увеличивает среднюю скорость движения клеток на пассажах 21 и 28 по сравнению с контролем, а на пассаже 8 эти вещества не влияют на скорость клеток. Полученные данные свидетельствуют, по-видимому, об увеличении активности RhoA-ассоциированных сигнальных путей в процессе PC.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, репликативное старение, клеточная подвижность, актиновый цитоскелет, RhoA, LPA, Y-27632 **DOI:** 10.31857/S0041377122050017

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) человека являются перспективным объектом как для фундаментальных биологических исследований, так и для использования их в биомедицинских технологиях. В настоящее время значительно расширяется использование МСК человека разного происхождения в биомедицинских исследованиях, связанных с широким спектром заболеваний (Albu et al., 2021; Mannino et al., 2021; Moghadasi et al., 2021; Raposo et al., 2021; Xiao et al., 2021; Saleh et al., 2021; Smojver et al., 2022; Su et al., 2022; Sun et al., 2022; Zhang et al., 2022). Широкое использование МСК человека в биомедицинских технологиях приводит к необходимости расширения и углубления фундаментальных исследований различных свойств, характерных для этих клеток, в разные периоды их жизнедеятельности, включая стадию активного репликативного старения (РС).

РС, происходящее в процессе длительного культивирования клеточных популяций, представляет собой комплексный динамический процесс, индуцированный генетическими и эпигенетическими изменениями, который начинается на ранних пассажах и постепенно усиливается в процессе культивирования. РС характеризуется существенными изменениями многих клеточных свойств (Бобков, Полянская, 2020). Несмотря на то, что МСК человека имеют определенный статус, определяемый рядом характеристик (Dominici et al., 2006; Sensebé et al., 2010), линии МСК различаются по характеристикам, ответственным за важнейшие клеточные процессы, включая клеточную подвижность (миграцию) и РС. Причинами наблюдаемых различий могут быть как эпигенетические факторы, связанные с условиями культивирования или с микроокружением, в котором существовали эти клетки до помещения их в условия in vitro, так и генетические (Stanko et al., 2014; Krylova et al., 2015; Voronkina et al., 2017, 2020; Полянская, 2018; Alessio et al., 2018; Facchin et al., 2018; Li et al., 2018; Полянская и др., 2019; Guan et al., 2019; Jin et al.,

Принятые сокращения: МСК – мезенхимные стволовые клетки; РС – репликативное старение; LPA – лизофосфатидная кислота.

2019; Khasawneh et al., 2019; Terunuma et al., 2019; Yang et al., 2019; Koltsova et al., 2021; Semenova et al., 2021; Shin et al., 2021; Tai et al., 2021; Yigitbilek et al., 2021).

Изменение характера клеточной подвижности является одним из признаков РС. Клеточная подвижность связана с внеклеточным матриксом, на котором распластаны клетки, и зависит от организации актинового цитоскелета. Внеклеточный матрикс, состоящий из разных белков, синтезируемых самими клетками, является одним из важнейших регуляторов клеточных процессов, представляя собой микроокружение, в котором живут клетки. Клеточная миграция лежит в основе тканевой репарации, способствующей широкому использованию МСК в биомедицинских технологиях. В связи с этим представляется существенным изучение связи РС с организацией цитоскелета. В настоящее время исследования молекулярных механизмов реорганизации цитоскелета в процессе длительного культивирования, включая активную стадию РС, проводятся в разных клетках человека и животных и находятся на этапе накопления экспериментальных результатов (Larsen et al., 2003; le Clainche, Carlier, 2008; Wang, Jang, 2009; Geissler et al., 2012; Özcan et al., 2016; Turinetto et al., 2016; Moujaber et al., 2019).

В связи с этим нами начаты систематические исследования по реорганизации актинового цитоскелета в процессе РС в клетках линий МСК человека, выделенных из разных источников. Ранее была исследована роль малой ГТФазы RhoA, как одного из ключевых факторов, участвующих в реорганизации актинового цитоскелета, в 3-х линиях МСК человека разного происхождения: MSCWJ-1 (из Вартонова студня пупочного канатика человека); DF-2 (из кожи век взрослого донора) и ADH-MSC (из эпикардиальной жировой ткани взрослого донора). Было показано, что в процессе РС снижается ядерная локализация малой ГТФазы RhoA в клеточных линиях MSCWJ-1 и DF-2, выделенных из здоровых доноров (Bobkov et al., 2020, 2022), тогда как в клеточной линии ADH-MSC, выделенной из нездорового донора и из нездорового органа (ткань сердца, полученная при проведении аортокоронарного шунтирования) наблюдается обратная картина: увеличение ядерной локализации ГТФазы RhoA в процессе PC (Goncharova et al., 2021). В клетках MSCWJ-1 показаны колебания средней скорости и направленности клеточного движения; наименьшую скорость и прямолинейность движения наблюдали в активной стадии PC (Bobkov et al., 2020). Надо подчеркнуть, что все перечисленные выше исследования относились исключительно к анализу роли ГТФазы RhoA в реорганизации актинового скелета на ряде клеточных линий, культивирующихся постоянно в нормальных (стандартных) условиях с 10% эмбриональной бычьей сыворотки.

В настоящей работе мы расширили наши исследования, проводимые на линии DF-2, по функциональному анализу RhoA в реорганизации актинового цитоскелета и клеточной подвижности, и изучили влияние активатора (LPA) и ингибитора (Y-27632) малой ГТФазы RhoA на эти процессы. Есть данные о существенном влиянии Y-27632 на изучаемые параметры, но получены эти данные при анализе эндотелиальных клеток (Li et al., 2013; Pipparelli et al., 2013; Diao, Hong, 2015). Ранее на МСК легкого человека было показано влияние LPA на процессы клеточной миграции, однако авторы не учитывали фактор PC (Badri, Lama, 2012).

В настоящей работе клетки линии DF-2 были кратковременно (24 ч) помещены в ростовую среду с концентрацией сыворотки 1% без добавления факторов, стимулирующих жизнеспособность и пролиферацию клеточной культуры. Это было сделано, чтобы избежать нежелательного влияния сыворотки в связи с возможными колебаниями ее свойств. Известно, что сыворотка, с одной стороны, является необходимым компонентом для нормальной жизнедеятельности клеточных популяций in vitro в отсутствие интегральных систем организма, а с другой стороны, являясь нестандартным компонентом ростовой среды, может способствовать изменению клеточных характеристик. Одним из важных ингредиентов сыворотки являются ростовые факторы, способствующие активной пролиферации клеток. Их количество может зависеть от источника получения сыворотки, от концентрации сыворотки в ростовой среде, от условий содержания животных и метода получения конкретной серии сыворотки (Полянская и др., 2019).

Учитывая возможное существенное влияние процентного содержания одной серии сыворотки на исследуемые клеточные характеристики, мы провели предварительное сравнительное исследование характера клеточной подвижности (средней скорости и извилистости клеточных движений) при кратковременном культивировании клеток в ростовой среде, содержащей 10, 5 и 1% сыворотки.

Таким образом, задачи настоящей работы на клетках линии DF-2 были следующими. 1) Проведение количественного анализа активности β -галактозидазы в процессе длительного культивирования; 2) сравнительный анализ клеточной подвижности при 24-часовом культивировании клеток в условиях разного содержания сыворотки (10, 5 и 1%); 3) сравнительный анализ клеточной подвижности и структуры актинового цитоскелета на разных стадиях PC клеток в контроле и при действии активатора или ингибитора малой ГТФзы RhoA.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки и агенты, действующие на Rho-сигналинг. В работе использовали линию мезенхимных стволо-

вых клеток человека, полученных из кожи век 45летнего здорового донора (DF-2). Клеточная линия получена и охарактеризована в ЦКП "Коллекция культур клеток позвоночных" ИНЦ РАН (Санкт-Петербург). Клетки исследуемой линий культивировали в ростовой среде, содержащей 90% среды DMEM/F12 (Биолот, Россия) и 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Hyclone, США). Клеточную линию культивировали в условиях 5% CO₂ при 37°C и влажности 90%. Микробиологический анализ подтвердил отсутствие бактериальной, грибковой и микоплазменной контаминации в полученной линии.

В эксперименте по влиянию сыворотки на подвижность на 8-ом пассаже ростовую среду заменяли на такую же, содержащую 1, 5 или 10% FBS. В случаях с низким содержанием сыворотки (1 или 5%) не использовали никакие добавки, влияющие на клетки. В остальных экспериментах по влиянию ингибитора и активатора Rho-сигналинга на клеточные процессы в контрольной группе никакие дополнительные вещества в среду не вводили, а в экспериментальных группах в среду, содержащую 1% сыворотки, вводили модуляторы Rho-сигналинга: LPA (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 нг/мл для активации LPA-рецепторов или Y-27632 (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 10 мкМ для ингибирования ROCK1. Для иммунофлуоресцентного анализа клетки культивировали с веществами-модуляторами в течение 1 ч, после чего фиксировали и окрашивали. Для анализа клеточной подвижности клетки культивировали с веществами-молуляторами и красителем Hoechst 33342 (для прижизненной визуализации ядер) в течение 1 ч, а затем производили съемку в течение 24 ч. Таким образом, суммарное время культивирования с веществами-модуляторами в процессе анализа клеточной подвижности составляло 25 ч.

Морфологический анализ. Для анализа клеток исследуемой линии использовали изображения, полученные с помощью платформы для конфокальной микроскопии, цитометрии и высокоинформативного скрининга CQ1, оснащенной объективами с увеличением 20× и 40× (Yokogawa, Япония).

Репликативное старение клеток. Оценивали активность фермента β -галактозидазы. Клетки выращивали в чашках Петри диаметром 3.5 см (Nunc, Дания) до образования субконфлюента. Затем среду удаляли и окрашивали клетки с помощью набора реактивов Senescence β -galactosidase staining kit (Cell Signaling, США) согласно инструкции. У клеток, вступающих в фазу активного РС, цитоплазма окрашивается в ярко синий цвет. Анализ проводили с помощью инвертированного микроскопа (Nicon, Япония) на 8-, 12-, 13-, 17-, 20- и 28-ом пассажах. Долю окрашенных клеток определяли в % при подсчете не менее 700 клеток в разных полях зрения на одну временную точку.

Конфокальная микроскопия для визуализации структуры актинового цитоскелета. Клетки DF-2, выращенные на покровных стеклах, фиксировали 10 мин 3%-ным раствором параформальдегида на PBS при комнатной температуре. Для пермеабилизации клетки обрабатывали 10 мин раствором 0.1%-ного Triton-X100 в PBS. Для окрашивания актинового цитоскелета клетки инкубировали 20 мин в PBS, содержащем 50 мкг/мл родамин-фаллоидина (Thermo Fisher Scientific, США). Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst 33342 в концентрации 1.5 мкг/мл (Thermo Fisher Scientific, США). После каждого этапа окрашивания клетки трижды промывали PBS. Полученный препарат монтировали на предметное стекло с помощью заключающей среды ProLong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, CIIIA). Изображения окрашенных клеток получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TSC SP8 (Leica, Германия), используя объектив 63× с масляной иммерсией (числовая апертура 1.4). Для возбуждения флуоресценции родамин-фаллоидина использовали НеNe-ый лазер (543 нм), а для возбуждения флуоресценции Hoechst 33342 — диодный лазер (405 нм). Флуоресценцию детектировали с помощью фотоумножителей в диапазонах: 552-792 нм для родамин-фаллоидина и 410-500 нм для Hoechst 33342. Диаметр конфокальной точечной диафрагмы (пинхол) составлял 100 мкм. Производили раздельное сканирование в двух каналах (родамин-фаллоидин, Hoechst 33342). Изображения, полученные в красном канале (родамин-фаллоидин), использовали для оценки локальной связной фрактальной размерности актинового цитоскелета.

Оценка локальной связной фрактальной размерности актинового цитоскелета. Чтобы охарактеризовать структуру актинового цитоскелета, оценивали коэффициент локальной связной фрактальной размерности (local connected fractal dimension – LCFD) клеток, окрашенных на F-актин и распластанных на стеклах, по изображениям (на оптических срезах), полученных с помощью конфокальной микроскопии. В отличие от глобальной фрактальной размерности, которую рассчитывают для всего изображения, набор значений локальной фрактальной размерности рассчитывается для каждого принадлежащего анализируемому объекту пикселя (Waliszewski, 2016). Измерение коэффициента LCFD является косвенной мерой для количественной оценки сложных геометрических объектов, каковым является актиновый цитоскелет распластанной клетки при монослойном культивировании (Qian et al., 2012; Alhussein et al., 2016; Bobkov et al., 2020). Этот коэффициент изменяется в диапазоне от 0 до 2 в зависимости от степени сложности структуры (от количества деталей в структуре): для точки он равен нулю, для линии – единице, а для поверхности – двум. LCFD актинового цитоскелета вычисляли с помощью плагина FracLac в программе ImageJ (Karperien, 2013). Использовали конфокальные изображения с разреше-

468

Таблица 1. Доля клеток DF-2 (%) с выраженной активно-
стью β-галактозидазы (β-гал) в процессе культивирования

Пассаж	Число проанализированных клеток	Доля клеток, окрашенных на β-гал, %
8	803	3.70 ± 0.67
12	1066	7.20 ± 0.80
13	748	12.70 ± 1.22
17	1132	23.90 ± 0.26
20	1557	26.50 ± 1.25
28	1324	43.10 ± 1.36

Показаны доли клеток (%) и их ошибки при подсчете не менее 700 клеток.

нием 1024 × 1024 пикселя, полученные при регистрации сигнала от родамин-фаллоидина, на которых вручную выделяли области интереса с помощью функции ROI (n = 20 для каждой группы наблюдений), содержащие распластанные клетки. В этих же ROI производили измерение площади.

Измерение клеточной подвижности. Исследовали живые подвижные клетки. Сравнительный анализ характеристик движения клеток в процессе РС проводили с использованием покадровой визуализации. Для регистрации движения отдельных клеток использовали платформу для конфокальной микроскопии и автоматической цитометрии CQ1 (Yokogawa, Япония) с технологией вращающегося диска. Изображения в проходящем свете (светлое поле) и флуоресценцию Hoechst 33342 регистрировали в течение 24 ч каждые 15 мин с использованием лазера с длиной волны 405 нм и сухого объектива 40× (числовая апертура 0.95). Все изображения имели размер 2528 × 2136 пикселей с физическим размером пикселя 0.6667 мкм по осям x и y. В программе ImageJ (Rueden et al., 2017) наборы координат x-v получали из изображений с помощью плагина Manual Tracking. Каждую клетку вручную помечали в середине ядра в каждый момент времени (N = 100 для каждой группы измерений). Анализировали только клетки, удовлетворяющие следующим условиям: клетка находится в поле зрения на всех кадрах одного поля зрения: клетка на протяжении всего периода наблюдений не подвергается делению и не входит в апоптоз. Траектории клеточных движений (треки) объединяли в наборы данных, сохраняли в виде файлов (*.csv) и затем передавали для анализа траекторий в свободную программную среду R. Траектории анализировали с использованием функций пакета trajr (McLean, Skowron Volponi, 2018), который был разработан для численного описания и анализа траекторий движущихся животных, но также подходит и для анализа движущихся клеток (Bobkov et al., 2020). Для описания характера движения клетки вычисляли параметры: средняя скорость, извилистость трека.

Методы статистического анализа. Сбор данных для статистической обработки производили с помощью электронных таблиц Office Excel 2016 (Місгоsoft, США). Статистическую обработку результатов осуществляли в свободной программной среде R версии 4.2.0 (R Core Team, 2022). Полученные в результате измерения активности В-галактозидазы данные обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента для альтернативной изменчивости. Для графического отображения данных, полученных при измерении площадей клеток, рассчитывали средние значения и стандартные ошибки среднего, специальных тестов для выявления отличий не проводили. Данные, полученные при анализе LCFD, прошли тест Шапиро-Уилка (Shapiro, Francia, 1972) на нормальность распределения, поэтому для выявления достоверных отличий между группами измерений использовали параметрический односторонний *t*-критерий Стьюдента (Sandon, 1943). Данные, полученные при анализе клеточной подвижности, не прошли тест Шапиро-Уилка на нормальность распределения, поэтому для выявления достоверных отличий между группами измерений использовали непараметрический критерий Вилкоксона (Wilcoxon, 1945). Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы P < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология клеток. Морфологический анализ показал однородность клеточных популяций DF-2, представленных средними по размеру вытянутыми фибробластоподобными клетками (рис. 1). Культивирование с 8-го по 28-ой пассаж сопровождалось почти двукратным увеличением средней площади распластанных клеток (рис. 2). Тенденция МСК к увеличению размеров и распластанности в процессе РС была наглядно продемонстрирована в работах, рассмотренных нами в обзорной статье (Бобков, Полянская, 2020).

Репликативное старение. Процесс РС клеток линии DF-2 оценивали по активности β -галактозидазы в клеточных популяциях (табл. 1). Уже на 8-ом пассаже обнаружена небольшая доля стареющих клеток, которая существенно увеличивается к 28-му пассажу. Процесс РС в клетках DF-2 протекает быстро, и к 17-му пассажу доля стареющих клеток увеличивается более чем в 5 раз по сравнению с пассажем 8, что свидетельствует о наступлении стадии активного PC.

Клеточная подвижность. Увеличение концентрации сыворотки в среде культивирования от 1 до 10% приводило к увеличению средней скорости движе-



Рис. 1. Однородность клеточных популяций в процессе репликативного старения. Прижизненные конфокальные изображения клеток линии DF-2, выращенных в лунках планшета и культивируемых в течение 24 ч в присутствии 1% сыворотки. Показаны клетки, помещенные в автоматический конфокальный цитометр на пассажах 8, 21 и 28 в начале эксперимента (0 мин) и в его конце (1440 мин). Ядра клеток окрашены красителем Hoechst 33342. Треки отслеживали по движению центра ядра. Стрелки указывают на двигающиеся клетки, треки движений которых обозначены цветными линиями. Масштабный отрезок: 200 мкм.

ния клеток DF-2, но при этом не влияло на извилистость треков (рис. 3). Однако даже при минимальной концентрации сыворотки (1%) как молодые клетки (на пассаже 8), так и клетки в стадии активного PC (на пассажах 21, 28) сохраняли фибробластоподобную форму и оставались подвижными на протяжении 24 ч (рис. 1).

Ряд исследований свидетельствует о влиянии качественного и количественного состава сыворотки на свойства разных клеточных линий при культивировании от нескольких суток до нескольких месяцев (Полянская, 1993; Bieback et al., 2009; Liu et al., 2015; Khasawneh et al., 2019; Toranova et al., 2021). В одной из работ было показано, что снижение содержания сыворотки до 4% при культивировании в течение нескольких суток выборочно влияет на клеточные свойства: не приводит к изменениям клеточной адгезии и скорости заживления раны при воздействии ингибитором Y-27632, но изменяет пролиферативную активность и ряд других параметров (Pipparelli et al., 2013). Таким образом, полученные нами результаты по клеточной подвижности при кратковременном культивировании клеточной культуры (24 ч) в присутствии разных концентраций сыворотки не противоречат ранее полученным данным. Эти результаты свидетельствуют о том, что при всех концентрациях сыворотки, включая 1%, клеточная подвижность присутствует, что является подходящим условием для эксперимента по влиянию модуляторов Rhoсигналинга на клеточную подвижность, результаты которого представлены на рис. 4.

Результаты эксперимента показали, что модуляторы Rho-сигналинга не вызывают значимых изменений скорости клеток DF-2 на 8-ом пассаже, но оказывают влияние на поздних пассажах. Воздействие LPA вызывало снижение средней скорости движения клеток на пассажах 21 и 28 по сравнению с контролем (рис. 4*a*), воздействие ингибитора Rhoкиназы Y-27632 вызывало достоверное увеличение средней скорости движения клеток на пассажах 21 и 28 по сравнению с контролем (рис. 4*a*). Такие результаты можно объяснить тем, что модификация



Рис. 2. Увеличение площади клеток линии DF-2 вследствие PC. Показаны средние значения и их стандартные ошибки.

активности сигнальных путей, ассоциированных с ГТФазой RhoA, приводят к изменениям как количества стресс-фибрилл и клеточных ламелл, так и способности клеток к адгезии.

В то же время были выявлены различия в извилистости клеточных треков между пассажами: на 8-ом пассаже LPA вызывала снижение этого параметра по сравнению с контролем, а на пассажах 21 и 28, наоборот, — увеличение; на 8-ом пассаже Y-27632 увеличивал извилистость относительно контроля, а на пассажах 21 и 28 уже не влиял. При этом следует отметить, что значимых отличий по средней скорости движения между контрольными клетками на пассажах 8, 21 и 28 не было выявлено (рис. 4a), т.е. PC клеток DF-2 не снижает клеточную подвижность. Однако были выявлены отличия по извилистости треков контрольных клеток: на пассажах 21 и 28 этот параметр был достоверно меньше, чем на пассаже 8 (рис. 4δ). По-видимому, снижение скорости движения MCK в процессе PC не является обязательной характеристикой PC, тогда как обязательным признаком PC являются изменения характера клеточной подвижности.

Эти результаты согласуются с полученными нами ранее на клеточной линии MSCWJ-1, на которой показано отсутствие различий средней скорости движения клеток между пассажами 9 и 28 (Bobkov et al., 2020). При этом характер изменений внутриклеточной локализации RhoA в процессе PC совпадает в клетках линий MSCWJ-1 и DF-2 при культивировании в среде с 10% сыворотки (Bobkov et al., 2022). По результатам влияния модулирующих Rho-сигналинг агентов на подвижность клеток DF-2 в процессе PC можно заключить, что чувствительность актинового цитоскелета MCK к действию этих агентов зависит от пассажа — более чувствительными оказываются старые клетки.



Рис. 3. Увеличение концентрации сыворотки приводит к ускорению движения клеток DF-2 (*a*), но при этом не влияет на извилистость треков (δ). Клетки выращивали в лунках планшета и культивировали в течение 24 ч в присутствии 1, 5 и 10% сыворотки. В каждой группе измерений анализировали 150 клеток. Показаны средние значения и стандартные отклонения (вертикальные отрезки) значений средней скорости и извилистости. Звездочки показывают достоверность отличий (односторонний тест Уилкоксона): **P* < 0.05; *****P* < 0.0001; ns – достоверных отличий нет.





Рис. 4. Модуляторы Rho-сигналинга не вызывают изменений скорости клеток DF-2 на 8-ом пассаже, но оказывают влияние на поздних пассажах. Представлены результаты измерения средней скорости (*a*) и извилистости треков (*б*) клеток, выращенных в лунках планшета и культивируемых в течение 24 ч в присутствии 1% сыворотки (контроль, белые столбцы), а также при добавлении в среду 1 нг/мл LPA (заштрихованные столбцы) или 10 мкМ Y-27632 (темные столбцы). В каждой группе измерений анализировали 150 клеток. Даны средние значения и стандартные отклонения (вертикальные отрезки). Звездочки показывают достоверность отличий (односторонний тест Уилкоксона): *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001; ns – достоверных отличий нет.



Рис. 5. Изменение организации актинового цитоскелета в клетках DF-2 при действии активатора (10 нг/мл LPA) или ингибитора (10 мкМ Y-27632) RhoA-ассоциированного сигнального пути зависит от пассажа культивирования клеток (стадии репликативного старения). Конфокальные изображения клеток, выращенных на стеклах и зафиксированных на 8-ом, 14-ом и 28-ом пассажах. Клетки окрашены красителем Hoechst 33342 для визуализации ядер и родамин-фаллоидином для окраски F-актина. Стрелка (пассаж 28) указывает на клетку, в которой снижено количество стресс-фибрилл и увеличено количество ламелл. Масштабный отрезок: 25 мкм.

Локальная связная фрактальная размерность (LCFD) актинового цитоскелета. Для того чтобы проверить предположение об изменениях структуры актинового цитоскелета, сопутствующих изменениям характера клеточной подвижности, мы проанализировали коэффициент LCFD актинового цитоскелета при культивировании клеток линии DF-2 на пассажах 8 и 28 (рис. 5, 6). Приведенные на рис. 5 конфокальные изображения клеток демонстрируют, что на 28-ом пассаже под действием Y-27632 в клетках снижается количество стресс-фибрилл и увеличивается количество ламелл. И действительно, измерения коэффициента LCFD для пассажей 8 и 28 свидетельствуют о его достоверном снижении по сравнению с контролем только на пассаже 28. LPA на 28-ом пассаже вызывала увеличение LCFD F-актина на уровне статистической тенденции. На 8-ом пассаже оба вещества не оказали влияния на LCFD F-актина (рис. 6).

В дальнейшем необходимы дополнительные исследования для прояснения механизма взаимодействия внутриклеточных сигнальных путей, опосредуемых малыми ГТФазами Rho-семейства, такими



Рис. 6. Изменение коэффициента локальной связной фрактальной размерности (LCFD) актинового цитоскелета при действии активатора (LPA) и ингибитора (Y-27632) Rho-киназы на различных пассажах в процессе репликативного старения клеток линии DF-2. Показаны средние значения и стандартные отклонения (вертикальные отрезки) из 20 независимых измерений. Звездочка показывает достоверность отличий (односторонний *t*-тест Стьюдента) при P < 0.05; ns – достоверных отличий нет.

как RhoA, Rac1 и Cdc42, для регуляции подвижности MCK в процессе PC.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе было использовано оборудование ЦКП Института цитологии РАН "Коллекция культур клеток позвоночных", поддержанного грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-683).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания (№ АААА-А19-119020-190093-9) Института цитологии РАН и поддержана Министерством науки и высшего образования РФ по проекту 15.БРК.21.0011 (Соглашение № 075-15-2021-1063).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах животные и люди не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бобков Д.Е., Полянская Г.Г. 2020. Клеточные и молекулярные характеристики репликативного старения мезенхимных стволовых клеток человека. Цитология. Т. 62. № 11. С. 782.

https://doi.org/10.31857/S0041377120110036 (*Bobkov D.E., Poljanskaya G.G.* 2020. Cellular and molecular characteristics of replicative aging of human mesenchymal stem cells. (Review). *Tsitologiya*. V. 62. P. 782. https://doi.) https://doi.org/10.31857/S0041377120110036

- Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н., Кольцова А.М., Мусорина А.С., Шарлаимова Н.С., Яковлева Т.К. 2019. В кн.: Методическое пособие по работе с клеточными культурами человека и животных. С.-Петербург, ПОЛИТЕХ-ПРЕСС. ISBN 978-5-7422-6602-0. С. 114. (Poljanskaya G.G., Efremova T.N., Koltsova A.M., Musorina A.S., Sharlaimova N.S., Yakovleva T.K. 2019. In: Methodological guide for working with human and animal cell cultures. St. Petersburg, POLYTECH PRESS. ISBN 978-5-7422-6602-0. P. 114.)
- Полянская Г.Г. 2018. Сравнительный анализ характеристик линий мезенхимных стволовых клеток человека, полученных в коллекции культур клеток позвоночных (обзор). Клеточные культуры, № 34. С. 3. (*Poljanskaya G.G.* 2018. Comparative analysis of the lines of human mesenchymal stem cells derived in the collection of cell cultures of vertebrates (review). Collection "Cell cultures", No. 34. P. 3)
- Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н., Кольцова А.М., Мусорина А.С., Шарлаимова Н.С., Яковлева Т.К. 2019. Методическое пособие по работе с клеточными культурами человека и животных. Спб.: Изд-во Политехнического ун-та, 114 с. (Poljanskaya G.G., Efremova T.N., Koltsova A.M. Musorina A.S., Sharlaimova N.S., Yakovleva T.K. 2019. Methodical handbook for working with cell cultures of humans and animals. SPb.: Polytechnic Univ. Publishing House. 114 pp.)
- Полянская Г.Г., Сизова Л.С., Николаенко Н.С. 1993. Кариотипическая характеристика линии фибробластов кожи индийского мунтжака при культивировании с разными сыворотками. Цитология. Т. 35. Р. 86. (Poljanskaya G.G., Sizova L.S., Nikolaenko N.S. 1993. Karyotypic characteristics of the Indian muntjak skin fibroblast line when cultured with different serums. Tsitologiya. V.35. P. 86.)
- Albu S., Kumru H., Coll R., Vives J., Vallés M., Denito- Penalva J., Rodriguez L., Codinach M., Hernández J., Navarro X., Vidal J. 2021. Clinical effects of intrathecal administration of expanded Wharton jelly mesenchymal stromal cells in patients with chronic complete spinal cord injury: a randomized controlled study. Cytotherapy. V. 23. P. 146. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.08.008
- Alessio N., Pipino C., Mandatori D., Di Tomo P., Ferone A., Marchiso M., Melone M.A.B., Peluso G., Pandolfi A., Galderisi U. 2018. Mesenchymal stromal cells from amniotic fluid are less prone to senescence compared to those obtained from bone marrow: an in vitro study. J. Cell Physiol. https://doi.org/10.1002/jcp.26845
- Alhussein G., Shanti A., Farhat I.A.H., Timraz S.B.H., Alwahab N.S.A., Pearson Y.E., Martin M.N., Christoforou N., Teo J.C.M. 2016. A spatiotemporal characterization method for the dynamic cytoskeleton. Cytoskeleton. V. 73.

P. 221.

https://doi.org/10.1002/cm.21297

- *Badri L., Lama V.N.* 2012. Lysophosphatidic acid induces migration of human lung-resident mesenchymal stem cells through the β -catenin pathwayio Stem cells. V. 30. P. 2010. https://doi.org/10.1002/stem.1171
- Bieback K., Hecker A., Kocaömer A., Lannert H., Schallmoser K., Strunk D., Klüter H. 2009. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. Stem Cells. V.27. P.2331. https://doi.org/10.1002/stem.139
- Bobkov D., Polyanskaya A., Musorina A., Lomert E., Shabelnikov S., Poljanskaya G. 2020. Replicative senescence in MSCWJ-1 human umbilical cord mesenchymal stem cells is marked by characteristic changes in motility, cytoskeletal organization, and RhoA localization. Mol. Biol. Rep. V. 47. P. 3867.

https://doi.org/10.1007/s11033-020-05476-6

- Bobkov D., Polyanskaya A., Musorina A., Poljanskaya G. 2022. The RhoA nuclear localization changes in replicative senescence: new evidence from in vitro human mesenchymal stem cells studies. BIOCELL. V. 46. P. 2053. https://doi.org/10.32604/biocell.2022.019469
- Diao Y.-M., Hong J. 2015. Rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, significantly enhances cell adhesion and induces a delay in G1 to S phase transition in rabbit corneal endothelial cells. Mol. Med. Rep. V.12. P. 1951. https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3628
- 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. Int. Soc. Cell. Ther. Pposition statement. Cytother. V. 8. P. 315.
- Facchin F., Bianconi E., Romano M., Impellizzeri A., Alviano F., Maioli M., Canaider S., Ventura C. 2018. Comparison of oxidative stress effects on senescence patterning of human adult and perinatal tissue-derived stem cells in short and long-term cultures. Int. J. Med Sci. V. 15. P. 1486.
- Geissler S., Textor M., Kühnisch J., Könnig D., Klein O., Ode A., Pfitzner T., Adjaye J., Kasper G., Duda G.N. 2012. Functional comparison of chronological and in vitro aging: differential role of the cytoskeleton and mitochondria in mesenchymal stromal cells. PLoS One. V. 7. P. e52700. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052700
- Goncharova D.F., Polyanskaya A.V., Musorina A.S., Poljanskaya G.G., Bobkov D.E. 2021. Analysis of nuclear-cytoplasmic redistribution of actin-binding protein apha-actinin-4 and signaling protein RhoA in the process of replicative senescence of human epicardial adipose tissue-derived ADH-MSC cell line. Cell Tiss. Biol. V. 15. P. 465. https://doi.org/10.1134/S1990519X21050035
- Guan Y.T., Xie Y., Li D.S., Zhu Y.Y., Zhang X.L., Feng Y.L., Chen Y.P., Xu L.J., Liao P.F., Wang G. 2019. Comparison of biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from the human umbilical cord and decidua parietalis. V. 20. P. 633.

https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10286

Jin Q., Yuan K., Lin W., Niu C., Ma R., Huang Z. 2019. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and adipose tissue for bone regeneration potential. Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. V. 47. P. 1577.

https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1594861

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

Karperien A. 2013. FracLac for ImageJ. Charles Sturt University. Colombo.

https://doi.org/10.13140/2.1.4775.8402

- Khasawneh R.B., Al Sharie A.H., Abu-El-Rub E., Serhan A.O., Obeidat H.N. 2019. Addressing the impact of different fetal bovine serum percentages on mesenchymal stem cells biological performance. Mol. Biol. Rep. V. 46 P. 4437. https://doi.org/10.1007/s11033-019-04898-1
- Koltsova A.M. Zenin V.V., Petrosyan M.A., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2021. Isolation and characterization of Mesenchymal Stem Cell Line Derived from different regions of the placenta of the same donor. Cell Tiss. Biol. V. 15. P. 356.
- *Krylova T.A., Musorina A.S., Zenin V.V., Poljanskaya G.G.* 2015. Cellular spheroids obtained from mesenchymal stem cells derived from bone marrow and limb muscle of early human Embryo. Cell Tiss. Biol. V. 9. P. 431.
- *Larsen M., Tremblay M.L., Yamada K.M.* 2003. Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. V. 4. P 700.
- *Le Clainche C., Carlier M.F.* 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. Physiol Rev. V. 88. P. 489.
- Li J., Xu S.-Q., Zhao Y.-M., Yu S., Ge L.-H., Xu B.-H. 2018. Comparison of the biological characteristics of human mesenchymal stem cells derived from exfoliated deciduous teeth, bone marrow, gingival tissue, and umbilical cord. Mol. Med. Rep. V. 18. P. 4969. https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9501
- Li S., Wang C., Dai Y., Yang Y., Pan H., Zhong J., Chen J. 2013. The stimulatory effect of ROCK inhibitor on bovine corneal endothelial cells. Tissue Cell. V. 45. P. 387. https://doi.org/10.1016/j.tice.2013.06.006
- Liu Y., Li Y.Q., Wang H.Y., Li Y.J., Liu G.Y. Xu X., Wu X.B., Jing Y.G., Yao Y., Wu C. T., Jin J.D. 2015. Effect of serum choice on replicative senescence in mesenchymal stromal cells. Cytotherapy. V. 17. P. 874. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.02.012
- Mannino G., Russo C, Longo A., Anfuso C.G., Lupo G., Furno D.L., Giuffrida R., Giurdanella G. 2021. Potential therapeutic applications of mesenchymal stem cells for the treatment of eye diseases. World J. Stem Cells. V. 13. P. 632.

https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i6.632

- McLean D.J., Skowron Volponi M.A. 2018. trajr: An R package for characterisation of animal trajectories. Ethology. V. 124. P. 440. https://doi.org/10.1111/eth.12739
- Moghadasi S., Elveny M., Rahman H.S., Suksatan W., Jalil A. T., Abdelbasset W.K., Yumashev A.V., Shariatzadeh S., Motavalli R., Behzad F., Marofi F., Hassanzadeh A., Pathak Y., Jarahian M. 2021. A paradigm shift in cell-free approach: the emerging role of MSCs-derived exosomes in regenerative medicine. J. Transl. Med. V. 19. P. 302. https://doi.org/10.1186/s12967-021-02980-6
- Moujaber O., Fishbein F., Omran N., Liang Y., Colmegna I., Presley J.F, Stochaj U. 2019. Cellular senescence is associated with reorganization of the microtubule cytoskeleton. Cell Mol. Life Sci. V. 76. P. 1169.
- Özcan S., Alessio N., Acar M.B., Mert E., Omerli F., Peluso G., Galderisi U. 2016. Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. Aging (Albany NY). V. 8. P. 1316.

Pipparelli A., Arsenijevic Y., Thuret G., Gain P., Nicolas M., Majo F. 2013. ROCK inhibitor enhances adhesion and wound healing of human corneal endothelial cells. PLoS One. V. 8. P. e62095.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062095

Qian A.R., Li D., Han J., Gao X., Di S.M., Zhang W., Shang P. 2012. Fractal dimension as a measure of altered actin cytoskeleton in MC3T3-E1 cells under simulated microgravity using 3-D/2-D clinostats. IEEE Trans. Biomed. Eng. V. 59. P. 1374.

https://doi.org/10.1109/TBME.2012.2187785

- *R Core Team.* 2022. R: A language and environment for statistical computing. In: R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. https://www.R-project.org
- Raposo L., Lourenço A.P., Nascimento D.S., Rui Cerqueira R., Cardim N., Leite-Moreira A. 2021. Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells as adjuvant therapy for myocardial infarction: a review of current evidence focusing on pre-clinical large animal models and early human trials. Cytotherapy. V. 23. P. 974. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2021.05.002
- Rueden C.T., Schindelin J., Hiner M.C., DeZonia B.E., Walter A.E., Arena E.T., Eliceiri K.W. 2017. Image J2: ImageJ for the next gen- eration of scientific image data. BMC Bioinform. V. 18. P. 529.

https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z

Saleh M., Vaezi A.A., Aliannejad R., Sohrabpour A.A., Kiaei S.Z.F., Shadnoush M., Siavashi V., Aghaghazvini L., Khoundabi B., Abdoli S., Chahardouli B., Seyhoun I., Alijani N., Verdi J. 2021. Cell therapy in patients with COVID-19 using Wharton's jelly mesenchymal stem cells: a phase 1 clinical trial. Stem Cell Res. Ther. V. 12. P. 410. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02483-7

Sandon F. 1943. "Student's" Collected Papers. Edited by ES Pearson and John Wishart, with a foreword by Launce Mc-Mullen. Math. Gaz. V. 27. P. 225.

- Semenova E., Grudniak M.P., Machaj E.K., Bocian K., Chroscinska-Krawczyk M., Trochonowicz M, Stepaniec I.M., Murzyn M., Zagorska K.E., Boruczkowski D., Kolanowski T.J., Oldak T., Rozwadowska N. 2021. Mesenchymal stromal cells from different parts of umbilical cord: approach to comparison & characteristics. Stem Cell Rev. Rep. V. 17. P. 1780. https://doi.org/10.1007/s12015-021-10157-3
- Sensebé L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P., Giordano R. 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. Vox Sang. V. 98. P. 93. https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01227.x
- Shapiro S.S., Francia R.S. 1972. An approximate analysis of variance test for normality. J. Am. Stat. Assoc. V. 67. P. 215. https://doi.org/481232 https://doi.org/101020/01/21450/1072/10
- https://doi.org/10.1080/01621459.1972.10
- Shin S., Lee J., Kwon Y., Park K-S., Jeong J-H., Choi S-J., Bang S., Chang J., Lee C. 2021. Comparative proteomic analysis of the mesenchymal stem cells secretome from adipose, bone marrow, placenta and Wharton's Jelly. Int. J. Mol. Sci. V. 22. P. 845.

https://doi.org/10.3390/ijms22020845

- Smojver I., Katalinić I., Bjelica R., Dragana Gabrić D., Matišić V., Vilim Molnar V., Primorac D. 2022. Mesenchymal stem cells based treatment in dental medicine: a narrative review. Int. J. Mol. Sci. V. 23. P. 1662. https://doi.org/10.3390/ijms23031662
- Stanko P., Kaiserova K., Altanerova V., Altaner C. 2014. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from

dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. V. 158. P. 373. https://doi.org/10.5507/bp.2013.078

Su J., Ge X., Jiang N., Zhang Z., Wu X. 2022. Effecacy of mesenchymal stem cells from human exfoliated deciduous teeth and their derivatives in inflammatory diseases therapy. Curr. Stem Cell Res. Ther. Online ahead of print. https://doi.org/10.2174/1574888X17666220417153309

Sun H., Shi C., Ye Z., Yao B., Li C., Wang X., Qian Q. 2022. The role of mesenchymal stem cells in liver injury. (review). Cell Biol. Int. V. 46. P. 501. https://doi.org/10.1002/cbin.11725

Tai C., Wang L., Xie Y., Gao T., Huang F., Wang B. 2021. Analysis of key distinct biological characteristics of human placenta-derived mesenchymal stromal cells and individual heterogeneity attributing to donors. Cells Tiss. Organs. V. 210. P. 45.

https://doi.org/10.1159/000513038

- *Terunuma A., Ashiba K., Takane T., Sakaguchi Y., Terunuma H.* 2019. Comparative transcriptomic analysis of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp and adipose tissues. J. Stem Cells Regen. Med. V. 15. P. 8. https://doi.org/10.46582/jsrm.1501003
- *Toranova P., Lochovska K., Pytlik R., Kalbasova M.* 2021. The impact of various culture conditions on human mesenchymal stromal cells metabolism. Stem Cells Int. V. 2021. Article ID 6659244. https://doi.org/10.1155/2021/6659244
- *Turinetto V., Vitale E., Giachino C.* 2016. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy. Int. J. Mol. Sci. V. 17. P. 1164.

https://doi.org/10.3390/ijms17071164

- Voronkina I.V., Smagina L.V., Bildyug N.B., A. S. Musorina N.B., Poljanskaya G.G. 2020. Dynamics of matrix metalloproteinase activity and extracellular matrix proteins content in the process of replicative senescence of human mesenchymal stem cells. Cell Tiss. Biol. V. 14. P. 349.
- Voronkina I.V., Smagina L.V., Krylova T.A., Musorina A.S., Poljanskaya G.G. 2017. Analysis of matrix metalloproteinase activity during differentiation of mesenchymal stem cells isolated from different tissues of one donor. Cell Tiss. Biol. V. 11. P. 95.
- *Waliszewski P.* 2016. The quantitative criteria based on the fractal dimensions, entropy, and lacunarity for the spatial distribution of cancer cell nuclei enable identification of low or high aggressive prostate carcinomas. Front. Physiol. V. 7. P. 34.

https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00034

- Wang D., Jang D.J. 2009. Protein kinase CK2 regulates cytoskeletal reorganization during ionizing radiation-induced senescence of human mesenchymal stem cells. Cancer Res. V. 69. P. 8200.
- *Wilcoxon F.* 1945. Individual comparisons by ranking methods. Biometrics Bull. V. 1. P. 80. https://doi.org/10.2307/3001968
- Xiao Z., Lei T., Liu Y., Yang Y., Bi W., Du H. 2021. The potential therapy with dental tissue-derived mesenchymal stem cells in Parkinson's disease. Stem Cell Res. Ther. V. 12. P. 5. https://doi.org/10.1186/s13287-020-01957-4
- Yang C., Chen Y., Zhong L., You M., Ya Z., Luo M., Zhang B., Yang B., Chen Q. 2019. Homogeneity and heterogeneity of

biological characteristics in mesenchymal stem cells from human umbilical cords and exfoliated deciduous teeth. Biochemistry and Cell Biology. V. 98. P. 415. https://doi.org/10.1139/bcb-2019-0253

Yigitbilek F, Conley S.M., Tang H., Saadiq I.M., Jordan K.L., Lerman L.O., Taner T. 2021. Comparable in vitro function of human liver-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells: implications for cell-based therapy. Front. Cell Dev. Biol. V. 9. P. 641792. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.641792

Zhang X., Li N., Zhu Y., Wen W. 2022. The role of mesenchymal stem cells in the occurrence, development, and therapy of hepatocellular carcinoma. (Review). Cancer Med. V. 11. P. 931. https://doi.org/10.1002/cam4.4521

Cell Motility and Cytoskeleton Structure under the Influence of Activator and Inhibitor of Small GTPase RhoA in the Process of Replicative Senescence of the MSC Line Isolated from Skin of Eyelids of an Adult Donor

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

^aInstitute of Cytology, Russian Acsdemy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia *e-mail: bobkov@incras.ru

The widespread use of human MSCs in biomedical technologies and the important role of cell migration in biomedical processes lead to the need to deepen fundamental studies of the mobility of these cells during replicative senescence (RS). In this work, a comparative analysis of the structure of the actin cytoskeleton and characteristics of the motility of DF-2 cells in the presence of an activator (LPA) or an inhibitor (Y-27632) of small GTPase RhoA at different stages of RS was performed. The following results were obtained: 1. the presence of RS was shown during longterm cultivation (8–28 passages) of control cells; 2. at the late stage of RS, cultivation in the presence of 10 ng/ml of LPA for 24 h did not show changes in the structure of the actin cytoskeleton, while the inhibitor of the activity of small GTPase RhoA contributed to a significant decrease in the number of stress fibrils; 3. measurements of the mean speed and sinuosity of cell movement showed the dependence of the cell response to the effects of LPA and Y-27632 caused an increase in the average speed of cell movement at passages 21 and 28 compared with the control, at passage 8 these substances did not affect the cell speed. The data obtained seem to indicate an increase in the activity of RhoA-associated signaling pathways during RS.

Keywords: mesenchymal stem cells, replicative senescence, cell motility, actin cytoskeleton, RhoA, LPA, Y-27632

УДК 57.085.23;616-006.04

ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ШАПЕРОНОВ КАК ФАКТОР ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

© 2022 г. М. А. Микеладзе¹, Е. Р. Михайлова¹, Б. А. Маргулис¹, И. В. Гужова^{1, *}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия *E-mail: irina.guzhova@incras.ru Поступила в редакцию 27.05.2022 г.

После доработки 21.06.2022 г. Принята к публикации 22.06.2022 г.

Современные методы противоопухолевой химиотерапии не способны уничтожить 100% клеточной популяции. Применение современных методов химиотерапии сдерживается повышенной эффективностью систем клеточной защиты раковых клеток, в частности молекулярных шаперонов, экспрессия которых возрастает при применении противоопухолевых препаратов. Комбинационная терапия с ингибиторами отдельных шаперонов, в частности Hsp70, или фактора HSF1, регулирующего синтез белков теплового шока, может стать средством для повышения действенности противоопухолевых препаратов. В настоящем исследовании мы сравнили эффект повышения чувствительности клеток аденокарциномы легкого A549 при подавлении активности Hsp70 или HSF1 в опухолевых клетках. Получив, с помощью метода PHK-интерференции сублинии A549-shHsp70 и A549-shHSF1 мы сравнили их чувствительность к действию противоопухолевых препаратов — этопозиду и оксалиплатину. Подавление функции Hsp70 и снижение активности HSF1 увеличивали количество погибших клеток и повышали активность каспазы-3/7, причем эффект инактивации HSF1 значительно превосходил результаты ингибирования Hsp70. Мы можем сделать вывод, что ингибиторы HSF1 имеют терапевтическую перспективу, будучи в составе противоопухолевых композиций.

Ключевые слова: противопухолевая терапия, молекулярные шапероны, Hsp70, HSF1, этопозид, оксалиплатин

DOI: 10.31857/S0041377122050066

Клетки многих опухолей человека демонстрируют высокий уровень молекулярных шаперонов, или белков теплового шока, в частности Hsp70 (Сіосса, Calderwood, 2005), что ведет к тому, что эти клетки более активно пролиферируют, охотнее метастазируют и обладают повышенной устойчивостью к противоопухолевым препаратам (Carpenter, Gökmen-Polar, 2019). В норме молекулярные шапероны обеспечивают правильную конформацию и, соответственно, функцию клеточных белков, транспортировку вновь синтезированных белков к местам клеточной локализации, где им надлежит исполнять их функцию (Balchin et al., 2016).

Экспрессия всех белков теплового шока регулируется транскрипционным фактором HSF1 (heat shock factor-1), который активируется в ответ на окислительный стресс, нагрев, гипоксию, УФ-излучение и другие воздействия (Li et al., 2017; Gomez-Pastor et al., 2018). В ходе развития опухолевого процесса HSF1 находится в постоянно активном состоянии и играет плейотропную роль, поддерживая злокачественность опухолевых клеток, т.е. увеличение их миграционной способности, повышение инвазивности и пролиферативного потенциала ракотельность опухолей к химиопрепаратам. Именно поэтому были предприняты попытки разработать низкомолекулярные ингибиторы для снижения активности HSF1 и снижения шаперонной активности Hsp70 и Hsp90 для подавления резистентности опухолевых клеток к химиопрепаратам. В настоящее время существует примерно 20 ингибиторов Hsp90, часть из которых проходит клинические испытания (Zuehlke et al., 2018; Zininga, Shonhai, 2019), не менее 10 ингибиторов Hsp70, включая выявленную в нашей лаборатории производную колхицина AEAC (Lazarev et al., 2018) и 14 ингибиторов HSF1 (Carpenter, Gökmen-Polar, 2019), включая открытый нами карденолид CL-43 (Nikotina et al., 2018).

вых клеток (Mendillo et al., 2012). Высокий уровень

HSF1 способствует развитию опухолевых клеток за

счет координации ряда фундаментальных клеточ-

ных процессов, включая метаболизм глюкозы, кон-

троль клеточного цикла, трансляцию белков и био-

генез рибосом (Willmund et al., 2013; Jagadish et al.,

2016; Albakova et al., 2020). Во многих исследованиях

было показано, что уровень экспрессии HSF1 опре-

делял злокачественность новообразования у паци-

ентов с разными типами рака и определял чувстви-

Мы задались вопросом, что является более эффективным средством для противоопухолевой терапии — выведение из строя отдельных шаперонов, которые являются непосредственными участниками процесса, или регулятора их экспрессии HSF1? Целью настоящего исследования стал ответ на этот вопрос.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Клетки немелкоклеточного рака легкого A549 дикого типа (A549wt) и иммортализованные клетки эмбриональной почки человека HEK-293T культивировали в среде DMEM, содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки (FBS, Gibco, CША), 2 мМ L-глутамина и антибиотики пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (0.1 мг/мл) (БиолоТ, Россия) при 37°С и 5% CO₂.

Все клеточные культуры были получены из Российской коллекции клеточных культур (ИНЦ РАН, Санкт-Петербург).

Трансферная плазмида pGFP-C-shLenti для нокдауна Hsp70 и его мастер-регулятора HSF1 была приобретена у OriGene (США): клоны TRCN0000008513 (shPHK против *HSPA1A* (*Hsp70*)); последовательность, кодирующую зрелую смысловую последовательность TTGATGCTCTTTGTTCAGGTCG, TRCN0000280463 или TRCN0000007481 (shPHK против *Hsf1*); последовательность, кодирующую зрелую смысловую последовательность CAAACGTGGAAGCTGTTCC или ATACTTGGGCATGGAATGTGC соответственно. Пакующая плазмида pMD2.G и плазмида вирусной оболочки psPAX были приобритены у Addgene (США).

Клетки НЕК-293Т трансфицировали с помощью полиэтиленимина (PEI; Sigma, США) смесью всех трех, для получения линии А549-shHsp70, или четырех, для получения линии A549-shHSF1, плазмид. Супернатанты клеточных культур, содержащие лентивирусные частицы, собирали в течение трех дней, после чего вирус концентрировали и высаживали с помощью центрифугирования при 5600 g в 30%-ном растворе полиэтиленгликоля (PEG; Sigma, CША) при 4°С. Осажденные вирусы растворяли в 50 мкл бессывороточной среды OptiMEM (Gibco, США) и далее использовали для трансдукции клеток А549. Положительные клоны отбирали в течение 12-суточной селекции на пуромицине (2.0 мкг/мл; Sigma, США) не менее чем за 2 нед. до начала экспериментов. Для анализа чувствительности А549 к химиотерапии в зависимости от уровня белков Hsp70 и (или) HSF1 клетки культивировали в присутствии препаратов оксалиплатин и этопозид в концентрацях 12.5, 25, 50, 100, 150 или 200 мкМ (Pharmachemie, Израиль).

Иммуноблотинг. Нокдаун Hsp70 или HSF1 в клетках A549 верифицировали с помощью Вестерн-блотанализа. Клетки, полученные с помощью селекции на пуромицине, лизировали на льду в растворе, содержащем 20 мМ TrisHCl pH 7.5, 20 мМ NaCl, 0.01% Трито-

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

на X-100, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF. Равные количества белка лизатов (20 мкг/проба) использовали для электрофореза в 11%-ном SDS-полиакриламидном геле и последующего иммуноблотинга. После переноса на PVDF-мембрану неспецифическое связывание блокировали раствором 5%-ного обезжиренного молока в PBS в течение ночи при 4°С. Далее мембрану последовательно инкубировали с антителами против Hsp70 клон 3C5 (Lasunskaia et al., 2010) и HSF1 (Cell Signaling, США). Для контроля нагрузки использовали антитела к тубулину (Thermo Fisher, США). После инкубации с первичными антителами, мембраны промывали раствором PBS, содержащим 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали с вторыми антителами против иммуноглобулинов мыши и (или) крысы, меченными пероксидазой хрена (Abcam, Великобритания).

Повышение количества белков Hsp70 и HSF1 в раковых клетках после обработки химиопрепаратами также регистрировали с помощью иммуноблотинга. Клетки A549 дикого типа культивировали в присутствии оксалиплатина в концентрации 25, 50 или 100 мкМ или этопозида в концентрации 12.5, 25, 50 или 100 мкМ в течение 24 ч, затем лизировали. Лизаты использовали для электрофореза и Вестернблот-анализа. Блот последовательно инкубировали с антителами против Hsp70, HSF1 и тубулина, указанными выше.

МТТ-тест. Токсичность химиотерапевтических препаратов регистрировали по количеству живых клеток с помощью метода определения активности дегидрогеназ по Мосману (МТТ-тест). Клетки А549 с разным уровнем экспрессии Hsp70 или HSF1 инкубировали в лунках 96-луночного планшета с оксалиплатином в концентрации 25, 50, 100 мкМ или с этопозидом в концентрации 12.5, 25, 50, 100 мкМ в течение 48 ч. Далее культуральную среду заменяли на раствор МТТ (1 мг/мл) в PBS (ПанЭко, Россия) из расчета 100 мкл на лунку. Спустя 2 ч, раствор удаляли, а кристаллы формазана, образовавшиеся в живых клетках, растворяли в DMSO (Sigma, США) в течение 15 мин. Оптическую плотность измеряли с помощью прибора Varioscan (Thermo Scientific, США) при длине волны 570 нм.

Анализ ферментативной активности каспазы 3 и 7. Для определения активности эффекторной каспазы 3 и 7 после проведенной химиотерапии использовали каспазный тест. Клетки А549, А549-shHsp70 и А549-shHSF1 рассеивали в лунки 12-луночного планшета в концентрации 3×10^5 кл./мл. После культивирования в присутствии 25, 50, 100 мкМ оксалиплатина или 12.5, 25, 50, 100 мкМ этопозида, в течение 14 ч, клетки центрифугировали при 2000 об./мин, дважды промывали холодным PBS и лизировали в буфере, содержащем 100 мМ НЕРЕS, pH 7.2, 10% сахарозы, 1 мМ EDTA pH 8.0, 0.1% CHAPS и 10 мМ DTT. Лизаты подвергали двум циклам замораживания—оттаивания и осаждали при 13000 об./мин в те-



Рис. 1. Концентрации противоопухолевых препаратов, превышающих терапевтическую дозу, не приводит к полной гибели популяции опухолевых клеток. Представлены данные измерения активности лактатдегидрогеназы с помощью набора Cyto-tox 96 в клетках А549 после обработки в возрастающих концентрациях этопозидом (*a*) и оксалиплатином (*б*). Красной звездочкой отмечены выжившие остатки клеточных популяций.

чение 10 мин. Лизат, содержащий 200 мкг белка в 50 мкл буфера для лизиса, вносили в лунки черного 96-луночного планшета (ThermoFisher, США) и в каждую лунку добавляли 40 мкМ флуорогенного субстрата (DMQD-AMC; Sigma, США). Планшет инкубировали при 37°С в течение 2 ч. Флуоресценцию детектировали с помощью ридера FluoStar Omega (BMG, Labtech, Великобритания), используя длину волны возбуждения и эмиссии 355 и 460 нм соответственно.

Статистическая обработка. Данные представлены как среднее значение и его стандартная ошибка (SEM). Количественный анализ выполнен с помощью GraphPad Prism 9.3.1. Сравнение проводили с помощью теста однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующей коррекцией с помощью теста множественного сравнения Дуннета, который позволяет сравнивать каждое среднее значение со всеми другими средними значениями. Все эксперименты повторяли не менее трех раз. Статистическую значимость определяли значением P < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Задачей противоопухолевой терапии является полное уничтожение опухолевых клеток, поскольку в противном случае происходит рецидив опухолевого роста и со временем обнаруживаются опухолевые узлы в отдаленных от первичного очага тканях. Мы проверили, можно ли с помощью противоопухолевых препаратов добиться полного уничтожения опухолевых клеток, и культивировали клетки немелкоклеточного рака легкого А549 в присутствии противоопухолевых препаратов, которые широко применяются в клинике для лечения рака данного гистогенеза — этопозидом и оксалиплатином в увеличивающихся концентрациях. При культивировании в присутствии этопозида в течение 48 ч доля погибших клеток А549 достигала 50% (IC50) при 7.5 мкМ, после чего эффективность препарата снижалась и при дальнейшем повышении концентрации доля мертвых клеток вырастала на 1–3% при каждом повышении концентрации на 25 мкМ (рис. 1*a*). При культивировании в присутствии оксалиплатина величина IC50 составила 66.6 мкМ, и тоже, начиная с концентрации 75 мкМ, доля погибших клеток увеличивалась на 1–6% при повышении концентрации препарата на 25 мкМ (рис. 16). В результате, в присутствии этопозида в самой высокой концентрации (200 мкМ) оставалось 14.81 ± 0.84% жизнеспособных клеток и 9.08 ± 1.37% при самой высокой (200 мкМ) концентрации оксалиплатина (рис. 1).

Клетки А549 обладают высоким уровнем экспрессии Hsp70, и мы проверили, как на экспрессию этого шаперона и регулятора его синтеза, HSF1, влияют противоопухолевые препараты этопозид и оксалиплатин. Мы культивировали клетки А549 в присутствии препаратов в повышающейся концентрации (рис. 2) и с помощью иммуноблоттинга определяли в них уровень белков Hsp70 и HSF1. Результаты показали, что уровень обоих белков возрастает дозо-зависимым образом (рис. 2a) и повышается у HSF1в 2 раза в случае действия этопозида и в 3.9 раз в случае оксалиплатина, а у Hsp70 – в 1.94 раза в случае этопозида (рис. 26) и в 2.3 раза в случае оксалиплатина (рис. 2a).

В клинике обычно проводят курсовую терапию, т.е. вводят противоопухолевые препараты внутривенно ежедневно в течение нескольких дней. Очевидно, что каждое последующее введение препарата будет становится менее эффективным, потому что опухолевые клетки приобретают мощную систему защиты в процессе терапии, и целесообразно использовать препараты, которые бы понижали содержание Hsp70 и (или) HSF1. Чтобы понять, подавление какого из этих белков более эффективно, мы получили клетки A549 с нокдауном по Hsp70 и нокдауном по HSF1. Данные иммуноблоттинга показали (рис. 3*a*), что уровень HSF1 в клетках A549-


Рис. 2. Анализ экспрессии HSF1 и Hsp70 в клетках A549 при применении противоопухолевых препаратов, этопозида и оксалиплатина в возрастающих концентрациях. Представлен иммуноблот клеток A549, инкубированный с антителами против HSF1 и Hsp70 (*a*) и данные подсчета относительной интенсивности зон HSF1 и Hsp70 к интенсивности α -тубулина для этопозида (δ) и оксалиплатина (*в*). **P* < 0.0001.

shHSF1 ниже, чем в клетках A549 в 1.7 раз, уровень Hsp70 в клетках A549-shHsp70 был ниже, чем в клетках A549 в 1.4 раза, а в клетках A549-shHSF1 – в 1.6 раз (рис. *36*).

Мы проверили, как изменилась чувствительность клеток линий A549-shHSF1 и A549-shHsp70 к этопозиду и оксалиплатину по сравнению с клетками A549wt; для этого клетки культивировали в присутствии противоопухолевых препаратов в возрастающих концентрациях. В анализ также были взяты клетки А549scr, несущие ту же генетическую конструкцию, что и A549-shHSF1 и A549-shHsp70, но без вставки целевого фрагмента. Анализ чувствительности клеток к этопозиду и оксалиплатину был проведен с помощью метода МТТ (рис. 4а, б). Разница в чувствительности к этопозиду у клеток A549-shHsp70 и A549-shHSF1 проявилась уже при наиболее низкой (12.5 мкМ) из используемых концентраций противоопухолевого препарата и была статистически достоверной (P < 0.0001), но начиная с концентрации 25 мкМ доля погибших клеток в клетках А549shHSF1 была статистически выше (P < 0.0005), чем у клеток A549-shHsp70, и эта тенденция продолжала сохраняться при повышении концентрации препарата (рис. 4*a*). При действии оксалиплатина мы не выявили повышения чувствительности клеток A549-shHsp70 к противоопухолевому препарату по сравнению с клетками A549wt и A549scr, в то время как клетки A549-shHSF1 приобрели статистически достоверную чувствительность к оксалиплатину (рис. 4*6*).

Этопозид и препараты платины вызывают апоптоз опухолевых клеток (Afanasyeva et al., 2007; Hato et al., 2014), и мы измерили уровень ферментативной активности каспаз 3 и 7 (рис. 4e, c) Каспазная активность в клетках A549wt и A549scr после воздействия этопозида или оксалиплатина не отличалась, в то время как уровни каспазной активности у клеток A549-shHsp70 статистически отличались от такового в клетках A549wt и A549scr и в клетках A549-shHSF1 статистически были выше, чем у клеток A549-shHsp70 (рис. 4e, c). Полученные нами данные убедительно показывают, что подавление одного Hsp70 увеличивает чувствительность опухолевых клеток к действию противоопухолевых препаратов, которые широко используются в клинике, но подавление HSF1 значительно превышает эффект подавления Hsp70, и ингибиторы HSF1 могли бы стать эффективным инструментом в терапевтических схемах при лечении немелкоклеточного рака легкого.

ОБСУЖДЕНИЕ

Два обстоятельства делают многие онкологические заболевания практически неизлечимым – формирование метастазов и способность опухолевых клеток к рецидиву после, казалось бы, успешной терапии (Mitra et al., Li, 2015; Sokolenko et al., 2020). Действительно, после химиотерапии опухоли часто остаются небольшие остатки клеточной популяции. Наш анализ чувствительности панели опухолевых клеток разного гистогенеза к ряду противоопухолевых препаратов, широко применяющихся в клинике, показал, что применение препаратов никогда не приводит к гибели 100% клеток в популяции, т.е., как бы ни была повышена концентрация терапевтического средства, не менее 2-3% клеток остаются живыми. В экспериментах, представленных в данной работе, мы показываем, что даже при увеличении дозы противоопухолевых препаратов этопозида и оксалиплатина выше терапевтической, жизнеспособными остаются 10-15% клеточной популяции.

Для того, чтобы увеличить эффективность противоопухолевой терапии, мы предлагаем использовать ингибиторы функции Hsp70 и активности мастеррегулятора клеточных шаперонов HSF1. В предыдущих исследованиях мы показали, что ингибиторы шаперонной функции АЕАС (производное колхицина) (Lazarev et al., 2018) и BT44 (Sverchinsky et al., 2018) повышали чувствительность опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам, замедляли рост опухолей меланомы и глиобластомы и увеличивали продолжительность жизни животных-опухоленосителей. Позитивный эффект показал также пептид Hsp70, ICit-2, способный проникать в опухолевые клетки, подавлять шаперонную функцию Hsp70 и усиливать чувствительность опухолевых клеток к действию доксорубицина (Sverchinsky et al., 2017). Мы также использовали ингибитор активности HSF1, выявленный нами в результате высокопроизводительного скриннинга, карденолид CL-43, который не только синергетически увеличивал чувствительность опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам (Nikotina et al., 2018), но в режиме монотерапии снижал способность опухолевых клеток к эпителиально-мезенхимному переходу и метастазированию (Nikotina et al., 2021).

Для того чтобы понять, какой подход может быть более значимым в клинике, мы провели данное исследование. Во-первых, мы показали, что препара-



Рис. 3. Иммуноблот клеток A549wt, A549scr, A549shHsp70 и A549-shHsp71 с антителами против HSF1 и Hsp70 (*a*) и (δ) данные подсчета относительной интенсивности зон HSF1 и Hsp70 к интенсивности α -тубулина. *P < 0.0001

ты, используемые в клинике, повышают уровень и Hsp70, и HSF1, и видимо повышают устойчивость клеток к последующему лечению. Во-вторых, мы получили клетки A549 с подавленной экспрессией как Hsp70, так и HSF1, и выяснили, что именно подавление HSF1 значительно снижает резистентность опухолевых клеток к этопозиду и оксалиплатину, значимо увеличивая активность эффекторных каспаз.

Снижение HSF1 вызывает снижение всех регулируемых им молекулярных шаперонов: Hsp70, Hsp90 и Hsp40 (Nikotina et al., 2018). Нокдаун HSF1 или применение известного ингибитора HSF1 триптолида, который был снят с III фазы клинических испытаний из-за общей токсичности, разрушало цитозольный комплекс между HSF1, p97, Hsp90 и деацетилазой Hsp90, известной как гистондеацетилаза 6 (HDAC6) (Ganguly et al., 2015). Кроме того, HSF1 управляет функцией более 1000 генов, не вовлеченных в ответ клетки на стресс, многие из которых связаны с прогрессией опухоли (Mendillo et al., 2012).

Наши данные свидетельствуют, что для повышения эффективности противоопухолевой терапии лучше использовать ингибиторы HSF1, чем Hsp70.



Рис. 4. Подавление HSF1 более эффективно повышает чувствительность клеток A549 к действию противоопухолевых препаратов. Представлены данные теста MTT клеток A549wt, A549scr, A549-shHsp70 и A549-shHSF1 при применении этопозида (*a*) и оксалиплатина (δ) в возрастающих концентрациях в течение 48 ч, а также активность каспаз 3, 7 для тех же клеток при применении этопозида (*e*) и оксалиплатина (*e*). Различия между количеством живых клеток или активностью каспаз 3, 7 в клет-ках A549wt и A549-shHsp70 или A549-shHSF1 достоверны при **P* < 0.0001.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность Р.В. Суезову (Институт цитологии РАН) за помощь в получении сублинии линии клеток A549-shHSF1.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-20161).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Afanasyeva E.A., Komarova E.Y., Larsson L.G, Bahram F, Margulis B.A., Guzhova I.V. 2007. Drug-induced Myc-mediated apoptosis of cancer cells is inhibited by stress protein Hsp70. Int. J. Cancer. V. 121. P. 2615. https://doi.org/10.1002/ijc.22974
- Albakova Z., Armeev G.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

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

Balchin D., Hayer-Hartl M., Hartl F.U. 2016. In vivo aspects of protein folding and quality control. Science. V. 353. P. 6294.

https://doi.org/10.1126/science.aac4354

Carpenter R.L., Gökmen-Polar Y. 2019. HSF1 as a cancer biomarker and therapeutic target. Curr. Cancer Drug Targets. V. 19. P. 515.

https://doi.org/10.2174/1568009618666181018162117

- *Ciocca D.R., Calderwood S.K.* 2005. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. Cell Stress Chaperones. V. 10 № 2. P. 86–103. https://doi.org/10.1379/csc-99r.1
- Ganguly S., Home T., Yacoub A., Kambhampati S., Shi H., Dandawate P., Padhye S., Saluja A.K., McGuirk J., Rao R. 2015. Targeting HSF1 disrupts HSP90 chaperone function in chronic lymphocytic leukemia. Oncotarget. P. 6. P. 31767. https://doi.org/10.18632/oncotarget.5167
- *Gomez-Pastor R., Burchfiel E.T., Thiele D.J.* 2018. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. V. 19. P. 4. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.73
- Hato S.V., Khong A., de Vries I.J., Lesterhuis W.J. 2014. Molecular pathways: the immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics. Clin. Cancer Res. V. 20. P. 2831. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3141
- Jagadish N., Agarwal S., Gupta N., Fatima R., Devi S., Kumar V., Suri V., Kumar R., Suri V., Sadasukhi T.C., Gupta A., An-

sari A.S., Lohiya N.K., Suri A. 2016. Heat shock protein 70-2 (HSP70-2) overexpression in breast cancer. J. Exp. Clin. Cancer Res. V. 35. P. 150. https://doi.org/10.1186/s13046-016-0425-9

- Lasunskaia E.B., Fridlianskaia I., Arnholdt A.V., Kanashiro M., Guzhova I., Margulis B. 2010. Sub-lethal heat shock induces plasma membrane translocation of 70-kDa heat shock protein in viable, but not in apoptotic, U-937 leukaemia cells. APMIS. V. 118. P. 179-87. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02576.x
- Lazarev V.F., Sverchinsky D.V., Mikhaylova E.R., Semenyuk P.I., Komarova E.Y., Niskanen S.A., Nikotina A.D., Burakov A.V., Kartsev V.G., Guzhova I.V., Margulis B.A. 2018. Sensitizing tumor cells to conventional drugs: HSP70 chaperone inhibitors, their selection and application in cancer models. Cell Death Dis. V. 9. P. 41. https://doi.org/10.1038/s41419-017-0160-v
- Li J., Labbadia J., Morimoto R.I. 2017, Rethinking HSF1 in stress, development, and organismal health. Trends Cell Biol. V. 27. P. 895. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.08.002
- Mendillo M.L., Santagata S., Koeva M., Bell G.W., Hu R., Tamimi R.M., Fraenkel E., Ince T.A., Whitesell L., Lindquist S. 2012. HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. Cell. V. 150. P. 549. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.031
- Mitra A., Mishra L., Li S. 2015. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. Oncotarget. V. 6. P. 10697.

https://doi.org/10.18632/oncotarget.4037

Nikotina A.D., Koludarova L., Komarova E.Y., Mikhaylova E.R., Aksenov N.D., Suezov R., Kartzev V.G., Margulis B.A., Guzhova I.V. 2018. Discovery and optimization of cardenolides inhibiting HSF1 activation in human colon HCT-116 cancer cells. Oncotarget. V. 9. P. 27268. https://doi.org/10.18632/oncotarget.25545

- Nikotina A.D., Vladimirova S.A., Komarova E.Y., Alexeev D., Efremov S., Leonova E., Pavlov R., Kartsev V.G., Polonik S.G., Margulis B.A., Guzhova I.V. 2021. Prevention of High Glucose-Mediated EMT by inhibition of Hsp70 chaperone. Int. J. Mol. Sci. V. 22. P. 6902. https://doi.org/10.3390/ijms22136902
- Sokolenko A.P., Bizin I.V., Preobrazhenskava E.V., Gorodnova T.V., Ivantsov A.O., Ivevleva A.G., Savonevich E.L., Kotiv K.B., Kuligina E.S., Imvanitov E.N. 2020. Molecular profiles of BRCA1-associated ovarian cancer treated by platinumbased therapy: Analysis of primary, residual and relapsed tumors. Int. J. Cancer. V. 146. P. 1879. https://doi.org/10.1002/ijc.32776
- Sverchinsky D.V., Lazarev V.F., Semenyuk P.I., Mitkevich V.A., Guzhova I.V., Margulis B.A. 2017. Peptide fragments of Hsp70 modulate its chaperone activity and sensitize tumor cells to anti-cancer drugs. FEBS Lett. V. 591. P. 4074. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12913
- Sverchinsky D.V., Nikotina A.D., Komarova E.Y., Mikhaylova E.R., Aksenov N.D., Lazarev V.F., Mitkevich V.A., Suezov R., Druzhilovskiy D.S., Poroikov V.V., Margulis B.A., Guzhova I.V. 2018. Etoposide-induced apoptosis in cancer cells can be reinforced by an uncoupled link between Hsp70 and caspase-3. Int. J. Mol. Sci. V. 19. P. 2519. https://doi.org/10.3390/ijms19092519
- Willmund F., del Alamo M., Pechmann S., Chen T., Albanèse V., Dammer E.B., Peng J., Frydman J. 2013. The cotranslational function of ribosome-associated Hsp70 in eukarvotic protein homeostasis. Cell. V.152. P. 196. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.001
- Zininga T., Shonhai A. 2019. Small Molecule inhibitors targeting the heat shock protein system of human obligate protozoan parasites. Int. J. Mol. Sci. V. 20. P. 5930. https://doi.org/10.3390/ijms20235930
- Zuehlke A.D., Moses M.A., Neckers L. 2018. Heat shock protein 90: Its inhibition and function. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. V. 373. P. 20160527. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0527

Suppression of the Molecular Chaperones Expression as a Factor of Increasing the Antitumor Therapy Efficiency

M. A. Mikeladze^{*a*}, E. R. Mikhaylova^{*a*}, B. A. Margulis^{*a*}, and I. V. Guzhova^{*a*}, *

^aInstitute of Cytology of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 164064 Russia

*e-mail: irina.guzhova@incras.ru

Modern methods of antitumor chemotherapy are not able to eliminate 100% of the cell population. The use of modern chemotherapy methods is constrained by the increased efficiency of cancer cell cellular defense systems, in particular molecular chaperones, whose expression increases with the use of anticancer drugs. Combination therapy with inhibitors of individual chaperones, in particular Hsp70, or HSF1, which regulates the synthesis of heat shock proteins, can be a means to increase the effectiveness of anticancer drugs. In the present study, we compared the effect of sensitizing A549 lung adenocarcinoma cells with Hsp70 suppression or HSF1 activity in tumor cells. Having obtained sublines A549-shHsp70 and A549-shHSF1 using the RNA interference method, we compared their sensitivity to the action of antitumor drugs etoposide and oxaliplatin. Suppression of Hsp70 function and decrease in HSF1 activity increased the number of dead cells and increased the activity of caspases-3 and -7, but the effect of HSF1 inactivation significantly exceeded the results of Hsp70 inhibition. We can conclude that HSF1 inhibitors have a therapeutic perspective as part of antitumor compositions.

Keywords: anticancer therapy, molecular chaperones, Hsp70, HSF1, etoposide, oxaliplatin

УДК 616.71-018.46:[615.032.14:577.352.2:621.318-022.532]-092.9:599.323.4

СТРОЕНИЕ И ДИНАМИКА КОЛИЧЕСТВА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ МАГНИТОЛИПОСОМ

© 2022 г. И. В. Мильто^{1, 2, *}, Н. М. Шевцова¹, В. В. Иванова¹, О. Н. Серебрякова¹, Р. М. Тахауов^{1, 2}, И. В. Суходоло¹

¹Кафедра морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России, Томск, 634050 Россия

²Северский биофизический научный центр Федерального медико-биологического агентства России, Северск, 636013 Россия *E-mail: milto bio@mail.ru

Поступила в редакцию 03.06.2022 г. После доработки 05.07.2022 г. Принята к публикации 11.07.2022 г.

Использование наночастиц магнетита в биологии и медицине неуклонно растет, при этом некоторые вопросы относительно их безопасности остаются неясными. Например, магнитолипосомы на основе наномагнетита являются многообещающей основой для создания новых лекарственных препаратов. В настоящей работе с помощью гематологических методов проведена сравнительная оценка изменения количества гемопоэтических клеток костного мозга у половозрелых беспородных крыс в течение 120 сут после внутривенного введения суспензии немодифицированных наночастиц магнетита (HЧМ) и магнитолипосом на их основе. Описаны особенности строения гемопоэтических клеток основных дифферонов костного мозга (эритроцитарного, гранулоцитарного, лимфоцитарного, моноцитарного и тромбоцитарного), а также определена динамика изменения их количества в течение эксперимента. Однократное внутривенное введение суспензии магнитолипосом на основе наночастиц магнетита в дозе 0.14 г (Fe₃O₄) на 1 кг массы тела (объем инъекции 3 мл) не вызывает изменения структуры и количества гемопоэтических клеток изучаемых дифферонов костного мозга крыс. Отсутствие негативного влияния магнитолипосом на основе наночастиц магнетита на структуру гемопоэтических клеток костного мозга позволяет рассматривать эти наноконструкции как перспективный магнитоуправляемый носитель для создания современных систем целевой доставки диагностических и терапевтических лекарственных средств.

Ключевые слова: наночастицы магнетита, магнитолипосомы, костный мозг, гемопоэтические клетки, крыса **DOI:** 10.31857/S0041377122050078

Применение магнитных наноматериалов в биомедицинских исследованиях и медицине открывает новые возможности для изучения живых систем, а также для диагностики и лечения заболеваний (Wu et al., 2010; Kelly et al., 2011; Braham et al., 2018; Maladkar et al., 2020). Одним из самых популярных магнитных наноматериалов являются наночастицы магнетита (НЧМ), которые широко исследуются в связи с возможностью их применения для целевой хемо- и термотерапии, а также в диагностических целях (Wu et al., 2010; Garcia-Pinel et al., 2020). Несмотря на длительное изучение и широкое внедрение в различные сферы деятельности человека НЧМ, в настоящее время отсутствует однозначная позиция относительно их биологической безопасности, которая продолжает быть предметом научных исследований (Couto et al., 2014). В последнее десятилетие в связи с использованием наночастиц для визуализации костного мозга и их применением для его радиопротекции, интенсивно изучается влияние наночастиц на гемопоэтические клетки, а также особенности распределение наночастиц в костном мозге (Dadachova, 2013).

НЧМ широко используются для визуализации костного мозга при диагностике заболеваний кроветворной системы, а также для целевой доставки лекарственных препаратов в этот орган. Помимо этого, НЧМ применяют для радиопротекции костного мозга при лучевой терапии злокачественных новообразований в связи с высокой радиочувствительностью гемопоэтических клеток (Dadachova, 2013).

В связи с высокой склонностью НЧМ к агрегации, для биомедицинских целей их всегда подвергают поверхностной модификации, одним из вариантов которой является заключение НЧМ в оболочку из двойного слоя липидов (Couto et al., 2015). Липосомы с заключенными в них НЧМ называют магнитолипосомами (Soenen et al., 2011). Магнитолипосомы являются перспективной наноконструкцией для

Принятые сокращения: НЧМ – наночастицы магнетита; МНФ – мононуклеарные фагоциты.

целевой доставки лекарственных средств и обладают рядом уникальных свойств, среди которых высокая биосовместимость, возможность проведения поверхностной модификации, способность переносить как гидрофильные (в полости), так и гидрофобные (в липидном бислое) соединения, сочетание визуализирующих и терапевтических агентов. Кроме того, имеется возможность создания магнитолипосом различных размеров в широком диапазоне (от 20 нм до более 1 мкм) (Soenen et al., 2011).

Вариабельность липидного состава оболочки магнитолипосом обеспечивает их эффективную функционализацию и делает их идеальной наноконструкцией для целевой доставки. Кроме того, магнитолипосомы можно визуализацировать с помощью разных методов (например, МРТ и флуоресценции), что обеспечивает надежный контроль их распределения и позволяет использовать их в биомедицинских целях (Kelly et al., 2011; Soenen et al., 2011).

Биосовместимость магнитолипосом для медицинского применения требует тщательного и всестороннего исследования. При этом особое внимание следует уделить взаимодействию НЧМ с кроветворной системой в связи с тем, что применение магнитолипосом может быть сопряжено с их внутрисосудистым введением (Ruiz et al., 2015). Изучение влияния магнитолипосом на основе НЧМ на кроветворные клетки костного мозга *in vivo* является важнейшим этапом изучения их биологических свойств.

Несмотря на то, что использование систем целевой доставки лекарственных препаратов на основе НЧМ будет способствовать снижению их повреждающего действия и улучшению эффективности терапии, необходимо оценить влияние данных наноконструкций на качественные и количественные показатели костного мозга.

Целью исследования являлась оценка влияния магнитолипосом на основе НЧМ после однократного внутривенного введения их суспензии на структуру и количество клеток эритроцитарного, гранулоциатрного, моноцитарного, лимфоцитарного и тромбоцитарного дифферонов костного мозга крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Характеристика НЧМ. Изучаемые НЧМ являются сферическими частицами (средний диаметр 7 нм), которые образованы смесью оксидов железа(II) и (III). НЧМ синтезированы механохимическим способом в Отделе структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН (Томск).

Приготовление суспензии немодифицированных НЧМ. Навеску немодифицированных НЧМ растворяли в стабилизирующем растворе (рН 7.4), в состав которого входили цитрат и хлорид натрия (РЕАХИМ, Россия), а также динатриевая соль HEPES (AppliChem, Германия). Приготовление суспензии магнитолипосом. Получение магнитолипосом проводили путем совместной экструзии суспензии немодифицированных НЧМ и липидов (8 мг/мл) в виде эмульсии через поликарбонатные фильтры (Sartorius, Германия) с размером пор 100 нм. Водородный показатель суспензии составлял 7.4.

Эмульсию липидов готовили из 1,2-дипальмитоилглицеро-3-фосфохолина (Lipoid GmbH, Германия), 1,2-дистеароил-глицеро-3-фосфохолина (Lipoid GmbH, Германия), холестерола, 1,2-дистеароил-глицеро-3-фосфоэтаноламина и ацетата α-токоферола (Avanti Polar Lipids, Inc., США). Молярное соотношение липидов сосьавляло 9:1:0.2:0.02:0.2 соответственно.

Стандартизация суспензий немодифицированных НЧМ и магнитолипосом. Рентгено-флуоресцентным методом (Quant'X, Thermo Scientific, Швейцария) устанавливали концентрацию НЧМ в суспензиях. Методом динамического светорассеяния (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Великобритания) определяли размер структурных элементов суспензий. Структуру и форму частиц в суспензиях изучали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100 CX II (JEOL, Япония).

Дизайн эксперимента. Работа выполнена на 128 беспородных половозрелых (4-месячного возраста) крысах-самцах (150 \pm 30 г), разделенных на 4 группы: интактные животные (24 крысы); животные с однократным введением 2 мл эмульсии полых липосом (8 мг/мл липидов; 24 крысы); животные с однократным введением 2 мл суспензии немодифицированных НЧМ (0.14 г (Fe₃O₄) на 1 кг массы тела; 40 крыс); животные с однократным введением 3 мл суспензии магнитолипосом (0.14 г (Fe₃O₄) на 1 кг массы тела; 40 крыс). Суспензию вводили крысам, находящимся в фиксаторе Когана, через хвостовые вены. Выведение животных из эксперимента осуществляли на 1, 7, 14, 21, 40, 60, 90 и 120 сут после введения суспензии путем асфиксии CO₂.

Приготовление гематологических препаратов костного мозга. В течение 2–3 мин после выведения животного из эксперимента из костного мозга грудины крыс готовили мазки, которые высушивали, фиксировали в абсолютном метаноле и окрашивали по методу Романовского–Гимзы. Из костного мозга каждого животного готовили по 3 мазка. Окрашивание мазков костного мозга проводили согласно инструкции производителя раствора азур-эозина по Романовскому (МиниМед-Р, Россия) (Bolliger, 2004).

Исследование гематологических препаратов костного мозга. Окрашенные мазки костного мозга изучали с помощью светового микроскопа Axioscope 40 (Zeiss, Германия) с использованием объектива с масляной иммерсии и увеличением $100 \times и$ окуляра с увеличением $10 \times$). На препаратах костного мозга крыс оценивали структуру гемопоэтических клеток и подсчитывали миелограмму. Для определения миелограммы считали не менее 1000 клеток в мазке

	Физико-химические параметры суспензии/эмульсии				
Объект	концентрация магнетита, мг/мл	средний размер структурного элемента, нм	диапазон изменения размера структурного элемента, нм		
Полые липосомы	_	146	65-500		
Немодифицированные НЧМ	7	90.4	45-300		
Магнитолипосомы	4.8	75	60-80		

Таблица 1. Физико-химические параметры эмульсии полых липосом, суспензии немодифицированных НЧМ и суспензии магнитолипосом

костного мозга по правилу меандров. Для фотосъемки гемопоэтических клеток костного мозга использовали цифровую камеру Canon G5 (Canon, Япония). Определение размеров гемопоэтических клеток костного мозга проводили по фотографиям с помощью программы ImageJ 1.48 (NIH Image, США).

Статистическая обработка результатов. Количественные результаты обрабатывали с помощью программы "SPSS 11.5" и представляли в виде медианы (Me), а также нижнего (Q_{25}) и верхнего (Q_{75}) квартилей. Вследствие того, что распределение не соответствовало нормальному (критерий Шапиро–Уилкса), для выяснения достоверности различий морфометрических показателей между экспериментальными группами использовали критерий Манна–Уитни для независимых выборок (p < 0.05). Сравнение параметров внутри групп проводили с применением критерия Вилкоксона для зависимых выборок (p < 0.05).

Реактивы. В работе использовали: азур-эозин по Романовскому (МиниМед-Р, Россия); динатриевую соль HEPES (AppliChem GmbH, Германия); хлорид натрия и цитрат натрия (РЕАХИМ, Россия); 1,2-дипальмитоил-глицеро-3-фосфохолин (Lipoid GmbH, Германия), 1,2-дистеароил-глицеро-3-фосфохолин (Lipoid GmbH, Германия); 1,2-дистеароил-глицеро-3-фосфоэтаноламин, холестерол и ацетат α-токоферола (Avanti Polar Lipids, Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика НЧМ. Немодифицированные НЧМ находятся в суспензии в виде отдельных сферических частиц и их агломератов. Физико-химические параметры суспензии немодифицированных НЧМ приведены в табл. 1

Характеристика полых липосом. Липосомы представлены сферическими и эллиптическими полыми везикулами, стенка которых образована одним (моноламеллярные липосомы) или несколькими (полиламеллярные липосомы) липидными бислоями. Физико-химические параметры эмульсии полых липосом приведены в табл. 1.

Характеристика магнитолипосом. Магнитолипосомы представлены везикулами, в полости которых

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

находятся НЧМ и агломераты НЧМ. Оболочка магнитолипосом образована одним или несколькими липидными бислоями, которые полностью окружают НЧМ и агломераты НЧМ. Физико-химические параметры суспензии магнитолипосом даны в табл. 1.

В виду идентичности клеточного состава изученных гемопоэтических дифферонов, а также отсутствия различий строения и размеров аналогичных гемопоэтических клеток у животныхвсех 4-х экспериментальных групп в течение 120 сут, описание структуры и среднего диаметра этих клеток далее приводится для животных после введения суспензии магнитолипосом.

Эритроцитарный дифферон. В течение эксперимента в мазках костного мозга крыс выявляли следующие клетки эритроцитарного дифферона (в порядке дифференцировки): эритробласты, пронормобласты, базофильные нормобласты, полихроматофильные нормобласты и оксифильные нормобласты. Эритробласты – круглые клетки (с диаметром 13.7 (12.9; 15.2) мкм) с ультрабазофильной цитоплазмой и крупным круглым ядром, которое содержит 1-2 ядрышка и эухроматин, имеющий сетчатую структуру. Пронормобласты – круглые клетки (с диаметром 10.8 (10.3; 11.9) мкм) с базофильной цитоплазмой и крупным круглым ядром, в котором преобладает эухроматин (структура хроматина сетчатая, ядрышки отсутствуют). Базофильные нормобласты – круглые мелкие клетки (с диаметром 9.1 (7.9; 10.0) мкм) с умеренно базофильной цитоплазмой и круглым ядром, в котором преобладает гетерохроматин (структура хроматина зернистая, ядрышки отсутствуют). Полихроматофильные нормобласты – круглые мелкие клетки (с диаметром 6.2 (5.6; 6.5) мкм) с полихромной (слабо базофильной или серо-розовой) цитоплазмой и круглым ядром, в котором преобладает гетерохроматин (структура хроматина плотная, ядрышки отсутствуют) (рис. 1). Оксифильные нормобласты – круглые мелкие клетки (диаметр 5.7 (5.1; 6.3) мкм) с оксифильной цитоплазмой и круглым пикнотичным ядром.

Введение суспензии немодифицированных НЧМ сопровождается снижением относительного количества эритробластов с 1 по 40 сут, базофильных и



Рис. 1. Гемопоэтические клетки костного мозга крысы после внутривенного введения магнитолипосом через 7 (*a*) и 40 сут (*б*). Показаны: 1 – миелобласт, 2 – нейтрофильный промиелоцит, 3 – нейтрофильный миелоцит, 4 – нейтрофильный метамиелоцит, 5 – палочкоядерный нейтрофил, 6 – сегментоядерный нейтрофил, 7 – полихроматофильный нормобласт, 8 – лимфоцит, 9 – моноцит. Окраска азур II-эозином.



Рис. 2. Динамика относительного количества клеток (%) эритроцитарного дифферона в костном мозге крыс экспериментальных групп в течение 120 сут. Здесь и на рис. 3 и 4: показаны значения медиан (Me), а также нижнего (Q_{25}) и верхнего (Q_{75}) квартилей; *а* – отличие (P < 0.05, критерий Манна–Уитни) от соответствующего показателя крыс интактной группы, δ – отличие от соответствующего показателя крыс после введения немодифицированных НЧМ (P < 0.05, критерий Манна–Уитни), *в* – отличие от показателя предыдущего срока этой же группы (P < 0.05, критерий Вилкоксона).

оксифильных нормобластов — с 1 по 120 сут, а полихроматофильных нормобластов — до 14 сут включительно по сравнению с аналогичными показателями интактных крыс. Введение суспензии магнитолипосом вызывает аналогичные, но менее продолжительные изменения эритроцитарного дифферона с полной нормализацией показателей к 14 сут эксперимента.

Динамика относительного количества клеток эритроцитарного дифферона в костном мозге крыс экспериментальных групп представлена на рис. 2.

Дифферон гранулоцитов на мазках костного мозга крыс представлен (в порядке дифференцировки): миелобластами, промиелоцитами, миелоцитами, метамиелоцитами, палочкоядерными гранулоцитами и сегментоядерными гранулоцитами (нейтрофилами, эозинофилами и базофилами). Миелобласты – округлые клетки (диаметр 18.7 (17.4; 19.4) мкм) с крупным круглым ядром, в котором преобладает эухроматин (структура хроматина сетчатая, содержится 1-2 ядрышка) и базофильной цитоплазмой, в которой могут присутствовать единичные азурофильные гранулы (рис. 1). Промиелоциты – крупные округлые клетки (диаметр 19.1 (18.5; 20.7) мкм) с крупным круглым, центрально расположенным ядром, содержащим 1-2 ядрышка. Хроматин имеет более грубую структуру, чем у миелобласта. В выраженной слабо базофильной цитоплазме присутствует азурофильная зернистость и появляются специфические гранулы, которые у нейтрофильных промиелоцитов представлены мелкими (пылевидными) фиолетовыми (базофильными) гранулами (нейтрофильной зернистостью) (рис. 1), у эозинофильных промиелоцитов – крупными красными (оксифильными, эозинофильными) гранулами (эозинофильной зернистостью), а у базофильных промиелоцитов крупными фиолетовыми гранулами (базофильной зернистостью).

Предшественники нейтрофилов и эозинофилов со стадии промиелоцита представлены двумя формами клеток: со сферическими и кольцевидными ядрами. Нейтрофильные миелоциты – округлые клетки (диаметр 13.4 (12.4; 15.0) мкм) с бобовидным или торовидным, эксцентрично расположенным ядром (структура хроматина грубая, ядрышки отсутствуют) и голубовато-розовой цитоплазмой с хорошо выраженной нейтрофильной зернистостью. Азурофильная зернистость отсутствует (рис. 1). Нейтрофильные метамиелоциты – округлые клетки (диаметр 11.8 (10.7; 12.6) мкм) с бобовидным или кольцевилным, эксцентрично расположенным ялром (структура хроматина глыбчатая, ядрышки отсутствуют) в розовой цитоплазме выражена нейтрофильная зернистость (рис. 1). Палочкоядерные нейтрофилы – округлые клетки (диаметр 9.2 (8.6; 10.7) мкм) с незамкнутым или кольцевидным несегментированным ядром (рис. 1). Сегментоядерные нейтрофилы крыс всех 4-х групп представляют собой округлые клетки (диаметр 10.5 (9.2; 11.1) мкм) с сегментированным незамкнутым гиперхромным ядром, имеющим 4-5 перетяжек. Цитоплазма нейтрофилов слабо оксифильна и имеет нейтрофильную зернистость (рис. 1).

Дифферон нейтрофила. Введение суспензии немодифицированных НЧМ вызывает увеличение относительного количества клеток дифферона нейтрофила (миелобластов, промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов и сегментоядерных нейтрофилов) с 1 по 14 сут, а также сопровождается увеличением относительного количества палочкоядерных нейтрофилов в течение всего эксперимента. При этом введение суспензии магнитолипосом сопровождается увеличением относительного количества всех клеток этого дифферона с 1 по 7 сут, за исключением нейтрофильных миелоцитов, повышение количества которых сохраняется до 14 сут.

Динамика относительного количества клеток дифферона нейтрофила в костном мозге крыс в течение 120 сут у животных экспериментальных групп представлена на рис. 3.

Дифферон эозинофила. В мазках костного мозга крыс всех экспериментальных групп определяли эозинофильные миелоциты, эозинофильные метамиелоциты, палочкоядерные эозинофилы и сегментоядерные эозинофилы. Палочкоядерные эозинофилы (диаметр10.1 (9.2; 11.8) мкм) представлены клетками с незамкнутым или кольцевидным несегментированным ядром. Сегментоядерные эозинофилы (диаметр 11.0 (9.8; 12.2) мкм) имеют незамкнутое сегментированное гиперхромное ядро. Оба типа клеток имеют множество крупных оксифильных гранул в цитоплазме. Увеличение относительного количества клеток дифферона эозинофила, сохраняющееся с 1 по 14 сут эксперимента, отмечали только после введения суспензии немодифицированных НЧМ (рис. 4).

Дифферон базофила. Клетки дифферона базофила в мазках костного мозга крыс в течение эксперимента выявляли в небольшом количестве. Они представлены исключительно сегментоядерными базофилами. Введение суспензии немодифицированных НЧМ и магнитолипосом не сопровождается изменением относительного содержания клеток дифферона базофила.

Динамика относительного количества клеток дифферонов эозинофила и базофила в костном мозге крыс в течение эксперимента у животных исследованных групп показана на рис. 4.

Дифферон моноцита. Моноциты костного мозга крыс всех экспериментальных групп представлены крупными округлыми клетками (D 11.0 (10.2; 14.19) мкм) с бобовидным или овальным ядром, в котором доминирует эухроматин. Цитоплазма моноцитов слабо базофильна и содержит единичные крупные азурофильные гранулы (рис. 1). В мазках костного мозга присутствуют макрофаги (диаметр 15.7 (15.2; 16.5) мкм), количество которых не отличается у крыс экспериментальных групп. Введение суспензии немодифицированных НЧМ вызывает увеличение относительного количества клеток дифферона моноцита с 1 по 14 сут, при этом введение суспензии магнитолипосом сопровождается увеличением этого показателя с 1 по 7 сут (рис. 4).

Дифферон лимфоцита. Лимфоциты костного мозга крыс являются мелкими круглыми клетками (диаметр 6.9 (6.2; 7.6) мкм) с крупным гиперхромным округлым ядром, которое окружено узкой полоской базофильной цитоплазмы (рис. 1).



Рис. 3. Динамика относительного количества клеток (%) дифферона нейтрофила в костном мозге крыс экспериментальных групп в течение 120 сут.



Рис. 4. Динамика относительного количества клеток (%) моноцитарного и лимфоцитарного дифферонов, а также дифферонов эозинофила и базофила в костном мозге крыс экспериментальных групп в течение 120 сут.

Введение суспензии немодифицированных НЧМ сопровождается снижением относительного количества клеток дифферона лимфоцита с 1 по 120 сут, тогда как введение суспензии магнитолипосом вызывает снижение относительного количества клеток этого дифферона лишь с 1 по 7 сут (рис. 4).

Плазматические клетки также определяли в костном мозге крыс всех экспериментальных групп. Они представляют собой округлые клетки (диаметр 11.0 (10.6; 12.8) мкм) с базофильной цитоплазмой и мелким эксцентрично лежащим ядром, гетерохроматин которого формирует радиальные тяжи. Мы не наблюдали изменения их относительного количества у крыс в течение эксперимента ни в одной из экспериментальных групп.

Динамика относительного количества клеток дифферонов моноцита и лимфоцита в костном мозге крыс 1-4 экспериментальных групп в течение 120 сут представлена на рис. 4.

Мегакариоциты крыс всех 4-х групп в течение эксперимента представлены крупными клетками (с диаметром 51.5 (39.3; 61.4) мкм), имеющими неправильную форму, крупное дольчатое ядро и выраженную базофильную цитоплазму, которая заполнена мелкими оксифильными гранулами. Относительное количество мегакариоцитов у крыс не меняется в течение эксперимента, не отличается между экспериментальными группами и составляет 0.55%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Костный мозг является основным органом кроветворения в постнатальном периоде развития, обеспечивающим формирование эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, а также тучных клеток, миелоидных и лимфоидных дендритных клеток (Paik et al., 2015; Mu et al., 2017).

Ввиду использования НЧМ в биомедицинских исследованиях, представляется важной оценка их биосовместимости, обязательным этапом изучения которой являются исследования на организменном уровне. Изучение распределения НЧМ в организме экспериментальных животных показали, что значительная доля НЧМ накапливается в органах с развитой системой мононуклеарных фагоцитов (МНФ), включая костный мозг. Влияние НЧМ на гемопоэтические клетки костного мозга активно изучается в связи с перспективой применения этого вида наноматериала для диагностики и лечения опухолевых и инфекционных (например, кандидоза, аспергиллеза, криптококкоза) заболеваний костного мозга (Dadachova, 2013; Mu et al., 2017).

Изучение гемосовместимости НЧМ и магнитолипосом на их основе, предназначенных для внутривенного введения, является обязательным и необходимым этапом исследования их биосовместимости (Wu et al., 2010). Показано, что моноциты и макрофаги способны к цитоплазматическому метаболизированию НЧМ и депонированию образовавшихся ионов железа в комплексе с ферритином (Wu et al., 2010, 2014; Kelly et al., 2011; Chen et al., 2018).

В водных растворах немодифицированные НЧМ часто подвергаются агрегации. Нанесение на поверхность НЧМ покрытия увеличивает их седиментационную устойчивость, время циркуляции в крови и биосовместимость (Chen et al., 2018). Покрытие и размер частиц влияют на их биораспределение, период полувыведения и клеточное поглощение: крупные НЧМ (более 60 нм) быстро фагоцитируются клетками системы МНФ печени и селезенки (до 75%) от дозы), тогда как мелкие НЧМ (менее 60 нм) дольше циркулируют в крови и имеют больше возможностей для проникновения в иные клетки (Wu et al., 2010; Couto et al., 2015).

При введении НЧМ в кровь они взаимодействуют с белками плазмы, что может сопровождаться гемолизом, активацией системы комплемента или свертывающей системы. Взаимодействие НЧМ с клетками влияет на пролиферацию, секрецию, клеточную гибель, метаболическую активность и т.д. Действуя на гемопоэтические клетки костного мозга, НЧМ опосредованно влияют на иммунную систему (Gaharwar et al., 2020).

Выраженные побочные эффекты, связанные с применением препаратов для лечения неопухолевых и опухолевых заболеваний костного мозга, существенно ограничивают их применение. Разработка систем адресной доставки лекарственных средств в костный мозг способствует повышению их эффективности и снижению терапевтической дозы препаратов, предназначенных для лечения заболеваний костного мозга (острой и хронической лейкемии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома и др.) (Braham et al., 2018; Maladkar et al., 2020). Эффективность лекарств при лечении злокачественных новообразований костного мозга довольно низкая вследствие их быстрого метаболизма и клиренса. Большая часть системно введенных лекарственных препаратов метаболизируется, выволится почками или накапливается в других органах. Эффективность целевой доставки лекарственного препарата зависит от размера, заряда, формы и других характеристик поверхности носителя (Kelly et al., 2011; Mu et al., 2017; Garcia-Pinel et al., 2020). Липосомы, как носители лекарств способны инкапсулировать макромолекулярные терапевтические агенты и позволяют легко модифицировать свою поверхность для обеспечения оптимальных фармакокинетических свойств (Mu et al., 2017).

В этой связи значительные усилия исследователей сосредоточены на оценке токсичности НЧМ іп *vitro*. Так, оценка токсичности НЧМ на первичных культурах гемопоэтических клеток условно здоровых доноров показала, что в диапазоне концентраций 5–100 мг/мл они не являются токсичными (Dadachova, 2013).

491

В то время как биоразлагаемые наночастицы практически лишены токсичности в отношении костного мозга, наночастицы металлов и оксидов металлов различаются по своему воздействию на костный мозг в зависимости от дозы и пути введения. Следовательно, исследования биологических эффектов должны проводиться отдельно для каждого вида наноматериала, планируемого к биомедицинскому применению (Dadachova, 2013).

Показано, что внутривенное введение наночастиц Fe_2O_3 в дозах 15 или 30 мг на 1 кг массы тела индуцирует апоптоз в гемопоэтических клетках костного мозга и вызывает снижение количества миелокариоцитов у крыс линии Вистар, а также сопровождается дозозависимым ингибированием активности антиоксидантных ферментов и ростом концентрации малонового диальдегида (Gaharwar et al., 2020).

Многократное внутрижелудочное введение крысам линии Вистар с экспериментальной железодефицитной анемией НЧМ и магнитолипосом в дозе 12 мг (Fe)/кг сопровождается увеличением количества эритроцитов и концентрации гемоглобина, а также снижением количества лейкоцитов крови. При этом авторы отмечают отсутствие изменения структуры форменных элементов крови (Fathy et al., 2019).

В ряде работ *in vitro* показано отсутствие влияния наночастиц Fe_2O_3 на экспрессию клеточных маркеров гемопоэтических клеток костного мозга и отсутствие цитотоксичности (Paik et al., 2015).

Противоречивость сведений о биологических эффектах НЧМ объясняется широкой вариативностью их физико-химических параметров: размера, заряда, площади удельной поверхности, варианта поверхностной модификации, типа покрытия и др. Свойства поверхности (типа модификации или покрытия) сильно влияют на уровень цитотоксичности НЧМ (Paik et al., 2015; Chen et al., 2018).

Культивирование эритроцитов с НЧМ приводит к повреждению плазмолеммы эритроцитов, изменению их морфометрических параметров, сдвигу эритрограммы в сторону предгемолитических форм. Имеет место прямое взаимодействие НЧМ с плазмолеммой эритроцитов и изменение поверхностного заряда мембраны эритроцитов, что способствует их агрегации (Плескова и др., 2017).

НЧМ проникают в мононуклеарные клетки по механизму эндоцитоза. При сокультивировании мононуклеарных клеток с НЧМ показано проникновение последних в цитоплазму и накопление их внутри везикул (с диаметром 0.5–3.5 мкм). Проникновение НЧМ сопровождается появлением глубоких инвагинаций кариолеммы, увеличением размеров ядрышек и количества везикул. НЧМ подвергаются фагоцитозу при сокультивировании с клетками костного мозга: например, содержание железа внутри моноцита за 24 ч возрастет от 0.07 до 5 пг (Paik et al., 2015; Chen et al., 2018). Доза НЧМ, которую мы использовали в настоящей работе, выше предполагаемой терапевтической дозы, что способствует выявлению их потенциального токсического влияния. Так, рекомендованная доза препаратов Feridex IV (Berlex Laboratories, Великобритания) и Endorem (Guerbert, США) 0.56 мг/кг массы тела (Ruiz et al., 2015).

Благодаря липидному покрытию, поверхность магнитолипосом можно легко функционализировать для увеличения времени их циркуляции в крови, а также для обеспечения активного нацеливания за счет конъюгации с пептидами или антителами (Soenen et al., 2011). Изготовление магнитолипосом из природных липидов делает эти конструкции биосовместимыми и биодеградируемыми. Наличие липидной оболочки является основной защитой транспортируемых ими лекарственных препаратов от ферментативной деградации и уменьшает их токсичность. Кроме того, магнитолипосомы повышают седиментационную стабильность НЧМ, позволяя им дольше оставаться в циркуляции, что увеличивает их биораспределение. Магнитолипосомы являются наиболее оптимальной системой целевой доставки, которая позволяет увеличить эффективность лекарственного препарата, а также обеспечить его активное или пассивное нацеливание и контролируемое высвобождение с заранее определенной скоростью (Fathy et al., 2019).

Некоторые авторы показали отсутствие прямого негативного воздействия НЧМ на жизнеспособность клеток, однако при повышении внутриклеточного содержания НЧМ возникают функциональные нарушения. Биогенные магнитолипосомы (магнетосомы) бактерий рода *Magnetospirillum* на основе магнетита, LD50 которых составляет 62.7 мг/кг массы тела, при внутривенном введении крысам в дозе 40 мг/кг массы тела не оказывают повреждающего эффекта на клетки костного мозга, печени и почек (Soenen et al., 2011).

НЧМ могут вызывать окислительный стресс, клеточную гибель и воспаление, т.к. участвуют в образовании активных форм кислорода при растворении наночастиц в лизосомах. Повышение концентрации активных форм кислорода может вызвать повреждение ДНК, которое может сопровождаться остановкой пролиферации и клеточной гибелью (Gaharwar et al., 2020).

По результатам цитотоксического теста с трипановым синим совместное культивирование НЧМ (в концентрации 0.3–3 мг/л) с гемопоэтическими клетками костного мозга мышей линии CBA/CaLac в течение 24 ч не вызывает увеличения гибели клеток по сравнению с контролем (Хлусов и др., 2008).

НЧМ индуцируют иммуносупрессию, которая проявляется снижением количества естественных киллерных (NK) лимфоцитов и отношения CD4⁺/CD8⁺-лимфоцитов, а также сопровождается увеличением количества В-лимфоцитов (Gaharwar et al., 2020). Наша работа продемонстрировала, что магнитолипосомы на основе НЧМ не вызывают повреждения гемопоэтических клеток костного мозга крыс, а их применение сопровождается обратимыми количественными изменениями миелограмм. Несмотря на длительное изучение биологических свойств НЧМ, многие стороны их влияния на организм (гемосовместимость, цитотоксичность) неоднозначны и требуют индивидуального исследования в зависимости от размера, формы и типа покрытия НЧМ.

Проведенное исследование позволяет рекомендовать использование магнитолипосом на основе НЧМ в качестве магниточувствительной системы для доставки лекарственных препаратов, которая не обладает повреждающим действием в отношении гемопоэтических клеток костного мозга.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Президента Российской Федерации (государственной поддержки молодых российских ученых; решение Конкурсной комиссии Минобрнауки РФ, протокол № 4 от 27.12.2019 г.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание крыс и манипуляции с ними проведены в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных", с соблюдением требований Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных животных. Протокол исследования одобрен решением локального этического комитета Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России № 4253 от 28.09.2015 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Плескова С.Н., Горностаева Е.Е., Крюков Р.Н., Боряков А.В., Зубков С.Ю. 2017. Изменения архитектоники и морфометрических характеристик эритроцитов под воздействием наночастиц магнетита. Цитология. Т. 59. № 12. С. 874. (Pleskova S.N., Gornostaeva E.E., Kryukov R.N., Boryakov A.V., Zubkov S.Yu. 2018. Changes in the architectonics and the morphometric characteristics of erythrocytes under the influence of magnetite nanoparticles. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 12. P. 127).
- Хлусов И.А., Седой В.С., Найден Е.П. 2008 Влияние магниточувствительных наноразмерных частиц на пул стволовых кроветворных клеток *in vitro*. Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии. Т. 6. № 4. С. 1247. (*Khlusov I.A., Sedoy V.S., Nayden E.P.* 2008. The effect of magnetically sensitive nanoscale particles on the pool of

hematopoietic stem cells *in vitro*. Nanosystems, nanomaterials, nanotechnologies. V. 6. № 4. P. 1247.)

- *Bolliger A.P.* 2004. Cytologic evaluation of bone marrow in rats: indications, methods, and normal morphology. Veterinary Clinical Pathol. V. 33. P. 58.
- Braham M.V., Deshantri A.K., Minnema M.C., Öner F.C., Schiffelers R.M., Fens M.H., Alblas J. 2018. Liposomal drug delivery in an *in vitro* 3D bone marrow model for multiple myeloma. Int. J. Nanomed. V. 13. P. 8105.
- *Chen S., Chen S., Zeng Y., Lin L., Wu C., Ke Y., Liu G.* 2018. Size-dependent superparamagnetic iron oxide nanoparticles dictate interleukin-1β release from mouse bone marrow derived macrophages. J. Appl. Toxicol. V. 38. P. 978.
- Couto D., Freitas M., Vilas-Boas V., Dias I., Porto G., Arturo Lopez-Quintela M., Rivas J., Freitas P., Carvalho F., Fernandes E. 2014. Interaction of polyacrylic acid coated and noncoated iron oxide nanoparticles with human neutrophils. Toxicol. Letters. V. 225. P. 57.
- Couto D., Sousa R., Andrade L., Leander M., Lopez-Quintela M.A., Rivas J., Freitas P., Lima M., Porto G., Porto B., Carvalho F., Fernandes E. 2015. Polyacrylic acid coated and non-coated iron oxide nanoparticles are not genotoxic to human T-limphocytes. Toxicol. Letters. V. 234. P. 67.
- Dadachova E. 2013. The Effects of nanoparticles on bone marrow cells In: Handbook of immunological properties of engineered nanomaterials. World scientific Publishing. Singapore. P. 433.
- Fathy M.M., Fahmy H.M., Balah A.M.M., Mohamed F.F., Elshemey W.M. 2019. Magnetic nanoparticles-loaded liposomes as a novel treatment agent for iron deficiency anemia: in vivo study. Life Science. V. 234. P. 1167.
- *Gaharwar U.S., Kumar S., Rajamani P.* 2020. Iron oxide nanoparticle-induced hematopoietic and immunological response in rats. Royal Soc. Chem. V. 10. P. 35753.
- Garcia-Pinel B., Jabalera Y., Ortiz R., Cabeza L., Jimenez-Lopez C., Melguizo C., Prados J. 2020. Biomimetic magnetoliposomes as oxaliplatin nanocarriers: *in vitro* study for potential application in colon cancer. Pharmaceutics. V. 12. P. 589.
- *Kelly C., Jefferies C., Cryan S.-A.* 2011. Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages. J. Drug Delivery. V. 2011. P. 727241.

https://doi.org/10.1155/2011/727241

- Maladkar M., Sankar S., Yadav A. 2020. A novel approach for iron deficiency anemia with liposomal iron: concept to clinic. Journal of Biosciences and Medicines. V. 8. P. 27.
- Mu C.-F., Shen J., Liang J., Zheng H.-S., Xiong Y., Wei Y.-H., Li F. 2017. Targeted drug delivery for tumor therapy inside the bone marrow. Biomaterials. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.029
- Paik S.-Y.-R., Kim J.-S., Shin S.J., Ko S. 2015. Characterization, quatification, and determination of the toxicity of iron oxide nanoparticles to the bone marrow cells. Int. J. Mol. Sci. V. 16. P. 22243. https://doi.org/10.3390/ijms160922243
- Ruiz A., Ali L.M.A., Caceres-Velez P.R., Cornudella R., Gutierrez M., Moreno J.A., Pinol R., Palacio F., Fascineli M.L., de Azevedo R.B., Morales M.P., Millan A. 2015. Hematotoxic-

ity of magnetite nanoparticles coated with polyethylene glycol: *in vitro* and *in vivo* study. Toxicol. Res. V. 4. P. 1555.

Soenen S.J., Velde G.V., Ketkar-Atre A., Himmelreich U., De Cuyper M. 2011. Magnetoliposomes as magnetic resonance imaging contrast agent. WIREs Nanomed. Nanobiotechnol. V. 3. P. 197.

Wu Q.H., Jin R.R., Feng T., Liu L., Yang L., Tao Y.H., Anderson J.M., Ai H., Li H. 2014. Iron oxide nanoparticles and induced autophagy in human monocytes. Toxicol. Letters. V. 225. P. 57.

Wu W., Chen B., Cheng J., Wang J., Xu W., Liu L., Xia G., Wei H., Wang X., Yang M., Yang L., Zhang Y., Xu C., Li J. 2010. Biocompatibility of Fe₃O₄/DNR magnetic nanoparticles in the treatment of hematologic malignancies. Int. J. Nanomed. V. 5. P. 1079.

The Structure and Dynamics of the Number of Hematopoietic Cells of Rat Bone Marrow after Intravenous Administration of Magnetoliposomes

I. V. Milto^{*a*, *b*, *, N. M. Shevtsova^{*a*}, V. V. Ivanova^{*a*}, O. N. Serebrjakova^{*a*}, R. M. Takhauov^{*a*, *b*}, and I. V. Suhodolo^{*a*}}

^aSiberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia ^bSeversk Biophysical Research Centre, Seversk, 636013 Russia *e-mail: milto bio@mail.ru

The use of magnetite nanoparticles in biology and medicine is steadily growing, while some aspects regarding their safety remain unclear. For example, magnetoliposomes based on magnetite nanoparticles are a promising basis for the creation of new diagnostic and therapeutic drugs. Using hematological methods, a comparative assessment of changes in the number of hematopoietic bone marrow cells in sexually mature mongrel rats was carried out for 120 days after intravenous administration of a suspension of unmodified nanoparticles of magnetite (NPM) and magnetoliposomes based on them. The features of the structure of hematopoietic cells of the main lineages of the bone marrow (erythroid, granulocytic, monocytic, lymphocytic and megakaryocytic) are described, as well as the dynamics of changes in their number during the experiment. The absence of influence of magnetoliposomes based on magnetite nanoparticles on the structure and number of hematopoietic cells of the studied rat bone marrow lineages was established. The absence of a negative effect of magnetoliposomes based on magnetite nanoparticles on the structure of hematopoietic cells in the bone marrow allows us to consider these nanostructures as a promising magnetically controlled carrier for creating modern systems for targeted delivery of diagnostic and therapeutic drugs.

Keywords: nanomagnetite, magnetoliposomes, bone marrow, hematopoietic cells rat

УДК 616-092.18

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛИПОЗНОЙ ТКАНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПОЛИПОЗНОМ РИНОСИНУСИТЕ

© 2022 г. А. Н. Горшков^{1, 2,} *, Е. А. Варюшина³, Е. В. Безрукова⁴, М. А. Афлитонов⁵, А. С. Симбирцев⁶

¹Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, 197376 Россия

²НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, 197341 Россия

³Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

⁴Кафедра оториноларингологии Северо-западного государственного медицинского университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, 191015 Россия

⁵Оториноларингологическое отделение клинической больницы Балтийского федерального университета им. Канта, Калининград, 236041 Россия

⁶Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, 197110 Россия

*E-mail: angorsh@yahoo.com

Поступила в редакцию 27.03.2022 г. После доработки 27.04.2022 г. Принята к публикации 05.05.2022 г.

Хронический риносинусит (ХРС) – сложное воспалительное заболевание, широко распространенное во всем мире и характеризующееся большой длительностью лечения. Лежащее в основе хронического полипозного риносинусита (ХПРС) воспаление слизистой оболочки околоносовых пазух приводит к множественным патоморфологическим изменениям. ХПРС связан с ремоделированием нормальных тканей. включая их деградацию и субэпителиальный фиброз. Гистопатологические исследования дают важнейшую информацию об особенностях протекания воспалительного процесса в слизистых оболочках околоносовых пазух. Ультраструктурные исследования полипозной ткани позволяют глубже понять механизмы развития патологических процессов в данных структурах на клеточном и субклеточном уровнях. Цель данной работы: выявление патогенетических особенностей полипозного воспалительного процесса при контролируемой и неконтролируемой формах течения ХПРС. Основные задачи: исследование процессов воспаления и ремоделирования в полипозной ткани на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях при данных формах заболевания. Материалом для исследований послужили биопсии полипозной ткани из решетчатого лабиринта (операционный материал), полученные у пациентов с контролируемой и неконтролируемой формами ХПРС. Гистологический анализ выполняли на срезах, окрашенных гематоксилином Карацци и эозином. Локализацию маркера макрофагов CD68 в полипозной ткани исследовали методом непрямой иммуногистохимии. Ультраструктурные исследования проводили с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Во всех исследованных случаях наблюдали патогистологические изменения, как в эпителиальном слое, так и в соединительно-тканной строме полипа. Было показано, что при полипозе нарушается целостность эпителиального слоя, происходит его гиперплазия и метаплазия. Субэпителиально и в строме полипа выявлены фиброз, отек, отложения коллагена и лейкоцитарная инфильтрация. По результатам иммуногистохимического исследования CD68-позитивные макрофаги детектируются в полипозной ткани как внутри- и субэпителиально, так и в соединительно-тканной строме полипа. Электронно-микроскопическое исследование образцов полипозной ткани выявило множественные патологические изменения, в том числе нарушения целостности плотных контактов в эпителии полипов, деструктивные изменения ресничек эпителиоцитов, инфильтрацию полипозной ткани эозинофилами и плазматическими клетками. Таким образом, анализ патоморфологической картины полипов позволил нам выявить особенности протекания процессов воспаления и ремоделирования в полипозной ткани при контролируемой и неконтролируемой формах заболевания. В результате проведенного комплексного исследования на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях были обнаружены изменения в структуре слизистой оболочки полипов.

Ключевые слова: хронический полипозный риносинусит, респираторный эпителий, лейкоцитарная инфильтрация, макрофаги, телоциты

DOI: 10.31857/S0041377122050042

Хронический риносинусит (ХРС) – сложное воспалительное заболевание, которое затрагивает значительную часть населения во всем мире и связано с большой длительностью лечения. Лежащее в основе хронического полипозного риносинусита (ХПРС) воспаление слизистой оболочки околоносовых пазух приводит к множественным патофизиологическим и патоморфологическим изменениям, включая дисфункцию эпителия, ремоделирование тканей, их разрушение и субэпителиальный фиброз (Meng et al., 2013; Kuhar et al., 2017). Классификация, этиология и патогенез ХПРС до конца не выяснены, поэтому изучение этих аспектов остается актуальным. В 2003 г. была предложена классификация ХПРС, при которой фенотипы полипозного риносинусита определены по наиболее вероятной причине возникновения заболевания (Пискунов, 2003; Пискунов, 2019). В международном Европейском согласительном документе по риносинуситу и назальному полипозу (EPOS, 2012) выделили два фенотипа ХРС – без полипов и с полипами (ХПРС) (Fokkens et al., 2012). В свою очередь, среди ХПРС дифференцируют формы с эозинофильными или нейтрофильными полипами. В 2020 г. в рекомендациях EPOS предложено разделение ХПРС на первичный и вторичный, при этом диффузные первичные ХПРС по характеру доминирующего эндотипа делятся на Th2- и не-Th2-типы (Fokkens et al., 2020). Th-2-тип иммунного ответа при ХПРС связан с эозинофильным воспалением, обильной продукцией иммуноглобулина Е (IgE), гистамина и Th-2-цитокинов (IL-5, IL-13) (Heffler et al., 2018; Ryu, Kim, 2019; Laidlaw et al., 2021). В 2021 г. на Европейском форуме по изучению аллергий и заболеваний дыхательных путей (EUFOREA) для оценки эффективности (контроля) лечения было предложено дифференцировать контролируемую, частично контролируемую и неконтролируемую формы течения ХПРС (Hellings et al., 2013; Toma, Hopkins, 2016; Bachert et al., 2021). При неконтролируемой форме течения ХПРС наблюдается резистентность к интраназальной кортикостероидной терапии. Причина развития неконтролируемой формы течения ХПРС (и неэффективности лечения) остается неизвестной, вот почему поиск патогенетических механизмов, играющих роль при неблагоприятном течении заболевания, является важной задачей.

Гистопатологические исследования являются важнейшим источником информации об особенностях протекания воспалительного процесса в слизистых оболочках носа и околоносовых пазух (Kim et al., 2007; Kuhar et al, 2017; Shay, Tajudeen, 2018). Такие данные дают новые фундаментальные знания о патогенетических механизмах ХПРС. Кроме того, в клинической практике они обладают прогностической ценностью и являются необходимыми при оценке результатов терапии. Морфологические исследования составляют один из общепризнанных методов изучения местного воспалительного процесса при ХРС и полипозе. Чаще всего они включают в себя гистологическое и иммуногистохимическое исследование операционного материала или тканевых биопсий полипов (Kuhar et al, 2017; Руо, Kim, 2021; Viksne et al., 2021). Имеется также высокий интерес исследователей к анализу ультраструктурной организации всего комплекса слизистой оболочки носа и околоносовых пазух при ХПРС (Ильинская, Захарова, 2001, 2005; Li et al., 2014; Khurana et al., 2020). Электронно-микроскопические исследования полипозной ткани позволяют глубже понять механизмы развития патологических процессов в данных структурах. Цель данной работы: выявление патогенетических особенностей полипозного воспалительного процесса при контролируемой и неконтролируемой формах течения ХПРС. Основные задачи: исследования процессов воспаления и ремоделирования в полипозной ткани на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях при данных формах заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Биопсийный материал. Материалом для исследований послужили биопсии полипозной ткани из решетчатого лабиринта (операционный материал), полученные у пациентов с ХПРС с контролируемой и неконтролируемой формами течения патологического процесса.

I группа. ХПРС (контролируемая форма) — 10 человек. Критерии включения: длительность заболевания более 5-ти лет, отсутствие оперативного лечения или одно оперативное лечение в течение болезни, уменьшение размеров полипозной ткани при применении интраназальных глюкокортикостероидов (ИНГКС) в течение нескольких месяцев, редкие рецидивы (1 раз в 5 лет) или их отсутствие.

II группа. ХПРС (неконтролируемая форма) – 15 человек (в том числе у 3 человек была сопутствующая БА, у 4 человек – астматическая триада (БА + + непереносимость НПВС + полипоз). Данная форма резистентна к терапии ИНГКС. Критерии включения: длительность заболевания более 5-ти лет, неоднократные оперативные вмешательства (от 2 и более раз), повторные курсы системной кортикостероидной терапии (не менее 1 раза в год) и частые рецидивы (через 1–2 г. после оперативного вмешательства).

Принятые сокращения: БА – бронхиальная астма; БМ – базальная мембрана; ИНГКС – интраназальные глюкокортикостероиды; Мф – макрофаги; НПВС – нестероидные противовоспалительные средства; ПФ – параформальдегид; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; ХПРС – хронический полипозный риносинусит; ХРС – хронический риносинусит; шЭПР – шероховатый эндоплазматический ретикулум; ЕРОS – Европейский согласительный документ по риносинуситу и назальному полипозу; EUFOREA – Европейский форум по изучению аллергий и заболеваний дыхательных путей; IgE – иммуноглобулин Е; IL – интерлейкин; IFN γ – интерферон γ ; Th-1 – T-хелперы 1 типа; Th-2 – T-хелперы 2 типа; TNF α – фактор некроза опухоли α .

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование. Биоптаты полипозной ткани разрезали на кусочки $5 \times 5 \times 5$ мм, фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида (ПФ) (Sigma, США) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), рН 7.2–7.4 в течение 40 мин при 4°С. Далее образцы отмывали в ФСБ, пропитывали в 20%-ном растворе сахарозы в ФСБ, помещали в среду для замораживания тканей ОСТ (Sakura, Япония) и замораживали в жидком азоте. Криостатные срезы толщиной 6 мкм были получены на криостате СМ 1510-1 (Leica, Германия), срезы монтировали на предметные стекла Super Frost Plus (Mentzel, Германия).

Для гистологического исследования срезы на предметных стеклах окрашивали гематоксилином Карацци и эозином (Биовитрум, Россия), обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в бальзам под покровное стекло.

Локализацию CD68 на срезах исследовали методом непрямой иммуногистохимии. В качестве первых антител использовали мышиные моноклональные антитела к человеческому CD68 MA5-13324 (Thermo fisher, США). Первичные антитела разводили в дилюэнте для антител Antibody Diluent with Background Reducing Components Code S3022B (Dako. Дания), рабочие разведения антител были подобраны в предварительных экспериментах. В случае отрицательного контроля на срезы наносили дилюэнт без первичных антител. После инкубации с антителами проводили отмывку в отмывочном буфере, содержащем 50 мМ TBS (50 mM TBS IHC Wash Buffer + Tween®; Cell Marque, США) 2 раза по 10 мин. Для визуализации иммуномечения использовали систему детекции N-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI) Universal Immuno-peroxidase Polymer (Nichirei biosciences inc, Япония), а в качестве окрашиваюшего pearenta – DAB (DAB Kit; Cell Marque, США) в соответствии с инструкциями производителей. Срезы докрашивали гематоксилином Каррацци и заключали в среду Clear Mount (GeneTex, США).

Гистологические и иммуногистохимические препараты изучали в оптическом микроскопе DMLB со встроенной камерой DC300 (Leica Microsystems AG) на нескольких увеличениях объектива ($\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 100$).

Электронная микроскопия. Немедленно после выделения образцы полипозной ткани были фрагментированы на небольшие кусочки (1-2 мм) и зафиксированы в 2.5%-ном растворе глютарового альдегида на ФСБ в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего промыты в 3-х сменах ФСБ. Далее была выполнена постфиксация материала в 1%-ном растворе тетроксида осмия на том же буфере, при той же температуре в течение 1 ч. После фиксации объекты были обезвожены в серии растворов этанола возрастающей концентрации (30, 50, 70, 96, 100%), пропитаны ацетоном и заключены в эпоксидную

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

смолу Эпон. Полимеризация эпоксидной смолы проходила в течение 24 ч в термостате при температуре 56°С.

На ультрамикротоме Leica UC7 были получены ультратонкие срезы исследуемых образцов полипов (толщина срезов 50–70 нм). Срезы были собраны на медные сетки для электронной микроскопии. Сетки со срезами были отконтрастированы в спиртовом растворе уранилацетата и водном растворе цитрата свинца. Электронно-микроскопическое исследование срезов выполнено в микроскопе JEOL JEM 1011. Цифровые электронные микрофотографии были получены с использованием камеры Morada (Digital Imaging Solutions Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологическая характеристика особенностей воспалительной картины при полипозе носа. На рис. 1 (a-r) представлены микрофотографии срезов полипов слизистой оболочки клеток решетчатого лабиринта. При контролируемой форме течения ХПРС (І группа) хорошо виден многорядный цилиндрический мерцательный эпителий, покрывающий полип (рис. 1*a*). На апикальной части реснитчатых эпителиальных клеток наблюдается гипертрофия ресничек. Бокаловидные клетки гипертрофированы, визуализируются вакуоли, заполненные слизью. На некоторых участках наблюдается отрыв эпителия до базального слоя, а на некоторых зонах, расположенных в центральной части полипа, эпителий отсутствует. При неконтролируемой форме ХПРС (II группа) на срезах полипа в эпителии наблюдается меньшее количество клеток с ресничками, чем в предыдущем случае (рис. 16). На некоторых участках эпителия есть гипертрофированные бокаловидные клетки, содержащие вакуоли. Наблюдаются признаки дистрофических изменений эпителия (отрыв апикальной части и разрушение клеток). В строме наблюдаются признаки сильного отека за счет повышенного содержания воды в ткани полипа (рис. 16). Умеренная инфильтрация воспалительными иммунными клетками представлена эозинофилами, лимфоцитами, плазматическими клетками. При ХПРС, протекающем на фоне БА, на препаратах наблюдаются значительные изменения эпителия (рис. 1в). Респираторный эпителий сохранен на некоторых участках, однако местами видны зоны, на которых происходит отрыв апикальной части клеток. Наблюдаются ранние признаки метаплазии респираторного эпителия. В строме полипа обращает на себя внимание большое количество гипертрофированных слизистых желез, визуализируется умеренная инфильтрация воспалительными клетками (рис. 1в). При ХПРС на фоне астматической триады были выявлены наиболее значительные изменения эпителиальной оболочки полипов (рис. 1г). Эпителий из многорядного становится многослойным, часть клеток не имеют связи с базальной мембраной, клетки эпите-



Рис. 1. Гистологическое исследование биоптатов полипозной ткани. $a - X\Pi PC$, контролируемая форма; $\delta - X\Pi PC$, неконтролируемая форма, *стрелки* – отек в строме полипа; $e - X\Pi PC + БА$, *головки стрелок* – слизистые железы; $e - X\Pi PC + аст-матическая триада. Обозначения: БК – бокаловидные клетки, РК – реснитчатые клетки, ЭП – эпителий, покрывающий полип. Увеличение объектива: <math>40 \times (a) \times (20 \times (\delta - e)$.

лия утрачивают реснички, не наблюдаются бокаловидные клетки, продуцирующие слизь. На срезах отчетливо визуализируется диффузная мононуклеарная инфильтрация собственного слоя слизистой оболочки. Таким образом, анализ патоморфологической картины полипов позволяет выявить различия в выраженности изменений покровного эпителия полипозной ткани и качественном составе клеток, инфильтрирующих собственный слой слизистой полипов. Для детализации полученных данных, было выполнено иммуногистохимическое исследование с использованием антител против макрофагального маркера CD68.

Иммуногистохимическое исследование полипозной ткани. CD68-положительные клетки в полипозной ткани обладали морфологическими признаками макрофагов: размер около 20 мкм, овальная или звездчатая форма, бобовидное или овальное ядро (рис. 1*a*, *c*). Инфильтрирующие ткани полипа

СD68⁺-макрофаги наблюдались при всех исследованных формах полипоза (рис. 2a-e). Выраженная макрофагальная инфильтрация была выявлена при ХПРС, протекающем на фоне БА, в особенности сопровождающимся астматической триадой (рис. 2e). Распределение CD68⁺-макрофагов в полипозной ткани отличалось следующими особенностями: в пределах эпителиального слоя наблюдалось внутриэпителиальное и субэпителиальное расположение CD68⁺-макрофагов (рис. 2a, b). В соединительнотканной строме полипа макрофаги обнаруживались в сосудах или около них (рис. 2b), а также иногда располагались в ткани вне связи с сосудами (рис. 2b-e).

Электронно-микроскопическое исследование полипов. При проведении электронно-микроскопического исследования образцов полипов нами установлено, что в некоторых участках исследованных полипов изолирующие плотные контакты между соседними клетками эпителия не сформированы.



Рис. 2. Иммуногистохимическое выявление CD68⁺-макрофагов в полипозной ткани. *a* – Внутриэпителиальная локализация макрофагов при контролируемой форме XПРС. δ – Макрофаги в соединительно-тканой строме полипа (*стрелка в центре*) в кровеносном сосуде и рядом (*стрелка справа*) в ткани вне связи с сосудами при XПРС + БА. *в*, *г* – Выраженная инфильтрация макрофагами на срезах полипа при XПРС + астматическая триада. *в* – Субэпителиальная область, *г* – соединительно-тканная строма полипа. *Стрелки* – CD68⁺-макрофаги. *Обозначения*: КРС – кровеносный сосуд, ЭП – эпителий, покрывающий полип. Увеличение объектива: 100× (*a*, *г*) и 20× (*б*, *в*).

Эпителиальные клетки слабо контактируют друг с другом латеральными пальцевидными выростами – интердигитациями, или не контактируют вовсе. В результате, между соседними эпителиальными клетками появляются щели размером около 1 мкм, с обнажением соответствующих участков базальной мембраны. При контролируемой форме ХПРС эпителий полипа в описываемых зонах преимущественно однорядный, форма клеток кубическая, высота эпителия в среднем 6-8 мкм. Реснички на апикальной поверхности эпителиальных клеток, как правило, отсутствуют (рис. 3а). В ряде случаев были отмечены картины некротической гибели эпителиальных клеток; при этом размер щелей между сохранившимися эпителиоцитами возрастает до размера погибшей клетки -5-8 мкм (рис. 36). Следует отметить также, что иногда в полипозном эпителии происходит утрата не только клеточного компонента эпителиального слоя, но и части его БМ. Обнажившийся таким

образом участок соединительно-тканного внеклеточного матрикса может заселяться гранулоцитами из состава инфильтрата (рис. 3*в*). При неконтролируемой форме ХПРС в некоторых эпителиальных клетках цитоплазма заполнена многочисленными плотно упакованными нитями тонофиламентов, что, по-видимому, свидетельствует о начале частичной кератинизации данного эпителия (рис. 3*г*).

Другим возможным вариантом комплексных ультраструктурных перестроек респираторного эпителия полипов является его метаплазия в многослойный плоский эпителий. При неконтролируемой форме ХПРС (ХПРС+БА) количество клеточных слоев в составе такого многослойного эпителия может варьировать от 3 до 7 и более, что, очевидно, отражает степень прогрессии процесса метаплазии. Базальный слой клеток, контактирующий с базальной мембраной, обычно представлен некрупными электронно-плотными уплощенными клетками вы-



Рис. 3. Эпителий полипа при контролируемой (a-e) и неконтролируемой (c) форме XПРС. Трансмиссионная электронная микроскопия. a – Однорядный эпителий со щелями (*стрелки*) между соседними клетками; δ – некроз эпителиальной клетки, с появлением щели в эпителии размером 5–7 мкм; e – частичная утрата базальной мембраны эпителия и миграция гранулоцита в данную область, *стрелки* – нарушение целостности базальной мембраны; e – многочисленные пучки тонофиламентов в цитоплазме эпителиальной клетки. *Обозначения*: БМ – базальная мембрана, ГЦ – гранулоцит, Э – эпителиальная клетка.

сотой около 5 мкм, с правильными овальными ядрами (рис. 4a). Апикальнее в эпителиальном пласте располагаются более крупные (8-10 мкм) клетки неправильной формы, цитоплазма которых часто бывает сильно вакуолизирована (рис. $4a, \delta$). Апикально расположенные клетки в составе многослойного



Рис. 4. Ультраструктура эпителия полипа при неконтролируемой форме ХПРС (ХПРС + БА). Видны ранние этапы метаплазии респираторного эпителия в многослойный плоский эпителий. *а*, *б* – В апикально расположенных эпителиальных клетках выявляются многочисленные базальные тельца ресничек, но сами реснички (Р) встречаются редко. *в* – Частичная утрата плазматической мембраны, обнаруживаемая на поперечных срезах ресничек. *Стрелки* – сохранившиеся фрагменты мембраны в ресничках. *Обозначения*: БТ – базальные тельца, БМ – базальная мембрана, МТ – микротрубочки, ФБ – фибробласты.

эпителия полипа часто содержат в цитоплазме многочисленные базальные тельца ресничек (рис. 4a, δ). При этом сами реснички очень редко обнаруживаются на ультратонких срезах (рис. 4δ), что заставляет говорить об их деструкции в рассматриваемом видоизмененном эпителии полипа.

При детальном ультраструктурном анализе срезов немногочисленных выявленных ресничек обнаруживается, что в них сохраняется характерный набор микротрубочек и ассоциированных с ними моторных белков (аксонемный комплекс), однако одновременно частично или почти полностью утрачивается плазматическая мембрана, окружающая ресничку (рис. 4e). При неконтролируемой форме ХПРС (ХПРС + + астматическая триада) в некоторых случаях на ультратонких срезах полипов наблюдаются и более продвинутые стадии метаплазии эпителия в многослойный плоский эпителий, сопровождающиеся увеличением количества слоев клеток до 7 и более, значительным увеличением электронной плотности клеток, массовым кариопикнозом и практически полной деструкцией органоидов цитоплазмы (рис. 5). В составе такого многослойного полипозного эпителия реснички не обнаруживаются.

Электронно-микроскопическое исследование стромы полипа выявило ее активную лейкоцитарную инфильтрацию. Как правило, воспалительные



Рис. 5. Эпителий полипа при неконтролируемой форме ХПРС (ХПРС + астматическая триада). Поздние этапы метаплазии респираторного эпителия в многослойный плоский эпителий (a-e). Наблюдается увеличение числа клеточных слоев, кариопикноз, деструкция органоидов цитоплазмы. *Обозначения*: ЭК – эпителиальные клетки, КП – кариопикноз.

иммунные клетки инфильтрата формируют небольшие кластеры (10–20 клеток) в соединительной ткани полипа, без очевидной ассоциации с кровеносными сосудами (рис. 6a). Популяция лейкоцитов в составе инфильтрата гетерогенна. Значительную ее часть во всех исследованных полипах составляют эозинофилы с сегментированным ядром и многочисленными гранулами в цитоплазме, содержащими кристаллоподобные включения (рис. 6f, e), и плазматические клетки. Плазматические клетки (рис. 62) характеризуются мощным развитием шероховатого эндоплазматического ретикулума (шЭПР).

В собственной пластинке полипов обнаруживается значительное количество кровеносных капилляров (рис. 7*a*). На препаратах визуализируются фенестрации между отдельными эндотелиальными клетками (рис. 7*a*). Также наблюдается истончение эндотелиальной выстилки (рис. 7*a*). Стенки капилляров в составе полипов тесно ассоциированы с сетью тонких удлиненных отростков (телоподий), принадлежащих специализированным периваскулярным интерстициальным клеткам – телоцитам (рис. 7*a*).

В соединительно-тканной строме полипов обнаруживаются также небольшие группы гладкомышечных клеток, окруженных собственной базальной мембраной. Особенностью ультраструктуры гладкомышечных клеток является огромное количество мелких (80–100 нм) пиноцитозных везикул колбовидной формы – кавеол, связанных с плазматической мембраной (рис. 76). В составе полипов присутствуют также слизистые железы, секреторные клетки которых заполнены множеством электронно-прозрачных секреторных гранул (рис. 76).

ОБСУЖДЕНИЕ

Эпителий полости носа в норме служит не только механическим барьером для защиты от факторов окружающей среды, микроорганизмов и токсинов, но также участвует как во врожденном, так и в адаптивном иммунном ответе (Yan et al., 2013). В нормальном эпителии дыхательных путей баланс обновления и дифференцировки клеток регулируется рядом генов и клеточных сигнальных путей. При воспалении слизистой оболочки эпителий повреждается, после чего происходит быстрое ремоделирование, которое может варьировать от эпителиальной гиперплазии до метаплазии бокаловидных кле-



Рис. 6. Лейкоцитарная инфильтрация в строме полипов. *a* – Кластер клеток лейкоцитарного инфильтрата в соединительнотканной строме полипа при неконтролируемой форме ХПРС. *б*, *e* – Эозинофилы в собственной пластинке полипов при контролируемой (*б*) и неконтролируемой (*в*) форме ХПРС. Наблюдаются сегментированные ядра и кристаллоподобные включения в составе гранул. *e* – Зрелые плазматические клетки в собственной пластинке полипа при неконтролируемой форме ХПРС. *Обозначения*: ПК – плазматические клетки, ЭФ – эозинофил.



Рис. 7. Строма полипа при неконтролируемой форме ХПРС. *a* – Кровеносный капилляр в собственной пластинке полипа. *Стрелки* – отростки телоцитов (телоподии), ассоциированные с эндотелием капилляров. *б* – Гладкомышечные клетки, окруженные базальной мембраной, в строме полипа при ХПРС + БА. Видны многочисленные кавеолы на плазматической мембране гладкомышечных клеток (*стрелки*). *в* – Секреторные клетки слизистой железы в составе полипа при ХПРС + БА. *Обозначения*: БМ – базальная мембрана, СГ – секреторные гранулы. ЭЦ – эритроциты, ЭНД – эндотелий.

ток, наблюдается потеря ресничек, фиброз или утолщение базальной мембраны (БМ).

Проведенный нами гистологический анализ показал, что при контролируемой и при неконтролируемой формах течения ХПРС наблюдается гипертрофия ресничек на реснитчатых клетках, а также гипертрофия бокаловидных клеток, продуцируюших слизь. Этот факт был описан и другими авторами, которые отмечали большое количество бокаловидных клеток в эпителии полипов, при этом клетки с нормальной ультраструктурой секреторных гранул и микровилл встречались очень редко (Ильинская, Захарова, 2001). Мы наблюдали на препаратах признаки дистрофических изменений эпителия (отрыв апикальной части и разрушение клеток). При ХПРС, протекающем на фоне БА, изменения эпителия становятся наиболее выраженными. При ХПРС + БА наблюдаются ранние признаки метаплазии респираторного эпителия, а при ХПРС на фоне астматической триады – признаки поздней метаплазии эпителия. Эпителий из многорядного становится многослойным, часть клеток не имеют связи с базальной мембраной, клетки эпителия утрачивают реснички, не наблюдаются бокаловидные клетки, продуцирующие слизь.

Выполненное в нашей работе электронно-микроскопическое исследование образцов полипов выявило ряд ультраструктурных особенностей, отражающих течение патологического процесса в полипозной ткани. Нами установлено, что покрывающий полип респираторный эпителий претерпевает значительные изменения своей морфологической и функциональной организации, причем эти изменения могут носить разнонаправленный характер. В частности, в некоторых участках исследованных полипов отмечена очевидная утрата эпителием барьерной функции. В этих областях изолирующие плотные контакты между соседними клетками эпителия не сформированы, между соседними эпителиальными клетками появляются щели с обнажением соответствующих участков БМ, отмечены картины некротической гибели эпителиальных клеток. Реснички на апикальной поверхности эпителиальных клеток, как правило, отсутствуют. Происходит утрата не только клеточного компонента эпителиального слоя, но и части БМ, при этом обнажается участок соединительно-тканного внеклеточного матрикса. Обнаружено, что в некоторых эпителиальных клетках цитоплазма заполнена нитями тонофиламентов, что, по-видимому, свидетельствует о начале частичной кератинизации данного эпителия. Другим возможным комплексом ультраструктурных перестроек респираторного эпителия полипов является его метаплазия в многослойный плоский эпителий. Количество клеточных слоев в составе такого многослойного эпителия может варьировать от 3 до 7 и более, что, очевидно, отражает степень прогрессии процесса метаплазии. В составе многослойного эпителия полипа часто обнаруживали клетки, которые содержат в цито-

плазме многочисленные базальные тельца ресничек. При этом сами реснички очень редко обнаруживаются на ультратонких срезах, что заставляет говорить об их деструкции в рассматриваемом видоизмененном эпителии полипа. В ресничках сохраняется характерный набор микротрубочек и ассоциированных с ними моторных белков (аксонемный комплекс), однако одновременно частично или почти полностью утрачивается плазматическая мембрана, окружающая ресничку. При ХПРС, протекающем на фоне БА и, особенно, сопровождающемся астматической триадой, на ультратонких срезах полипов наблюдаются и более пролвинутые сталии метаплазии эпителия в многослойный плоский эпителий. Эпителиальная метаплазия при этом сопровождается увеличением количества слоев клеток до 7 и более, массовым кариопикнозом и практически полной деструкцией органоидов цитоплазмы. В составе такого многослойного полипозного эпителия реснички не обнаруживаются. По нашему мнению, вышеописанные изменения в эпителии (утрата ресничек, гибель эпителиальных клеток, увеличение слоев клеток, массовый кариопикноз) имеют связь с невосприимчивостью полипозной ткани к терапии кортикостероидами при неконтролируемой форме ХПРС.

Полученные в нашей работе данные о том, что при метаплазии эпителия полипа реснитчатые клетки демонстрируют аномальные реснички или потерю ресничек подтверждаются опубликованными в литературе результатами (Ильинская, Захарова, 2001; Yan et al., 2013). Аномальная архитектура ресничек наблюдалась у пациентов с полипами с помощью сканирующей электронной микроскопии. Аномалии в строении ресничек приводят к нарушениям функции мукоцилиарного клиренса. Частота цилиарного ритма ресничек эпителия in vitro значительно снижена у пациентов с полипозом (Yan et al., 2013). Таким образом, морфологические признаки эпителиальной гиперплазии сопровождаются нарушением подвижности ресничек. Движения ресничек клеток эпителия дыхательных путей играют важную роль в освобождении от инородных тел, включая патогены и аллергены с поверхности эпителия, и тем самым защищают ткани от вредных факторов. Нарушение данной функции является вероятной причиной хронического воспаления слизистой оболочки, персистирования инфекции и играет роль при развитии аллергических процессов при ХПРС. По нашим данным, покрывающий поверхность полипа респираторный эпителий может претерпевать глубокие дегенеративные изменения, с полной утратой им как барьерной функции, так и функции мукоцилиарного клиренса. Эти результаты согласуются с имеющимися в литературе характеристиками ультраструктурных изменений эпителия полипов (Ильинская, Захарова, 2001; Kuhar et al., 2017). Ранее при электронно-микроскопическом исследовании было показано статистически значимое увеличение толщины БМ, усиление субэпителиального отека и

фиброза в полипах (Kuhar et al., 2017). У пациентов с полипами толщина БМ коррелирует с симптомами и показателями качества жизни. Было показано, что толщина БМ при полипозном процессе значительно превышает таковую у пациентов с риносинуситом без полипов (Kim et al., 2007). Предполагают, что утолщение БМ является компенсаторной реакцией слизистой оболочки на нарушение целостности и проницаемости эпителильного слоя (Ильинская, Захарова, 2001). Также было отмечено, что при полипозе респираторный эпителий околоносовых пазух подвергался более выраженным изменениям, чем эпителий самого полипа. По-видимому, это связано с нарушениями вегетативной иннервации слизистой оболочки пазух. Действительно, нервная система может оказывать влияние на воспалительные/иммунные реакции. В частности, продемонстрирована парасимпатическая гиперактивность у пациентов с аллергическим ринитом (Ozsutcu et al., 2013). Выявлено, что в носовом полипе снижена реактивность биения ресничек в ответ на ацетилхолин (Do et al., 2019).

Важнейшей морфологической особенностью стромы полипа является ее активная лейкоцитарная инфильтрация. Гистологический анализ выявил наличие воспалительной инфильтрации как при контролируемой, так и при неконтролируемой формах ХПРС. По нашим данным, умеренная инфильтрация воспалительными иммунными клетками представлена эозинофилами, лимфоцитами, плазматическими клетками. При ХПРС на фоне астматической триады лейкоцитарная инфильтрация являлась наиболее выраженной. Электронно-микроскопическое исследование подтвердило, что популяция лейкоцитов в составе инфильтрата гетерогенна, во всех исследованных образцах присутствуют эозинофилы и плазматические клетки. Цитоплазма эозинофилов содержит большое количество гранул с кристаллической структурой, что отражает зрелое состояние этих клеток. Плазматические клетки характеризуются мощным развитием шЭПР, что свидетельствует об их полностью зрелом, активированном состоянии в строме полипа.

Лейкоцитарная инфильтрация слизистой оболочки носа и полипов формируется с участием цитокинов и специфических хемокинов, которые продуцируются в очаге под действием повреждения или инфекции (Meng et al., 2013). Продукция в воспалительном микроокружении хемокина IL-8 вызывает приток нейтрофильных гранулоцитов (Henriquez et al., 2015). Привлечение эозинофилов в слизистую оболочку носа требует сложного взаимодействия между клетками эпителия, Th2-лимфоцитами и цитокинами (Vanderhaegen et al., 2021). Значительная эозинофильная инфильтрация полипозной ткани, как показано, обычно связана с более тяжелыми формами заболевания (Kuhar et al., 2017). Инфильтрация эозинофилами, нейтрофилами и плазматическими клетки была ранее обнаружена при ультраструктурном анализе слизистой оболочки при полипозном и полипозно-гнойном ринусинусите и другими авторами (Ильинская, Захарова, 2005). Нейтрофильная инфильтрация была характерна в основном для полипозно-гнойного ринусинусита. Для зрелых плазматических клеток наблюдалось характерное расширение цистерн шЭПР и тесная связь цистерн с митохондриями, что отражает активный синтез иммуноглобулинов, их предшественников на мембранах шЭПР этих клеток и накопление данных белков в цистернах (Ильинская, Захарова, 2005).

При гистологическом исследовании в собственном слое слизистой оболочки полипов выявляли инфильтрацию мононуклеарными клетками. Для дифференцировки макрофагов выполняли иммуногистохимическое исследование с помощью антител к макрофагальному маркеру CD68. Антитела к CD68 распознают гликопротеин массой 110 кДа, который является частью лизосом, и наличие большого количества лизосом в цитоплазме обуславливает положительную реакцию макрофагальных клеток. Инфильтрирующие ткани полипа CD68⁺-макрофаги наблюдались при всех исследованных формах полипоза, выраженная макрофагальная инфильтрация была выявлена при ХПРС, протекающем на фоне БА, в особенности сопровождающимся астматической триадой. Воспалительная реакция с участием врожденного иммунного ответа при ХПРС – это сложный процесс, в котором участвуют антиген-презентирующие клетки, такие как дендритные клетки, моноциты и макрофаги. Роль CD68⁺-макрофагов в патогенезе назальных полипов находится под пристальным вниманием исследователей (Banks et al., 2018; Muluk et al., 2020). Макрофаги являются основными продуцентами цитокинов в очаге воспаления, осуществляют презентацию антигена и фагоцитоз. Макрофаги могут как прямо, так и косвенно индуцировать продукцию Th2-цитокинов, хотя их роль при ХПРС остается недостаточно изученной. Полученные в нашей работе результаты согласуются с литературными данными. Многочисленные CD68-положительные клетки с морфологическими признаками макрофагов были обнаружены в эпителии и в собственной пластинке полипов (Muluk et al., 2021). В субэпителиальном и глубоких слоях собственной пластинки CD68-положительные макрофаги, как правило, собираются вокруг эозинофилов и могут фагоцитировать эти клетки (Muluk et al., 2021). Авторы полагают, что повышенное содержание макрофагов в полипозной ткани не вызывает рост носовых полипов, а вместо этого макрофаги уменьшают количество эозинофилов в уже развившихся полипах носа. В другом исследовании было обнаружено наличие локальной макрофагальной инфильтрации в тканях полипов при назальном полипозе, при этом количество макрофагов не зависело от атопического статуса пациента (Banks et al., 2014). Показано, что продукция хемокинов CCL23, MCP-1, которые участвуют в рекрутировании макрофагов, значи-

тельно повышается в полипозной ткани. CCL23, как известно, связывается с CCR1 и привлекает моноциты, макрофаги и дендритные клетки в очаг воспаления. Уровни белка CCL23 были значительно повышены в полипах от пациентов с чувствительностью к аспирину (Poposki et al., 2011). Это позволяет объяснить увеличение количества макрофагов на срезах биопсий у пациентов с астматической триадой в нашем исследовании.

Макрофаги можно разделить на 2 фенотипа – М1 и М2. Макрофаги М1 обладают провоспалительными функциями и нацелены на элиминацию внутриклеточных патогенов. Макрофаги М2 праймируются Th2 цитокинами, усиливают Th2-опосредованный иммунный ответ и играют роль при аллергических заболеваниях. Было показано, что CD68+-макрофаги М1 в полипозной ткани экспрессируют IL-17А (Ryu et al., 2020). Известно, что Th17-ассоциированное воспаление усиливается при хроническом полипозном риносинусите и связано с тяжестью заболевания и резистентностью к стероидам. Обнаружено, что количество макрофагов М2 в слизистых оболочках носовой полости значительно увеличивается при полипозном процессе. Снижение фагоцитоза S. aureus и активация макрофагов с фенотипом M2 способствовали сохранению хронического воспаления. Маркеры Th2-иммунного ответа положительно коррелировали с повышенным количеством макрофагов (Krysko et al., 2010). Макрофаги М2 характеризуются высокой экспрессией интерлейкина-10 (IL-10), что имеет решающее значение для разрешения воспаления. Показано, что при эозинофильной форме ХПРС происходит нарушение продукции IL-10 макрофагами М2, что способствует устойчивому характеру протекания воспаления (Wang et al., 2018).

В соединительно-тканной строме полипов были обнаружены небольшие группы гладкомышечных клеток, окруженных собственной базальной мембраной. В составе полипов присутствуют также слизистые железы, в ряде случаев при неконтролируемом ХПРС наблюдали их гипертрофию.

Известно, что полипозная ткань характеризуется активным ангиогенезом. При ультраструктурном исследовании в собственной пластинке полипов было выявлено значительное количество кровеносных капилляров. При этом происходят изменения морфологии кровеносных сосудов: наблюдаются фенестрации между отдельными эпителиальными клетками и истончение эндотелиальной выстилки. Полученные результаты подтверждаются данными других исследователей. изучавших ультраструктуру кровеносных сосудов при назальном полипозе. По данным трасмиссионной электронной микроскопии, увеличение размера фенестраций между структурами межэндотелиального соединения свидетельствует о сосудистой дисрегуляции, вызванной воспалением при ХПРС (Khurana et al., 2020). При ХПРС наблюдают значительное увеличение васкуляризации, экспрессии проангиогенных генов и белков (Khurana et al., 2020). Стенки капилляров в составе полипов, по нашим наблюдениям, ассоциированы с периваскулярными интерстициальными клетками — телоцитами. По современным представлениям, именно телоциты являются важнейшим клеточным фактором регуляции ангиогенеза в норме и при разнообразных патологических процессах (Zhang, 2016).

Анализ патоморфологической картины полипов позволил нам выявить особенности протекания процессов воспаления и ремоделирования в полипозной ткани при контролируемой и неконтролируемой формах заболевания. В результате проведенного комплексного исследования на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях были обнаружены изменения в структуре слизистой оболочки полипов. Гистологический анализ показал различия в выраженности изменений покровного эпителия полипозной ткани и качественном составе клеток, инфильтрирующих собственный слой слизистой полипов. При иммуногистохимическом исследовании в составе воспалительных инфильтратов были дифференцированы активированные макрофаги. Электронно-микроскопическое исследование образцов полипов выявило ряд ультраструктурных особенностей, отражающих течение патологического процесса в полипозной ткани. Эти процессы включают в себя деструкцию и дисфункцию эпителия, эпителиальную метаплазию, обширную лейкоцитарную инфильтрацию стромы полипа, патологический ангиогенез. Выраженность и направленность перечисленных изменений связаны с тяжестью и формой ХПРС. По нашему мнению, выявленные изменения в эпителии имеют связь с невосприимчивостью полипозной ткани к терапии кортикостероидами при неконтролируемой форме ХПРС.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-01750 "а").

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

507

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ильинская Е.В., Захарова Г.П. 2001.Особенности ультраструктуры эпителия слизистой оболочки верхнечелюстных пазух при хроническом полипозном и полипозно-гнойном риносинусите. Российская ринология. № 4. С. 8. (*Ilyinskaya E.V., Zakharova G.P.* 2001. Features of the ultrastructure of the epithelium of the mucous membrane of the maxillary sinuses in chronic polypous and polypous-purulent rhinosinusitis. Russian rhinology. № 4. P. 8.)
- Ильинская Е.В., Захарова Г.П. 2005. Особенности распределения и ультраструктуры иммунокомпетентных клеток в слизистой оболочке больных хроническими полипозными риносинуситами. Российская оториноларингология. № 1. С. 6. (*Ilyinskaya E.V., Zakharova G.P.* 2005. Features of the distribution and ultrastructure of immunocompetent cells in the mucosa of patients with chronic polypous rhinosinusitis. Russian otorhinolaryngology. № 1. Р. 6.)
- Пискунов Г.З. 2003. Полипоз носа, околоносовых пазух и его лечение. Российская ринология. № 2. С. 10. (*Pi-skunov G.Z.* 2003. Polyposis of the nose, paranasal sinuses and its treatment. Russian Rhinology. № 2. Р. 10.)
- Пискунов Г.З. 2019. Клинические фенотипы полипозного риносинусита. Российская ринология. Т. 27. № 4. С. 224. (*Piskunov G.Z.* 2019. Clinical phenotypes of polyposis rhinosinusitis. Russian Rhinology. V. 27. № 4. Р. 224). https://doi.org/10.17116/rosrino201927041224
- Bachert C., Han J.K., Wagenmann M., Hosemann W., Lee S.E., Backer V., Mullol J., Gevaert P., Klimek L., Prokopakis E., Knill A., Cavaliere C., Hopkins C., Hellings P. 2021. EU-FOREA expert board meeting on uncontrolled severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) and biologics: Definitions and management. J. Allergy Clin. Immunol. V. 147. № 1. P. 29. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.11.013
- Banks C.A., Schlosser R.J., Wang E.W., Casey S.E., Mulligan R.M., Mulligan J.K. 2014. Macrophage infiltrate is elevated in CRSwNP sinonasal tissue regardless of atopic status. otolaryngology head and neck surgery. V. 151. P. 215. https://doi.org/10.1177/0194599814528672
- Do H.B., Ohbuchi T., Yokoyama M., Kitamura T., Wakasugi T., Ohkubo J.-I., Suzuki H. 2019. Decreased ciliary beat responsiveness to acetylcholine in the nasal polyp epithelium. Clinical Otolaryngology. V. 44. P. 356. https://doi.org/10.1111/coa.13312
- Fokkens W.J., Lund V.J., Hopkins C., Hellings P.W., Kern R., Reitsma S., Toppila-Salmi S., Bernal-Sprekelsen M., Mullol J., Alobid I., Terezinha Anselmo-Lima W., Bachert C., Baroody F., von Buchwald C., Cervin A. et al. 2020. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps. Rhinology. V. 58 (Suppl. S29). P. 1. https://doi.org/10.4193/Rhin20.600
- Fokkens W.J., Lund V.J., Mullol J., Bachert C., Alobid I., Baroody F., Cohen N., Cervin A., Douglas R., Gevaert P., Georgalas C., Goossens H., Harvey R., Hellings P., Hopkins C. et al. 2012. European position paper on rhinosinusitis and na-

sal polyps. Rhinol. Suppl. V. 23: 3 p preceding table of contents. P. 1.

Heffler E., Malvezzi L., Boita M., Brussino L., De Virgilio A., Ferrando M., Puggioni F., Racca F., Stomeo N., Spriano G.M., Canonica G.W. 2018. Immunological mechanisms underlying chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Expert Review of Clinical Immunology.

https://doi.org/10.1080/1744666x.2018.1512407

- Hellings P.W., Fokkens W.J., Akdis C., Bachert C., Cingi C., Dietz de Loos D., Gevaert P., Hox V., Kalogjera L., Lund V., Mullol J., Papadopoulos N.G., Passalacqua G., Rondón C., Scadding G. et al. 2013. Uncontrolled allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: where do we stand today? Allergy. V. 68. № 1. P. 1. https://doi.org/10.1111/all.12040
- Henriquez K.M., Hayney M.S., Xie Y., Zhang Z., Barrett B. 2015. Association of interleukin-8 and neutrophils with nasal symptom severity during acute respiratory infection. J. Med. Virol. V. 87. P. 330. https://doi.org/10.1002/jmv.24042
- *Khurana N., Pulsiphe A., Jedrzkiewicz J., Ashby S., Pollard C.E., Ghandehari H., Alt J.A.* 2020. Inflammation-driven vascular dysregulation in chronic rhinosinusitis. International Forum of Allergy & Rhinology. https://doi.org/10.1002/alr.22723
- *Kim J.-W., Hong S.-L., Kim Y.-K., Lee C.H., Min Y.-G., Rhee C.-S.* 2007. Histological and immunological features of non-eosinophilic nasal polyps. Otolaryngology-Head and Neck Surgery. V. 137. P. 925. https://doi.org/10.1016/j.otohns.2007.07.036
- Krysko O., Holtappels G., Zhang N., Kubica M., Deswarte K., Derycke L., Claeys S., Hammad H., Brusselle G.G., Vandenabeel P., Krysko D.V., Bachert C. 2010. Alternatively activated macrophages and impaired phagocytosis of S. aureus in chronic rhinosinusitis. Allergy. V. 66. P. 396. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02498.x
- Kuhar H.N., Tajudeen B.A., Mahdavinia M., Gattuso P., Ghai R., Batra P.S. 2017. Inflammatory infiltrate and mucosal remodeling in chronic rhinosinusitis with and without polyps: structured histopathologic analysis. International Forum of Allergy and Rhinology. V. 7. P. 679. https://doi.org/10.1002/alr.21943
- Laidlaw T.M., Mullol J., Woessner K.M., Amin N., Mannent L.P. 2021. Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps and Asthma. J. Allergy Clin. Immunol. Pract. V. 9. P. 1133. https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.09.063
- Li Y.Y., Li C.W., Chao S.S., Yu F.G., Yu X.M., Liu J., Yan Y., Shen L., Gordon W., Shi L., Wang D.Y. 2014. Impairment of cilia architecture and ciliogenesis in hyperplastic nasal epithelium from nasal polyps. Journal of Allergy and Clinical Immunology. V. 134. P. 1282. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.038
- Meng J., Zhou P., Liu Y., Liu F., Yi X., Liu S., Holtappels G., Claus Bachert C., Zhang N. 2013. The development of nasal polyp disease involves early nasal mucosal inflammation and remodelling. PLoS One. V. 8. e82373. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082373

Muluk N.B., Arikan O.K., Atasoy P., Kiliç R., Yalçinozan E.T. 2020.The role of CD68 (+) histiocytic macrophages in nasal polyp development. J. Neurol. Surg. B. Skull Base. V. 82. P. 700.

https://doi.org/10.1055/s-0040-1715593

- Ozsutcu M., Ozkaya E., Demir A., Erenberk U., Sogut A., Dundaroz R. 2013. Pupillometric assessment of autonomic nervous system in children with allergic rhinitis. Medical Principles and Practice. V. 22. P. 444. https://doi.org/10.1159/000350292
- Poposki J.A., Uzzaman A., Nagarkar D.R., Chustz R.T., Peters A.T., Suh L.A., Carter R., Norton J., Harris K.E., Grammer L.C., Tan B.K., Chandra R.K., Conley D.B., Kern R.C., Schleimer R.P. et al. 2011. Increased expression of the chemokine CCL23 in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Journal of Allergy and Clinical Immunology. V. 128. P. 73. e4.

http://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.03.017

- *Pyo J.-S., Kim S.J.* 2021. Relationship between histologic changes and inflammatory markers in chronic rhinosinusitis. Int. J. Clin. Exp. Pathol. V. 14. P. 501.
- Ryu G., Bae J.-S., Kim J.H., Kim E.H., Lyu L., Chung Y.-J., Mo J.-H. 2020. Role of IL-17A in chronic rhinosinusitis with nasal polyp. Allergy Asthma Immunol. Res. V. 12. P. 507.

https://doi.org/10.4168/aair.2020.12.3.507

Ryu G., Kim D. W. 2019. Th2 inflammatory responses in the development of nasal polyps and chronic rhinosinusitis. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology. V. 20. P. 1.

https://doi.org/10.1097/aci.00000000000588

Shay A.D., Tajudeen B.A. 2018. Histopathologic analysis in the diagnosis and management of chronic rhinosinusitis. Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery. V. 27. P. 20.

https://doi.org/10.1097/moo.000000000000510

- *Toma S., Hopkins C.* 2016. Stratification of SNOT-22 scores into mild, moderate or severe and relationship with other subjective instruments. Rhinology. V. 54. № 2. P. 129. https://doi.org/10.4193/Rhino15.072
- Vanderhaegen T., Gengler I., Dendooven A., Chenivesse C., Lefèvre G., Mortuaire G. Eosinophils in the field of nasal polyposis: towards a better understanding of biologic therapies. Clin. Rev. Allergy Immunol. 2021. V. 62. P. 90. https://doi.org/10.1007/s12016-021-08844-7
- *Viksne R.J., Sumeraga G., Pilmane M.* 2021. Characterization of cytokines and proliferation marker Ki67 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps: A pilot study. Medicina (Kaunas). V. 57. P. 607.
- Wang Z.-C., Yao Y., Wang N., Liu J.-X., Ma J., Chen C.-L., Deng Y.-K., Wang M.-C., Liu Y., Zhang X.-H., Liu Z. 2018. Deficiency in interleukin-10 production by M2 macrophages in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. International Forum of Allergy and Rhinology. https://doi.org/10.1002/alr.22218
- Yan Y., Gordon W.M., Wang D.-Y. 2013. Nasal epithelial repair and remodeling in physical injury, infection, and inflammatory diseases. Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery. V. 21. P. 263. https://doi.org/10.1097/moo.0b013e32835f80a0
- Zhang H. 2016. Vascular telocytes. Telocytes. P. 377. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1061-3_24

Ultrastructural and Immunohistochemical Analysis of Polyposis Tissue in Chronic Polyposis Rhinosinusitis

A. N. Gorshkov^{a, b, *}, E. A. Varyushina^c, E. V. Bezrukova^d, M. A. Aflitonov^e, and A. S. Simbirtsev^f

^aSmorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 197376 Russia ^bLaboratory of Pathomorphology, Almazov National Research Centre, St. Petersburg, 197341 Russia

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

^dDepartment of Otorhinolaryngology, Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, 191015 Russia

^eDepartment of Otorhinolaryngology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041 Russia

^fState Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, 197110 Russia

*e-mail: angorsh@yahoo.com

Chronic rhinosinusitis (CRS) is a complex inflammatory disease that is widespread throughout the world and is characterized by a long duration of treatment. The underlying inflammation of the nasal mucosa in chronic polyposis rhinosinusitis (CRSwNP) leads to multiple pathological changes. CRSwNP is associated with tissue remodeling, including tissue degradation and subepithelial fibrosis. Histopathological studies provide the most important information about the peculiarities of the inflammatory process in the mucous membranes of the paranasal sinuses. Ultrastructural studies of polyposis tissue provide deeper understanding of the mechanisms of development of pathological processes in these structures at the cellular and subcellular levels. The purpose of this work: to identify the pathogenetic characteristics of the polyposis inflammatory process in controlled and uncontrolled forms of CRSwNP. Main objectives: to study the processes of inflammation and remodeling in polyps at the tissue, cellular and subcellular levels in these forms of the disease. The material for the study was biopsies of polyposis tissue from the ethmoid labyrinth (surgical material) obtained from patients with controlled and uncontrolled forms of CRSwNP. Histological analysis was performed on sections stained with Carazzi's hematoxylin and eosin. Localization of macrophage marker CD68 in polypous tissue was studied by indirect immunohistochemistry. Ultrastructural studies were performed using transmission electron microscopy. In all studied cases, pathohistological changes were

ГОРШКОВ и др.

observed both in the epithelial layer and in the connective tissue stroma of the polyp. It has been shown that in polyposis the integrity of the epithelial layer is damaged, its hyperplasia and metaplasia occur. Fibrosis, edema, collagen deposits and leukocyte infiltration were detected subepithelially and in the stroma of the polyp. According to the results of immunohistochemical studies, CD68-positive macrophages are identified in the polypous tissue both intraand subepithelially and in the connective tissue stroma of the polyp. Electron microscopic study of polyposis tissue samples revealed multiple pathological changes, including defects of the integrity of tight junctions in the epithelium of polyps, destructive changes in the cilia of epitheliocytes, infiltration of polyposis tissue by eosinophils and plasma cells. Thus, the analysis of the pathomorphological picture of polyps allowed us to identify the features of the processes of inflammation and remodeling in polyposis tissue in controlled and uncontrolled forms of the disease. As a result of a comprehensive study at the tissue, cellular and subcellular levels pathological changes were found in the structure of the mucous membrane of polyps.

Keywords: chronic polyposis rhinosinusitis, respiratory epithelium, leukocyte infiltration, macrophages, telocytes

510

УДК 577.352.26

ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТОВ СЕМЯН ГРЕЙПФРУТА, ЛИСТЬЕВ ОБЛЕПИХИ И ЧАГИ НА СВОЙСТВА МОДЕЛЬНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

© 2022 г. С. С. Ефимова^{1, *}, А. А. Захарова¹, Д. Н. Чернышова¹, О. С. Остроумова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия *E-mail: efimova@incras.ru Поступила в редакцию 15.04.2022 г.

После доработки 02.05.2022 г. Принята к публикации 02.05.2022 г.

В работе исследовано действие экстрактов семян грейпфрута (ЭСГ), листьев облепихи (ЭЛО) и чаги (ЭЧ) на модельные липидные мембраны. Показано, что пороговые концентрации ЭСГ и ЭЧ, приводящие к дестабилизации фосфатидилглицерин-обогащенных бислоев, в 1.3–1.4 раза меньше, чем в случае фосфатадилхолин-содержащих мембран. Установлено, что ЭСГ и ЭЛО снижают граничный потенциал мембран, сформированных из смеси фосфатадилхолина и холестерина (изменения достигают 45 и 40 мВ при концентрациях 60 и 800 мкг/мл соответственно). ЭЧ выраженным потенциал-модифицирующим эффектом не характеризуется. Показано, что изменения граничного потенциала в присутствии ЭЛО обусловлены наличием в его составе флавонолов, кверцетина и мирицетина. Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии также обнаружено, что кверцетин и мирицетин способны влиять на термотропное поведение мембранообразующих липидов, а, следовательно, на плотность их упаковки. Показана потенциация порообразующей активности противогрибкового полиенового макролида нистатина и антибактериального липопептида полимиксина Б при введении ЭЛО. Эти данные указывают на возможный синергизм противомикробного действия тестируемых антибиотиков и ЭЛО, что может быть использовано при создании комбинированных противомикробных средств широкого спектра действия.

Ключевые слова: природные экстракты, модельные липидные мембраны, липосомы, граничный потенциал мембраны, плотность упаковки липидов, ионные каналы, антибиотики

DOI: 10.31857/S0041377122050030

Одним из глобальных вызовов XXI в. является рост смертности от инфекционных заболеваний на фоне распространения устойчивых к антибиотикам патогенных микроорганизмов. В связи с растущей резистентностью к антибиотикам у возбудителей инфекционных заболеваний человека особую значимость для исследователей и клиницистов приобретает разработка лекарственных препаратов, характеризующихся более медленным развитием устойчивости. Ввиду консервативности мишени таким свойством обладают препараты, действующие на клеточную мембрану, в частности антибиотики, образующие поры в мембранах клеток-мишеней. Как правило, серьезным ограничением применения подобных препаратов является их высокая токсичность.

Макролидные полиеновые антибиотики, в частности амфотерицин Б и нистатин, используются в медицине для лечения различных грибковых инфекций, включая системные микозы. Согласно превалирующей в литературе гипотезе, механизм фунгицидного действия полиенов обусловлен их связыванием с эргостерином в мембране грибковой клетки (Gray et al., 2012) и нарушением ее проницаемости вследствие формирования ион-проводящих пор (Andreoli, 1974; Ermishkin et al., 1976). Вероятность связывания с холестерином в мембранах клеток человека определяет высокую токсичность полиеновых антибиотиков (Wilcock et al., 2013), наиболее часто выражающуюся в нефропатии (Sawaya et al., 1995), что существенно ограничивает их применение в клинической практике (Zotchev 2003; Laniado-Laborín, Cabrales-Vargas, 2009; Bagnis, Deray, 2013).

Полимиксин Б — это полипептидный антибиотик, продуцируемый грамположительной бактерией *Bacillus polymyxa* и направленно действующий на грамотрицательные микроорганизмы. Его применение показано при полирезистентности целевых штаммов. Однако побочные эффекты полимиксина Б, в частности выраженная нефротоксичность (Zavascki et al.,

Принятые сокращения: ДОФГ – 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3фосфо-(1'-*rac*-глицерин); ДОФХ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3фосфохолин; ДФФХ – 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ДПФХ – 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ПОФХ – 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; СМ – сфингомиелин; ХОЛ – холестерин; ЭЛО – экстракт листьев облепихи; ЭСГ – экстракт семян грейпфрута; ЭЧ – экстракт чаги.

2007; Abdelraouf et al., 2014; Zavascki, Nation, 2017), существенно ограничивают спектр применения этого антибиотика.

Одним из способов преодоления проблемы высокой токсичности антибиотиков является поиск соединений, способных потенцировать их порообразующую способность и, тем самым, снижать действующую концентрацию. Особый интерес в этой связи представляют вещества природного происхождения. Это обусловлено сразу несколькими причинами: известным профилем безопасности и возможностью перепрофилирования в кратчайшие сроки, а также собственной противомикробной активностью некоторых природных экстрактов.

Семена грейпфрута (*Citrus paradisi*) характеризуются выраженным антибактериальным действием, которое обусловлено их уникальным фитохимическим составом (Ionescu et al., 1990; Heggers et al., 2002). В составе ЭСГ в большом количестве обнаруживаются биофлавоноиды, относящиеся к классу флаванонов, большинство из которых гликозилированы (Avula et al., 2016). Известно, что семена грейпфрута проявляют активность в отношении *Staphylococcus* sp. (в частности *Staphylococcus aureus*), *Klebsiella* sp., *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Legionella pneumophila*, а также против некоторых видов спирохет (Ionescu et al., 1990; Heggers et al., 2002; Fukuyama et al., 2003; Oyelami et al., 2005; Brorson, Brorson, 2007).

Разные сорта облепихи (например, *Hippophae rhamnoides*) являются важным источником антимикробных агентов. Фенольные соединения в составе ЭЛО, в основном, представлены флавонолами и их гликозидами (Yogendra Kumar et al., 2013). Анализ данных из литературы показывает, что экстракт листьев облепихи (ЭЛО) проявляет антибактериальную активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* и некоторых других важных с медицинской точки зрения видов бактерий (Arora et al., 2012; Michel et al., 2012; Yogendra Kumar et al., 2013).

Данные из литературы свидетельствуют и о высокой антибактериальной и противогрибковой активности экстракта березового гриба или чаги (*Inonotus obliquus*) (ЭЧ), в том числе в отношении клинически важных патогенов человека, включая *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus* и *Aspergillus niger* (Glamočlija et al., 2015). Значительную долю экстрактивных веществ чаги представляют липофильные соединения, в частности тритерпеноиды и стерины (Nikitina et al., 2016).

Цель настоящего исследования заключалась в изучении мембранной активности природных экстрактов (семян грейпфрута, листьев облепихи и чаги) и оценка перспектив их совместного применения с порообразующими антибиотиками. Показана липидная специфичность действия ЭСГ и ЭЧ на модельные мембраны, что может обуславливать селективность влияния этих экстрактов на бактериальные мембраны. Впервые продемонстрирована способность ЭЛО снижать граничный потенциал фосфолипидных мембран и определены компоненты, ответственные за его потенциал-модифицирующий эффект. Обнаружена потенциация ЭЛО порообразующей способности макролидного полиенового антимикотика нистатина и липопептидного антибиотика полимиксина Б. Эти данные могут служить научно-техническим заделом для разработки комбинированных противомикробных средств широкого спектра действия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы (Sigma, США): хлорид калия (KCl), хлорид натрия (NaCl), HEPES, KOH, NaOH, пентан, этанол, гексадекан, диметилсульфоксид (ДМСО), Тритон X-100, сефадекс G-50, кальцеин, нистатин, полимиксин Б, кверцетин, мирицетин, рутин; 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ); 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ); 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-(1'-*rac*-глицерин) (ДОФГ); 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ); холестерин (ХОЛ) и сфингомиелин (СМ).

Экстракт семян грейпфрута (ЭСГ), экстракт листьев облепихи (ЭЛО) и экстракт чаги (ЭЧ) предоставлены ЗАО Эвалар (Россия). Тестирование проводили для трех образцов каждого экстракта, представляющих собой независимые серии экстрагирования.

Формирование плоских бислоев и исследование влияния экстрактов на ионную проницаемость мембран. Формирование бислойных липидных мембран проводили по методу Монтала и Мюллера (Montal, Muller, 1972) путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстии в тефлоновой пленке, разделяющей экспериментальную камеру на два (иис-и транс-) отделения. Объем каждого отделения составлял 1.5 мл, толщина тефлоновой пленки -10 мкм, диаметр отверстия – 30-50 мкм. Перед началом процесса формирования мембраны отверстие в тефлоновой пленке обрабатывали гексадеканом. Мембраны формировали из смесей ДОФХ и ХОЛ в молярном соотношении 80 и 20 мол. %; ДОФХ, ДОФГ и ХОЛ в соотношении 40, 40 и 20 мол. % и ПОФХ, СМ и ХОЛ в соотношении 60, 20 и 20 мол. %. Эксперименты проводили при одинаковом ионном составе разделяемых мембраной водных растворов электролита (0.1 M KCl, pH 7.4). Кислотность растворов (рН 7.4) поддерживали буферной смесью 5 мМ HEPES-КОН. После испарения пентана на поверхности водного раствора оставался конденсированный липидный монослой. Подъем уровней жидкости в обоих отсеках камеры выше отверстия в тефлоновой пленке приводил к образованию бислойной мембраны. Измерения тока, протекающего через бислойную липидную мембрану, осуществляли в режиме фиксации потенциала.

Для подачи напряжения на мембрану и отведения сигнала использовали хлор-серебряные электроды (Ag/AgCl), соединенные с растворами камеры через агарозные мостики (1.5%-ный гель агарозы, 2 M KCl). Положительным считали напряжение, вызывающее поток катионов из *цис-* в *транс-*отделение камеры. Электрофизиологические измерения проводили при комнатной температуре. Усиление и аналогово-цифровое преобразование трансмембранных токов проводили при помощи Axopatch 200B и Digidata 1440A (Axon Instruments, США).

Образцы экстрактов из исходных растворов в воде или ДМСО добавляли в оба отсека камеры до предельных концентраций, которые вызывают дестабилизацию и разрушение бислоя ($C_{\rm thr}$).

Определение изменений электрического потенциала на границе мембрана/водный раствор при введении тестируемых экстрактов. Ионофор нонактин из стока в спирте добавляли в омывающие растворы с обеих сторон мембраны до конечной концентрации 10⁻⁷– 10⁻⁶ М. Липидные мембраны формировали из смесей ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %), ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) и ПОФХ/СМ/ХОЛ (60/20/20 мол. %) по методу Монтала и Мюллера в 0.1 М растворах КСІ (5 мМ HEPES–КОН, рН 7.4), как описано выше.

Проводимость бислоя (*G*) находили как отношение стационарного трансмембранного тока к трансмембранному напряжению, равному 50 мВ. Изменения электрического потенциала на границе мембраны с водным раствором при введении тестируемых экстрактов ($\Delta \varphi_b$) определяли согласно распределению Больцмана (Andersen et al., 1976):

$$\frac{G_m}{G_m^0} = \exp\left(\frac{e\Delta\varphi_b}{kT}\right),\tag{1}$$

где G_m^0 и G_m – значения стационарной К⁺-проводимости мембраны, индуцированной нонактином соответственно до и после введения тестируемого экстракта.

Электрофизиологические измерения активности порообразующих антибиотиков в бислойных липидных мембранах. Для формирования липидных бислоев использовали смеси ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) и ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %). Мембраны модифицировали противогрибковым полиеновым антибиотиком нистатином и антибактериальным циклическим липопептидом полимиксином Б. Нистатин или полимиксин Б добавляли с цис-стороны бислоя до конечной концентрации в диапазоне 1-3 и 50-100 мкМ соответственно. Тестируемые экстракты вводили в оба отсека камеры до конечной концентрации 100 мкг/мл. Вычисляли среднее отношение стационарного макроскопического нистатин- или полимиксин-индуцированного тока после и до введения экстракта ($I_{\infty} / I_{\infty}^0$).

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

Оценка изменения проницаемости мембран под действием тестируемых экстрактов путем флуориметрии утечки калышенна из липосом. Олнослойные везикулы из смесей ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %). ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) или ПОФХ/СМ/ХОЛ (60/20/20 мол. %), нагруженные флуоресцентным красителем кальцеином, формировали с помощью мини-экструдера (Avanti Polar Lipids, Inc., США). Исходный раствор липида в хлороформе помещали в виалу, после чего растворитель удаляли потоком азота. Полученную липидную пленку гидратировали буферным раствором (35 мМ кальцеина, 10 мМ HEPES-NaOH, pH 7.4) и после пятикратного замораживания-размораживания 13 раз пропускали через поликарбонатную мембрану (Nucleopore TM, США) с диаметром пор 100 нм для получения гомогенной популяции больших однослойных липосом. Незахваченный липосомами кальцеин удаляли гель-фильтрацией на колонке, заполненной сефадексом G-50. В качестве элюента использовали свободный от кальцеина буферный раствор (150 мМ NaCl, 10 мМ HEPES-NaOH, pH 7.4). Кальцеин, находящийся внутри липосом, в концентрации 35 мМ испытывал самотушение. Флуоресценция кальцеина, вытекающего из липосом в окружающий их раствор под действием тестируемых экстрактов, свидетельствовала об увеличении проницаемости мембран вследствии разобщения образующих их липидов при встраивании компонентов экстрактов. Липосомную суспензию разделяли на аликвоты. Контрольные образцы не модифицировали. Тестируемые экстракты добавляли в липосомальную суспензию до концентрации 5–250 мкг/мл.

Интенсивность флуоресценции высвобожденного из липосом кальцеина (*RF*, %) измеряли с помощью спектрофлюориметра (Флюорат Панорама-02, Россия; длина волны возбуждения и эмиссии соответственно 490 и 520 нм). В конце эксперимента в суспензию добавляли Тритон X-100. В концентрации 10 мМ этот детергент вызывает разрушение всех липидных везикул и полное высвобождение захваченного маркера.

Величину утечки *RF* (%) определяли по формуле:

$$RF = \frac{\alpha I_i - I_0}{1.1I_{\text{max}}^0 - I_0} \times 100\%$$

где I_i и I_0 – интенсивность флуоресценции раствора соответственно в присутствии и отсутствие тестируемого экстракта, I_{max} – интенсивность флуоресценции раствора после добавки Тритона X-100 (множитель 1.1 введен для учета разбавления образца водным раствором детергента), α – поправочный коэффициент тушения флуоресценции маркера экстрактом. Коэффициент тушения определяли в ходе калибровочных экспериментов без использования липидных везикул как отношение максимальной интенсивности флуоресценции раствора кальцеина до и после введения экстракта.

Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия модифицированных экстрактами или их компонентами липидных везикул. Большие одноламеллярные липосомы изготавливали из ДПФХ методом электроформации с помощью прибора Nanion vesicle prep pro (Германия). На стекла подавали переменное напряжение с амплитудой 3 В и частотой 10 Гц в течение 1 ч при температуре 55°С. Концентрация липида составляла 3 мМ. В экспериментальные образцы вводили компоненты ЭЛО (кверцетин, мирицетин или рутин) до достижения соотношения липид : флавонол 10 : 1. Компоненты ЭЧ и ЭСГ пентациклические тритерпеноиды (бетулин и люпеол) и флаванононы (нарингин и нарирутин, которые являются гликозидами нарингенина) соответственно были исследованы ранее (Efimova et al., 2018: Efimova, Ostroumova, 2021). Термограммы липосомальных суспензий получали при помощи дифференциального сканирующего микрокалориметра µDSC7 (Setaram, Франция). Воспроизводимости температурной зависимости теплоемкости достигали путем повторного нагревания образца сразу после охлаждения с постоянной скоростью 0.2°С/мин. Термограммы характеризовали наличием пика, соответствующего предпереходу ДПФХ из гель- в промежуточную риппл-фазу, максимальной температурой основного фазового перехода (T_m) , а также шириной пика, соответствующего плавлению, на полувысоте ($T_{1/2}$). Изменение указанных параметров позволяет судить о термотропном поведении липидов при адсорбции компонентов экстрактов.

Все параметры, характеризующие действие экстрактов или их компонентов на свойства мембран или реконструированных каналов, определены путем вычисления среднего арифметического величин, полученных в 4—9 независимых экспериментах. Величины $C_{\rm thr}$ и *RF* представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений (SD). Величины $\Delta \varphi_b$, I_{∞}/I_{∞}^0 , ΔT_m и $\Delta T_{1/2}$ представлены в виде среднего значений и его стандартной ошибки (SE).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе исследована способность ЭСГ, ЭЛО и ЭЧ увеличивать ионную проницаемость плоских липидных бислоев различного состава. Модельные липидные мембраны формировали из незаряженных и отрицательно заряженных фосфолипидов, сфинголипидов и стеринов. В табл. 1 представлены пороговые концентрации экстрактов, при достижении которых нарушалась электрическая стабильность липидных бислоев различного состава. Добавление ЭСГ, ЭЛО и ЭЧ до концентрации соответственно 950, 300 и 900 мкг/мл к незаряженным мембранам из ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) не вызывало увеличения их проницаемости для ионов. При этом максимально достижимая концентрация ЭЛО была ограничена допустимым объемом растворителя в экспериментальной кювете и составляла 300 мкг/мл. Введение ДМСО в большем количестве способствовало росту ионной проницаемости мембран и не позволяло дискриминировать эффекты растворителя и экстракта. Дальнейшее увеличение концентрации ЭСГ и ЭЧ (более 950 и 900 мкг/мл соответственно) приводило к повышению проницаемости липидных бислоев для ионов, нарушению их электрической стабильности (увеличению чувствительности к приложению трансмембранной разности потенциалов) и последующему разрушению. В случае незаряженных мембран из смеси ПОФХ/СМ/ХОЛ %) наблюдали аналогичные (60/20/20)мол. ДОФХ/ХОЛ-бислоям эффекты, а именно: введение ЭСГ, ЭЛО и ЭЧ до концентрации соответственно 1100, 300 и 1000 мкг/мл не способствовало росту ионной проницаемости мембран, а увеличение концентрации ЭСГ и ЭЧ вызывало дестабилизацию и дезинтеграцию мембран указанного состава.

Замена электрически нейтральных бислоев, сформированных из смесей ДОФХ/ХОЛ или ПОФХ/СМ/ХОЛ, на отрицательно заряженные ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ мембраны вызывала 1.3-1.4кратное снижение пороговых концентраций ЭСГ и ЭЧ, при которых наблюдали разрыв мембран (табл. 1). Учитывая сходную чувствительность использованных в исследовании холестерин-содержащих мембран к электропробою, снижение пороговых концентраций ЭСГ и ЭЧ в отношении отрицательно заряженных мембран по сравнению с нейтральными бислоями может отражать селективность их мембранного действия и указывать на предпочтительное взаимодействие этих экстрактов с фосфатидилглицерином (ДОФГ) по сравнению с фосфатидилхолинами (ДОФХ или ПОФХ). Учитывая, что отрицательно заряженный фосфатидилглицерин является мажорным компонентом бактериальных мембран, в отличие от фосфатидилхолина, в большом количестве содержащегося в мембранах клеток млекопитающих, полученные данные могут указывать на механизмы антибактериального действия ЭСГ и ЭЧ.

Для установления влияния тестируемых соединений на трансмембранное распределение электрического потенциала проведена оценка изменений граничного потенциала липидных бислоев ($\Delta \phi_b$) при введении ЭСГ, ЭЛО и ЭЧ. Зависимости среднего изменения граничного потенциала липидных бислоев, сформированных из смесей ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %), ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20)%) мол. И ПОФХ/СМ/ХОЛ (60/20/20 мол. %), от концентрации тестируемых экстрактов в околомембранных растворах представлены на рис. 1. Видно, что все приведенные зависимости характеризуются насыщением при достижении определенной концентрации экстракта, дальнейшее увеличение его содержания в околомембранном растворе не сопровождается изменением граничного потенциала. Насыщение кривых принято описывать максимальной величиной

экстракт -	ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %)		ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %)		ПОФХ/СМ/ХОЛ (60/20/20 мол. %)				
	$C_{ m thr}$ мкг/мл	Δφ _{bmax} мВ	RF %	$C_{ m thr}$ мкг/мл	Δφ _{bmax} мВ	RF %	$C_{ m thr}$ мкг/мл	$\Delta \phi_{bmax}$ мВ	RF %
ЭСГ	950 ± 50	-38 ± 7	6 ± 3	700 ± 50	-28 ± 4	3 ± 1	1100 ± 75	-20 ± 4	2 ± 1
ЭЛО	300 ^a	-45 ± 11	14 ± 7	300 ^a	-10 ± 4	7 ± 5	300 ^a	-35 ± 8	8 ± 4
ЭЧ	900 ± 50	11 ± 9	1 ± 1	650 ± 25	10 ± 6	2 ± 1	1000 ± 50	-4 ± 3	1 ± 1

Таблица 1. Влияние тестируемых экстрактов на физико-химические свойства модельных липидных мембран различного состава

Примечание. C_{thr} – пороговая концентрация экстракта, вызывающая нарушение диэлектрической функции мембраны и ее разрушение; $\Delta \phi_{bmax}$ – изменение электрического потенциала липидных бислоев на границе мембрана/водный раствор; RF – максимальное относительное высвобождение кальцеина из липидных везикул под действием экстракта в концентрации 100 мкг/мл. (^a) – максимально достижимая в эксперименте концентрация ЭЛО (дальнейшее увеличение концентрации ЭЛО ограничено введением в экспериментальную кювету максимально допустимого объема ДМСО и нарушением стабильности мембраны под действием самого растворителя).

изменения граничного потенциала, $\Delta \phi_{bmax}$. Величины $\Delta \phi_{bmax}$ для ДОФХ/ХОЛ-, ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ- и ПОФХ/СМ/ХОЛ-мембран в присутствии тестируемых экстрактов представлены в табл. 1.

На рис. 1а можно заметить, что наибольшей способностью модифицировать граничный потенциал мембран из ДОФХ/ХОЛ характеризуется ЭЛО: введение экстракта в относительно низких концентрациях (менее 60 мкг/мл) сопровождается уменьшением граничного потенциала до 45 мВ (табл. 1). ЭСГ также способен снижать граничный потенциал. но характеризуется меньшим эффектом при больших концентрациях (около 30 мВ при концентрациях более 400 мкг/мл). При этом введение ЭЧ вызывает незначительное (не более 10 мВ) увеличение граничного потенциала ДОФХ/ХОЛ-мембран. Введение в состав мембран отрицательно заряженного ДОФГ сопровождается значительным падением эффективности потенциал-модифицирующего действия ЭЛО (в 4.5 раза) (рис. 16, табл. 1). Эффективность действия ЭСГ и ЭЧ на нейтральные (ДОФХ/ХОЛ) и отрицательно заряженные мембраны (ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ) мало отличается: величины $\Delta \phi_{bmax}$ совпадают в пределах погрешности (табл. 1). Граничный потенциал мембран из ПОФХ/СМ/ХОЛ под действием ЭСГ и ЭЛО уменьшается на 20 и 35 мВ соответственно (рис. 1в, табл. 1). Потенциал-модифицирующая активность ЭЧ в отношении бислоев из ПОФХ/СМ/ХОЛ практически не проявляется (рис. 1в, табл. 1).

Согласно данным из литературы, флавонолы (кверцетин и мирицетин), также и гликозид кверцетина рутин являются мажорными компонентами ЭЛО (Yogendra Kumar et al., 2013), а пентациклические тритерпеноиды бетулин и люпеол входят в состав ЭЧ. В составе ЭСГ обнаружены флаванононы, в частности нарингин и нарирутин, которые являются гликозидами нарингенина (Avula et al., 2016). Ранее нами показано, что максимальное уменьшение граничного потенциала фосфатидилхолин-содержащих бислоев при адсорбции кверцетина и мирице-

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

тина составляет 104 и 111 мВ соответственно (Efimova, Ostroumova, 2012; табл. 2). Потенциал-модифицирующая способность рутина значительно меньше, чем его агликона кверцетина: максимальное уменьшение граничного потенциала мембран не превышает 40 мВ (Ефимова, Остроумова, 2015; табл. 2). Максимальное уменьшение граничного потенциала мембран в присутствии нарингенина составляло 50 мВ (Efimova et al., 2018). Можно предположить, что потенциал-модифицирующий эффект гликозидов нарингенина, нарингина и нарирутина окажется значительно ниже, чем у агликона.

Подобная зависимость обнаружена как в случае флавонолов кверцетина и его гликозида рутина ($\Delta \varphi_{bmax}$ составило 104 и 40 мВ соответственно), так и дигидрохалконов флоретина и его гликозида флорицина (около 150 и 90 мВ соответственно) (Efimova, Ostroumova, 2012; Ефимова, Остроумова, 2015). Ранее нами

Компонент	$\Delta \phi_{bmax}$, мВ	$\Delta T_{\rm m}$, °C	$\Delta T_{1/2}$, °C	
Rominitien	ДФФХ	ДПФХ	ДПФХ	
Кверцетин	-104 ± 7^{a}	-0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.3	
Мирицетин	-111 ± 1^{a}	-0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	
Рутин	-40 ± 6^{6}	0	0	
Бетулин	$-1 \pm 1^{\text{B}}$	$-0.2\pm0.1^{\rm b}$	$0.1\pm0.1^{\text{b}}$	
Люпеол	$-1 \pm 1^{\text{B}}$	$-0.3\pm0.1^{\text{b}}$	$0.1\pm0.1^{\text{b}}$	

Таблица 2. Влияние некоторых компонентов тестируемых экстрактов на физико-химические свойства модельных липидных мембран

Примечание. $\Delta \phi_{bmax}$ — изменение электрического потенциала липидных бислоев на границе мембрана/водный раствор; ΔT_m — изменение температуры главного фазового перехода ДПФХ; $\Delta T_{1/2}$ — изменение полуширины пика, соответствующего плавлению ДПФХ. Соотношение липид : флавонол и липид : тритерпеноид составляет 10 : 1 и 50 : 1 соответственно. Данные взяты из: (^a) — Efimova, Ostroumova, 2012; (^b) — Ефимова, Остроумова, 2015); (^в) — Efimova, Ostroumova, 2021.



Рис. 1. Зависимость изменения граничного потенциала мембраны от концентрации ЭСГ (*квадраты*), ЭЛО (*кружки*) и ЭЧ (*треугольники*) в мембраноомывающем растворе. Мембраны сформированы из следующих смесей: *а* – ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %), *б* – ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) или *в* – ПОФХ/СМ/ХОЛ (60/20/20 мол. %) в растворах 0.1 М КСl, рН 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

также установлено, что бетулин и люпеол не влияют на граничный потенциал фосфолипидных мембран ($\Delta \phi_{bmax}$ не превышает по абсолютному значению 1 мВ) (Efimova, Ostroumova, 2021; табл. 2). Сопоставление результатов действия на граничный потенциал природных экстрактов и их компонентов позволяет предположить, что изменение граничного потенциала под действием ЭЛО обусловлено присутствием в его составе кверцетина и мирицетина, а слабое потенциалмодифицирующее действие ЭСГ и ЭЧ связано с высоким содержанием в составе этих экстрактов гликозидов нарингенина и пентациклических тритерпеноидов соответственно.

Для оценки способности экстрактов увеличивать проницаемость липидных везикул для маркера путем разобщения мембранных липидов проведена флуориметрия утечки кальцеина из моноламеллярных липосом различного состава при введении в суспензию экстрактов в концентрации до 100 мкг/мл. В табл. 1 представлены средние величины максимальной утечки маркера из ДОФХ/ХОЛ-, ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ- и

ПОФХ/СМ/ХОЛ-везикул под действием 100 мкг/мл экстракта ЭСГ, ЭЛО или ЭЧ. Вычисления проведены с учетом тушения экстрактами флуоресценции кальцеина (см. раздел "Материал и методика"). В случае ЭСГ, ЭЛО и ЭЧ утечка маркера из везикул ДОФХ/ХОЛ не превышает 6, 14 и 1% соответственно. Величины RF мало зависят от состава липосом. Можно заключить, что ЭСГ и ЭЧ практически не увеличивают проницаемость липосом для кальцеина независимо от их состава. Эти данные указывают на отсутствие способности компонентов ЭСГ и ЭЧ изменять плотность упаковки липидов при встраивании в бислой. Незначительный рост высвобождения маркера из липосом под действием ЭЛО может указывать на способность некоторых компонентов, входящих в состав этого экстракта, разупорядочивать липиды в мембране. Выдвинутое предположение было проверено с помощью дифференциальной сканирующей микрокалориметрии липосом в присутствии компонентов ЭЛО.


Рис. 2. Термограммы плавления ДПФХ ($C_p(T)$) в отсутствие (1) и в присутствии рутина (2), мирицетина (3) или кверцетина (4). Соотношение липид : флавонол составляет 10 : 1.

В отсутствие каких-либо модификаторов предпереход ДПФХ наблюдается при 33.9°С, температура главного фазового перехода липида составляет 41.4°С, а полуширина соответствующего плавлению пика составляет около 0.5°C. Обнаружено, что введение в липосомальную суспензию кверцетина или мирицетина (флавонолов, входящих в состав ЭЛО). приводит к подавлению пред-перехода ДПФХ, снижению его температуры плавления на 0.3 и 0.4°С и увеличению полуширины основного пика на 0.2 и 0.7°С соответственно (рис. 2, табл. 2). Гликозид кверцетина рутин на термограмму плавления ДПФХ практически не влияет (рис. 2, табл. 2). Элиминирование пред-перехода, снижение температуры плавления ДПФХ и увеличение полуширины основного пика на термограмме в присутствии кверцетина и мирицетина указывают на встраивание этих флавонолов в бислой между липидными головками, в результате чего происходит увеличение площади, приходящейся на одну липидную молекулу, разупорядочение ацильных цепей липидов и снижение кооперативности главного фазового перехода ДПФХ. Погружение кверцетина и мирицетина в гидрофильную область мембраны также должно сопровождаться индукцией положительной спонтанной кривизны. Ранее нами показано, что в отличие от флавонолов в составе ЭЛО, кверцетина и мирицетина, компоненты ЭЧ (бетулин и люпеол) практически не влияют на термотропное поведение ДПФХ (Efimova, Ostroumova, 2021; табл. 2).

Подробная количественная характеристика влияния природных экстрактов и их компонентов на физико-химические свойства модельных липидных мембран раскрыла перспективы их совместного применения с антибиотиками, порообразующая активность которых зависит от липидного микроокружения. Для оценки синергизма действия экстрактов с антибиотиками в плоские липидные бислои был реконструирован противогрибковый антибиотик, относящийся к классу полиеновых макролидов, нистатин. Известно, что образованные нистатином ионные каналы обладают механочувствительностью, что обусловлено наличием у формируемых пор липидного устья, характеризующегося положительной кривизной (Chulkov et al., 2015).

Рис. 3 (верхняя панель) демонстрирует изменения стационарного трансмембранного тока, индуцированного введением нистатина с цис-стороны ДОФХ/ХОЛ-бислоев, после двустороннего добавления тестируемых экстрактов. Как видно на рис. 3а-е, ЭСГ и ЭЧ не влияют на величину тока, а ЭЛО вызывает значительное увеличение порообразующей активности нистатина. Табл. 3 суммирует результаты, полученные в серии независимых экспериментов. Ранее нами показано, что флавонолы, входящие в состав ЭЛО, кверцетин и мирицетин, потенцируют порообразующую способность нистатина (в 19-41 и 4-270 раз соответственно) путем снижения энергии образования липидного устья нистатиновых каналов (Chulkov et al., 2015). Таким образом, потенциация ЭЛО порообразующей активности нистатина, вероятно, связана с наличием в составе экстракта ЭЛО кверцетина и мирицетина и индукцией этими компонентами положительной спонтанной кривизны липидных монослоев. Это хорошо согласуется с результатами изучения влияния компонентов ЭЛО

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

ЕФИМОВА и др.



Рис. 3. Влияние различных экстрактов на стационарный макроскопический трансмембранный ток, индуцированный *цис*-добавкой нистатина (*верхняя панель*) или полимиксина Б (*нижняя панель*). Стрелка указывает моменты введения ЭСГ (*a*, *e*), ЭЛО (*б*, *d*) или ЭЧ (*s*, *e*) в омывающий раствор с обеих сторон мембраны до концентрации 100 мкг/мл. Нистатин-модифицированные мембраны сформированы из ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) и омываются раствором KCl 2.0 M при рН 7.4 (*верхняя панель*); полимиксин-модифицированные бислои сформированы из ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) и омываются раствором KCl 0.1 M при рН 7.4 (*нижняя панель*). Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

(кверцетина и мирицетина) на термограмму плавления ДПФХ (табл. 2).

Рис. 3 (нижняя панель) демонстрирует действие тестируемых экстрактов на стационарный трансмембранный ток, индуцированный введением с цисстороны другого антибиотика, антибактериального

Таблица 3. Отношение стационарного макроскопического нистатин- или полимиксин Б-индуцированного трансмембранного тока после и до введения экстракта

Экстракт	I_{∞}/I_{∞}^0	
	нистатин	полимиксин Б
ЭСГ	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
ЭЛО	11 ± 6	3 ± 1
ЭЧ	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1

Примечание. Нистатин-модифицированные мембраны сформированы из ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) и омываются раствором КСІ 2.0 М при рН 7.4, полимиксин-модифицированные бислои сформированы из ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) и омываются раствором КСІ 0.1 М при рН 7.4. Нистатин или полимиксин Б добавляли с *цис*-стороны бислоя до конечной концентрации в диапазоне 1–3 и 50–100 мкМ соответственно. Тестируемые экстракты вводили в оба отсека камеры до конечной концентрации 100 мкг/мл.

циклического липопептила полимиксина Б. Известно, что полимиксин Б формирует в модельных липидных мембранах ионные каналы (Корепанова и др., 2000). На рис. 3∂ показано, что ЭЛО усиливает способность полимиксина Б формировать поры в ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ-мембранах. В среднем, липопептил-инлушированный трансмембранный ток после введения ЭЛО увеличивается в 3 раза (табл. 3). ЭСГ и ЭЧ на активность полимиксина Б практически не влияют (рис. 3∂ , *е* соответственно), и средние токи до и после добавки экстрактов практически не отличаются (табл. 3). Сходство влияния тестируемых экстрактов на порообразующую активность нистатина и полимиксина Б может свидетельствовать о сходном строении образуемых этими антибиотиками пор. Можно предположить, что полимиксин Б формирует в мембранах тороидальные поры, одно устье которых образовано молекулами липопептида, а второе – мембранными липидами. Важно отметить, что по такому принципу формирует каналы другой липопептидный антибиотик сирингомицин Е (Ostroumova et al., 2007).

Таким образом, полученные данные указывают на синергизм противомикробного действия порообразующих антибиотиков (нистатина и полимиксина Б) и ЭЛО, что может быть использовано при создании комбинированных противомикробных средств широкого спектра действия, назначаемых медицинскими специалистами до выявления природы патогена.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке ЗАО "Эвалар".

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ефимова С.С., Остроумова О.С. 2015. Модификаторы дипольного потенциала липидных бислоев. Акта Натура. Т. 7. № 4. С. 73. (*Efimova S.S., Ostroumova O.S.* 2015. Modifiers of the dipole potential of lipid bilayers. Acta Naturae. V. 7. P. 70.)
- Корепанова Е.А., Шевченко Е.В., Кожомкулов Е.Т., Вассерман А.Н., Морозова Е.Р., Антонов В.Ф. 2000. Полимиксин Б и Ca²⁺ индуцируют флуктуации проводимости в БЛМ из дипальмитоилфосфатидной кислоты. Биофизика. Т. 45. С. 276. (Korepanova E.A., Shevchenko E.V., Kozhomkulov E.T., Vasserman A.N., Morozova E.R., Antonov V.F. 2000. Polymyxin B and Ca(2+) induce conductance fluctuations in the dipalmitoyl phosphatidic acid bilayer lipid membrane. Biofizika. V. 45. P. 276.)
- Abdelraouf K., Chang K.T., Yin T., Hu M., Tam V.H. 2014. Uptake of polymyxin B into renal cells. Antimicrob Agents Chemother. V. 58. P. 4200.
- Andersen O.S., Finkelstein A., Katz I., Cass A. 1976. Effect of phloretin on the permeability of thin lipid membranes. J. Gen. Physiol. V. 67. P. 749.
- *Andreoli T.* 1974. The structure and function of amphotericin B cholesterol pores in lipid bilyer membranes. Ann. N.Y. Acad. Sci. V. 235. P. 448.
- Arora R., Mundra S., Yadav A., Stobdan T. 2012. Antimicrobial activity of seed, pomace and leaf extracts of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) against foodborne and food spoilage pathogens. African. J. Biotechnol. V. 11. P. 10424. https://doi.org/10.5897/AJB11.4150
- Avula B., Sagi S., Wang Y.H., Wang M., Gafner S., Manthey J.A., Khan I.A. 2016. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis of limonoids and flavonoids in seeds of grapefruits, other citrus species, and dietary supplements. Planta. Med. V. 82. P. 1058.
- Bagnis C.I., Deray G. 2013. Amphotericin B nephrotoxicity. Saudi J. Kidney Dis. Transplant. V. 13. P. 481.
- Brorson O., Brorson S.H. 2007. Grapefruit seed extract is a powerful *in vitro* agent against motile and cystic forms of Borrelia burgdorferi sensu lato. Infection. V. 35. P. 206.
- Chulkov E.G., Schagina L.V., Ostroumova O.S. 2015. Membrane dipole modifiers modulate single-length nystatin channels

ЦИТОЛОГИЯ том 64 № 5 2022

via reducing elastic stress in the vicinity of the lipid mouth of a pore. Biochim. Biophys. Acta. V. 1848. P. 192.

- *Efimova S.S., Zakharova A.A., Medvedev R.Ya., Ostroumova O.S.* 2018. Ion channels induced by antimicrobial agents in model lipid membranes are modulated by plant polyphenols through surrounding lipid media. J. Membr. Biol. V. 251. P. 551.
- *Efimova S.S., Ostroumova O.S.* 2012. Effect of dipole modifiers on the magnitude of the dipole potential of sterol-containing bilayers. Langmuir. V. 28. P. 9908. https://doi.org/10.1021/la301653s
- *Efimova S.S., Ostroumova O.S.* 2021. Is the membrane lipid matrix a key target for action of pharmacologically active plant saponins? Int. J. Mol. Sci. V. 22. P. 3167. https://doi.org/10.3390/ijms22063167
- *Ermishkin L.N., Kasumov K.M., Potzeluyev V.M.* 1976. Single ionic channels induced in lipid bilayers by polyene antibiotics amphotericin B and nystatine. Nature. V. 262. P. 698.
- Fukuyama M., Furuhata K., Oonaka K., Yakiwara R., Koizumi T., Hara M., Dogasaki C., Shimada T., Kuribayashi T., Nakazawa M., Watanabe T. 2003. Isolation and serotyping of Vero toxin-producing Escherichia coli (VTEC) from pig. Kansenshogaku Zasshi. V. 77. P. 1032.
- Glamočlija J., Ćirić A., Nikolić M., Fernandes Â., Barros L., Calhelha R.C., Ferreira I.C., Soković M., van Griensven L.J. 2015. Chemical characterization and biological activity of Chaga (Inonotus obliquus), a medicinal "mushroom". J. Ethnopharmacol. V. 162. P. 323.
- Gray K.C., Palacios D.S., Dailey I., Endo M.M., Uno B.E., Wilcock B.C., Burke M.D. 2012. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 109. P. 2234.
- Heggers J.P., Cottingham J., Gusman J., Reagor L., McCoy L., Carino E., Cox R., Zhao J.G. 2002. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and *in vitro* toxicity. J. Altern. Complement. Med. V. 8. P. 333.
- Ionescu G., Kiehl R., Wichmann-Kunz F., Williams C.H., Bauml L., Levine S. 1990. Oral Citrus seed extract in atopic eczema: In vitro and in vivo studies on intestinal microflora. J. Orthomolecular. Med. V. 5. P. 155.
- Laniado-Laborín R., Cabrales-Vargas M.N. 2009. Amphotericin B: side effects and toxicity. Rev. Iberoam. Micol. V. 26. P. 223.
- Michel T., Destandau E., Le Floch G., Lucchesi M.E., Elfakir C. 2012. Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. Food Chem. V. 131. P. 754.
- *Montal M., Muller P.* 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and study of their electrical properties. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 65. P. 3561.
- Nikitina S.A., Khabibrakhmanova V.R., Sysoeva M.A. 2016. Composition and biological activity of triterpenes and steroids from *Inonotus obliquus* (chaga). Biochem. (Moscow). Suppl. Series B. V. 62 P. 369.
- *Oyelami O.A., Agbakwuru E.A., Adeyemi L.A., Adedeji G.B.* 2005. The effectiveness of grapefruit (*Citrus paradisi*) seeds in treating urinary tract infections. J. Altern. Complement. Med. V. 11. P. 369.
- Ostroumova O.S., Gurnev P.A., Schagina L.V., Bezrukov S.M. 2007. Asymmetry of syringomycin E channel studied by polymer partitioning. FEBS Lett. V. 581. P. 804.

- Sawaya B.P., Briggs J.P., Schnermann J. 1995. Amphotericin B nephrotoxicity: the adverse consequences of altered membrane properties. J. Am. Soc. Nephrol. V. 6. P. 154.
- *Wilcock B.C., Endo M.M., Uno B.E., Burke M.D.* (2013). C2'-OH of amphotericin B plays an important role in binding the primary sterol of human cells but not yeast cells. J. Am. Chem. Soc. V. 135. P. 8488.

https://doi.org/10.1021/ja403255s

- Yogendra Kumar M.S., Tirpude R.J., Maheshwari D.T., Bansal A., Misra K. 2013. Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophae rham-noides* L.) leaves *in vitro*. Food Chem. V. 141. P. 3443.
- Zavascki A.P., Goldani L.Z., Li J., Nation R.L. 2007. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. J. Antimicrob. Chemother. V. 60. P. 1206. https://doi.org/10.1093/jac/dkm357
- Zavascki A.P., Nation R.L. 2017. Nephrotoxicity of polymyxins: is there any difference between colistimethate and polymyxin B? Antimicrob. Agents Chemother. V. 61. P. e02319-16. https://doi.org/10.1128/AAC.02319-16
- *Zotchev S.B.* 2003. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. Curr. Med. Chem. V. 10. P. 211.

Extracts of Grapefruit Seeds, Sea Buckthorn Leaves and Chaga Affect Properties of Model Lipid Membranes and Reconstituted Ion Channels

S. S. Efimova^a, *, A. A. Zakharova^a, D. N. Chernyshova^a, and O. S. Ostroumova^a

^aInstitute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia *e-mail: efimova@incras.ru

The effects of extracts of grapefruit seeds (EGS), sea buckthorn leaves (ESBL) and chaga (EC) on model lipid membranes were studied. It was shown that the threshold concentrations of EGS and EC leading to destabilization of phosphatidylglycerol-enriched bilayers are 1.3-1.4 times lower than for phosphatidylcholine-containing membranes. It was established that EGS and ESBL reduced the boundary potential of membranes formed from a mixture of phosphatadylcholine and cholesterol (boundary potential changes reached for 45 and 40 mV at concentrations of 60 and 800 µg/mL, respectively). EC was not characterized by a pronounced potential-modifying effect. It was demonstrated that changes in the boundary potential in the presence of ESBL were due to the presence in its composition of flavonols, quercetin and myricetin. Using differential scanning microcalorimetry, it was also found that quercetin and myricetin were able to influence the thermotropic behavior of membrane-forming lipids, and, consequently, their packing density. The potentiation of the pore-forming activity of the antifungal polyene macrolide nystatin and the antibacterial lipopeptide polymyxin B at the introduction of ESBL was shown. These data indicate a possible synergism of the antimicrobial action of the tested antibiotics and ESBL, which can be used to develop combined broad-spectrum antimicrobial agents.

Keywords: plant extracts, model lipid membranes, liposomes, membrane boundary potential, lipid packing, ion channels, antibiotics