

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ISSN 0041-3771

# ЦИТОЛОГИЯ

TSITOLOGIYA

2024. Том 66

2024. Vol. 66

3



# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 66, номер 3, 2024

---

---

- Рецепция повреждения и активация роста соединительной ткани: ключевые регуляторные этапы регенерации у человека  
*Р. Ю. Еремичев, П. И. Макаревич* 207
- Генетически кодируемый биосенсор НуРег как инструмент для количественного определения внутриклеточного уровня перекиси водорода  
*О. Г. Люблинская, Ю. С. Иванова* 223
- Двойственное влияние хлорида лития на эффективность образования и ПСК мыши  
*А. В. Кузнецов, Е. В. Скворцова, А. Н. Томилин, А. С. Цимоха* 234
- Создание модельной линии опухолевых клеток с индуцируемой экспрессией аденовирусного E1A для изучения его антипролиферативных и цитотоксических свойств *in vitro* и *in vivo*  
*А. В. Моршнева, А. М. Козлова, О. О. Гнедина, М. В. Иготти* 242
- Метод EMSA—SELEX—seq для анализа последовательностей сайтов связывания в комплексах ДНК—белок  
*И. Б. Назаров, М. Н. Гордеев, А. А. Кузьмин, Д. С. Зилов, Е. В. Потапенко, А. Н. Томилин* 253
- N-ацилпроизводные 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола — потенциальные протекторы при индуцируемом нейтрофилами галогенирующем стрессе  
*Г. Н. Семенкова, И. И. Жолнеревич, Е. И. Коваленко, Г. А. Ксендзова, В. Л. Сорокин, Н. В. Амазгбери, А. В. Климович* 259
- Грануляция цитоплазмы ооцитов человека на стадии зародышевого пузырька как предиктор способности к спонтанному созреванию в стимулированных циклах экстракорпорального оплодотворения  
*Д. Ф. Салимов, И. О. Боголюбова, Д. С. Боголюбов* 268
- In vitro* скрининг потенциальных систем доставки эхинохрома для лечения заболеваний глаз  
*Э. И. Александер-Синклер, С. А. Александрова, Д. М. Дарвиш, Н. В. Едоменко, В. И. Горбач, А. О. Кравченко, И. М. Ермак, Н. А. Михайлова, М. И. Блинова* 274
- Особенности молекулярного фенотипа и ультраструктуры гладких миоцитов восходящей части аорты преждевременно рожденных крыс  
*О. Н. Серебрякова, В. В. Иванова, И. В. Мильто* 289
- Методы анализа изображений внутриклеточных структур актина, меченного фаллоидином  
*А. В. Ревитцер, Ю. А. Негуляев* 299
- 
-

# CONTENTS

---

---

Volume 66, No. 3, 2024

---

---

|   |     |
|---|-----|
| Reception of damage and activation of growth of connective tissue: Crucial regulatory milestones of regeneration in humans<br><i>R. Yu. Eremichev, P. I. Makarevich</i>   | 207 |
| Genetically encoded biosensor HyPer as a tool for quantification of intracellular hydrogen peroxide concentrations<br><i>O. G. Lyublinskaya, Ju. S. Ivanova</i>   | 223 |
| The dual effect of lithium chloride on the efficiency of generating mouse-induced pluripotent stem cells<br><i>A. V. Kuznetsov, E. V. Skvortsova, A. N. Tomilin, A. S. Tsimokha</i>   | 234 |
| Creation of a model line of tumor cells with inducible expression of adenoviral E1A to study its antiproliferative and cytotoxic properties in vitro and in vivo<br><i>A. V. Morshneva, A. M. Kozlova, O. O. Gnedina, M. V. Igotti</i>                                | 242 |
| EMSA—SELEX—seq method for analysis of binding site sequences in DNA—protein complexes<br><i>I. B. Nazarov, M. N. Gordeev, A. A. Kuzmin, D. S. Zilov, E. V. Potapenko, A. N. Tomilin</i>   | 253 |
| N-acyl derivatives of 2-amino-4,6-di- <i>tert</i> -butylphenol — potential protectors under neutrophil-induced halogenating stress<br><i>G. N. Semenkova, I. I. Zholnerevich, E. I. Kovalenko, G. A. Ksendzova, V. L. Sorokin, N. V. Amaegberi, A. V. Klimovich</i>   | 259 |
| Cytoplasmic granulation of human oocytes at the germinal vesicle stage as a predictor of their ability to spontaneous maturation in stimulated cycles of in vitro fertilization<br><i>D. F. Salimov, I. O. Bogolyubova, D. S. Bogolyubov</i>                          | 268 |
| In vitro screening of potential echinochrome delivery systems for the treatment of eye diseases<br><i>E. I. Alexander-Sinklair, S. A. Aleksandrova, D. M. Darvish, N. V. Edomenko, V. I. Gorbach, A. O. Kravchenko, I. M. Yermak, N. A. Mikhailova, M. I. Blinova</i> | 274 |
| Features of molecular phenotype and ultrastructure of smooth muscle cells in ascending aorta in premature born rats<br><i>O. N. Serebryakova, V. V. Ivanova, I. V. Milto</i>  | 289 |
| Methods for image analysis of intracellular structures of actin labeled with phalloidin<br><i>A. V. Revittser, Y. A. Negulyaev</i>  | 299 |

---

---

УДК 57.022+576.54+576.385+576.36

## РЕЦЕПЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ И АКТИВАЦИЯ РОСТА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ: КЛЮЧЕВЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭТАПЫ РЕГЕНЕРАЦИИ У ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. Р. Ю. Еремичев<sup>1, 2</sup>, П. И. Макаревич<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория генно-клеточной терапии, Институт регенеративной медицины,  
Медицинский научно-образовательный центр, МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва, 119192, Россия

<sup>2</sup>Кафедра биохимии и регенеративной медицины факультета фундаментальной медицины  
МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва, 119192, Россия

\*E-mail: makarevichpi@ty.msu.ru

Поступила в редакцию 21.11.2023

После доработки 07.12.2023

Принята к публикации 08.12.2023

Повреждение тканей активирует программы, направленные на выживание организма и восстановление его целостности, однако длительное время молекулярные и клеточные механизмы их реализации оставались нерасшифрованными. За последние годы получен ряд важных сведений о механизмах регенерации, которые в значительной степени уточняют представления о регуляции ответа на повреждение и заслуживают внимания в плане поиска новых мишеней для управления этим процессом. В данном обзоре кратко суммируются сведения об основных механизмах регуляции, связанных с ранними этапами ответа тканей человека на повреждение. Также приводятся актуальные данные о механизмах рецепции повреждения и роли стромальных клеток в формировании первичной соединительной ткани как структуры, определяющей исход регенерации.

**Ключевые слова:** регенерация, фиброз, стволовая клетка, мезенхимная стромальная клетка, строма, регенеративная медицина

**Принятые сокращения:** ВКМ — внеклеточный матрикс; ГТ — грануляционная ткань; МСК — мезенхимная стромальная клетка; СК — стволовая клетка; СТ — соединительная ткань; ФР — фактор роста; ЭК — эндотелиальная клетка; CGRP — кальцитонин-ген связанный пептид (calcitonin gene-related peptide); DAMPs — ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны (damage-associated molecular patterns); HIF — индуцируемый гипоксией фактор (hypoxia-inducible factor); IL — интерлейкин; NFκB — ядерный фактор каппа-B (nuclear factor κB); PAMPs — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns); PDGF — фактор роста тромбоцитарного происхождения (platelet-derived growth factor); PRR — распознающие паттерны рецепторы (pattern recognition receptor); TGF — трансформирующий фактор роста (transforming growth factor); TLR — toll-подобный рецептор (toll-like receptor); NLR — NOD-подобный рецептор (NOD-like receptor); vWF — фактор фон Виллебранда; VEGF — фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor).

**DOI:** 10.31857/S0041377124030011, **EDN:** PERILR

Одним из свойств живой системы является неотъемлемая способность поддерживать исходный состав (обновляться) и восстанавливать его (регенерировать) после повреждения (Hall, 1997). Повреждение может быть непосредственно вызвано внешними воздействиями (травма, интоксикация), так и происходить при нарушениях адаптации к действию внешних факторов или к резким изменениям среды (Yun, 2015). Вне зависимости от причины повреждение заключается в разрушении части живой системы, т. е. к ее утрате не по мере естественного износа, а относительно быстро или даже одномоментно, как в случае острой травмы (Stocum, 2001).

Основой поддержания целостности многоклеточного организма является *физиологическое обновление* — постоянный процесс замещения отслуживших клеточных элементов, в основном, за счет пролиферации зрелых клеток или активации резидентных стволовых клеток (СК) с последующей дифференцировкой. Все клетки имеют заданный период жизни, по истечении которого происходит их программируемая гибель с замещением вновь образованными клетками. Этот цикл является основой постоянства клеточного состава, которое определяется динамичными процессами гибели и появления новых клеток (Wyllie, 1987; Guillot, Lecuit, 2013).

Обновление с разной интенсивностью постоянно идет в коже, жировой ткани, во всех паренхиматозных и полых органах, сердце и нервной системе. Гибель и появление новых клеток представляют собой подобию прямой и обратной реакции с константами, меняющимися под влиянием неблагоприятных условий, например, дефицита питания и истощения, хронического воспаления и, наконец, старения организма в целом (Iismaa et al., 2018). Примером высокоэффективного обновления считают функционирование красного костного мозга или крипты кишечника, которые обеспечивают поддержание состава крови и обновление слизистой оболочки кишки соответственно. Скорость обновления является достаточно жестко закрепленным тканеспецифичным параметром, любые резкие изменения которого вызывают серьезные отклонения в структуре и функции ткани (Макаревич et al., 2020).

При повреждении однократная или хроническая утрата большого количества клеток и иных элементов ткани активирует процесс их восстановления, который получил название *репаративной регенерации*. Принципы восстановления структуры в такой ситуации отличаются от описанного выше физиологического обновления. Большинство авторов середины XX в. указывали, что ключевым ответом на повреждение является локальная активация программы *роста ткани*, направленного на восстановление целостности (Argyris, 1968).

Действительно, если рассматривать обязательные для любого повреждения процессы воспаления, гомеостаза как необходимые для выживания защитные реакции, то воссоздание структуры требует именно роста ткани, которого не происходит при обновлении. Таким образом, помимо вызывающей его причины и масштабов гибели клеток, процесс репаративной регенерации отличается от обновления наличием фазы роста, основу которой закладывают воспалительная и иммунная реакции на повреждение. Кроме того, если обновление по определению должно заканчиваться восстановлением структуры, то при репаративной регенерации существует возможность различных исходов, крайними вариантами которых считают *фиброзирование* и *эпиморфную регенерацию*.

При фиброзировании разрастание соединительной ткани успешно восстанавливает механическую целостность органа, но полностью блокирует возможность эпиморфоза — роста с восстановлением исходной структуры. Хотя ряд тканей обладает стойкой способностью к полноценной (т. н. *эпиморфной*) регенерации, даже в них при выраженном повреждении или нарушении процессов восстановления может

формироваться рубец, т. е. идет фиброзирование. Яркими примерами описанной выше ситуации являются дистальная фаланга пальца, селезенка, а также кожа, роговица и большинство слизистых оболочек при неглубокой травме (Londono et al., 2018).

Из этого можно сделать еще важный вывод, что репаративная регенерация тканей после повреждения представляет собой реакцию с нестрогим детерминированным исходом. С точки зрения физиологии ключевым аспектом является именно регуляция процессов, которые происходят после потери организмом своих элементов (Singh et al., 2017). Именно регулируемость ответов, предшествующих исходу, открывает возможность его изменения за счет воздействия на соответствующие звенья регуляции. С этой позиции можно заключить, что современные представления о репаративной регенерации рассматривают ее как *последовательность регулируемых физиологических ответов, определяющих ее исход* (Singh et al., 2017; Rodrigues et al., 2019).

Накопленные данные о регуляции процессов регенерации уже не позволяют сводить ее к упрощенной модели, в которой объем повреждения, тканеспецифичные свойства клеток и стереотипные патофизиологические процессы (гемостаз, воспаление) определяют исход заживления. Кроме того, исследование клеточной судьбы и анализ транскриптомов одиночных клеток убедительно показали возможность динамических изменений фенотипа вплоть до трансдифференцировки в ходе репаративной регенерации (Mollinari et al., 2018; Tanabe et al., 2018). В это связи мы оказываемся в достаточно затруднительном положении, в ходе уточнения имеющихся представлений мы сталкиваемся с определенными ситуациями, которые выходят за их рамки.

Данное сообщение не ставит своей целью пересмотр классических представлений о ранозаживлении в организме человека или о возможностях регенерации его тканей. Мы предлагаем читателю обратить внимание на ранние события в ходе репаративной регенерации и их регуляцию. Исходя из классических представлений о первичном стимуле, значительное внимание уделяется вопросу рецепции повреждения и ранним этапам ответа на него, т. к. они определяют выживание и закладывают основу для дальнейших событий. Далее мы предлагаем обратить внимание на ключевую для исхода процесс формирования соединительной ткани (СТ) на месте разрушенных структур и акцентируем внимание на роли стромальных клеток как участников и потенциальных координаторов этого критического этапа.

Таким образом, данный обзор посвящен вопросам физиологической регуляции гемостаза, воспаления и пролиферации, которые в ответе на повреждение часто рассматривают как стереотипные. В нашем представлении формируемые в ходе них регуляторные звенья и связи играют важную роль в определении исхода и заслуживают внимания, в т. ч. как мишени в регенеративной медицине.

## ЭТАПЫ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ, ЕЕ РЕГУЛЯЦИЯ И ИСХОДЫ

### Гемостаз, рецепция повреждения и его механизмы.

При достаточно объемном повреждении любой ткани происходит нарушение ее структуры на всех уровнях и потеря связей, существовавших между ее элементами. Основными чертами этого события являются массивная гибель клеток многих типов и разрушение межклеточного вещества. Пространство, образовавшееся в зоне повреждения, заполняется содержимым кровеносных сосудов и элементами, которые отсутствовали в ткани до повреждения: клетками воспаления, белками плазмы крови. Такое изменение структуры и состава ткани становится ключевым триггером гемостаза: фактор фон Виллебранда (vWF) и коллагены тканей связываются с гликопротеином Ib (GPIb) тромбоцитов, вызывают их распластывание и дегрануляцию (Klatt, Kumar, 2014). При этом в ткани выбрасывается содержимое тромбоцитарных гранул, содержащих, в том числе, факторы роста (ФР) — PDGF, VEGF, TGF- $\beta$  и др., а также нейромедиаторы (серотонин, АДФ) (Rodrigues et al., 2019). На этом этапе активированные тромбоциты являются одним из немногих и, возможно, основным, источником ФР (Rodrigues et al., 2019). ФР также относятся к ключевым регуляторам процессов заживления на более поздних этапах, однако при активации тромбоцитов их содержание в зоне повреждения значительно возрастает уже через несколько минут после начала кровотечения. Таким образом, они начинают оказывать свое плейотропное действие уже на ранних этапах регенерации — гемостазе и воспалении (Kulebyakin et al., 2020).

Активация тромбоцитов на начальных этапах гемостаза идет по принципу положительной обратной связи, что обеспечивает формирование тромбоцитарного сгустка, а также выброс достаточного количества активаторов дальнейших стадий свертывания крови. Следующим ключевым моментом является запуск каскада свертывания крови экспонированным на поверхности клеток тканевым фактором, что приводит к образованию фибринового сгустка (Klatt,

Kumar, 2014). Его роль не ограничена остановкой кровотечения — ниже будет отражена его роль как первичного структурного матрикса для дальнейшего процесса заживления (Rodrigues et al., 2019), а клетки крови, входящие в его состав, активно продуцируют спектр биологически активных веществ, диффундирующих в ткани.

Кровь рассматривается как важнейший участник первых этапов ответа на повреждение, поскольку она всегда участвует в этом процессе, причем обладает двойственной функцией. Во-первых, форменные элементы крови способны к рецепции повреждения с активацией гемостаза и воспаления вне зависимости от типа поврежденной ткани, а отличающиеся характеристики гемостаза и воспаления в разных органах связаны с тканеспецифичной экспрессией факторов, регулирующих этот процесс (Maskman, 2005). Во-вторых, контакт клеток ткани с компонентами крови является обязательной частью рецепции повреждения самой тканью, а субстанции, выделяющиеся при гемостазе, пополняют локальный пул ФР и медиаторов воспаления, о которых речь пойдет в соответствующем разделе настоящего обзора.

При этом механизмы рецепции повреждения, не ассоциированные с активацией гемостаза, изучены слабее, однако установлено, что компоненты погибших клеток представляют собой *ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны* (damage-associated molecular patterns, или DAMPs), а компоненты проникающих из внешней среды микроорганизмов — *патоген-ассоциированные молекулярные паттерны* (pathogen-associated molecular patterns, или PAMPs).

DAMPs представляют собой молекулы, выполняющие различные функции внутри клетки и в норме крайне редко оказывающиеся в межклеточном пространстве. Основным механизмом клеточной гибели при обширном повреждении является некроз, в исходе которого содержимое клеток изливается во внеклеточное пространство. Компоненты разрушенных клеток и попавшие из внешней среды факторы начинают непосредственно воздействовать на окружающие ткани. Во внеклеточной среде они начинают выполнять функцию сигнальных молекул, сообщающих окружающим клеткам информацию о степени повреждения, его природе. Наиболее хорошо изученным представителем DAMPs, является HMGB1, для которого в конце 1990-х гг. было обнаружено, что он выделяется из некротизированных клеток в зоне повреждения и играет роль активатора клеток иммунной системы (Wang et al., 1999; Lotze, Tracey, 2005).

PAMPs представлены, в основном, различные частями микроорганизмов, часто контаминирующих зону повреждения. В отличие от DAMPs, PAMPs практически отсутствуют в неповрежденных тканях организма. Как правило, это компоненты бактериальной клеточной стенки или жгутиков, а также чужеродная ДНК и РНК (Takeuchi, Akira, 2010). Липополисахарид — компонент внешней мембраны грамотрицательных бактерий — наиболее хорошо изученный представитель PAMPs. В связи с активным развитием микробиологии и иммунологии, количество известных DAMPs и PAMPs постоянно растет и становится ясно, что их представители могут являться носителями различной информации о повреждении (Mogensen, 2009). В особенности это стало актуально для PAMPs, которые могут в числе прочего нести информацию о типах контаминирующих микроорганизмов (Takeuchi, Akira, 2010).

Молекулы обоих упомянутых классов сигнализируют о повреждении посредством различных распознающих паттерны рецепторов (pattern recognition receptors, или PRRs). В настоящее время описаны целые классы рецепторов, отнесенных к PRR: toll-like receptors (TLR), NOD-like receptors (NLR), а также различные внутриклеточные ДНК-сенсоры (Takeuchi, Akira, 2010; Gong et al., 2020).

Основные данные о сигнальных каскадах, активируемых PAMPs и DAMPs, были получены при изучении клеток иммунной системы, однако позднее было показано, что PRRs имеются на большинстве других типов клеток, в том числе на СК, а также клетках паренхимы и стромы (Prockop, Oh, 2012; Murphy, Weaver, 2016; Gong et al., 2020). Репертуар PRRs и сопряжение активируемых ими сигнальных путей с даунстрим-мишенями могут варьировать в различных клеточных популяциях (Lee, Kim, 2007), что приводит к вариативности ответа тканей на повреждение (Szabo et al., 2006; Kigerl et al., 2014).

Таким образом, на ранних этапах ответа на повреждение гемостаз и прочно ассоциированная с ним рецепция повреждения являются важнейшим стимулом для активации соответствующих программ в других типах клеток. Не связанные с гемостазом механизмы рецепции повреждения являются менее изученными, однако в деталях показано участие в них DAMPs и PAMPs. Чаще всего они ассоциируются с последующей активацией иммунной реакции, однако их роль в активации обновления и репаративной регенерации сейчас активно исследуется (Venegau et al., 2015).

**Сосудистая реакция на повреждение и таксис лейкоцитов.** Внутренняя выстилка сосудов (эндотелий)

представляет собой интерфейс, определяющий взаимоотношения между тканями и кровью, которые нарушаются при повреждении. Микроокружение, формируемое в ответ на рецепцию повреждения, становится регуляторной основой для дальнейших этапов заживления и одной из ранних фаз является сосудистая реакция, зависящая от активности эндотелиоцитов. Последние содержат внутриклеточные гранулы — тельца Вайбеля—Паладе с биологически активными веществами, например, эндотелином-1, IL-8, растворимой формой vWF и др. (Rondaj et al., 2006). В ответ на рецепцию повреждения содержимое эндотелиальных телец Вайбеля—Паладе путем деградации выбрасывается в зону процесса заживления, внося вклад в гемостаз и в формирование в тканях пула медиаторов воспаления. Высвобождаемый эндотелин-1 вызывает сокращение поврежденных сосудов, vWF — активацию и агрегацию тромбоцитов, а IL-8 является мощным хемокином для нейтрофилов и других иммунных клеток (Rondaj et al., 2006). Вазоконстрикция в первые минуты после повреждения, вызываемая также активацией симпатической нервной системы, краткосрочна и быстро нивелируется за счет активности тучных клеток (Klatt, Kumar, 2014). Продуцируемый ими гистамин и другие вазоактивные медиаторы вызывают длительную вазодилатацию с усилением проницаемости сосудов (Rodrigues et al., 2019). Результатом вазодилатации, опосредованной расслаблением гладкомышечных элементов стенок артериол, становится увеличение объема кровотока вблизи зоны повреждения, сопровождаемое открытием дополнительных капилляров, а также покраснением и разогревом тканей. Усиление проницаемости сосудов происходит за счет ретракции эндотелиоцитов и увеличения фенестр между ними, в результате чего плазма крови начинает выходить из сосудов в окружающие ткани, формируя *отек*. Из-за уменьшения объема плазмы кровь в сосудах сильно сгущается, в результате чего движение форменных элементов замедляется и возникает состояние, называемое *стазом*. Вместе с образованием пор между эндотелиоцитами это создает необходимые условия для роллинга и адгезии лейкоцитов к стенкам сосудов с последующей миграцией в зону повреждения и окружающие ее ткани (Rodrigues et al., 2019).

Первыми мигрируют *нейтрофилы*: приходя в зону повреждения, они взаимодействуют с компонентами воспалительного микроокружения, проходя стадии праймирования и активации (Phillipson, Kubes, 2019). В зависимости от стимулов, активирующих нейтрофилы, их судьба может быть различной. Нейтрофилы, попавшие в окружение с низким уровнем медиа-

торов воспаления и высоким содержанием PAMPs и DAMPs, начинают продуцировать свободные радикалы и выбрасывают во внеклеточное пространство ДНК (Kolaczowska, Kubes, 2013). В результате этого в ткани увеличивается содержание молекул с бактерицидным и бактериостатическим действием, однако под влиянием свободных радикалов, матричных металлопротеиназ (ММП) и свободной ДНК одновременно увеличивается зона повреждения и секреция тканями медиаторов воспаления (Kolaczowska, Kubes, 2013). Нейтрофилы, оказавшиеся в условиях высокой концентрации медиаторов воспаления (которые обеспечивают праймирование вновь прибывающих в зону повреждения нейтрофилов) и при этом со снижающимся содержанием PAMPs и DAMPs, начинают активно фагоцитировать дебрис и подвергаться апоптозу (Mayadas et al., 2014). Таким образом, на данном этапе происходит очищение зоны повреждения на фоне высокого уровня провоспалительных цитокинов, в том числе секретируемых самими нейтрофилами.

*Моноциты* начинают мигрировать из системного кровотока в зону повреждения вместе с нейтрофилами, но делают это значительно медленнее, поэтому накопление их в достаточном количестве происходит, когда количество нейтрофилов уже начинает снижаться по описанному выше механизму (Rodrigues et al., 2019). В зоне повреждения моноциты начинают дифференцироваться в макрофаги, функциональный фенотип которых зависит от регуляторного окружения, в которое они попадают. Известно, что макрофаги могут приобретать провоспалительный (M1) и противовоспалительный (M2) фенотип, однако *in vivo* в зоне повреждения ситуация обстоит гораздо сложнее. M1-макрофаги продуцируют преимущественно провоспалительные цитокины (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), а после переключения фенотипа на M2 — ФР и противовоспалительные цитокины (PDGF, VEGF, факторы роста TGF- $\beta$  и IGF-1, IL-10 и др.) (Yunna et al., 2020).

Описанные *in vitro* M1- и M2-фенотипы являются противоположными точками континуума возможных фенотипов макрофагов, в той или иной степени обладающих признаками как M-1, так и M-2 клеток (Novak, Koh, 2013). При заживлении острого повреждения многих органов в первые дни превалируют макрофаги провоспалительного типа, но в течение нескольких суток происходит смена фенотипа и в большинстве оказываются макрофаги с противовоспалительным фенотипом (Novak, Koh, 2013). Одним из сильнейших стимулов для такого «переключения» фенотипа являются апоптотические тельца нейтрофилов, которые

фагоцитируются макрофагами (Mantovani et al., 2013; Greenlee-Wacker, 2016). Это приводит к очередной смене регуляторного микроокружения и способствует разрешению воспаления, а также дальнейшему заживлению тканей (Wynn, Vannella, 2016).

**Реакция периферической нервной системы и нейрогенное воспаление.** Непосредственное участие в рецепции повреждения и регуляции воспаления принимают чувствительные нервные волокна, получившие название *первичных афферентов* и локализующиеся в периваскулярной соединительной ткани (СТ) (Glatte et al., 2019). Первичные афференты обладают двумя основными функциями: 1) они передают в центральную нервную систему (ЦНС) информацию, субъективно воспринимаемую как боль; 2) они функционируют как неотъемлемая часть иннервируемых тканей, паракринно взаимодействуя с клетками за счет секреции нейропептидов (Choi, Di Nardo, 2018). Важной особенностью этого паракринного взаимодействия является масштабность, достигаемая при помощи *аксон-рефлекса*. Его основой является особая структура первичных афферентов — каждое волокно при входе в ткань распадается на несколько ветвей, завершающихся свободными нервными окончаниями — таким образом оно иннервирует не несколько отдельных клеток, а некоторый объем органа. Когда на одной из таких ветвей возникает потенциал действия, то он распространяется как по восходящему волокну, так и по остальным его ветвям, при этом из них в иннервируемые ткани выделяются нейропептиды (Schäffer et al., 1998).

Свободные нервные окончания несут на своей поверхности PRRs (рецепторы DAMPs, PAMPs), а также рецепторы медиаторов воспаления, поэтому участвуют как в рецепции повреждения, так и в регуляции воспаления. Активация этих рецепторов приводит к генерации в цитоплазме нервных окончаний вторичных мессенджеров — цАМФ и Ca<sup>2+</sup>, которые активируют соответствующие протеинкиназы с генерацией потенциала действия, секрецией нейропептидов и гиперсенситизацией нервных окончаний (Chavan et al., 2017).

Наиболее изученными среди секретируемых первичными афферентами нейропептидов являются субстанция Р и кальцитонин-ген связанный пептид (CGRP). При их продукции в ответ на значимое раздражение нервных окончаний развивается нейрогенное воспаление, которое приводит к экссудации и миграции лейкоцитов в ткань. Функциональные рецепторы к субстанции Р и CGRP присутствуют на большинстве клеток соединительной ткани, в том числе на эндотелиальных клетках сосудов и тучных

клетках, активация которых и приводит к развитию нейрогенного воспаления (Choi, Di Nardo, 2018). При повреждении это представляется важным аспектом усиления реакции сосудов вокруг зоны повреждения. Оно осуществляется, с одной стороны, за счет аксон-рефлекса, а с другой — посредством взаимной активации нервных окончаний и тучных клеток по механизму положительной обратной связи. Нервные окончания секретируют нейропептиды, запускающие дегрануляцию тканевых базофилов и выделение большого количества гистамина, вызывающего активацию нервных окончаний и усиление выброса ими нейропептидов (Choi, Di Nardo, 2018).

**Роль резидентных иммунокомпетентных клеток в регуляции воспаления.** Характер развивающейся воспалительной реакции определяется составом пула медиаторов воспаления, который зависит от тканеспецифичных механизмов рецепции повреждения. При этом воспаление сохраняет стереотипные черты, не зависящие от характеристик повреждающего стимула или типов повреждаемых тканей (Zhang, Ma, 1999). Это объясняется одной из главных особенностей медиаторов воспаления — способностью вызывать продукцию клетками других медиаторов воспаления по принципу положительной обратной связи, что обеспечивает присутствие относительно устойчивого пула этих молекул независимо от первоначального стимула и места их образования.

Среди резидентных иммунокомпетентных клеток, активно отвечающих на образующиеся провоспалительные факторы, наиболее представлены тканевые макрофаги и дендритные клетки (ДК). Они обнаружены в различных органах и тканях, причем массово они представлены в слизистых оболочках, а также в органах, контактирующих с внешней средой или подверженных высокой антигенной нагрузке (Murphy, Weaver, 2016). ДК и тканевые макрофаги несут множество PRRs, распознающих PAMPs и (или) DAMPs, в основном, TLRs и NLRs. Активация TLRs приводит к их взаимодействию с цитоплазматическими адаптерными белками MyD88, TRIF, MAL и TRAM, запускающими соответствующие внутриклеточные сигнальные каскады (Duan et al., 2022). Как правило, это приводит к активации ассоциированных с воспалением факторов транскрипции NF- $\kappa$ B и AP-1 IRFs, которые индуцируют экспрессию генов множества цито- и хемокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) (Murphy, Weaver, 2016).

Медиаторы воспаления, выделяемые ДК и тканевыми макрофагами в ответ на повреждение, обладают мощным провоспалительным действием. Кроме того, они способны индуцировать секрецию

факторов воспаления другими клетками по принципу положительной обратной связи (Murphy, Weaver, 2016). Благодаря этой положительной обратной связи со временем увеличивается количество клеток, продуцирующих провоспалительные цитокины и хемокины. Этот ответ является критически важным для индукции и увеличения масштабов воспаления, однако без механизмов, сдерживающих эту положительную обратную связь, повреждение приводило бы к гибели от септического шока. Важнейшим фактором сдерживания воспаления является продукция противовоспалительных цитокинов привлекаемыми из системного кровотока лейкоцитами; из числа резидентных клеток эту роль берут на себя стромальные клетки, к которым относятся и упомянутые выше МСК (Rozenendaal, Mebius, 2011).

**Роль стромальных клеток в регуляции ответа на повреждение.** Определение роли стромальных клеток в репаративной регенерации затруднено, прежде всего, потому что не существует достаточно надежных критериев их обнаружения *in vivo* среди множества подобных им клеточных типов. Это связано как с отсутствием экспрессии ими высокочувствительных и специфичных маркеров, так и с высокой гетерогенностью данной популяции (Rodrigues et al., 2019).

Дополнительную неопределенность вносит существование различных типов СТ вкуче с присутствием нескольких типов СТ в составе стромы отдельно взятого органа. Например, стромальные клетки дермы могут быть разделены по принципу принадлежности к определенному типу СТ на фибробласты сосочкового слоя (рыхлая волокнистая СТ) и фибробласты сетчатого слоя (плотная неоформленная СТ) (Mescher, 2018). Также можно отдельно выделить стромальные клетки, контактирующие с эндотелием (перicyты), эпидермисом (субэпидермальные фибробласты), волосяными фолликулами (парафолликулярные фибробласты) и входящие в состав адвентиции сосудов (адвентициальные фибробласты) и т.д. (Lee, Tumber, 2012; Rodrigues et al., 2019; Sviderski-Kind et al., 2021).

Стромальные клетки обладают еще одной особенностью, затрудняющей их изучение *in vivo*, — высокой пластичностью, которая становится актуальной при заживлении. Маловероятно, что в физиологических условиях стромальные клетки способны трансдифференцироваться в клеточные типы, являющиеся производными другого эмбрионального листка, но в пределах пула стромальных клеток и его производных фенотипические переходы происходят. Они обусловлены, скорее, транзиторным влиянием

окружения, а не изменением автономных, т. е. стойко закрепленных свойств, приобретенных в эмбриогенезе (Rodrigues et al., 2019).

Таким образом, современное представление о стромальных клетках описывает их как гетерогенную популяцию фибробластоподобных элементов СТ, хотя данная позиция имеет ряд возражений, основанных, в том числе, на транскриптомном анализе одиночных клеток (Fan et al., 2022).

Большинство данных о рецепции стромальными клетками повреждения и характеристиках ответа на него получены в исследованиях *in vitro* или *in vivo* при разработке методов клеточной терапии, однако сформированная на их основе концепция устойчива и принимается большинством исследователей.

Стромальные клетки экспрессируют ряд PRRs и функциональные рецепторы провоспалительных цитокинов, активация которых в зависимости от контекста вызывает приобретение стромальными клетками про- или противовоспалительного фенотипа. Если стромальные клетки находятся в нормальном (невоспалительном) микроокружении, они могут отвечать на DAMPs и PAMPs продукцией провоспалительных цитокинов. Стромальные клетки, находящиеся в воспалительном окружении, в ответ на эти же стимулы начинают производить противовоспалительные молекулы (Prockop, Oh, 2012). Основными механизмами противодействия воспалительной реакции является продукция стромальными клетками PGE<sub>2</sub>, TSG-6, IL-1ra, IL-10, которые противодействуют чрезмерной продукции провоспалительных цитокинов в зоне повреждения и нарушают положительную обратную связь каскада активации воспаления (Prockop, Oh, 2012; Prockop, 2013; Le Blanc, Davies, 2015).

Несмотря на важность стромальных клеток в регуляции и смягчении острого воспалительного ответа, им присуща и другая важнейшая роль, связанная уже не с ответом на повреждение, а с инициацией роста ткани. Ее можно определить как формирование уникальной СТ, носящей название грануляционной и ассоциированной исключительно с процессами заживления и репаративной регенерации (Häkkinen et al., 2011).

## ГРАНУЛЯЦИОННАЯ ТКАНЬ — ЕЕ СТРУКТУРА, МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ И РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ

**Определение грануляционной ткани и роль стромальных клеток в ее образовании.** Последовательность этапов процессов заживления такова, что

по завершении формирования фибринового свертка, на основе которого разворачивается дальнейший процесс роста ткани, начинается переход к образованию специализированной структуры, которой дали название *грануляционной ткани* (ГТ). Такое название она получила из-за входящих (в ее состав многочисленных капилляров, придающих ей зернистый вид (от лат. *granum* — зерно). ГТ является специфичной для процесса заживления временной соединительнотканной структурой и богата не только пронизывающими внеклеточный матрикс (ВКМ) кровеносными сосудами, но и активированными стромальными и иммунными клетками (Murawala et al., 2012). Функционально она необходима для закрытия зоны повреждения за счет контракции ее краев, а также является местом событий, определяющих исход заживления в фиброзирование или полную регенерацию (Reinke, Sorg, 2012; Singh et al., 2017). В целом, существование ГТ укладывается в *иерархическую модель* развития и морфогенеза, когда следующий по сложности и зрелости уровень структуры разворачивается на основе предыдущего, который может носить временный, но критически важный характер (Aller et al., 2010).

Рост ГТ начинается уже через 48–72 ч после повреждения, когда капиллярные ростки ответвляются от мелких сосудов сохранной ткани и начинают направленный рост в зону повреждения. Непосредственно в зоне повреждения образование ГТ начинается с пролиферации и миграции стромальных, эндотелиальных и эпителиальных клеток. В предшествующую этому фазу воспаления клетки данных типов в большей степени формируют регуляторное микроокружение и взаимодействуют с ним (Singh et al., 2017; Rodrigues et al., 2019). Такой переход клеточной активности от регуляторных функций к формированию структуры в виде ГТ является основополагающим, поскольку на этом этапе начинается собственно рост ткани взамен утраченной, что составляет суть репаративной регенерации (Roosendaal, Mebius, 2011).

Под стромальными клетками в аспекте формирования ГТ чаще всего подразумевают фибробласты, составляющие ее основу и ответственные за синтез, депонирование и ремоделирование ВКМ (Greaves et al., 2013). Однако к стромальным клеткам относят также перициты, гладкомышечные клетки (ГМК) и МСК. О роли МСК в репаративной регенерации речь пойдет в дальнейших разделах настоящего обзора, сейчас же сконцентрируемся на ходе образования ГТ.

Под влиянием ФР, цито- и хемокинов стромальные клетки из окружающей ткани перемещаются в зону повреждения. Для миграции клеток в раневое пространство через толщу поперечно сшитого фибрина необходима высокая протеолитическая активность. Кроме плазмينا сыворотки этому способствуют продуцируемые стромальными клетками протеазы, в том числе активаторы пламиногена и различные коллагеназы (Clark, 1988). Механизмы, позволяющие стромальным клеткам покидать ВКМ нормальной СТ и проникать в толщу фибринового свертка, однозначно не определены, однако показано, что важную роль в этом играет фибронектин, выполняющий роль субстрата для миграции клеток (Lenselink, 2015). Иммуные клетки, на данном этапе представленные, в основном, макрофагами М1- и М2-типов, способствуют этому, продуцируя протеазы и осуществляя активный фагоцитоз. Они также секретируют ФР, необходимые для координации процесса роста ГТ, в котором преобладает *фиброплазия*, т. е. увеличение объема СТ за счет увеличения числа клеток (Hesketh et al., 2017). Для фиброплазии недостаточно только пролиферации клеток СТ, требуется также депонирование коллагена, для процессинга и сшивания которого необходимо достаточное количество кислорода (Clark, 1988). Стромальные клетки синтезируют коллагены и протеогликаны (Clark et al., 1995), которые замещают фибрин и создают каркас будущей ГТ. Таким образом, на данном этапе возникает ситуация, при которой для полноценного роста ГТ необходима васкуляризация, которая обеспечивается активно идущим *ангиогенезом*. Во взрослом организме основным способом образования новых сосудов является их ответвление от предсуществующих (Carmeliet, 2003). Данный процесс начинается с активации, пролиферации и миграции эндотелиальных клеток (ЭК), которые сменяются этапом стабилизации образованных сосудов (Makarevich, Parfyonova, 2017).

**Критическая роль ангиогенеза в формировании грануляционной ткани, его этапы и регуляция.** Основным стимулом для активации ангиогенеза является гипоксия, развивающаяся при быстром росте ГТ. Первоначально стромальные клетки насыщаются кислородом за счет диффузии, но когда расстояние до ближайшего капилляра превышает предел диффузии кислорода (около 100 мкм), то гипоксия стимулирует синтез индуцируемых гипоксией факторов транскрипции HIF (Hypoxia-inducible factor) (Pugh, Ratcliffe, 2003). HIF контролируют многие гены, среди которых критически важна экспрессия гена VEGF, которая в течение нескольких минут

после стимуляции гипоксией возрастает в 20—30 раз (Ferrara et al., 2003). Помимо HIF и VEGF существует целый спектр молекул, регулирующих ветвление и рост сосудов — ангиопоэтины (Ang-1 и -2), FGF2, HGF, некоторые хемокины, гормоны и нейропептиды (Makarevich, Parfyonova, 2017).

В образовании и поддержании кровеносных сосудов следует отметить решающее значение ВКМ. В покоящихся сосудах эндотелий и перициты окружены базальной мембраной, преимущественно состоящей из коллагена IV и ламининов, а интерстициальный ВКМ из коллагена I и эластина обеспечивает прочность стенки сосудов. Действие ангиогенных ФР приводит к ослаблению плотных контактов между клетками эндотелия и продукции протеаз — активаторов пламиногена и проколлагеназ. Все это вызывает фрагментацию базальной мембраны и позволяет ЭК образовывать новые кровеносные сосуды в толще ГТ (Grambow et al., 2021). При этом локальный протеолиз ВКМ должен происходить сбалансированно: с одной стороны, новые сосуды нуждаются в прочном каркасе, который будет выдерживать давление крови, а с другой, недостаточный протеолиз не позволит ЭК покинуть исходное местоположение. Напротив, избыточный лизис ВКМ приведет к потере опорных и направляющих сигналов для мигрирующих ЭК (Luttun et al., 2000). Таким образом, для успешного формирования ГТ активность стромальных клеток и процессы ангиогенеза должны достигать определенного физиологического равновесия.

Формирование сосудистой сети сменяется этапом созревания, который является определяющим для ее функциональности и зависит от взаимодействия эндотелия с перицитами. Ассоциация перицитов с вновь образованными сосудами регулирует пролиферацию, выживаемость, миграцию ЭК, а также остановку ветвления сосуда и снижение его проницаемости, которую в этом контексте часто называют текучестью (англ. *leaking*) (Jain, 2003). После контакта перицитов с сосудистой стенкой взаимное влияние клеток ингибирует пролиферацию ЭК, снижает проницаемость и вызывает формирование стабильного сосуда. Тромбоцитарный фактор роста (PDGF-BB) и его рецептор (PDGFR- $\beta$ ) играют важную роль в стабилизации кровеносных сосудов путем привлечения PDGFR- $\beta$ -положительных мезенхимальных предшественников перицитов (Hirschi et al., 1998). Недостаточное привлечение стромальных клеток этого типа приводит к избыточной пролиферации эндотелия, росту проницаемости и расширению сосудов, экссудации, нарушению перфузии и гипоксии ткани (Betsholtz et al., 2001).

Таким образом, на раннем этапе развития ГТ основными процессами являются фиброплазия и ангиогенез (Greaves et al., 2013; Klatt, Kumar, 2014; Rodrigues et al., 2019). Стромальные клетки активно продуцируют ВКМ, в котором преобладают фибронектин и коллаген III типа, ЭК формируют густую сеть капилляров, большинство из которых не покрыты перицитами и проницаемы для плазмы крови, т. е. являются «текучими» (англ. *leaky*) капиллярами (Rodrigues et al., 2019). Хотя высокая васкуляризация является следствием роста ГТ и необходимости обеспечения клеток в ее составе кислородом и нутриентами, доставляемыми током крови, устоявшаяся точка зрения заключается в том, что капилляры ГТ играют важную роль в процессах фиброобразования. Действительно, их текучесть и прочная ассоциация ЭК со стромальными клетками, которые дают начало миофибробластам, о которых речь пойдет далее, являются важными факторами, связанными с депонированием ВКМ, составляющего основу будущего рубца.

**Фенотипический переход стромальных клеток в миофибробласты и ремоделирование грануляционной ткани.** По мере роста ГТ начинается последний этап — этап *ремоделирования*, сопровождающийся реорганизацией ВКМ и контракцией раны, которые приводят в зоне повреждения либо к росту и образованию ранее существовавшей ткани (эпиморфоз), либо к формированию нефункционального рубца (фиброгенез) (Хуе, Jackson, 2015).

Примерно на 4—5-е сутки стромальные клетки в составе ГТ начинают приобретать фенотип *миофибробластов*. Миофибробласты, источником которых могут служить большинство типов стромальных клеток, обладают высокой сократительной способностью за счет появления в цитоплазме пучков актин-содержащих микрофиламентов. Они также склонны к гиперпродукции ВКМ и активно секретируют тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMPs) при низкой продукции протеолитических ферментов (Hinz, Gabbiani, 2003; Yang et al., 2014), что делает их ключевыми эффекторами окончательного формирования рубца.

Фенотипический переход стромальных клеток в миофибробласты активируется TGF- $\beta$ 1 и PDGF, а также механическим стрессом, которому подвержены ткани в зоне повреждения (Hinz, 2016). Более значимым индуктором фенотипических изменений является TGF- $\beta$ 1, в то время как PDGF в большей мере способствует пролиферации и миграции необходимых стромальных клеток (Lodyga, Hinz, 2020). Действие механического стресса также связано

с TGF- $\beta$ 1, поскольку вызывает его высвобождение из ВКМ и переход из связанной (неактивной) в свободную (активную) форму (Hinz et al., 2019). Дополнительным косвенным подтверждением значимости TGF- $\beta$ 1 является факт достаточности его воздействия на стромальные клетки для индукции их фенотипического перехода в миофибробласты *in vitro* (Chen et al., 2009).

TGF- $\beta$ 1, связываясь со своими рецепторами, приводит к активации белков SMAD, а также некоторых SMAD-независимых сигнальных каскадов, включая митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) и малые ГТФазы (RhoA и др.) (Kim et al., 2018). Это приводит к повышению экспрессии маркеров миофибробластов —  $\alpha$ -гладкомышечного актина ( $\alpha$ -ГМА), коллагена I и III типов, а также сплайс-формы фибронектина, в состав которой включен дополнительный внеклеточный домен А (ВД-А фибронектин) (Hinz, 2016). Повышение продукции и снижение деградации белков ВКМ смещают баланс в сторону их депонирования во внеклеточном пространстве (Rosenbloom et al., 2017). В состав образующихся актиновых филаментов включается  $\alpha$ -ГМА, обеспечивающий необходимую для контракции сократительную способность миофибробластов (Hinz, 2016; Hinz et al., 2019). Микрофиламенты актина прикрепляются посредством талина, винкулина и интегринов к фокальным адгезионным контактам, опосредуя взаимодействие цитоскелета с ВКМ (Hinz, 2016; Hinz et al., 2019). Таким образом, ГТ становится контрактильной и, собственно, этой контракции подвергается в дальнейшем, сближая края зоны повреждения или раны.

В ходе поздних стадий ремоделирования ГТ белки ВКМ в ее составе замещаются фибриллами коллагена I типа, скрепленными поперечными «сшивками». Эти фибриллы не поддаются деградации эндогенными протеазами, а миофибробласты и клетки других клеточных типов вступают в процесс апоптоза, в результате чего формируется рубец (Klatt, Kumar, 2014; Rodrigues et al., 2019). Рубец на месте повреждения затем подвергается окончательному ремоделированию, процесс которого может занимать несколько недель и уже является необратимым. Основным компонентом созревшего рубца, слабо васкуляризованного и практически лишенного клеток, является коллаген I типа, который не может быть замещен функциональными клеточными элементами и не восприимчив к экзогенным вмешательствам методами регенеративной медицины, например, клеточной терапии (Nimiritsky et al., 2019).

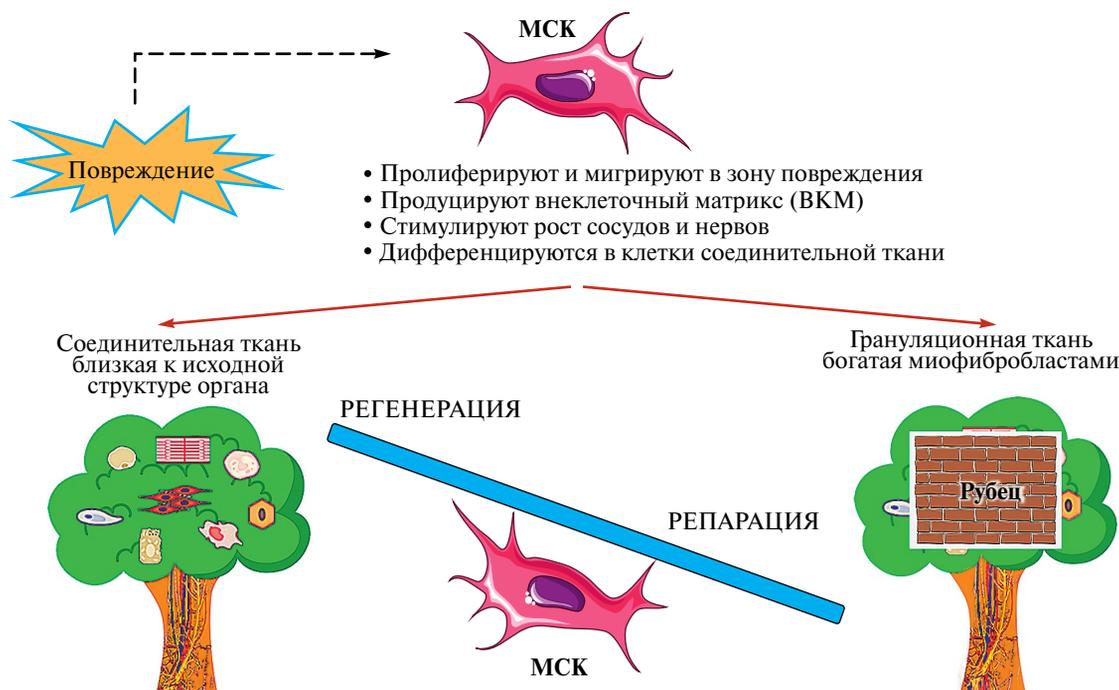


Рис. 1. Роль МСК в регуляции формирования соединительной ткани в ответ на повреждение и определение исхода процесса заживления.

Изложенные выше представления о роли стромальных клеток и, в частности, МСК, в ответе тканей на повреждение в обобщенном виде представлены на рис. 1.

**Координирующая роль стромальных клеток в ходе развития и восстановления тканей человека.** В отношении стромальных клеток, которые активно участвуют в заживлении и в то же время могут быть источником миофибробластов, задействованных в образовании рубца, интересные параллели можно провести, как ни странно, с развитием организма. Формирование сложных по архитектуре тканей и органов начинается с нестрогой упорядоченной массы клеток, которая затем реализует определенную программу развития (Schweisguth, Corson, 2019) на основе динамически изменяющихся сигналов и межклеточных взаимодействий. При этом важнейшую координирующую роль в этом процессе выполняет *эмбриональная мезенхима* — низкодифференцированная СТ, дающая начало практически всем зрелым СТ будущего организма (Pispa, Thesleff, 2003; Morales et al., 2021). Ее высокая (по сравнению с эпителиальными клетками) подвижность, а также паракринная активность является залогом регуляции дифференцировочных процессов и пространственной организации закладок всех частей тела и органов. Ярким примером такого участия является самоорганизация путем конденсации, включающей миграцию и агрегацию

мезенхимных клеток в области закладок конечностей, опорно-двигательного аппарата, полых и паренхиматозных органов. Считается, что именно активация мезенхимы и ее ранних производных дает старт морфогенетическим процессам, обеспечивая точное формирование органов и регуляцию ответов клеток на внешние стимулы (Hilfer et al., 1985; Ghosh et al., 2009; Takebe et al., 2015; Schweisguth, Corson, 2019).

Еще одной особенностью эмбриональных СТ млекопитающих является способность к эпиморфной регенерации органов, которые во взрослом организме всегда отвечают на значимое повреждение образованием рубца. Интересно, что после рождения быстро (в течение нескольких суток) это свойство практически полностью утрачивается, возможно, из-за контакта с атмосферным уровнем кислорода и резким ростом его парциального давления в тканях. Колоссальный окислительный стресс из-за нового уровня оксигенации тканей в первые часы и дни после рождения приводит к высокому содержанию свободных радикалов (Buonocore et al., 2017; Torres-Cuevas et al., 2017) и шквалу эпигенетических модификаций, напрямую влияющих на экспрессию сотен генов, кодирующих белки, а также регуляторные РНК (Redd et al., 2004). В результате, хотя последовательность ДНК в клетках организма остается практически неизменной, уже через неделю после рождения мы имеем дело с принципиально отличающимся

по эпигенетической модификации и профилю экспрессии состоянием генома (Yun, 2015; Nakada et al., 2017). Именно по этой причине многие исследователи высказывают серьезные сомнения в том, что сравнение механизмов регенерации у эмбриона и взрослого человека релевантно и позволит достичь принципиально важных результатов в этой области (Wang, Conboy, 2010; Park, 2021).

Тем не менее полученные к настоящему времени данные дают надежду на то, что стромальные клетки СТ во взрослом организме при определенных условиях могут возобновлять присущие им в ходе развития функции координации процессов морфогенеза и эпиморфной регенерации. Дополнительным аргументом в пользу важности исследования роли стромальных клеток в регуляции безрубцового заживления тканей человека является то, что при заживлении переломов, идущем без рубца, остеогенезу предшествует этап конденсации, который очень напоминает самоорганизацию мезенхимы в эмбриогенезе (Fu et al., 2021). В постнатальном развитии также можно найти примеры самоорганизации, например при эктопическом формировании тканей, которое показано для костей, эндометрия и селезенки. Это означает, что у некоторых клеток во взрослом организме сохраняется способность активировать программы автономной самоорганизации, многие из которых присущи, скорее, развивающемуся, нежели зрелому организму (Ornitz, Marie, 2002; Svandova et al., 2020).

Таким образом, процессы формирования архитектуры органов как в эмбриогенезе, так и в постнатальном периоде зависимы от стромального компонента СТ, происходящего из клеток эмбриональной мезенхимы. Следовательно, понимание роли стромы в регуляции исхода заживления может оказаться ключом к успешному управлению восстановлением ткани и сдвигу его исхода в сторону регенерации.

Суммируя изложенное, регенерация во взрослом организме существенно ограничена, однако нельзя утверждать, что она исключена. Склонность к фиброгенезу после повреждения большинства органов человека связывают с потерей клеточной пластичности или снижением способности должным образом отвечать на морфогенетические стимулы в ходе ранозаживления. Тем не менее исход процесса ранозаживления может быть обусловлен особенностями межклеточных взаимодействий и их тканеспецифичностью (Eremichev et al., 2021). В большей степени это может относиться к клеткам стромы, которые обеспечивают формирование на месте повреждения структуры *de novo*, на которой, как на каркасе, будут

формироваться более высокие уровни организации ткани.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тело человека не способно регенерировать крупные части, однако большинству органов присущ определенный объем способности к регенерации. Основным механизмом поддержания функции органа после формирования рубца в зоне повреждения является компенсаторный рост его сохранной части. Такая регенерация несовершенна с точки зрения полного восстановления структуры и функции, но, в целом, ее зачастую оказывается достаточно для поддержания функционирования жизненно важных органов. Классическим примером является компенсаторный рост долей печени после парциальной гепатэктомии, которого хватает для сохранения ключевых функций этого органа и, как следствие, гомеостаза на уровне всего организма.

И регенерация, и образование рубца являются процессами формирования новой структуры на месте разрушенной. Образование новых структур происходит и во время эмбрионального развития, однако его механизмы не тождественны механизмам заживления. При эмбриональном развитии новая структура формируется из предшествующей закладки, в то время как при заживлении основой восстановления являются ткани уже зрелого организма, а также пул клеток и регуляторных молекул, заполняющих зону повреждения, как было описано выше.

У взрослого человека заживление повреждений путем *эпиморфной*, т. е. безрубцовой регенерации также возможно, но относится к редким событиям. Незначительные повреждения завершаются полным восстановлением ткани и их характерным признаком является вовлечение одного — двух типов ткани (преимущественно эпителия) без выраженного участия стромального и соединительнотканного компонентов. Это позволяет предположить, что успешная регенерация связана с малой степенью активации стромальных клеток в ходе ранозаживления (McClain et al., 1996). Уникальным органом с точки зрения способности к заживлению является матка, в особенности ее слизистая оболочка — эндометрий. В ходе каждой менструации эндометрий полностью десквамируется и затем заживает без фиброза до 400 и более раз в течение жизни. Также эндометрий полностью восстанавливается после родов, кесарева сечения и малых хирургических вмешательств (Camboni, Marbaix, 2021; Eremichev et al., 2021). Таким образом,

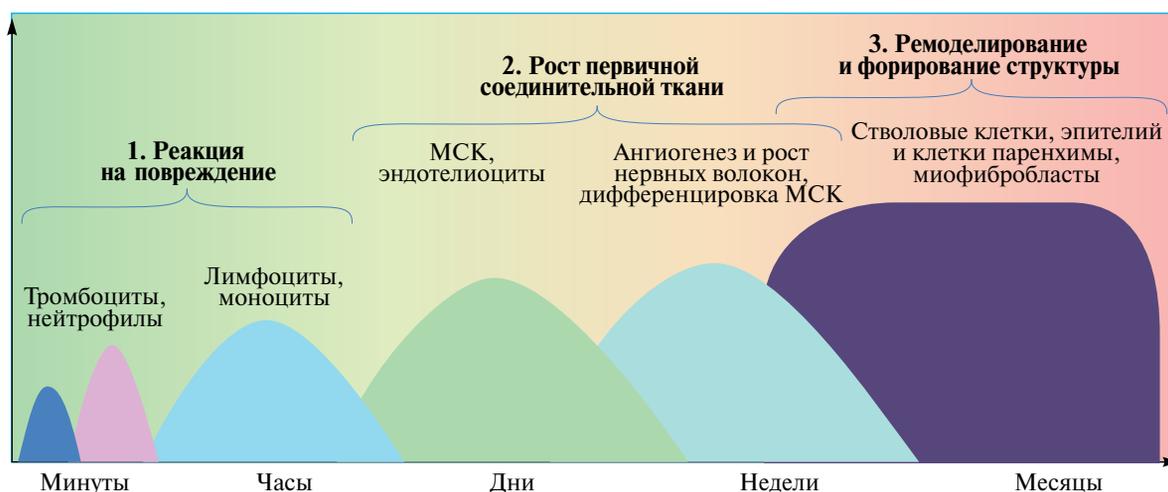


Рис. 2. Основные этапы репаративной регенерации и клетки, играющие критическую роль в их реализации.

заживление путем эпиморфной регенерации в теле человека принципиально возможно.

Образование рубца и регенерация в зоне повреждения различаются по сути процессов и по динамике формирования новых структур на месте разрушенных. Интересно, что образование рубца в большинстве органов и у многих видов идет похожим образом, что указывает на высокую консервативность этой реакции, а также на высокую эффективность фиброобразования, которое позволяет сохранить целостность органа даже ценой утраты части функциональных элементов. Маловероятно, что в ходе эволюции могла бы закрепиться какая-либо непродуктивная реакция. Широкая распространенность образования рубца как исхода заживления указывает на то, что при субъективно неоптимальном или даже негативном результате такая программа обеспечивает выживание и видовую сохранность многим живым существам, включая человека.

Обобщение основных процессов репаративной регенерации представлено на рис. 2. На представленной схеме указаны ключевые типы клеток, являющиеся потенциальными мишенями для воздействия с целью регуляции исхода заживления.

При этом эпиморфная регенерация органов имеет существенные тканеспецифичные отличия. Так, при сращении перелома первые этапы заживления очень схожи с таковыми при заживлении кожной раны вплоть до образования ГТ и миофибробластов, однако в дальнейшем в кости на месте ГТ развивается костная ткань, а в коже — рубцовая. Процесс образования ГТ вообще до определенной степени напоминает ранние этапы эмбриогенеза кости, возможно, поэтому он завершается регене-

рацией при сращении переломов, но не при других видах повреждения. Также можно предположить, что у человека образование ГТ в принципе создает предпосылки для формирования рубца как результата процесса заживления. Без образования ГТ регенерирует роговица, по-видимому, в силу отсутствия в ней сколько-нибудь значимой васкуляризации. Регенерация эндометрия также проходит без явного образования ГТ несмотря на наличие кровотечения и богатой васкуляризации стенки матки. С точки зрения межвидового подхода следует отметить, что образование ГТ не характерно для хорошо регенерирующих таксонов: плоских червей, некоторых рыб, хвостатых амфибий.

Резюмируя, можно сказать, что суть процессов заживления различных органов одинакова — это формирование новых структур в зоне повреждения путем миграции, пролиферации и фенотипических переходов клеток, а также продукции ими межклеточного вещества. Следовательно, регуляция этих процессов может быть очень схожа и осуществляется одними классами регуляторных молекул. В то же время нельзя не учитывать и факт тканеспецифичности этих реакций. Действительно, по многим признакам процессы заживления органов различаются, что может указывать на особенности состава пула регуляторных молекул и динамики его изменений, а также чувствительности к сигналам за счет представленности рецепторов и сопряжения сигнальных каскадов с эффекторными элементами.

Изложенные выше данные в сжатой форме отражают основные принципы регенерации у человека с акцентом на ранние стадии репаративного ответа, идущие после повреждения. Актуальные

представления в этой области все чаще обращаются к биологии развития и рассматривают рост ткани в ответ на повреждение как сложно скоординированный процесс, который во взрослом организме идет по пути, во многом отличающемся от того, который он же проходит в период эмбриогенеза. Фокус усилий, которые несколько десятилетий назад были сконцентрированы на биологии СК как универсального инструмента для регенеративной медицины, в настоящее время переместился на клетки иммунной, нервной и кровеносной систем. Их участие в регуляции баланса регенерации и фиброобразования после повреждения в значительной степени говорит о критической роли микроокружения, без которого реализация СК их регенераторного потенциала становится невозможной. Поскольку СТ и строма являются активными участниками как эпиморфной регенерации, так и формирования рубца в зоне повреждения именно на них, вероятно, будет сосредоточено внимание исследователей. В такой концепции стромальные клетки рассматриваются как регуляторная и направляющая сила, ответственная за создание регуляторного микроокружения и вносящая существенный вклад в исход репаративной регенерации.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М. В. Ломоносова и при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-30007-П).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит исследований с использованием животных или людей в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Макаревич П. И., Ефименко А. Ю., Ткачук В. А. 2020. Биохимическая регуляция регенеративных процессов факторами роста и цитокинами: основные механизмы и значимость для регенеративной медицины. *Биохимия*. V. 85. P. 15. (Макаревич П. И., Ефименко А. Ю., Ткачук В. А. Biochemical regulation of regenerative processes by growth factors and cytokines: Basic mechanisms and relevance for regenerative medicine. *Biochemistry* (Moscow). 2020. V. 85. No. 1. P. 11–26).
- Aller M. A., Arias J. I., Arias J. 2010. Pathological axes of wound repair: gastrulation revisited. *Theor. Biol. Med. Model.* V. 7. P. 37.
- Argyris T. S. 1968. Growth induced by damage. *Adv. Morphog.* V. 7. P. 1.
- Betsholtz C., Karlsson L., Lindahl P. 2001. Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays*. V. 23. P. 494–507.
- Buonocore G., Perrone S., Tataranno M. L. 2017. Oxidative stress in the newborn. *Oxid. Med. Cell Longev.* V. 2017: 1094247.
- Camboni A., Marbaix E. 2021. Ectopic endometrium: The pathologist's perspective. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22: 10974.
- Carmeliet P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* V. 9. P. 653.
- Chavan S. S., Pavlov V. A., Tracey K. J. 2017. Mechanisms and therapeutic relevance of neuro-immune communication. *Immunity*. V. 46. P. 927.
- Chen C. Z., Peng Y. X., Wang Z. B., Fish P. V., Kaar J. L., Koepsel R. R., Russell A. J., Lareu R. R., Raghunath M. 2009. The Scar-in-a-Jar: studying potential antifibrotic compounds from the epigenetic to extracellular level in a single well. *Br. J. Pharmacol.* V. 158. P. 1196.
- Choi J. E., Di Nardo A. 2018. Skin neurogenic inflammation. *Semin. Immunopathol.* V. 40. P. 249.
- Clark R. A. 1988. The molecular and cellular biology of wound repair. Springer.
- Clark R. A., Nielsen L. D., Welch M. P., McPherson J. M. 1995. Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta. *J. Cell Sci.* V. 108 (Pt 3). P. 1251.
- Duan T., Du Y., Xing C., Wang H. Y., Wang R. F. 2022. Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity. *Front. Immunol.* V. 13: 812774.
- Eremichev R., Kulebyakina M., Alexandrushkina N., Nimiritsky P., Basalova N., Grigorieva O., Egiazaryan M., Dyikanov D., Tkachuk V., Makarevich P. 2021. Scar-free healing of endometrium: Tissue-specific program of stromal cells and its induction by soluble factors produced after damage. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 9: 616893.
- Fan C., Liao M., Xie L., Huang L., Lv S., Cai S., Su X., Wang Y., Wang H., Wang M., Liu Y., Wang Y., Guo H., Yang H., Liu Y., et al. 2022. Single-cell transcriptome integration analysis reveals the correlation between mesenchymal stromal cells and fibroblasts. *Front. Genet.* V. 13: 798331.
- Ferrara N., Gerber H.-P., LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* V. 9. P. 669.
- Fu R., Liu C., Yan Y., Li Q., Huang R. L. 2021. Bone defect reconstruction via endochondral ossification: A developmental engineering strategy. *J. Tiss. Eng.* V. 12: 204173142111004211.
- Ghosh S., Laha M., Mondal S., Sengupta S., Kaplan D. L. 2009. In vitro model of mesenchymal condensation during chondrogenic development. *Biomaterials*. V. 30. P. 6530.
- Glatte P., Buchmann S. J., Hijazi M. M., Illigens B. M.-W., Siepmann T. 2019. Architecture of the cutaneous autonomic nervous system. *Front. Neurol.* V. 10: 970.
- Gong T., Liu L., Jiang W., Zhou R. B. 2020. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Imm.* V. 20. P. 95.

- Grambow E., Sorg H., Sorg C. G. G., Struder D.* 2021. Experimental models to study skin wound healing with a focus on angiogenesis. *Med. Sci. (Basel)*. V. 9: 55.
- Greaves N. S., Ashcroft K. J., Baguneid M., Bayat A.* 2013. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J. Dermatol. Sci.* V. 72. P. 206.
- Greenlee-Wacker M. C.* 2016. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Imm. Rev.* V. 273. P. 357.
- Guillot C., Lecuit T.* 2013. Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis. *Science*. V. 340. P. 1185.
- Häkkinen L., Larjava H., Koivisto L.* 2011. Granulation tissue formation and remodeling. *Endodontic Topics*. V. 24. P. 94.
- Hall S.* 1997. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J. Anat.* V. 190 (Pt 1). P. 57.
- Hesketh M., Sahin K. B., West Z. E., Murray R. Z.* 2017. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. *Int. J. Mol. Sci.* V. 18: 1545.
- Hilfer S. R., Rayner R. M., Brown J. W.* 1985. Mesenchymal control of branching pattern in the fetal mouse lung. *Tiss. Cell*. V. 17. P. 523.
- Hinz B.* 2016. The role of myofibroblasts in wound healing. *Curr. Res. Transl. Med.* V. 64. P. 171.
- Hinz B., Gabbiani G.* 2003. Mechanisms of force generation and transmission by miofibroblast. *Curr. Opin. Biotechnol.* V. 14. P. 538.
- Hinz B., McCulloch C. A., Coelho N. M.* 2019. Mechanical regulation of myofibroblast phenoconversion and collagen contraction. *Exp. Cell Res.* V. 379. P. 119.
- Hirschi K. K., Rohovsky S. A., D'Amore P. A.* 1998. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J. Cell Biol.* V. 141. P. 805.
- Ismaa S. E., Kaidonis X., Nicks A. M., Bogush N., Kikuchi K., Naqvi N., Harvey R. P., Husain A., Graham R. M.* 2018. Comparative regenerative mechanisms across different mammalian tissues. *NPJ Regen. Med.* V. 3. P. 6.
- Jain R. K.* 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* V. 9. P. 685.
- Kigerl K. A., de Rivero Vaccari J. P., Dietrich W. D., Popovich P. G., Keane R. W.* 2014. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp. Neurol.* V. 258. P. 5.
- Kim K. K., Sheppard D., Chapman H. A.* 2018. TGF-β1 signaling and tissue fibrosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 10: a022293.
- Klatt E. C., Kumar V.* 2014. Robbins and cotran review of pathology. Elsevier Health Sciences.
- Kolaczowska E., Kubes P.* 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* V. 13. P. 159.
- Kulebyakin K. Y., Nimiritsky P. P., Makarevich P. I.* 2020. Growth factors in regeneration and regenerative medicine: "the cure and the cause". *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. V. 11: 384.
- Mescher A.* 2018. Junqueira's basic histology text and atlas, XV ed., McGraw-Hill Education.
- Le Blanc K., Davies L. C.* 2015. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol. Lett.* V. 168. P. 140.
- Lee J., Tumber T.* 2012. Hairy tale of signaling in hair follicle development and cycling. *Semin. Cell Dev. Biol.* V. 23. P. 906.
- Lee M. S., Kim Y.-J.* 2007. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu. Rev. Biochem.* V. 76. P. 447.
- Lenselink E. A.* 2015. Role of fibronectin in normal wound healing. *Int. Wound J.* V. 12. P. 313.
- Lodyga M., Hinz B.* 2020. TGF-β1 — A truly transforming growth factor in fibrosis and immunity. *Semin. Cell Dev. Biol.* V. 101. P. 123.
- Londono R., Sun A. X., Tuan R. S., Lozito T. P.* 2018. Tissue repair and epimorphic regeneration: An overview. *Curr. Pathobiol Rep.* V. 6. P. 61.
- Lotze M. T., Tracey K. J.* 2005. High-mobility group box 1 protein (HMGB): Nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* V. 5. P. 331.
- Luttun A., Dewerchin M., Collen D., Carmeliet P.* 2000. The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. *Curr. Atheroscler. Rep.* V. 2. P. 407.
- Mackman N.* 2005. Tissue-specific hemostasis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* V. 25. P. 2273.
- Makarevich P. I., Parfyonova Ye. V.* 2017. Therapeutic angiogenesis: Foundations and practical Application. *Physiologic and Pathologic Angiogenesis*. Ed.: S. Dan, S. Agneta. Rijeka, IntechOpen: Ch. 17.
- Mantovani A., Biswas S. K., Galdiero M. R., Sica A., Locati M.* 2013. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* V. 229. P. 176.
- Mayadas T. N., Cullere X., Lowell C. A.* 2014. The multifaceted functions of neutrophils. *Ann. Rev. Pathol.: Mechanisms of Disease*. V. 9. P. 181.
- McClain S. A., Simon M., Jones E., Nandi A., Gailit J. O., Tonnesen M. G., Newman D., Clark R. A.* 1996. Mesenchymal cell activation is the rate-limiting step of granulation tissue induction. *Am. J. Pathol.* V. 149. P. 1257.
- Mescher A.* 2018. Junqueira's basic histology text and atlas, XV ed., McGraw-Hill Education.
- Mogensen T. H.* 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* V. 22. P. 240.
- Mollinari C., Zhao J., Lupacchini L., Garaci E., Merlo D., Pei G.* 2018. Transdifferentiation: a new promise for neurodegenerative diseases. *Cell Death & Disease*. V. 9. P. 830.
- Morales J. S., Raspopovic J., Marcon L.* 2021. From embryos to embryoids: How external signals and self-organization drive embryonic development. *Stem Cell Rep.* V. 16. P. 1039.
- Murawala P., Tanaka E. M., Currie J. D.* 2012. Regeneration: the ultimate example of wound healing. *Semin. Cell Dev. Biol.* V. 23. P. 954.
- Murphy K., Weaver C.* 2016. Janeway's immunobiology. Garland science.

- Nakada Y., Canseco D. C., Thet S., Abdisalaam S., Asaithamby A., Santos C. X., Shah A. M., Zhang H., Faber J. E., Kinter M. T., Szweda L. I., Xing C., Hu Z., Deberardinis R. J., Schiattarella G., et al.* 2017. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature*. V. 541. P. 222.
- Nimiritsky P. P., Eremichev R. Y., Alexandrushkina N. A., Efimenko A. Y., Tkachuk V. A., Makarevich P. I.* 2019. Unveiling mesenchymal stromal cells' organizing function in regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20: 823.
- Novak M. L., Koh T. J.* 2013. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J. Leukoc. Biol.* V. 93. P. 875.
- Ornitz D. M., Marie P. J.* 2002. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Gen. Dev.* V. 16. P. 1446.
- Park S.* 2021. Building vs. rebuilding epidermis: Comparison embryonic development and adult wound repair. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 9: 796080.
- Phillipson M., Kubes P.* 2019. The healing power of neutrophils. *Trends Immunol.* V. 40. P. 635.
- Pispa J., Theisfeldt I.* 2003. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev. Biol.* V. 262. P. 195.
- Prockop D. J.* 2013. Concise review: Two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. *Stem Cells*. V. 31. P. 2042.
- Prockop D. J., Oh J. Y.* 2012. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): Role as guardians of inflammation. *Mol. Ther.* V. 20. P. 14.
- Pugh C. W., Ratcliffe P. J.* 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* V. 9. P. 677.
- Redd M. J., Cooper L., Wood W., Stramer B., Martin P.* 2004. Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* V. 359. P. 777.
- Reinke J. M., Sorg H.* 2012. Wound repair and regeneration. *Eur. Surg. Res.* V. 49. P. 35.
- Rodrigues M., Kosaric N., Bonham C. A., Gurtner G. C.* 2019. Wound healing: A cellular perspective. *Physiol. Rev.* V. 99. P. 665.
- Rondaij M. G., Bierings R., Kragt A., van Mourik J. A., Voorberg J.* 2006. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* V. 26. P. 1002.
- Roosendaal R., Mebius R. E.* 2011. Stromal cell-immune cell interactions. *Annu. Rev. Immunol.* V. 29. P. 23.
- Rosenbloom J., Macarak E., Pitera-Velazquez S., Jimenez S. A.* 2017. Human fibrotic diseases: current challenges in fibrosis research. *Meth. Mol. Biol.* V. 1627. P. 1.
- Shierski-Kind J., Mroz N., Molofsky A. B.* 2021. Perivascular stromal cells: Directors of tissue immune niches. *Immunol. Rev.* V. 302. P. 10.
- Schäffer M., Beiter T., Becker H. D., Hunt T. K.* 1998. Neuropeptides: mediators of inflammation and tissue repair? *Arch. Surg.* V. 133. P. 1107.
- Schweigsuth F., Corson F.* 2019. Self-organization in pattern formation. *Dev. Cell.* V. 49. P. 659.
- Singh S., Young A., McNaught C.-E.* 2017. The physiology of wound healing. *Surg. (Oxford)*. V. 35. P. 473.
- Stocum D. L.* 2001. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen.* V. 9. P. 429.
- Svandova E., Peterkova R., Matalova E., Lesot H.* 2020. Formation and developmental specification of the odontogenic and osteogenic mesenchymes. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8: 640.
- Szabo G., Dolganiuc A., Mandrekar P.* 2006. Pattern recognition receptors: a contemporary view on liver diseases. *Hepatology*. V. 44. P. 287.
- Takebe T., Enomura M., Yoshizawa E., Kimura M., Koike H., Ueno Y., Matsuzaki T., Yamazaki T., Toyohara T., Osafune K., Nakauchi H., Yoshikawa H. Y., Taniuchi H.* 2015. Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via mesenchymal cell-driven condensation. *Cell Stem Cell*. V. 16. P. 556.
- Takeuchi O., Akira S.* 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. V. 140. P. 805.
- Tanabe K., Ang C. E., Chanda S., Olmos V. H., Haag D., Levinson D. F., Südhof T. C., Wernig M.* 2018. Transdifferentiation of human adult peripheral blood T cells into neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci.* V. 115. P. 6470.
- Torres-Cuevas I., Parra-Llorca A., Sanchez-Illana A., Nunez-Ramiro A., Kuligowski J., Chafer-Pericas C., Cernada M., Escobar J., Vento M.* 2017. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biol.* V. 12. P. 674.
- Venereau E., Ceriotti C., Bianchi M. E.* 2015. DAMPs from cell death to new life. *Front. Immunol.* V. 6: 422.
- Wang H., Bloom O., Zhang M., Vishnubhakat J. M., Ombrellino M., Che J., Frazier A., Yang H., Ivanova S., Borovikova L., Manogue K. R., Faist E., Abraham E., Andersson J., Andersson U. et al.* 1999. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. V. 285. P. 248.
- Wang J., Conboy I.* 2010. Embryonic vs. adult myogenesis: challenging the 'regeneration recapitulates development' paradigm. *J. Mol. Cell Biol.* V. 2. P. 1.
- Wyllie A. H.* 1987. Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J. Pathol.* V. 153. P. 313.
- Wynn T. A., Vannella K. M.* 2016. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*. V. 44. P. 450.
- Xue M., Jackson C. J.* 2015. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. V. 4. P. 119.
- Yang X., Chen B., Liu T., Chen X.* 2014. Reversal of myofibroblast differentiation: a review. *Eur. J. Pharmacol.* V. 734. P. 83.
- Yun M. H.* 2015. Changes in regenerative capacity through lifespan. *Int. J. Mol. Sci.* V. 16: 25392.
- Yunna C., Mengru H., Lei W., Weidong C.* 2020. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur. J. Pharmacol.* V. 877: 173090.
- Zhang R., Ma P. X.* 1999. Poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *J. Biomed. Mater. Res.* V. 44. P. 446.

## RECEPTION OF DAMAGE AND ACTIVATION OF GROWTH OF CONNECTIVE TISSUE: CRUCIAL REGULATORY MILESTONES OF REGENERATION IN HUMANS

R. Yu. Eremichev<sup>a, b</sup>, P. I. Makarevich<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of gene and cell therapy, Institute for regenerative medicine, Medical research and education centre,  
Lomonosov Moscow State University, 119192, Russia

<sup>b</sup>Chair of Biochemistry and Regenerative medicine, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University,  
119192, Russia

\*e-mail: makarevichpi@my.msu.ru

Tissue damage activates programs aimed at the survival of the body and restoration of its integrity, but for a long time the molecular and cellular mechanisms of their implementation remained undeciphered. In recent years, a number of important information has been obtained about the regulation of regeneration processes, which significantly clarify a number of ideas about the regulation of the response to damage and deserve attention in terms of searching for new targets for controlling this process. This review briefly summarizes the basic regulatory mechanisms associated with the early stages of the human tissue response to injury. It also provides current data on the mechanisms of damage reception and the role of stromal cells in the formation of primary connective tissue as a structure that determines the outcome.

**Keywords:** regeneration, fibrosis, stem cell, mesenchymal stromal cell, stroma, regenerative medicine

УДК 577.3

## ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ БИОСЕНСОР $\text{HyPer}$ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО УРОВНЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

© 2024 г. О. Г. Люблинская<sup>1</sup>, \*, Ю. С. Иванова<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

\*E-mail: o.lyublinskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 07.12.2023

После доработки 14.12.2023

Принята к публикации 14.12.2023

В настоящем мини-обзоре систематизирована информация о методах количественной оценки внутриклеточной концентрации перекиси водорода, основанных на использовании генетически кодируемого сенсора пероксида  $\text{HyPer}$ . Рассматриваются два подхода: 1) градуировка биосенсора с использованием экзогенной перекиси водорода, основанная на оценке скорости проникновения пероксида в клетки и внутриклеточной пероксидазной активности; 2) прямое определение внутриклеточного содержания пероксида, основанное на измерении уровня окисления биосенсора, константы реакции окисления и константы реакции восстановления  $\text{HyPer}$  в клетках. Применение этих методов позволяет решать широкий спектр задач клеточной редокс-биологии — ранжировать диапазон физиологических и повреждающих концентраций перекиси водорода в клетках, оценивать эффективность системы антиоксидантной защиты в различных клеточных компартментах в условиях окислительного стресса, определять вклад различных ферментативных систем в пероксидазную активность клеток и изучать особенности систем антиоксидантной защиты в различных биологических контекстах (в процессе клеточного старения, дифференцировки, репрограммирования, при развитии патологий). Описанные методы могут быть адаптированы для других генетически-кодированных биосенсоров перекиси водорода.

**Ключевые слова:** перекись водорода, антиоксидантная защита, пероксидазная активность, генетически кодируемые биосенсоры,  $\text{HyPer}$

DOI: 10.31857/S0041377124030026, EDN: PERHTF

Перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) является участником многих метаболических и сигнальных каскадов в клетках аэробных организмов (Sies, Jones, 2020). Эта молекула образуется в различных клеточных компартментах — либо в реакциях, сопровождающихся восстановлением молекулярного кислорода ( $\text{O}_2$ ) путем присоединения двух атомов водорода, либо в результате спонтанной или ферментативной дисмутации супероксидного анион-радикала  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , образующегося из  $\text{O}_2$ . Часть продуцируемой в клетках  $\text{H}_2\text{O}_2$  является побочным продуктом внутриклеточного метаболизма. Например, в пероксисомах  $\text{H}_2\text{O}_2$  может синтезироваться в ходе катаболических реакций при окислении различных субстратов (длинноцепочечных жирных кислот, аминокислот), а в митохондриях — как результат клеточного дыхания. Другая часть молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  образуется в реакциях сигнальных каскадов. Источниками, пополняющими пул регуляторно-активных молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$ , считаются преимущественно NADPH-оксидазы — ферменты, локализующиеся

на плазматической мембране, а также на мембранах внутриклеточных органелл (Sies et al., 2017). Параллельно с реакциями генерации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в клетке постоянно протекают реакции разложения пероксида, а ответственные за это ферментативные системы образуют основу систем антиоксидантной защиты клетки.  $\text{H}_2\text{O}_2$  удаляется высокопродуктивными ферментами, такими как пероксиредоксины, глутатионпероксидазы и каталаза (Sies et al., 2017). Эти ферменты, функционирующие в разных клеточных компартментах, обеспечивают точный контроль внутрикомпаратментных уровней  $\text{H}_2\text{O}_2$ , поддержание которых критически важно для сохранения функционирования и жизнеспособности клеток. Внутриклеточная концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  зависит от физиологического контекста и, согласно последним оценкам, может исчисляться от единиц до сотен нМ (Sies 2021). Концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  служит важнейшей характеристикой физиологического состояния клеток, а её повышение часто служит индикатором патологических состояний, таких как индукция

апоптотической программы или клеточного старения. При этом важно понимать, что под термином внутриклеточная концентрация в данном случае понимается показатель, усредненный по объёму клетки, однако в реальности он формируется за счет локальных в пространстве и ограниченных во времени колебаний уровня пероксида, обеспечивающих протекание  $H_2O_2$ -зависимых сигнальных и метаболических процессов.

Чтобы разобраться, какую роль играет  $H_2O_2$  в великом множестве метаболических и сигнальных каскадов клетки, и как научиться корректировать нарушения внутриклеточного редокс-гомеостаза, сопровождающиеся изменением физиологически релевантного уровня  $H_2O_2$ , нужны инструменты, позволяющие специфично и количественно оценивать внутриклеточные и внутрикомпаратментные концентрации пероксида. Однако проведение подобных измерений в живых клетках вплоть до последнего времени было практически невозможным, и лишь создание и внедрение в лабораторную практику новых молекулярных инструментов — генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров  $H_2O_2$  — стало прорывом, позволившим продвинуться вперед в решении этих сложных задач.

Благодаря усилиям целого круга научных коллективов, разрабатывающих различные стратегии применения биосенсоров  $H_2O_2$  в редокс-биологии, в последние годы появилась серия работ, описывающих методы количественной характеристики  $H_2O_2$ -опосредованных процессов в живых клетках. На наш взгляд, пришла пора систематизировать эти исследования и обрисовать круг возможных задач, для решения которых можно применять эти методы.

В настоящем мини-обзоре мы сконцентрируемся на том, какие возможности для количественного определения внутриклеточного уровня  $H_2O_2$  открывает генетически кодируемый биосенсор HyPer и постараемся описать, как можно использовать эти возможности для изучения метаболизма  $H_2O_2$  в клетках человека в норме и патологии. На протяжении всего текста мы будем преимущественно говорить о первой, появившейся в 2006 г., версии биосенсора HyPer (Belousov et al. 2006), поскольку большинство экспериментов по количественному измерению внутриклеточного содержания  $H_2O_2$  проводили именно с этим вариантом сенсора. Перспективы использования новейшей, более чувствительной версии биосенсора, HyPer7 (Pak et al., 2020), мы коротко обсудим в последнем разделе обзора.

## HyPer: СТРУКТУРА БИОСЕНСОРА И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К $H_2O_2$

HyPer представляет собой химерный белок, сконструированный путем внедрения пермутированной формы желтого флуоресцентного белка (cpYFP) в регуляторный домен природного сенсора  $H_2O_2$ -бактериального транскрипционного фактора OxyR, регулирующего в *Escherichia coli* экспрессию антиоксидантов генов при повышении внутриклеточного уровня пероксида (Belousov et al., 2006). Под действием  $H_2O_2$  в домене OxyR образуется дисульфидная связь, домен претерпевает конформационные изменения, которые влияют на протонирование cpYFP, что приводит к изменению его флуоресцентных свойств. Максимум спектра флуоресценции HyPer расположен в зеленой области спектра (516 нм). Для биосенсора характерно наличие двух пиков возбуждения флуоресценции — в фиолетовой области (400—420 нм, соответствует восстановленной форме HyPer) и голубой области спектра (480—500 нм, соответствует окисленной форме HyPer). Соответственно, при увеличении доли окисленных молекул биосенсора, в спектре возбуждения флуоресценции HyPer происходит пропорциональное увеличение возбуждения в полосе 480—500 нм и уменьшение возбуждения в полосе 400—420 нм (Belousov et al., 2006). Флуорофор биосенсора (cpYFP) отличается высокой яркостью и светостойкостью. Коэффициент экстинкции при 490 нм составляет  $17000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Bilan et al., 2013). Высокая чувствительность HyPer к  $H_2O_2$  определяется константой скорости его реакции с пероксидом ( $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (Bilan et al., 2013).

Генетическая последовательность, кодирующая биосенсор, может доставляться в клетки или отдельные клеточные компартменты с использованием методов плазмидной трансфекции или вирусной трансдукции (Bilan, Belousov, 2016). Для доставки HyPer в выбранный клеточный компартмент используется вариант генетической последовательности HyPer, слитый с сигналом локализации в этом компартменте. Измерение флуоресцентных сигналов HyPer, экспрессируемого в клетках или тканях модельных животных, при использовании возбуждающих лазеров с длиной волны 405 и 488 нм позволяет судить о соотношении окисленной и восстановленной формы биосенсора и отслеживать таким образом изменения уровня  $H_2O_2$  в клеточных компартментах с высокой степенью специфичности и чувствительности, которые недоступны для других существующих методов детекции пероксида в живых системах (Mishina et al., 2013; Bilan, Belousov, 2016).

Как и другие биосенсоры, созданные на основе *srYFP*, флуоресцентный сигнал HyPer является pH-зависимым, так как спектральные свойства биосенсора зависят от протонирования домена *srYFP*. Поскольку величина *pKa* HyPer составляет 8.5, то даже при небольшом защелачивании внутриклеточной среды, pH которой типично находится в диапазоне 7.0—7.5, наблюдаются изменения в спектре возбуждения локализованного в клетках HyPer, аналогичные тем, которые наблюдаются при его окислении. Чтобы разделить два эффекта (депротонирование при изменении pH и депротонирование при окислении под действием  $H_2O_2$ ), в экспериментах, наряду с HyPer, как правило, используют его контрольный белок — *SyrPer*, отличающийся от HyPer одной аминокислотной заменой C199S. Мутация C199S приводит к утрате белком  $H_2O_2$ -чувствительности, но сохраняет в неизменности зависимость его флуоресцентных свойств от pH (Bilan, Belousov, 2016).

#### МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО СИГНАЛА HyPer

Как правило, в экспериментах *in vitro* с клетками, экспрессирующими HyPer, используется лазерная конфокальная микроскопия, которая позволяет визуализировать флуоресценцию биосенсора и отслеживать его редокс-статус в живых клетках (Mishina et al., 2013). Еще одним эффективным методом детекции сигнала биосенсора является использование планшетных флуориметров (Malinouski et al., 2011), и, наконец, недавно появилась еще одна опция для подобного анализа — проточная цитометрия (Lyublinskaya et al., 2018). Использование в экспериментах различных модификаций биосенсора, локализованных в разных клеточных компартментах (цитозоль, ядро, митохондрии) или субкомпартаментах (межмембранное митохондриальное пространство, заякоривание на промежуточных филаментах) обеспечивает возможность изучать метаболизм пероксида на уровне отдельных сайтов локализации HyPer (Malinouski et al., 2011; Mishina et al., 2019).

В процессе измерений обычно детектируется ратиометрический сигнал HyPer — отношение сигналов флуоресценции биосенсора при двух разных длинах волн возбуждения (488 и 405 нм), соответствующих его окисленной и восстановленной форме. Измерение ратиометрического сигнала позволяет проводить качественный анализ — наблюдать изменение внутриклеточного или внутрикомпарментного уровня  $H_2O_2$  под воздействием различных стимулов. При использовании планшетных

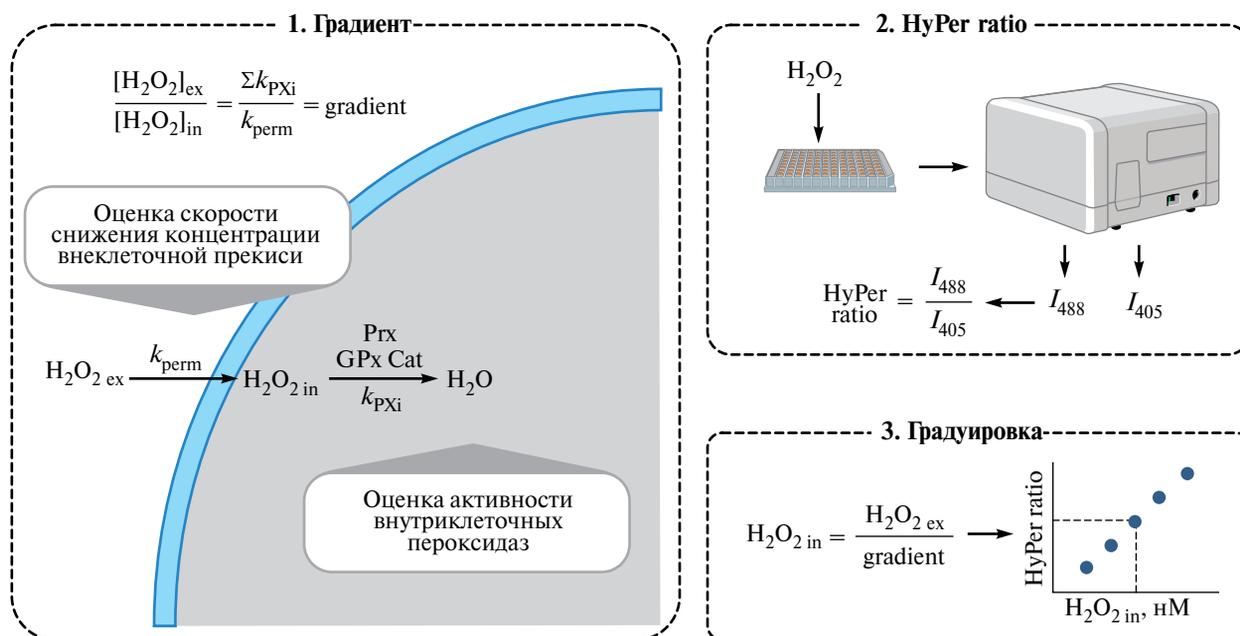
флуориметров и проточной цитометрии удается, кроме того, определять долю окисленного/восстановленного сенсора в клеточных компартментах и субкомпартаментах, используя прием калибровки флуоресцентных сигналов биосенсора. Для калибровки к клеткам добавляются высокие дозы дитиотреитола (ДТТ, обычно 10—30 мМ) и экзогенной  $H_2O_2$  (100—1000 мкМ), обеспечивающие полное восстановление и окисление HyPer соответственно. При подобной калибровке долю окисленного сенсора в клетке (OxD — oxidation degree), изменяющуюся в пределах от 0 до 1, можно определить по формуле (Meयर, Dick, 2010):

$$OxD = \frac{I_{488} \times I_{405DTT} - I_{488DTT} \times I_{405}}{I_{488} \times I_{405DTT} - I_{488} \times I_{405H_2O_2} + I_{488H_2O_2} \times I_{405} - I_{488DTT} \times I_{405}} \quad (1)$$

где OxD =  $N_{ox}/N_{tot}$  — отношение фракции окисленных (ox) молекул HyPer к его общему (tot) количеству в клетке,  $I_{488}$  и  $I_{405}$  — флуоресцентные сигналы биосенсора в клетках интереса, измеренные при длинах волн возбуждения 488 и 405 нм соответственно, а  $I_{DTT}$  и  $I_{H_2O_2}$  — сигналы, измеренные в образцах клеток при инкубации с калибровочными дозами ДТТ и  $H_2O_2$  соответственно. Измерение доли окисленного сенсора позволяет проводить не только качественные, но и количественные оценки внутриклеточных уровней  $H_2O_2$  с использованием приёмов, описанных в следующем разделе обзора.

#### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ HyPer ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ $H_2O_2$ В УСЛОВИЯХ ВНЕШНЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ НАГРУЗКИ НА КЛЕТКИ

В условиях окислительного стресса, индуцированного внеклеточными источниками  $H_2O_2$ , конечная скорость проникновения  $H_2O_2$  через плазматическую мембрану и эффективная внутриклеточная элиминация  $H_2O_2$  ферментами антиоксидантной защиты приводит к значительной разнице между внеклеточной и внутриклеточной концентрацией пероксида: внутри клетки уровень  $H_2O_2$  оказывается намного меньше, чем снаружи (Antunes, Cadenas, 2000). Клеточные пероксидазы элиминируют избыточную перекись намного быстрее, чем она проникает в клетку, и устанавливающийся внутриклеточный уровень  $H_2O_2$  зависит от конкуренции этих двух процессов. В исследованиях, посвященных влиянию повышенных внеклеточных уровней  $H_2O_2$



**Рис. 1.** Схема эксперимента по градуировке биосенсора HyPer в живых клетках с использованием экзогенной  $H_2O_2$ . Обозначения: gradient – отношение внеклеточной концентрации  $H_2O_2$  ( $[H_2O_2]_{ex}$ ) к внутриклеточной ( $[H_2O_2]_{in}$ );  $k_{PXi}$  – константа скорости элиминации  $H_2O_2$  внутриклеточными пероксидазами: пероксиредоксинами (Prx), глутатионпероксидазами (GPx), каталазой (Cat),  $c^{-1}$ ;  $k_{perm}$  – константа скорости проникновения  $H_2O_2$  в клетку,  $c^{-1}$ ; HyPer ratio – ратиометрический сигнал биосенсора, отношение сигналов флуоресценции HyPer при двух разных длинах волн возбуждения: 488 нм ( $I_{488}$ ) и 405 нм ( $I_{405}$ ).

на физиологию клеток, отношение внеклеточной к внутриклеточной концентрации  $H_2O_2$  принято называть градиентом  $H_2O_2$ , хотя с точки зрения физической химии это некорректно – в этой области науки под концентрационным градиентом, как правило, понимается разность концентраций, но не их отношение. Однако поскольку термин «градиент  $H_2O_2$ » стандартно используется в клеточной редокс-биологии для описания клеточного ответа на внешний окислительный стресс, мы позволим себе использовать его и в настоящем обзоре, толкуя его как безразмерную величину, отвечающую на вопрос, во сколько раз внеклеточная концентрация  $H_2O_2$  превышает внутриклеточную.

Для количественного определения с помощью HyPer внутриклеточного уровня  $H_2O_2$  в условиях окислительного стресса были разработаны две различные стратегии. Первая – градуировка биосенсора с помощью экзогенной  $H_2O_2$ , и использование затем этой градуировки для определения уровня пероксида в клетках, находящихся в условиях окислительного стресса. Вторая стратегия – прямое измерение внутриклеточного содержания  $H_2O_2$ , основанное на анализе кинетики окисления биосенсора в живых клетках непосредственно после индукции стресса. Рассмотрим подробнее оба предложенных подхода.

**Градуировка HyPer с использованием экзогенной  $H_2O_2$ .** Подход, предлагающий использовать градуировку HyPer, был предложен коллективом авторов из лаборатории Hadley D. Sikes (Massachusetts Institute of Technology, США) около 10 лет назад (Huang, Sikes, 2014). В рамках этого подхода для градуировки биосенсора, локализованного в клетках, используются значения внутриклеточной концентрации, вычисленные на основе внеклеточной концентрации  $H_2O_2$  и величине градиента, устанавливающегося после добавления к клеткам экзогенного пероксида. Градиент определяется с использованием метода, предложенного в 2000 г. Fernando Antunes (Lisbon University) (Antunes, Cadenas, 2000). Согласно этому методу, градиент вычисляется, основываясь на разнице между скоростью проникновения  $H_2O_2$  в клетку и скоростью её элиминации внутриклеточными пероксидазами (рис. 1):

$$k_{perm} \times [H_2O_2]_{ex} = \sum_i k_{PXi} \times [H_2O_2]_{in}, \quad (2)$$

$$\text{gradient} = [H_2O_2]_{ex} / [H_2O_2]_{in} = \sum_i k_{PXi} / k_{perm}, \quad (3)$$

где  $k_{perm}$  – это константа скорости проникновения  $H_2O_2$  внутрь клетки,  $k_{PX}$  – константа скорости элиминации пероксида внутриклеточными пероксидазами

( $PX_i$ ), а  $[H_2O_2]_{ex}$  и  $[H_2O_2]_{in}$  — вне- и внутриклеточная концентрации  $H_2O_2$  соответственно.

Для определения скорости проникновения  $H_2O_2$  измеряется скорость детоксификации  $H_2O_2$  клетками: фотометрическим способом с использованием  $H_2O_2$ -чувствительных реагентов (например, AmplexRed, 10-ацетил-3,7-дигидроксибензофенона) определяется внеклеточная концентрация  $H_2O_2$  в разные временные точки после добавления в клеточную среду экзогенного пероксида. Для определения скорости внутриклеточной элиминации  $H_2O_2$  пероксидазами клетки лизируют и проводят тесты на специфическую ферментативную активность пероксиредоксинов, глутатионпероксидаз, каталазы (основных участников процесса элиминации  $H_2O_2$  в клетках) (Huang, Sikes, 2014). Определив таким образом градиент, можно вычислить значение  $[H_2O_2]_{in}$  для каждой конкретной концентрации  $H_2O_2$ , добавляемой в клеточную среду, и сопоставив это значение с измеренным флуоресцентным ратиометрическим сигналом *HuPer*, проградуировать сенсор. В дальнейшем эту градуировку можно использовать для определения внутриклеточной концентрации  $H_2O_2$  в экспериментальных образцах клеток.

Предложенный в лаборатории Hadley D. Sikes протокол был реализован для определения диапазона цитотоксических и нецитотоксических внутриклеточных концентраций  $H_2O_2$  при индукции окислительного стресса в культивируемых клетках линии HeLa (Huang et al., 2016). Для этих клеток вычисленное значение градиента составило 650 раз (Huang, Sikes, 2014). С использованием этой оценки авторы показали, что внутриклеточные концентрации  $H_2O_2$  ниже 35 нМ не вызывают цитотоксических эффектов, в то время как концентрации, превышающие это значение, могут приводить к гибели клеток, однако токсичность пероксида зависит от времени воздействия  $H_2O_2$  (Huang et al., 2016).

Несмотря на пионерский характер экспериментов, проведенных в лаборатории Hadley D. Sikes, позволивших впервые ранжировать диапазон физиологически релевантных и повреждающих внутриклеточных концентраций  $H_2O_2$ , стоит отметить, что концепция предложенного метода, в рамках которой градиент  $H_2O_2$  считается независимым от интенсивности окислительного воздействия, является значительным упрощением, что заставляет рассматривать полученные значения (Huang et al., 2016) с осторожностью — в большей степени как вероятные оценочные величины. Ещё одно ограничение этого подхода — невозможность оценки внутрикомпарментных уровней  $H_2O_2$ , устанавли-

вающих в условиях окислительного стресса, поскольку ферментативная пероксидазная активность, измеряемая для вычисления градиента и градуировки сенсора, определяется в тотальных клеточных лизатах. Помимо этого, метод достаточно трудоемкий и не может быть использован для рутинного измерения внутриклеточного содержания  $H_2O_2$ .

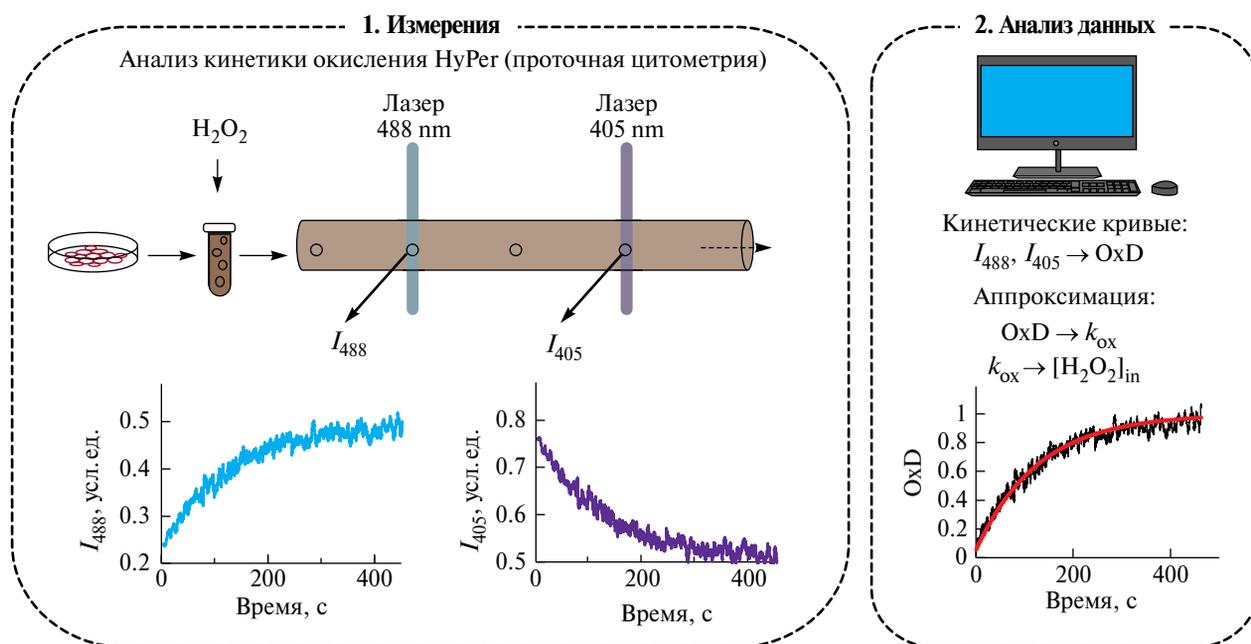
**Анализ кинетики окисления *HuPer*.** Альтернативный подход для количественного определения внутриклеточного уровня  $H_2O_2$  с использованием *HuPer* был предложен в работе авторов настоящего обзора, выполненной в сотрудничестве с Fernando Antunes (Lyublinskaya, Antunes, 2019). В рамках этого подхода было предложено определять концентрацию  $H_2O_2$ , устанавливающуюся в различных компартаментах клетки в условиях внешнего  $H_2O_2$ -индуцированного стресса, основываясь на анализе кинетики окисления *HuPer*, локализованного в этих компартаментах, непосредственно после добавления экзогенного пероксида в клеточную среду. При разработке метода авторы исходили из следующего:

1) анализ кинетики химических реакций служит удобным инструментом для определения концентраций реагирующих веществ (достаточно лишь знать константы протекающих реакций);

2) окисление внутриклеточных белков может быть описано с использованием кинетической модели, разработанной ранее (Brito, Antunes, 2014);

3) скорость реакции окисления *HuPer* в клетках существенно, на несколько порядков, ниже скорости установления внутриклеточной концентрации  $H_2O_2$  после добавления к клеткам экзогенного пероксида (Lim et al., 2016; Lyublinskaya et al., 2018).

Был разработан протокол для измерения внутрикомпарментных уровней  $H_2O_2$ , устанавливающихся в условиях постоянного присутствия экзогенного пероксида во внеклеточном пространстве (Lyublinskaya, Antunes, 2019; Zenin и др., 2022). Первый этап протокола (рис. 2) подразумевает измерение кинетических кривых. С использованием планшетного флуориметра или проточного цитометра отслеживается кинетика окисления *HuPer*, локализованного в изучаемом клеточном компарimente — измеряются флуоресцентные сигналы, соответствующие окисленной и восстановленной форме биосенсора в зависимости от времени, прошедшего после добавления  $H_2O_2$  в клеточную среду (Zenin et al., 2022). Второй этап протокола предполагает вычисление на основе полученных данных доли окисленного биосенсора  $OxD$  (см. уравнение 1) и аппроксимацию кинетических кривых уравнениями химической кинетики (Brito, Antunes, 2014).



**Рис. 2.** Схема эксперимента по определению внутриклеточной концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{in}}$ ) при индукции внешнего окислительного стресса. Левая панель — схема измерений, проточно-цитометрический анализ клеток. Правая панель — обработка экспериментальных данных, пример кинетической кривой (черная) и аппроксимации этой кривой кинетическим уравнением (4) (красная кривая). Обозначения:  $I_{488}$  и  $I_{405}$  — сигналы флуоресценции HyPer при длинах волн возбуждения 488 и 405 нм соответственно; OxD (oxidation degree) — отношение количества окисленных молекул HyPer к их общему количеству в клетке;  $k_{\text{Ox}}$  — константа скорости реакции второго порядка между HyPer и  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{с}^{-1}$ .

Согласно описанным в настоящей работе закономерностям, непосредственно после индукции внешнего окислительного стресса, доля окисленного HyPer в исследуемом клеточном компартменте начинает расти, достигая со временем квазистационарного уровня, благодаря конкуренции процессов окисления и восстановления сенсора. Увеличение доли окисленного сенсора со временем описывается следующими уравнениями:

$$\text{OxD} = \text{OxD}_{\text{ss}} - e^{-(k_{\text{Ox}} + k_{\text{rd}}) \times t} \times (\text{OxD}_{\text{ss}} - \text{OxD}_0) \quad (4)$$

$$\text{OxD}_{\text{ss}} = \frac{k_{\text{Ox}}}{k_{\text{rd}} + k_{\text{Ox}}} \quad (5)$$

В этих уравнениях OxD — это доля окисленного сенсора в момент времени  $t$ ,  $\text{OxD}_{\text{ss}}$  — устанавливающийся со временем квазистационарный уровень окисления сенсора,  $\text{OxD}_0$  — доля сенсора в начальный момент времени, а  $k_{\text{Ox}}$  и  $k_{\text{rd}}$  — это константы псевдопервого порядка окисления и восстановления сенсора соответственно. Величина  $k_{\text{rd}}$  зависит от активности ферментативных систем тиол-дисульфидного обмена, восстанавливающих сенсор. Величина  $k_{\text{Ox}}$  зависит от уровня  $\text{H}_2\text{O}_2$  внутри клетки и определяется следующим образом:

$$k_{\text{Ox}} = k_{\text{HyPer} + \text{H}_2\text{O}_2} \times [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{in}}, \quad (6)$$

где  $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{in}}$  — это внутриклеточная концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$ , усредненная по сайтам локализации сенсора, а  $k_{\text{HyPer} + \text{H}_2\text{O}_2} = 5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{с}^{-1}$  это константа реакции между HyPer и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (известна из: Bilan et al., 2013).

Двухпараметрическая нелинейная аппроксимация кинетических кривых уравнениями (4) и (5) с использованием метода наименьших квадратов позволяет определить  $k_{\text{Ox}}$  и  $k_{\text{rd}}$ , а уравнение (6) используется для вычисления внутрикомпаратментного содержания  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Описанный протокол был апробирован с использованием клеток K-562, экспрессирующих цитоплазматический вариант HyPer (Lyublinskaya, Antunes, 2019; Zenin et al., 2022). Были определены цитоплазматические концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$ , установившиеся при добавлении разных концентраций экзогенной  $\text{H}_2\text{O}_2$  в клеточную среду. Вычисленные концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  позволили определить градиенты  $\text{H}_2\text{O}_2$ , которые оказались разными для разных окислительных нагрузок на клетки. При низких концентрациях экзогенной  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $< 10 \text{ мкМ}$ ) градиент был близок к  $10^3$ , но быстро уменьшался с увеличением окислительной нагрузки. При высоких внеклеточных концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10–100 мкМ), которые вызывали полное окисление HyPer, градиент стабилизировался и оказался равным 440 раз. На основе проведенных измерений был определен цитотоксический порог внутриклеточных

концентраций  $H_2O_2$ . Цитоплазматическая концентрация  $H_2O_2$ , приводящая к гибели 50 % клеток K-562 через 1 сут после индукции стресса (показатель LD50), оказалась равной 45 нМ (Zenin et al., 2022), что в целом хорошо согласуется с результатами, полученными в лаборатории Hadley D. Sikes для клеток линии HeLa (Huang et al., 2016).

Основным достоинством описанного выше метода количественного определения  $H_2O_2$  является возможность его рутинного использования в экспериментах с клетками самого разного типа и происхождения, а также возможность работы с компартиментализованными вариантами HuPer. Для каждого типа клеток и каждого варианта сенсора можно один раз проградуировать HuPer с использованием экзогенной  $H_2O_2$ , а затем использовать эту градуировку для измерения внутрикомпарментного содержания  $H_2O_2$  в других экспериментах, посвященных реакции клеток на внешний окислительный стресс. Метод детекции флуоресценции биосенсора может быть разным: с помощью планшетного флуориметра или проточной цитометрии. При применении проточной цитометрии появляется возможность анализировать отдельные клеточные субпопуляции в составе одной популяции клеток, однако недостатком этого метода является необходимость перевода клеточной культуры в суспензию, что может влиять на клеточное микроокружение и физиологический контекст в случае адгезивных культур.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ HuPer ДЛЯ ОЦЕНКИ БАЗАЛЬНОГО УРОВНЯ $H_2O_2$ В КЛЕТКАХ

Помимо оценок внутриклеточного содержания  $H_2O_2$  в условиях окислительного стресса, в работе (Lyublinskaya, Antunes, 2019), HuPer был использован для экспериментального определения базальной внутриклеточной концентрации перекиси водорода в цитоплазме культивируемых клеток. Согласно уравнениям (5) и (6), для определения средней концентрации эндогенной перекиси водорода в выбранном клеточном компартменте необходимо в отсутствие экзогенного пероксида измерить уровень базального окисления HuPer, локализованного в этом компартменте ( $OxD_{ss\_basal}$ ), и базальную константу реакции восстановления сенсора ( $k_{rd\_basal}$ ).  $OxD_{ss\_basal}$  в экспериментальных образцах клеток вычисляется с использованием уравнения (1), основываясь на измерениях, проведенных с использованием планшетного флуориметра или проточного цитометра. Для определения  $k_{rd\_basal}$  необходимо провести серию кинетических экспериментов с добавлением в кле-

точную среду экзогенного пероксида. Полученные в этих опытах кинетические кривые аппроксимируются уравнением (4) для определения  $k_{rd}$ , после чего путем экстраполяции зависимости  $k_{rd}$  от внеклеточной концентрации  $H_2O_2$  определяются значения  $k_{rd\_basal}$  ( $k_{rd}$  при  $[H_2O_2]_{ex} = 0$ ) (Lyublinskaya, Antunes, 2019). С использованием значений  $OxD_{ss\_basal}$  и  $k_{rd\_basal}$  из уравнения (5) определяется  $k_{ox\_basal}$ , а из уравнения (6) — базальная внутрикомпарментная концентрация  $[H_2O_2]_{in\_basal}$ .

С использованием этого подхода, была определена базальная концентрация  $H_2O_2$  в цитоплазме клеток K-562, ресуспендированных в PBS, которая составила  $2 \pm 0.5$  нМ (Lyublinskaya, Antunes, 2019). Однако в более поздних работах было обнаружено, что в культурах K-562, ресуспендированных в полной ростовой среде, HuPer, локализованный в цитоплазме, оказывается полностью восстановлен (Zenin et al., 2022). Согласно уравнению (5), подобная картина может наблюдаться только при выполнении условия  $k_{ox\_basal} \ll k_{rd\_basal}$ . По-видимому, выполнение этого условия в клетках, ресуспендированных в полной среде, обусловлено эффективной работой дисульфидредуктаз, восстанавливающих биосенсор. Аналогичная картина наблюдалась и в клетках других клеточных линий (Zenin et al., 2022), что свидетельствует о невозможности использовать HuPer для количественного определения среднего базального уровня  $H_2O_2$  в клеточной цитоплазме в условиях физиологической нормы с использованием описанного выше метода.

Таким образом, проведенные эксперименты (Lyublinskaya, Antunes, 2019; Zenin et al., 2022) показали, что полноценный состав питательной среды важен для поддержания нормального редокс-метаболизма клетки, обеспечивающего полное восстановление редокс-активных тиольных групп HuPer в условиях физиологической нормы. Напротив, ресуспендирование клеток в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) приводит к обеднению питательными веществами и способствует нарушению редокс-гомеостаза в клеточной цитоплазме, приводя к окислению HuPer. Несмотря на это, измерения, проведенные с использованием клеток K-562, ресуспендированных в PBS (Lyublinskaya, Antunes, 2019), заслуживают внимания, так как позволили впервые экспериментально определить концентрационный диапазон для эндогенной  $H_2O_2$  в клеточной цитоплазме. Согласно проведенной оценке, усредненная по времени и объему цитоплазматическая концентрация  $H_2O_2$  измеряется в нМ (нмоль/л), что хорошо согласуется с существующими теоретическими представлениями на этот счет (Sies 2021).

## СПЕКТР ЗАДАЧ, РЕШАЕМЫХ ПУТЕМ ПРОВЕДЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ОЦЕНОК УРОВНЯ $H_2O_2$ В НУРЕР-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ

Несмотря на ряд ограничений описанных выше методов количественного определения внутриклеточного содержания  $H_2O_2$  (главное из которых — затруднения, возникающие при определении с помощью Нурер базальной концентрации пероксида), эти методы могут использоваться для решения широкого ряда задач клеточной редокс-биологии.

Во-первых, измеряемый с помощью Нурер уровень  $H_2O_2$ , устанавливающийся в клеточных компартментах в условиях внешнего  $H_2O_2$ -индуцированного стресса, можно рассматривать как характеристику систем антиоксидантной защиты клеток. Соответственно, проводя подобные измерения, можно отслеживать, как меняется эффективность этих систем при изменении физиологического контекста — в процессе клеточного старения, дифференцировки, репрограммирования. Так, в работе Зенина с коллегами (Zenin et al., 2022) было проанализировано изменение антиоксидантной активности в цитоплазме клеток человека в ходе репрограммирования и последующей дифференцировки. Чтобы иметь возможность сравнивать между собой изогенные линии клеток разного фенотипа, авторы работы получили индуцированные плюрипотентные клетки человека (иПСК), используя в качестве родительских культур мезенхимные стволовые клетки (МСК), экспрессирующие Нурер, после чего методом спонтанной дифференцировки получили дифференцированные потомки иПСК, близкие по фенотипу к исходным культурам МСК (иПСК-МСК). Для полученных клеточных линий были измерены цитоплазматические концентрации  $H_2O_2$ , устанавливающиеся при различных окислительных нагрузках на клетки. Проведенные эксперименты показали, что при репрограммировании МСК эффективность антиоксидантной защиты увеличивается, в то время как дифференцировка иПСК не приводит к заметному изменению антиоксидантной активности в клеточной цитоплазме (Zenin et al., 2022). В целом, культуры иПСК и иПСК-МСК характеризовались самой мощной системой антиоксидантной защиты из всех проанализированных в данной работе клеточных линий (МСК, иПСК, иПСК-МСК, HeLa, K-562) (Zenin et al., 2022). На основе полученных результатов была сформулирована гипотеза о высокоэффективной системе антиоксидантной защиты клеток, характерной для этапа эмбрионального развития.

Во-вторых, работая с клетками пациентов, можно исследовать влияние различных патологий на активность антиоксидантной защиты клеток. Так, в настоящее время в научной литературе обсуждается целый набор противоопухолевых стратегий, основанных на разной чувствительности нормальных и трансформированных клеток к окислительному стрессу (Sporn, Liby, 2012; Milkovic et al., 2017), однако четкого представления об особенностях редокс-метаболизма малигнизированных клеток нет. Для решения этой проблемы можно выделить различные популяции клеток из опухолевых и нормальных тканей человека, трансдуцировать их Нурер, и, используя методы, описанные в данном обзоре, сравнить эффективность антиоксидантной защиты клеток малигнизированного и нормального фенотипа.

В-третьих, важнейшее направление исследований, которое можно реализовать с использованием описанных в обзоре количественных методов — это идентификация ферментативных путей, контролирующих редокс-метаболизм клеток разного типа, а также разных клеточных компартментов в условиях окислительной нагрузки. Например, сочетание метода определения внутриклеточной концентрации  $H_2O_2$ , основанного на анализе кинетики окисления Нурер, с ингибиторным анализом и (или) генетическими манипуляциями, позволяющими подавлять активность конкретных ферментативных путей, дает возможность разобраться, при каких интенсивностях внешнего окислительного стресса какие из многочисленных клеточных пероксидаз критически важны, а какие выполняют регулируемую или резервирующую функцию в клетках разного типа. Так, в работе Ивановой с соавторами (Ivanova et al., 2023) был проанализирован вклад тиоредоксин-зависимых пероксидаз (пероксиредоксинов) в систему антиоксидантной защиты иПСК и их дифференцированных клеток-потомков мезенхимного типа (иПСК-МСК). С использованием ингибиторного анализа было показано, что тиоредоксин-зависимые пероксидазы оказывают влияние на антиоксидантную активность в цитоплазме как иПСК, так и иПСК-МСК исключительно в условиях легкой окислительной нагрузки, но не играют существенной роли в условиях интенсивного окислительного стресса. Полученные результаты свидетельствуют об универсальном характере редокс-метаболизма стволовых и дифференцированных клеток в условиях окислительного стресса и подчеркивают значение пероксиредоксинов как основных источников элиминации  $H_2O_2$  в клеточной цитоплазме в условиях слабых окислительных возмущений.

## ОСОБЕННОСТИ HyPer, КОТОРЫЕ НЕОБХОДИМО УЧИТЫВАТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ОЦЕНОК ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО УРОВНЯ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Используя HyPer для оценки внутриклеточного или внутрикомпарментного содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, необходимо помнить, что флуоресцентный сигнал биосенсора зависит от внутриклеточного показателя рН (Bilan, Belousov, 2016). Рекомендуется проводить контрольные эксперименты с редокс-неактивной версией биосенсора SupHyPer, которая отличается от HyPer всего одной аминокислотной заменой. Благодаря этой замене химерный белок теряет свою чувствительность к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, но сохраняет все свои основные особенности, в том числе и рН-чувствительность.

Помимо этого, стоит учитывать, что параметр, оцениваемый с помощью описанных в обзоре методов (уровень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), представляет собой усредненную по времени и пространству величину, характеризующую внутриклеточный или внутрикомпарментный редокс-гомеостаз в целом, но не дающую представления о локальных процессах генерации и элиминации пероксида в конкретные моменты времени.

Наконец, стоит иметь в виду, что серьезной проблемой при проведении количественных измерений уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с помощью HyPer является недостаточно точная оценка константы его взаимодействия с пероксидом, которая основана преимущественно на экспериментах с его белком-прародителем OxyR (Zheng et al., 1998; Lee et al., 2004). Дальнейшая работа по определению этого параметра необходима для проведения более аккуратных количественных тестов на внутриклеточное содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с использованием HyPer. Уточнение константы взаимодействия биосенсора с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может привести в будущем к коррекции уже полученных с помощью HyPer количественных оценок.

В заключении обзора хотелось бы обсудить еще один важный аспект — перспективы использования для количественных оценок уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> новой модификации биосенсора, HyPer7, отличающейся высочайшей чувствительностью к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Pak et al., 2020). Высокая константа скорости реакции HyPer7 с пероксидом (которая на два порядка превышает параметры первой версии HyPer) позволяет надеяться, что измерению будут доступны уровни H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, индуцируемые окислительными возмущениями не только экзогенной, но и эндогенной природы. Так, явление, которое до сих пор не охарактеризовано с точки зрения количественного определения уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — это

индукция физиологического окислительного стресса при стимуляции клеток ростовыми факторами. Использование HyPer7 может оказаться гораздо более эффективным при проведении подобных экспериментов, чем использование HyPer. Помимо высокой чувствительности к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, флуоресцентный сигнал HyPer7 является рН-независимым, что обеспечит дополнительные преимущества при изучении этого явления. Мы надеемся, что в ближайшем будущем появятся работы, реализующие эту возможность.

## ВЫВОДЫ

Использование генетически кодируемого биосенсора HyPer предоставляет широкие возможности для проведения количественных оценок внутриклеточной и внутрикомпарментной концентрации перекиси водорода в живых клетках. Определение содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может быть использовано для ранжирования диапазона физиологических и повреждающих концентраций H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетках, оценки эффективности систем антиоксидантной защиты разного типа клеток и отдельных клеточных компарментов в норме и патологии, а также для идентификации молекулярных механизмов защиты клеток от окислительного стресса.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (в рамках проекта № 21-74-20178 был собран и систематизирован материал для первых четырёх глав обзора; в рамках проекта № 23-74-01142 — для заключительных трёх глав).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Antunes F., Cadenas E.* 2000. Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes. *FEBS Lett.* V. 475. P. 121.  
*Belousov V. V., Fradkov A. F., Lukyanov K. A., Staroverov D. B., Shakhbazov K. S., Terskikh A. V., Lukyanov S. A.* 2006. Genetically encoded fluorescent indicator

- for intracellular hydrogen peroxide. *Nat. Methods* V. 3. P. 281.
- Bilan D. S., Belousov V. V.* 2016. HyPer family probes: state of the art. *Antioxidants Redox Signal.* V. 24. P. 731.
- Bilan D. S., Pase L., Joosen L., Gorokhovatsky A. Y., Ermakova Y. G., Gadella T. W., Grabher C., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V. V.* 2013. HyPer-3: a genetically encoded H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. *ACS Chem. Biol.* V. 8. P. 535.
- Brito P. M., Antunes F.* 2014. Estimation of kinetic parameters related to biochemical interactions between hydrogen peroxide and signal transduction proteins. *Front. Chem.* V. 2. P. 82.
- Huang B. K., Sikes H. D.* 2014. Quantifying intracellular hydrogen peroxide perturbations in terms of concentration. *Redox Biol.* V. 2. P. 955.
- Huang B. K., Stein K. T., Sikes H. D.* 2016. Modulating and measuring intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using genetically encoded tools to study its toxicity to human cells. *ACS Synth. Biol.* V. 5. P. 1389.
- Ivanova J., Guriev N., Pugovkina N., Lyublinskaya O.* 2023. Inhibition of thioredoxin reductase activity reduces the antioxidant defense capacity of human pluripotent stem cells under conditions of mild but not severe oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 642. P. 137.
- Lee C., Lee S. M., Mukhopadhyay P., Kim S. J., Lee S. C., Ahn W. S., Yu M. H., Storz G., Ryu S. E.* 2004. Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat. Struct. Mol. Biol.* V. 11. P. 1179.
- Lim J., Langford T., Huang B., Deen W., Sikes H.* 2016. A reaction-diffusion model of cytosolic hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* V. 90. P. 85.
- Lyublinskaya O. G., Antonov S. A., Gorokhovtsev S. G., Pugovkina N. A., Kornienko J. S., Ivanova J. S., Shatrova A. N., Aksenov N. D., Zenin V. V., Nikolsky N. N.* 2018. Flow cytometric HyPer-based assay for hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* V. 128 P. 40.
- Lyublinskaya O., Antunes F.* 2019. Measuring intracellular concentration of hydrogen peroxide with the use of genetically encoded H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor HyPer. *Redox Biol.* V. 24: 101200.
- Malinouski M., Zhou Y, Belousov V, Hatfield D, Gladyshev V.* 2011. Hydrogen peroxide probes directed to different cellular compartments. *PLoS One.* V. 6: e14564.
- Meyer A. J., Dick T. P.* 2010. Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid. Redox Signal.* V. 13. P. 621.
- Milkovic L., Zarkovic N., Saso L.* 2017. Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biol.* V. 12. P. 727.
- Mishina N., Bogdanova Y., Ermakova Y., Panova A., Kotova D., Bilan D., Steinhorn B., Arnér E., Michel T., Belousov V.* 2019. Which antioxidant system shapes intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients? *Antioxid. Redox Signal.* V. 31. P. 664.
- Mishina N., Markvicheva K., Bilan D., Matlashov M., Shirmanova M., Liebl D., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V.* 2013. Visualization of intracellular hydrogen peroxide with HyPer, a genetically encoded fluorescent probe. *Methods Enzymol.* V. 526. P. 45.
- Pak V. V., Ezeriņa D., Lyublinskaya O. G., Pedre B., Tyurin-Kuzmin P. A., Mishina N. M., Thauvin M., Young D., Wahni K., Martínez Gache S. A., Demidovich A. D., Ermakova Y. G., Maslova Y. D., Shokhina A. G., Eroglu E., et al.* 2020. Ultrasensitive genetically encoded indicator for hydrogen peroxide identifies roles for the oxidant in cell migration and mitochondrial function. *Cell Metab.* V. 31. P. 642.
- Sies H.* 2021. Oxidative eustress: on constant alert for redox homeostasis. *Redox Biol.* V. 41: 101867.
- Sies H., Berndt C., Jones D. P.* 2017. Oxidative stress. *Annu Rev. Biochem.* V. 86. P. 715.
- Sies H., Jones D. P.* 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 21. P. 363.
- Sporn M. B., Liby K. T.* 2012. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat. Rev. Cancer.* V. 12. P. 564.
- Zenin V., Ivanova J., Pugovkina N., Shatrova A., Aksenov N., Tyuryaeva I., Kirpichnikova K., Kuneev I., Zhuravlev A., Osyayeva E., Lyublinskaya E., Gazizova I., Guriev N., Lyublinskaya O.* 2022. Resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human cells of different phenotypes. *Redox Biol.* V. 50: 102245.
- Zheng M., Åslund F., Storz G.* 1998. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science.* V. 279. P. 171  
<https://doi.org/10.1007/s10561-022-10011-x>

## GENETICALLY ENCODED BIOSENSOR HyPer AS A TOOL FOR QUANTIFICATION OF INTRACELLULAR HYDROGEN PEROXIDE CONCENTRATIONS

O. G. Lyublinskaya<sup>a, \*</sup>, Ju. S. Ivanova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, Tikhoretskii pr., 4*

<sup>\*</sup>*e-mail: o.lyublinskaya@mail.ru*

This mini-review systematizes information on methods for quantitative assessment of intracellular hydrogen peroxide concentration based on the use of a genetically encoded peroxide sensor HyPer. Two approaches are being considered: 1) calibration of the biosensor using exogenous hydrogen peroxide, based on assessing the rate of peroxide penetration into cells and intracellular peroxidase activity; 2) direct determination of the intracellular peroxide content, based on measuring the level of oxidation of the biosensor, the oxidation reaction constant and the reduction reaction constant of HyPer in the cells. The use of these methods makes it possible to solve a wide range of tasks in cellular redox biology — to determine the range of physiological and damaging concentrations of hydrogen peroxide in cells, to evaluate the effectiveness of the antioxidant defense system in various cellular compartments under conditions of oxidative stress, to determine the contribution of various enzymatic systems to the peroxidase activity of cells, and to characterize antioxidant defense systems in various biological contexts (in the process of cellular senescence, differentiation, reprogramming, during the development of pathologies). The described methods can be adapted for other genetically encoded hydrogen peroxide biosensors.

**Keywords:** hydrogen peroxide, antioxidant defense, peroxidase activity, genetically encoded biosensors, HyPer

УДК 57.052:57.041:576.53

## ДВОЙСТВЕННОЕ ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА ЛИТИЯ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ ИПСК МЫШИ

© 2024 г. А. В. Кузнецов<sup>1</sup>, Е. В. Скворцова<sup>1</sup>, А. Н. Томили<sup>1</sup>, А. С. Цимоха<sup>1,\*</sup>

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

\*E-mail: [atsimokha@incras.ru](mailto:atsimokha@incras.ru)

Поступила в редакцию 06.12.2023

После доработки 11.12.2023

Принята к публикации 12.12.2023

Соматические клетки могут быть репрограммированы в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) с помощью определенных факторов. Низкая эффективность процесса репрограммирования ограничивает потенциал их применения для фундаментальных исследований, а гетерогенность получаемых иПСК – в клеточной терапии. В настоящей работе мы показываем, что хлорид лития (LiCl), известный активатор сигнального пути Wnt, снижает или усиливает эффективность генерации иПСК из эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ) в зависимости от момента его добавления в течение процесса репрограммирования. Наши результаты не только демонстрируют способ улучшения эффективности формирования иПСК, но также указывают на двойную роль LiCl в этом процессе.

**Ключевые слова:** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), LiCl, витамин С, репрограммирование, эмбриональные фибробласты мыши

**Принятые сокращения:** иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; МЭФ – эмбриональные фибробласты мыши; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

**DOI:** 10.31857/S0041377124030037, **EDN:** PENZNV

В настоящее время плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) представляют значительный интерес, как для фундаментальных исследований, так и для регенеративной медицины. Плюрипотентными, т. е. способными неограниченно делиться и дифференцироваться во все клеточные типы взрослого организма, являются эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), которые получают из клеток раннего эпибласта (первичной эктодермы) эмбрионов млекопитающих (Гордеев et al., 2021). Клетки, названные индуцированными ПСК (иПСК), обладают сходными с ЭСК характеристиками и впервые были получены в результате репрограммирования соматических клеток мыши с помощью эктопической экспрессии четырех транскрипционных факторов – Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мyc (Takahashi, Yamanaka, 2006). К настоящему моменту стало возможным получение иПСК с использованием малых молекул (Hou et al., 2013; Guan et al., 2022), причем профили экспрессии генов в таких иПСК сходны с ЭСК и иПСК, полученных с помощью вирусной доставки транскрипционных факторов. Главным достоинством иПСК по сравнению с ЭСК, очевидно, является отсутствие этических препятствий для их получения.

Сегодня иПСК находят применение в моделировании заболеваний, в разработке и тестировании терапевтических препаратов, однако, наибольший интерес представляет потенциальная возможность их использования в тканезаместительной терапии (Yamanaka, 2020).

Первые полученные линии ЭСК мыши поддерживали в культуре в присутствии сыворотки и с использованием фидерных слоев клеток (Evans, Kaufman, 1981). Позднее, плюрипотентное состояние этих клеток научились поддерживать в культуре более эффективно, получая более однородную по экспрессии маркеров популяцию с помощью бессывороточной среды, названной 2iL и содержащей два низкомолекулярных ингибитора (2i): ингибитор киназы MEK1/2 (PD0325901) и ингибитор киназы GSK3 $\beta$  (CHIR99021) (Ying et al., 2008), а также ингибирующий лейкемию фактор (LIF) (Niwa et al., 2009). Важно отметить, что и репрограммирование клеток в иПСК в такой бессывороточной среде также оказалось более эффективным (Okada et al., 2010). В дальнейшем появилось множество исследований, посвященных улучшению как эффективности самого процесса репрограммирования, так и качества

получаемых клонов иПСК. Для этого использовали различные способы доставки репрограммирующих факторов в клетки, а также оптимизировали условия культивирования клеток (Hong, 2015). Например, было показано, что эффективность генерации иПСК повышалась в присутствии LiCl, который выступает в качестве ингибитора киназы GSK3β (Wang et al., 2011), а также витамина С (Esteban et al., 2010). В результате скрининга была даже разработана среда для репрограммирования, получившая название iCD1, которая отличалась от стандартной 2iL среды тем, что в ее состав были дополнительно введены LiCl, витамин С и основной фактор роста фибробластов (bFGF), но исключен ингибитор PD0325901 (табл. 1) (Chen et al., 2011).

**Таблица 1.** Информация о составе бессывороточных (Б/с) сред 2iL и iCD1

| Название (фирма-производитель)        | Концентрация или кратность | Б/с среда 2iL | Б/с среда iCD1 |
|---------------------------------------|----------------------------|---------------|----------------|
| DMEM/F12 среда (Thermo, США)          | 0.5×                       | +             | +              |
| Neurobasal™ среда (Thermo, США)       | 0.5×                       | +             | +              |
| N2 добавка (Thermo, США)              | 1×                         | +             | +              |
| B27 добавка (Thermo, США)             | 1×                         | +             | +              |
| L-глутамин (Thermo, США)              | 1 мМ                       | +             | +              |
| Пенициллин-Стрептомицин (Thermo, США) | 1×                         | +             | +              |
| β-меркаптоэтанол (Sigma, США)         | 50 мкМ                     | +             | +              |
| BSA 10% р-р (Sigma, США)              | 0.0025%                    | +             | +              |
| CHIR99021 (Sigma, США)                | 3 мкМ                      | +             | +              |
| PD0325901 (Sigma, США)                | 1мкМ                       | +             | -              |
| LIF (лабораторный сток)               | 500 Ед/мл                  | +             | +              |
| bFGF (Peprotech, США)                 | 5 нг/мл                    | -             | +              |
| Витамин С (Sigma, США)                | 50 мкг/мл                  | -             | +              |
| LiCl (Sigma, США)                     | 5 мМ                       | -             | +              |

Несмотря на выраженный интерес к иПСК и на определенные успехи в этой области, эффективность получения и качество иПСК все равно остаются неудовлетворительными, в том числе из-за медленной кинетики процесса и многофакторных требований (Yamanaka, 2020). В связи с этим подбор оптимальных условий для получения иПСК остается актуальной задачей. В данной работе мы сравнили эффективность образования колоний иПСК в бессывороточных средах 2iL и iCD1 при репрограмми-

ровании МЭФ с помощью лентивирусного вектора, несущего четыре репрограммирующих фактора транскрипции — Oct4, Klf4, Sox2 и cMyc. Мы также обнаружили, что присутствие LiCl оказывает положительное или ингибирующее влияние на эффективность генерации иПСК в зависимости от момента его добавления в процессе репрограммирования.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клетки** почки эмбриона человека линии HEK293, полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН), культивировали при 37 °С в среде DMEM («Биолот», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, Thermo, США), в присутствии пенициллина и стрептомицина («Биолот», Россия). МЭФ получали из 13.5-суточных эмбрионов мыши линии C57BL/6 по стандартной методике (Durkin et al., 2013) и культивировали в среде MEF, содержащей смесь питательных сред DMEM («Биолот», Россия) и DMEM/F-12 («Биолот», Россия) в соотношении 1:1 и 15% FBS (Thermo, США) с добавлением пенициллина и стрептомицина («Биолот», Россия).

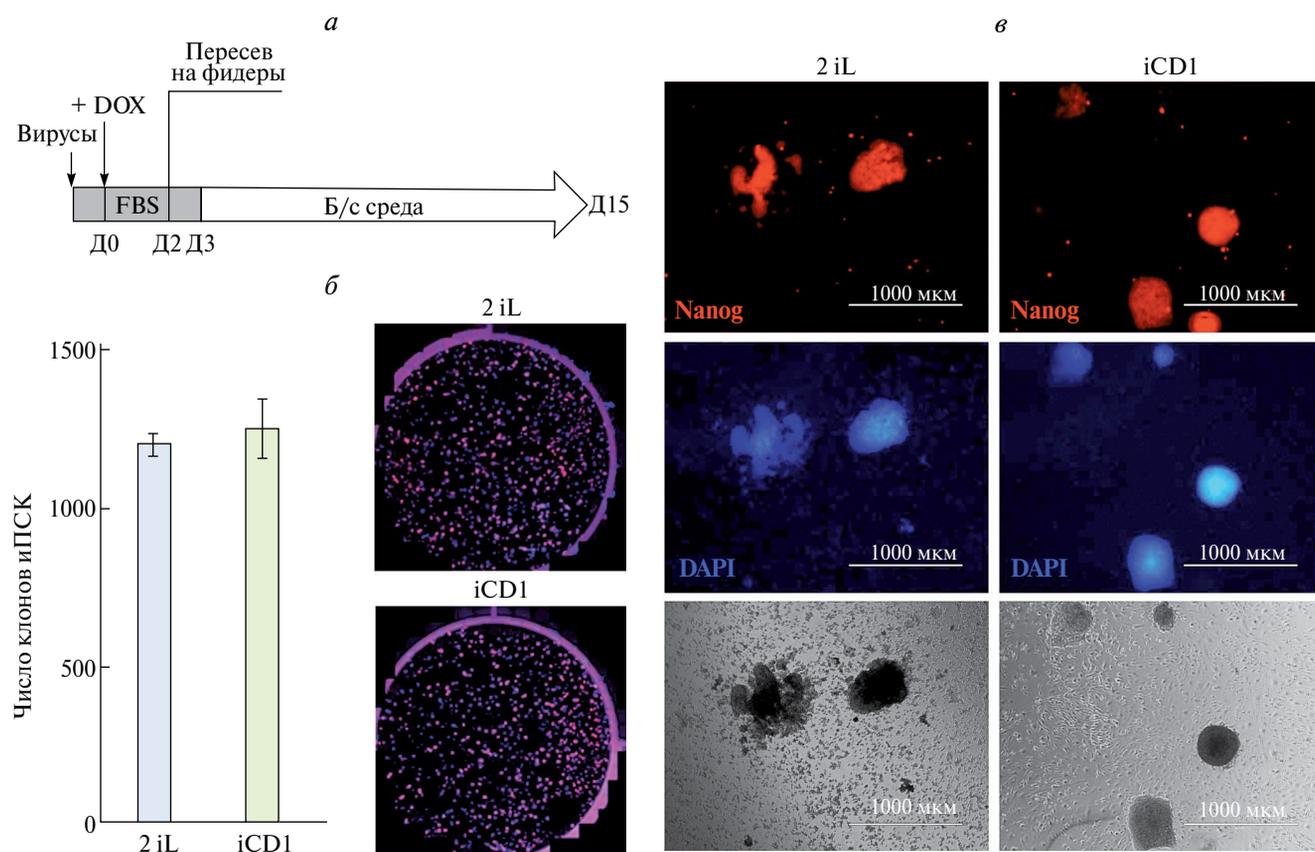
**ПЦР-анализ** клеток на присутствие микоплазмы проводили с помощью набора «БиоМастер» («Биолабмикс», Россия) и специфических праймеров: 5'-TGACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3' и 5'-GGGAGCAAACAGGATTAAGATACCCT-3'.

**Репрограммирование** МЭФ и иПСК осуществляли с помощью лентивирусной трансдукции четырех транскрипционных факторов: Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, схема эксперимента представлена на рис. 1а. Для сборки вирусов, клетки HEK293T ко-трансфицировали плазмидами, кодирующими полицистронную доксициклин-активируемую конструкцию HAGE2-TetO-miniCMV-hOct4-F2A-hKlf4-IRES-hSox2-E2A-hcMyc-W-loxP (OKSM) (Somers et al., 2010) или белок-активатор транскрипции rtTA (FUW-M2rtTA, addgene #20342) (Carey et al., 2009), и белки необходимые для сборки вирусных частиц pMD2.G и psPAX2 (Wiznerowicz, Trono, 2003). Трансфекцию проводили с помощью полиэтиленамина PEI MAX® (PEI, PolyScience, США) согласно рекомендациям фирмы производителя. По прошествии 16 ч среду меняли на свежую, и через 48, 72 и 96 ч производили сбор кондиционированной клетками среды, содержащей вирусные частицы. Полученную среду пропускали через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм (Milipore, США). Осадок вирусных частиц, полученный центрифугированием при 47000 g в течение 2 ч при 4 °С, растворяли в среде Opti-MEM (Thermo, США),

аликвотировали по 50 мкл и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Титр вирусов определяли методом конечных разведений и окраской клеток НЕК293 с помощью первичных антител к Oct4 (1:300; Santa Cruz, США). За сутки до заражения вирусами МЭФ высевали из расчета  $5 \times 10^4$  клеток на лунку 24-луночного планшета, поверхность которой обработана 0.1 %-ным желатином (Sigma, США). На следующий день среду заменяли на бессывороточную OptiMEM и выдерживали в течение 1 ч. После этого среду отбирали и добавляли 200 мкл среды OptiMEM, содержащей смесь вирусов, несущих OKSM и гТA, в равном соотношении. Через 3–4 ч добавляли еще 100 мкл OptiMEM и инкубировали в течение 16 ч. На следующий день среду меняли на среду MEf с добавлением доксициклина (3 мкг/мл, Sigma, США), и этот день считали нулевым с начала репрограммирования (D0). На следующий день (D1)

митотически инактивированные МЭФ (мМЭФ) (инкубация с митомицином С в концентрации 100 мкг/мл в течение 3–4 ч) высевали в количестве  $3 \times 10^5$  клеток на лунку 6-луночного планшета, предварительно обработанную 0.1 %-ным желатином (Sigma, США). Ещё через день (D2) пересеивали репрограммирующиеся МЭФ на фидерный слой мМЭФ в соотношении: клетки с 1 лунки 24-луночного планшета высевали на 3 лунки 6-луночного планшета. Начиная с 3 дня (D3) репрограммирование МЭФ в иПСК осуществляли в бессывороточной среде 2iL или iCD1 (табл. 1), а также в этих средах с добавлением LiCl и/или витамина С. Репрограммирование проводили при  $37^{\circ}\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  в течение 15 дней (D15), среду меняли на свежую каждые 2 дня.

Иммунофлуоресцентную микроскопию колоний иПСК проводили на 15 ДР, для чего клетки промы-



**Рис. 1.** Эффективность репрограммирования МЭФ в иПСК одинакова для сред 2iL и iCD1. *а* — Схема процесса репрограммирования МЭФ в иПСК; МЭФ инфицировали вирусами и на следующий день (D0) активировали экспрессию OKSM с помощью доксициклина (DOX). Через 2 дня (D2) репрограммирующиеся МЭФ рассеивали на фидерный слой клеток и через день (D3) среду с сывороткой меняли на бессывороточную. *б* — На диаграмме представлено число Nanog-положительных колоний иПСК, образованных к 15-му дню репрограммирования (D15) в лунке 6-луночного планшета. Данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений SD ( $n = 3$ ). На нижней панели представлены репрезентативные изображения целых лунок 6-луночного планшета, содержащих Nanog-положительные колонии иПСК (красный), окраска ядер DAPI (синий). *в* — Микрофотографии колоний иПСК в проходящем свете, Nanog-положительных (красный), полученных в среде 2iL (слева) и iCD1 (справа). Окраска ядер DAPI (синий). Масштабная линейка: 1000 мкм.

вали PBS и в течение 10 мин, фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида (Sigma, США) в PBS. Далее клетки промывали PBS и пермеабелизировали 0.1%-ным раствором Triton X-100 (Amresco, США) в PBS в течение 15 мин, после чего снова промывали PBS. Центры неспецифического связывания антигенов блокировали 3%-ным раствором BSA (Amresco, США) в PBSt (PBS с добавлением 0.1% Tween 20 (Amresco, США)) при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего клетки снова промывали PBSt и инкубировали с первичными антителами к маркеру плюрипотентности Nanog (1:500, Bethyl, США) в течение ночи при 4 °С. В качестве вторичных антител использовали козы антигена против кролика, конъюгированные с флуоресцентным агентом Alexa Fluor® 647 (1:500, Jackson ImmunoResearch Laboratories, США). Ядра клеток окрашивали раствором DAPI (Sigma, США) в концентрации 0.5 мкг/мл в PBSt. Фотографии Nanog-положительных клонов и ПСК получали с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS (Thermo, США).

**Количественный и качественный анализ** клонов и ПСК проводили с помощью программы ImageJ (НИН, США) методом визуального подсчета Nanog-позитивных колоний. Полученные значения представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок.

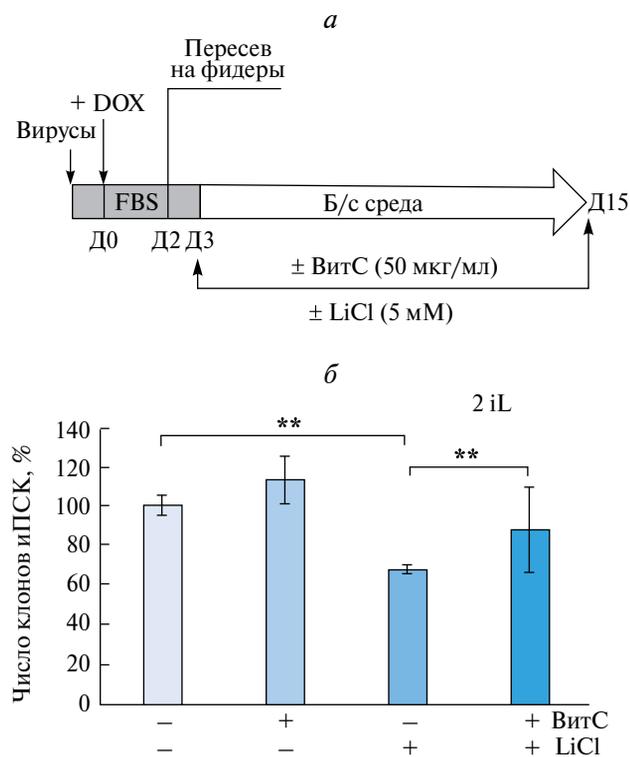
**Статистическую обработку** данных проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия полученных результатов считались статистически достоверными при уровне значимости  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы использовали полицистронный вектор, экспрессирующий полноразмерные Oct4, Klf4, Sox2 и cMyc человека (OKSM), разделенные пептидами 2A и последовательностью IRES. Этот вектор показал более высокую эффективность при генерации и ПСК, чем другой полицистронный вектор OSKM (Skvortsova et al., 2018). Важно отметить, что высокая гомология этих факторов транскрипции у млекопитающих позволяет использовать их для репрограммирования клеток как человека, так и мыши. Перед каждым экспериментом МЭФ тестировали на присутствие микоплазмы при помощи ПЦР со специфическими праймерами, поскольку, согласно нашему опыту, заражение микоплазмой отражается крайне негативно на эффективности репрограммирования. Репрограммирование проводили согласно схеме, представленной на рис. 1а.

Сначала мы сравнили эффективность репрограммирования МЭФ с использованием двух сред: стандартной среды 2iL и среды iCD1, разработанной специально для репрограммирования клеток в и ПСК при помощи кассеты из трех факторов OKS (Chen et al., 2011). Мы показали, что эффективность генерации и ПСК в классической среде 2iL и в среде iCD1 не отличается при использовании кассеты OKSM (рис. 1б). Однако колонии и ПСК, полученные при репрограммировании МЭФ в этих двух средах, немного отличались морфологически. Так, при культивировании в среде 2iL колонии начинали формироваться раньше (результаты не представлены), и в момент анализа они визуальнo имели увеличенный диаметр, бóльшую рыхлость и фрагментарность, а также более рваные края, чем в среде iCD1 (рис. 1в). В таких клонах величина сигнала от флуоресцентной метки также могла различаться на разных участках одного и того же клона, что говорило о разной плотности и/или гетерогенности клеточной популяции в пределах одной колонии (рис. 1в). Колонии и ПСК, полученные на среде iCD1, в среднем, были меньше по размеру, имели более высокую плотность клеток, выраженную округлую форму с гладкими краями и равномерно распределенную окраску на Nanog и ДНК (DAPI) в пределах одной колонии (рис. 1в).

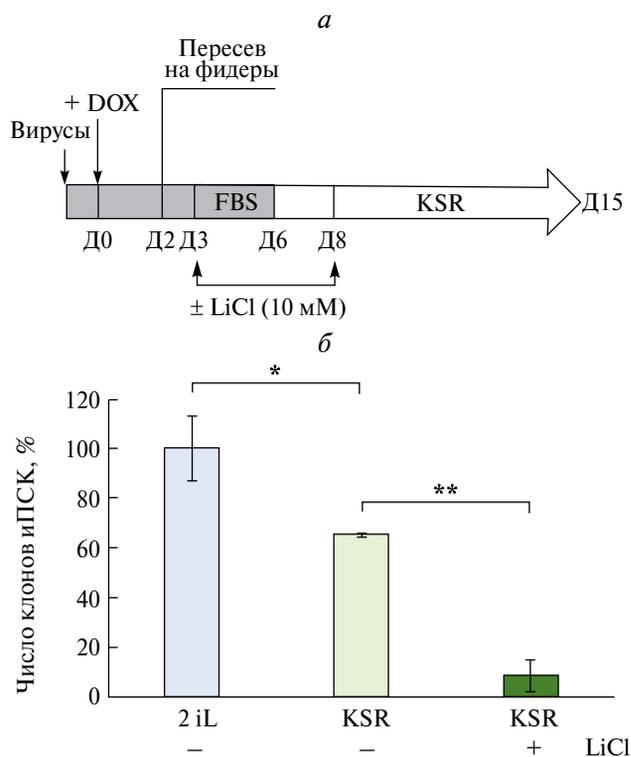
Предложенная ранее среда iCD1 (Chen et al., 2011) несколько отличается от стандартной среды 2iL, в том числе наличием в ее составе витамина С и LiCl (табл. 1). Положительный эффект от добавления этих соединений на генерацию и ПСК также был ранее показан (Esteban et al., 2010; Wang et al., 2011). Мы использовали данные компоненты для модификации стандартной среды 2iL в процессе репрограммирования МЭФ в и ПСК и показали, что присутствие витамина С (50 мкг/мл) с 3-го по 15-й день репрограммирования не оказывало статистически значимого влияния на эффективность колониеобразования и ПСК, тогда как присутствие 5 мМ LiCl оказывало ингибирующий эффект (рис. 2б). Интересно, что сочетанное воздействие витамина С и LiCl сглаживало негативный эффект LiCl на генерацию и ПСК (рис. 2б). Важно отметить, что мы обнаружили положительное влияние витамина С на репрограммирование МЭФ в условиях 2-кратного снижения числа клеток фидерного слоя (данные не представлены), что может указывать на возможное влияние витамина С на поддержание жизнеспособности фидерных клеток в процессе репрограммирования, что, в конечном счете, может оказывать положительное влияние на эффективность репрограммирования. Этот эффект можно также объяснить компенсирующим



**Рис. 2.** Присутствие LiCl с 3-го дня репрограммирования МЭФ снижает эффективность генерации клонов иПСК в среде 2iL. *а* — Схема эксперимента по репрограммированию МЭФ в иПСК в среде 2iL. Экспрессию ОКSM активировали с помощью доксицилина (DOX). Витамин С (ВитС) в концентрации 50 мкг/мл и (или) 5 мМ LiCl добавляли начиная с 3-го дня репрограммирования (Д3) и до конца эксперимента (Д15). *б* — На диаграмме представлено процентное содержание Nanog-положительных клонов на 15-й день репрограммирования. Данные представлены в виде средних значений и стандартного отклонения ( $n = 3$ ), \*\* — достоверные отличия по сравнению со средой 2iL ( $p < 0.01$ ).

недостаток фидерных клеток влиянием витамина С и на сами репрограммирующиеся МЭФ.

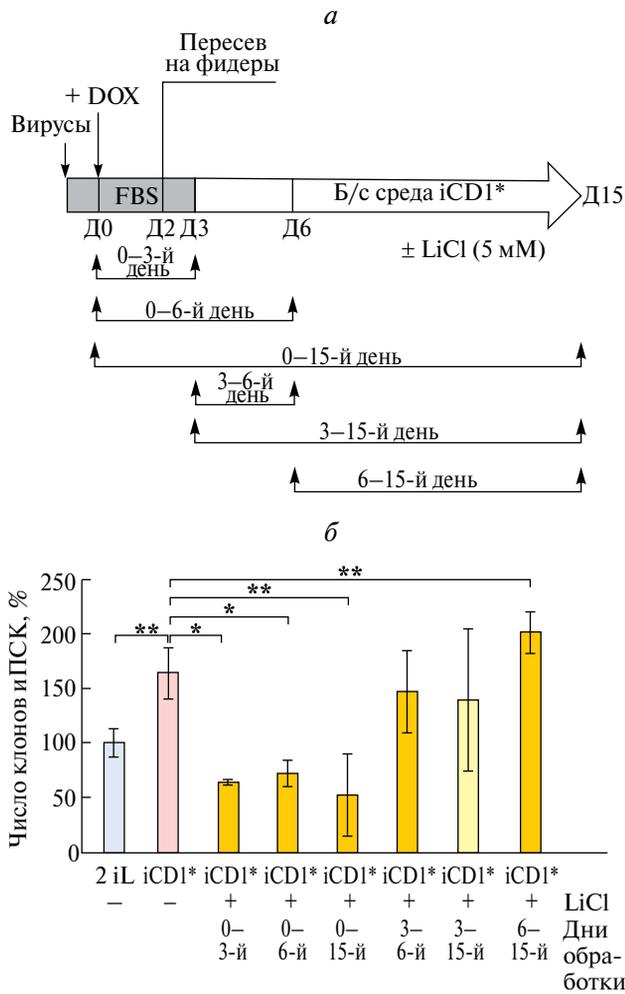
Далее, поскольку вместо ожидаемого эффекта от присутствия LiCl на количество получаемых клонов иПСК наблюдали его ингибирующее влияние, мы проверили влияние LiCl на эффективность репрограммирования МЭФ в иПСК, проводимое согласно описанному ранее протоколу (Wang et al., 2011). Согласно данному протоколу, МЭФ заражали вирусами, кодирующими мышинные факторы Oct4, Sox2, Klf4 и с-Мус, а репрограммирование проводили в среде с сывороткой, которую заменяли на шестой день (Д6) на среду, содержащую вместо сыворотки ее заменитель KSR (KnockOut™ Serum Replacement, Thermo, США). Согласно протоколу, 10 мМ LiCl добавляли с 3-го по 8-й день репрограммирования (рис. 3а). Во-первых, важно отметить, что



**Рис. 3.** Присутствие LiCl снижает эффективность генерации клонов иПСК из МЭФ в среде с заменителем сыворотки (KSR). *а* — Схема эксперимента по репрограммированию МЭФ в иПСК в среде с заменителем сыворотки (KSR). Экспрессию ОКSM активировали с помощью доксицилина (DOX). 10 мМ LiCl добавляли в период с 3-го (Д3) по 8-й день (Д8) репрограммирования. Смену среды с сывороткой на среду с KSR производили с 6-го дня репрограммирования (Д6). *б* — На диаграмме представлено процентное содержание Nanog-положительных клонов на 15-й день репрограммирования. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 3$ ). Звездочками обозначены достоверные различия между группами (\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ).

репрограммирование в среде с KSR была заметно ниже, чем в стандартной среде 2iL. Во-вторых, мы обнаружили, что LiCl оказывал негативное влияние на эффективность формирования колоний иПСК в среде KSR (рис. 3б).

Следующей задачей стало изучение роли LiCl в составе среды iCD1 на разных этапах репрограммирования. Для этого мы использовали iCD1 без LiCl (iCD1\*), в которую добавляли LiCl в разные периоды репрограммирования (рис. 4). Интересно, что в iCD1\* формировалось большее число колоний иПСК чем в iCD1 или стандартной среде 2iL (рис. 4б), в то время как репрограммирование в средах 2iL и iCD1 не отличалось по эффективности (рис. 1б). Это означало, что LiCl оказывает негативный эффект



**Рис. 4.** Присутствие LiCl МЭФ с начала репрограммирования снижает эффективность генерации клонов иПСК в среде iCD1\*, но увеличивает с 6-го дня репрограммирования. *а* — Схема эксперимента по репрограммированию МЭФ в иПСК в среде iCD1\*. Экспрессию OKSM активировали с помощью доксициклина (DOX). 5 мМ LiCl добавляли в разные периоды репрограммирования. Смену среды с сывороткой на бессывороточную производили на 3-й день репрограммирования (Д3). *б* — На диаграмме представлено процентное содержание Nanog-положительных клонов на 15-й день репрограммирования. Данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений ( $n = 3$ ). Звездочками обозначены достоверные отличия по сравнению со средой iCD1\* (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

на колониеобразование иПСК при его добавлении с 3 дня репрограммирования.

Репрограммирование — это сложный процесс, который принято разделять на три фазы: инициация, созревание и стабилизация (David, Polo, 2014). Мы проверили, какое влияние оказывает присутствие LiCl на разных этапах репрограммирования. Для этого 5 мМ LiCl добавляли в iCD1\* в различные периоды

этого процесса (рис. 4*а*). Также мы анализировали влияние LiCl при добавлении его с 3-го по 6-й день репрограммирования или до конца эксперимента, что соответствовало экспериментам в iCD1 среде (рис. 1*б*). Последний временной интервал влияния LiCl был с 6-го дня и до конца репрограммирования. Сравнительный анализ эффективности формирования иПСК колоний в этих экспериментах мы проводили относительно iCD1\* среды. Как оказалось, добавление LiCl с момента активации экспрессии кассеты OKSM оказывало сильный ингибирующий эффект на формирование клонов иПСК независимо от того, присутствовал LiCl лишь в течение первых трех дней или на протяжении всего срока репрограммирования (рис. 4*б*). Это означало негативное влияние LiCl на фазе инициации репрограммирования. При этом присутствии LiCl в среде начиная с 3-го дня репрограммирования не оказывало никакого влияния на эффективность генерации клонов иПСК. Более того, начиная с 6-го дня, т. е. в фазе созревания, наблюдалось положительное влияние LiCl на конечный итог репрограммирования. При этом в среде 2iL влияние LiCl было негативным во всех временных промежутках (данные не представлены).

Известно, что Li ингибирует киназу GSK3 $\beta$  (Jope, 2003), а ингибиторы GSK3 $\beta$  поддерживают плюрипотентное состояние ЭСК посредством активации передачи сигналов Wnt-сигналинга (Sato et al., 2004). Показано, что передача сигналов Wnt также оказывает значимое влияние на фазу созревания иПСК, поскольку экзогенная стимуляция пути Wnt между 6-м и 9-м днями после индукции репрограммирования усиливала образование Nanog-положительных колоний (Ho et al., 2013). Поэтому неудивительно, что выраженный положительный эффект LiCl проявлялся лишь с 6-го дня после инициации репрограммирования.

С другой стороны, в недавней работе была показана роль LiCl в усилении митохондриального дыхания в нейрональных клетках-предшественниках, полученных из иПСК (Osete et al., 2021). Известно, что во время репрограммирования соматических клеток в иПСК происходят существенные изменения в клеточном метаболизме и окислительно-восстановительной передаче сигналов (David, Polo, 2014). Двойственный механизм действия митохондриальных активных форм кислорода при репрограммировании был описан (Skvortsova et al., 2022). Поэтому влияние LiCl может приводить к дисбалансу уровней митохондриальных активных форм в клетках на ранней стадии репрограммирования и, тем самым, ингибировать образование иПСК.

В заключение, следует отметить, что в силу сложности и многофакторности процесса репрограммирования пока не существует универсальных протоколов культивирования клеток в течение всего процесса. Каждый эксперимент требует начальной оптимизации условий культивирования клеток для повышения количества и качества получаемых колоний и ПСК.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00390). Получение первичной культуры МЭФ проводилось при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-29-04117).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордеев М. Н., Бахмет Е. И., Томилин А. Н. 2021. Динамика плюрипотентности в эмбриогенезе и в культуре. Онтогенез. V. 52. P. 429. (Gordeev M. N., Bakhmet E. I., Tomilin A. N. 2021. Pluripotency dynamics during embryogenesis and in cell culture. Russ. J. Dev. Biol. V. 52. P. 379.)
- Carey B. W., Markoulaki S., Hanna J., Saha K., Gao Q., Mitalipova M., Jaenisch R. 2009. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. Proc. Natl. Acad. Sci. V. 106. P. 157.
- Chen J., Liu J., Chen Y., Yang J., Chen J., Liu H., Zhao X., Mo K., Song H., Guo L. 2011. Rational optimization of reprogramming culture conditions for the generation of induced pluripotent stem cells with ultra-high efficiency and fast kinetics. Cell Res. V. 21. P. 884.
- David L., Polo J. M. 2014. Phases of reprogramming. Stem Cell Res. V. 12. P. 754.
- Durkin M. E., Qian X., Popescu N. C., Lowy D. R. 2013. Isolation of mouse embryo fibroblasts. Bio-protocol. V. 3. P. e908.
- Esteban M. A., Wang T., Qin B., Yang J., Qin D., Cai J., Li W., Weng Z., Chen J., Ni S. 2010. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. V. 6. P. 71.
- Evans M. J., Kaufman M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. V. 292. P. 154.
- Guan J., Wang G., Wang J., Zhang Z., Fu Y., Cheng L., Meng G., Lyu Y., Zhu J., Li Y. 2022. Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells. Nature. V. 605. P. 325.
- Ho R., Papp B., Hoffman J. A., Merrill B. J., Plath K. 2013. Stage-specific regulation of reprogramming to induced pluripotent stem cells by Wnt signaling and T cell factor proteins. Cell Rep. V. 3. P. 2113. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.015>
- Hong K. 2015. Cellular reprogramming and its application in regenerative medicine. Tiss. Eng. Regen. Med. V. 12. P. 80.
- Hou P., Li Y., Zhang X., Liu C., Guan J., Li H., Zhao T., Ye J., Yang W., Liu K. 2013. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. Science. V. 341. P. 651.
- Jope R. S. 2003. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. Trends Pharm. Sci. V. 24. P. 441.
- Niwa H., Ogawa K., Shimosato D., Adachi K. 2009. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. Nature. V. 460. P. 118.
- Okada M., Oka M., Yoneda Y. 2010. Effective culture conditions for the induction of pluripotent stem cells. Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subjects. V. 1800. P. 956.
- Osete J. R., Akkouch I. A., de Assis D. R., Szabo A., Frei E., Hughes T., Smeland O. B., Steen N. E., Andreassen O. A., Djurovic S. 2021. Lithium increases mitochondrial respiration in iPSC-derived neural precursor cells from lithium responders. Mol. Psych. V. 26. P. 6789.
- Sato N., Meijer L., Skaltsounis L., Greengard P., Brivanlou A. H. 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. Nat. Med. V. 10. P. 55.
- Skvortsova E. V., Nazarov I. B., Tomilin A. N., Sinenko S. A. 2022. Dual mode of mitochondrial ROS action during reprogramming to pluripotency. Int. J. Mol. Sci. V. 23: 10924.
- Skvortsova E. V., Sinenko S. A., Tomilin A. N. 2018. Immortalized murine fibroblast cell lines are refractory to reprogramming to pluripotent state. Oncotarget. V. 9: 35241.
- Somers A., Jean J.-C., Sommer C. A., Omari A., Ford C. C., Mills J. A., Ying L., Sommer A. G., Jean J. M., Smith B. W. 2010. Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. Stem Cells. V. 28. P. 1728.
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. V. 126. P. 663.
- Wang Q., Xu X., Li J., Liu J., Gu H., Zhang R., Chen J., Kuang Y., Fei J., Jiang C. 2011. Lithium, an anti-psychotic drug, greatly enhances the generation of induced pluripotent stem cells. Cell Res. V. 21. P. 1424.
- Wiznerowicz M., Trono D. 2003. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. J. Virol. V. 77. P. 8957.
- Yamanaka S. 2020. Pluripotent stem cell-based cell therapy — promise and challenges. Cell Stem Cell. V. 27. P. 523.
- Ying Q.-L., Wray J., Nichols J., Battle-Morera L., Doble B., Woodgett J., Cohen P., Smith A. 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. Nature. V. 453. P. 519.

## THE DUAL EFFECT OF LITHIUM CHLORIDE ON THE EFFICIENCY OF GENERATING MOUSE-INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

A. V. Kuznetsov<sup>a</sup>, E. V. Skvortsova<sup>a</sup>, A. N. Tomilin<sup>a</sup>, A. S. Tsimokha<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: atsimokha@incras.ru*

Somatic cells can be reprogrammed into induced pluripotent stem cells (iPSCs) using certain factors. The low efficiency of the reprogramming, as well as the heterogeneity of iPSCs, limits the potential application for iPSCs in cell therapy. Here, we show that lithium chloride (LiCl), a known activator of the Wnt signaling pathway, reduces or enhances the efficiency of iPSC generation from mouse embryonic fibroblasts (MEFs) depending on the timing of its addition during the reprogramming. Our results not only demonstrate a method to improve the efficiency of iPSC formation by LiCl, but also indicate its dual role in this process.

**Keywords:** induced pluripotent stem cells (iPSCs), LiCl, embryonic fibroblasts (MEF), reprogramming, vitamin C

УДК 576.385

## СОЗДАНИЕ МОДЕЛЬНОЙ ЛИНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК С ИНДУЦИРУЕМОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ АДЕНОВИРУСНОГО E1A ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЕГО АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫХ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *IN VITRO* И *IN VIVO*

© 2024 г. А. В. Моршнева<sup>1</sup>, А. М. Козлова<sup>1</sup>, О. О. Гнедина<sup>1</sup>, М. В. Игotti<sup>1</sup>, \*

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

\*E-mail: marie.igotti@gmail.com

Поступила в редакцию 23.11.2023

После доработки 12.12.2023

Принята к публикации 13.12.2023

В последние десятилетия генная терапия на основе аденовирусного E1A доказала свою эффективность в отношении ряда опухолевых заболеваний, как на животных моделях, так и в клинических исследованиях. Показано, что помимо собственной антипролиферативной активности, E1A также обладает способностью усиливать цитотоксический эффект некоторых противоопухолевых препаратов. Применение E1A в комбинированной терапии может решить ряд проблем клинической онкологии, среди которых наиболее актуальными являются проблема устойчивости или невосприимчивости опухолевых клеток к цитотоксическому воздействию. В настоящей работе описано создание клеточных моделей с индуцируемой антибиотиком доксициклином экспрессией белка аденовирусного E1A на основе клеток колоректального рака человека HCT116 и цисплатин-устойчивых клеток HCT116/C. Нами показана концентрационная и временная зависимость экспрессии белка E1A от доксициклина, а также показан антипролиферативный эффект аденовирусного E1A при индукции его экспрессии в полученных клетках HCT116-E1A и HCT116/C-E1A *in vitro* в экспериментах по оценке жизнеспособности в тестах МТТ и клоногенной активности, а также и *in vivo* в ксенорафтных мышинных моделях. Таким образом, в результате нашей работы была создана модель для анализа антипролиферативных и сенсibiliзирующих свойств E1A в чувствительных и платино-устойчивых клетках колоректального рака и поиска новых подходов противораковой терапии *in vitro* и *in vivo*. Полученная клеточная линия является удобной моделью для подбора наиболее перспективных сочетаний цитостатиков с генной терапией на основе E1A.

**Ключевые слова:** аденовирусный E1A, аденовирус, колоректальный рак, модельная клеточная линия, антипролиферативный эффект, сенсibilизация опухолевых клеток

DOI: 10.31857/S0041377124030041, EDN: PELLCN

Ранняя область *Ia* аденовируса человека (adenovirus early region *Ia*, *eIa*) представляет собой ген, который экспрессируется первым во время репликации аденовируса. Генетическая информация аденовируса кодируется двухцепочечной линейной молекулой ДНК. Примерно через 1 ч после вирусной инфекции запускается транскрипция аденовирусного генома с образованием первичного продукта гена *eIa*. В результате альтернативного сплайсинга, при котором части экзонов или интронов дифференциально соединяются или пропускаются, транскрибируется пять продуктов с коэффициентами седиментации 13S, 12S, 11S, 10S и 9S, каждый из которых кодирует разные белки с различным количеством аминокислотных остатков 289R, 243R, 217R, 171R, 55R соответственно (Radko et al., 2015). Белки 289R и 243R являются основными продуктами, кодируемыми *eIa* Ad5. Эти

два белка имеют почти одинаковые внутренние последовательности, за исключением 46 внутренних аминокислот, уникальных для белка 289R.

Кодируемые геном *eIa* белки функционально важны для репликации аденовируса. Аденовирус обычно инфицирует терминально дифференцированные эпителиальные клетки, что создает для вируса проблему репликации его ДНК. В дифференцированных клетках, таких как эпителиальные, недостаточно условий для репликации вирусного генома. В частности, не хватает пула дезоксирибонуклеотидов и вспомогательных факторов, необходимых для репликации (Hofer et al., 2012). ДНК-вирусы способны преодолевать это ограничение благодаря сформированной стратегии перевода клеток в S-фазу клеточного цикла, в которой есть все условия для репликации вируса (Hofer et al., 2012).

Белок E1A раннего района аденовируса является определяющим фактором, ответственным за перевод дифференцированных клеток в S-фазу после инфекции (Pelka et al., 2008). E1A дерегулирует клеточный цикл и способствует входу в S-фазу, связывая и инактивируя ключевой регулятор выхода из фазы G<sub>1</sub> клеточного цикла белок pRb и родственные ему белки p130 и p107, высвобождая транскрипционный фактор E2F (Ikeda, Nevins, 1993; Tiainen et al., 1996). E1A также способен взаимодействовать с белковым комплексом E2F/DP, активируя E2F-зависимые промоторы (Pelka et al., 2011). E1A-зависимый переход покоящихся клеток в S-фазу также связывают с p300-зависимой индукцией протоонкогена c-myc (Baluchamy et al., 2007; Singhal et al., 2013). Экспрессия E1A в результате инфекции аденовирусом покоящихся клеток приводит к возобновлению репликации клеточной ДНК, которая, однако, идет с нарушениями, в результате чего активируется клеточный ответ на повреждения ДНК (DNA damage response, DDR) (Singhal et al., 2013). Помимо индукции клеточного цикла и перехода клеток в S-фазу, E1A также вовлечен в регуляцию транскрипции с других вирусных промоторов, в подавление ранних этапов иммунного ответа, а именно компонентов врожденного иммунитета, участвующих в ответе на аденовирусную инфекцию, за счет снижения экспрессии IFN $\alpha$  (Cook, Routes, 2005; Hendrickx et al., 2014; Zemke et al., 2023) и инактивации иммунопротеасом (Berhane et al., 2011), а также в перепрограммирование клетки для более эффективной репродукции вируса (Marthaler et al., 2016; Mendoza et al., 2023).

Несмотря на участие аденовируса в кооперации с другими ранними генами в избегании иммунного ответа, экспрессия E1A (по многочисленным данным) приводит к увеличению чувствительности клеток к цитотоксическому воздействию компонентов клеточного иммунного ответа хозяина. Такое противоречие во влиянии E1A на иммунную систему объясняется E1A-зависимым ингибированием интерферон-активируемого сигнального пути, реализуемого как часть иммуносупрессирующего действия аденовируса, но в то же время приводящего к отмене у инфицированных клеток устойчивости к иммунному лизису (Cook, Routes, 2005). В контексте генной терапии рака эти данные представляют особый интерес, поскольку дополнительная стимуляция противоопухолевого иммунного ответа и селективный лизис опухолевых клеток являются несомненным преимуществом в терапии, тогда как иммуносупрессия, вызванная вирусом, не является желательным эффектом. Кроме того, на фоне

экспрессии E1A усиливается действие стимулов, индуцирующих апоптоз, таких как факторы TNF, химиотерапевтические агенты и окислительный стресс (Radke, Cook, 2018).

Показаны онкосупрессорные свойства E1A в самых разных типах опухолевых клеток человека: карциноме, фибросаркоме и меланоме (Frisch et al., 1990; Frisch, Dolter, 1995), что удивительно, принимая во внимание разнообразие генетических изменений в этих типах опухолей. Среди возможных E1A-опосредованных механизмов, подавляющих развитие опухоли, выделяют репрессию транскрипции протоонкогена HER-2/neu (Yu et al., 1993; Chang et al., 1997; Hung et al., 2002), сенсбилизацию клеток к такому виду клеточной гибели как апоптоз (Frisch, 1994), подавление метастатического потенциала (Bernhard et al., 1995), снижение васкуляризации опухоли (Saito et al., 2006), повышение чувствительности к фактору некроза опухоли (Shisler et al., 1996; Deng et al., 2002), а также индукцию апоптоза (Rao et al., 1992; White, 1993; Deng et al., 2002).

Несмотря на участие в широком спектре клеточных процессов и изменении клеточной транскрипции в глобальном масштабе (Ferrari et al., 2012), E1A не обладает ДНК-связывающей способностью (Pelka et al., 2008). Вместо этого E1A связывается с разнообразными клеточными белками, изменяя их активность или локализацию (Pelka et al., 2008). Взаимодействие E1A с белками ремоделирования хроматина, такими как CBP/p300 и p400, также считается необходимым для функции E1A (Chakraborty, Tansey, 2009; Singhal et al., 2013).

Экспрессия аденовирусного E1A повышает чувствительность ряда опухолевых клеток млекопитающих к действию цитотоксических агентов, используемых в противоопухолевой терапии, таких, как этопозид, паклитаксел, цисплатин, таксаны и др. (Sánchez-Prieto et al., 1996; Liao et al., 2004; Chang et al., 2014). При этом подобной сенсбилизации не обнаруживалось в нормальных клетках (Sunamura et al., 2002; Yamaguchi et al., 2010). В связи с этим для исследователей представляет интерес изучение возможности использования аденовирусного E1A в комбинированной терапии опухолей с целью снижения концентраций используемых терапевтических препаратов для устранения побочных эффектов, а также для возможного использования E1A для лечения опухолей, которые приобрели устойчивость к препаратам в ходе терапии.

В представленной работе описано получение модельных линий клеток колоректального рака человека, чувствительных и устойчивых к цисплатину,

с индуцируемой экспрессией аденовирусного E1A. Предложенная нами модель является удобным подходом для изучения способностей аденовирусного E1A оказывать антипролиферативное и (или) сенсибилизирующее к действию цитостатиков влияние на опухолевые клетки. В нашей модели накопление аденовирусного белка E1A индуцируется в клетках добавлением антибиотика доксицилина, одобренного в США FDA (Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) и Росздравнадзором в Российской Федерации (Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития). Такая модель избавляет исследователей от решения проблемы доставки E1A в клетки-мишени как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, в работе приведены результаты использования полученных модельных клеточных линий в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, доказывающих антипролиферативную способность аденовирусного E1A в отношении опухолевых клеток.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Конструирование вектора Tight-E1A.** Фрагмент аденовируса, кодирующий E1A, был амплифицирован с использованием праймеров, включающих сайты для эндонуклеаз BamHI и EcoRI (F-grE1-ggtgatccTTGAGTGCCAGCGAGTAG, R-grE1-gctgaattcCAAACTCCCAAGCCTC), с помощью высокоточной ДНК-полимеразы для синтеза крупных фрагментов ДНК (Encyclo, Евроген, Россия). В качестве матрицы была использована плазмидная ДНК p1A, которая содержит последовательность генома аденовируса 5-го типа (1—1834 н. п.) (Whyte et al., 1988). Очистку амплифицированного фрагмента раннего района аденовируса E1A (E1A-AФ) от матрицы и праймеров осуществляли при электрофоретическом разделении в геле из легкоплавкой агарозы. Фрагмент геля, содержащий синтезированный участок E1A-AФ, процессировали в соответствии с инструкцией фирмы производителя для экстракции ДНК из геля (Cleanup Mini для очистки ДНК из геля, Евроген, Россия).

Очищенный амплифицированный фрагмент ДНК, кодирующий E1A, последовательно обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BamHI и EcoRI (SibEnzyme, Россия) в течение 1 ч при 37°C для формирования “липких” концов, удобных для последующего лигирования в вектор pLVX-Tight-Puro, который также последовательно обрабатывали BamHI и EcoRI. Для того чтобы исключить самолигирование,

обработанные рестриктазами амплифицированный фрагмент ДНК E1A-AФ и pLVX-Tight-Puro отделяли от вырезанных рестриктазами фрагментов электрофоретически в геле из легкоплавкой агарозы. После очистки лигированный акцепторный вектор pLVX-Tight-Puro лигировали с фрагментом E1A-AФ при 16°C в течение 2 ч. Лигазная смесь объемом 10 мкл содержала 200 ед. T4-лигазы (SibEnzym, Россия), 1-кратный буфер для лигазы (SibEnzym, Россия), 50 нг вектора и 55 нг вставки. Количество вставки для лигирования (X, нг) вычисляли по формуле:

$$X = (10 \times Y \times L \times Y) / L,$$

где Y — количество вектора (нг), L — длина вставки (пары оснований). По истечении времени лигирования лигазной смесью (3 мкл) трансформировали 50 мкл компетентных клеток бактерий *Escherichia coli* штамма Stable3, специально разработанного для амплификации крупных лентивирусных векторов. Трансформированные клетки селектировали на ампициллине, отобранные клоны анализировали на наличие в них E1A-экспрессирующего вектора Tight-E1A методом рестрикционного анализа, ПЦР с праймерами к E1A, а также при секвенировании (Евроген, Россия).

**Паковка вирусов и получение стабильных клонов.** Лентивирусные векторы Tet-ON системы Tight-E1A (10 мкг), кодирующий аденовирусный E1A под контролем Tet-оператора, или вектор p-LVX-Tet-On-Advanced (10 мкг), кодирующий рекомбинантный фактор транскрипции rtTA, котрансфицировали с помощью кальций-фосфатной трансфекции в течение 16 ч в клетки линии HEK293FT (для сборки вирусных частиц в чашках 10 см) с двумя упаковочными плазмидами — psPAX2, 2 мкг (#12260, Addgene, США) и pMD2.G, 2 мкг (#12259, Addgene, США), экспрессирующими оболочку лентивируса. Культуральную среду, содержащую вирусные частицы, собирали трижды через каждые 24 ч. Вирусы из среды осаждали центрифугированием при 47 000 об/мин в течение 2 ч при 4°C и использовали для трансдукции целевых клеточных линий (HCT116 или HCT116/C) с последующим отбором клонов, в которые произошло встраивание конструкции с индуцируемой экспрессией E1A, на селектирующей антибиотике. Инфицированные Tight-E1A клетки селектировали на среде с 15 мкг/мл пурамицина, а после инфицирования p-LVX-Tet-On-Advanced на гигромицине В (100 мкг/мл) для получения клеточных линий с индуцибельной экспрессией E1A (HCT116-E1A или HCT116/C-E1A).

**Клеточные линии и воздействия.** В работе использовали клетки линии колоректальной карциномы человека НСТ116 («ПраймБиоМед», Россия). Клетки культивировали в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), содержащей 10 % FCS (fetal calf serum) и гентамицин, при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>. Для индукции экспрессии гена аденовируса *e1a* клетки обрабатывали доксициклином (аптечный препарат) в концентрации 0.5–1 мкг/мл на протяжении 24–72 ч для анализа жизнеспособности или до 14 сут для анализа образования колоний.

**Клоногенный анализ.** Для анализа образования колоний клетки рассеивали на 12-луночные планшеты по 400 клеток на лунку. Через 1 сут после посева в части клеток добавляли доксициклин в концентрации 1 мкг/мл для индукции экспрессии *e1a*. Через 14 сут, когда сформированные вокруг единичных клеток колонии определялись невооруженным глазом, их фиксировали в охлажденном 100 %-ном метаноле в течение 10 мин на холоде, окрашивали в течение 10 мин в 0.5 %-ном растворе кристаллического фioletового, приготовленного в 25 %-ном метаноле, отмывали водой и фотографировали. Число окрашенных колоний считали и сравнивали с необработанным контролем. Анализировали изображения с помощью программного продукта Image J (1.51d; Bethesda, MD, USA).

**Оценка жизнеспособности клеток.** Использовали тест МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид). Для этого клетки рассеивали на 96-луночные планшеты в плотности  $15 \times 10^3$  клеток на ячейку и культивировали в присутствии или отсутствие доксициклина (0.5–1 мкг/мл) в течение 24–72 ч. Жизнеспособность определяли спектрофотометрически, оценивая метаболическую активность клеток по способности восстанавливать МТТ (Sigma, США) до нерастворимого формазана, который имеет пурпурное окрашивание. Клетки инкубировали в растворе МТТ в конечной концентрации 0.5 мг/мл, приготовленном на PBS, 1.5 ч при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, после чего культуральную среду удаляли, а клетки лизировали в ДМСО. Определяли оптическую плотность в каждой лунке при длине волны 570 нм на приборе Multiskan-EX (Thermo Electron, Германия), используя ДМСО в качестве отрицательного контроля.

**Эксперимент *in vivo*.** Ксенотрансплантаты выращивали после подкожной инъекции  $2 \times 10^6$  клеток НСТ116-E1A в 0.1 мл среды, смешанной в пропорции 1:1 с матригелем (ABW, Китай), в среднюю дорсальную область спины самцов иммунодефицитных мышей Balb/c-NUDE в возрасте 8 нед. Мышей со-

держали в пластиковых клетках по четыре мыши на клетку в условиях 12-часового цикла свет/темнота со свободным доступом к пище и воде и поддержания постоянной температуры и влажности. Мыши получали стандартную диету из облученных кормов (ЗАО Тосненский комбикормовый завод, Россия). После инокуляции животных делили на две группы, которые получали питьевую воду без ограничения. Одна группа получала воду, содержащую 2 мг/мл доксициклина, вторая — воду без доксициклина. Смену воды производили через день в связи с относительной нестабильностью доксициклина в водном растворе. Измерения объемов опухолей производили каждые 3 сут. Использовали электронный штангенциркуль, определяя наибольшие диаметры: продольный (длину  $L$ ) и поперечный (ширину  $S$ ). Объем опухоли  $V$  вычисляли по формуле  $V = \pi / 6 \times (L \times S \times S)$ . Когда объем опухоли превышал 800 мм<sup>3</sup>, мышей умерщвляли по этическим соображениям. Из крупных органов и опухолей брали биопсии, из которых выделяли белки для дальнейшего вестерн-блот-анализа.

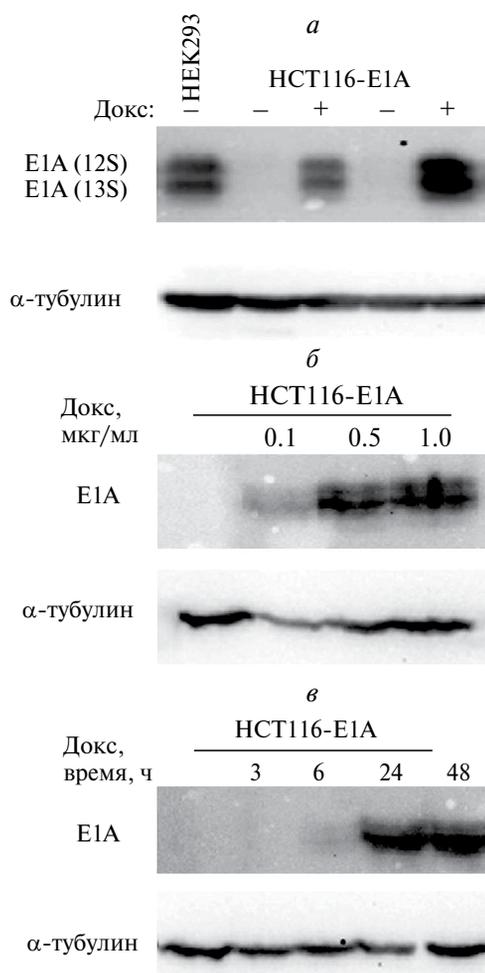
**Вестерн-блот-анализ.** Из культур клеток и препаратов биопсий опухолей и тканей получали экстракты, инкубируя клетки и препараты в течение 20 мин при 4 °C в PBS, содержащем 1 % NP-40, 0.5 % дезоксихолата натрия, 0.1 % додецилсульфата натрия (SDS), ингибиторы протеаз, фосфатаз и 1 mM PMSF. Клеточные экстракты (20 мкг) прогревали в буфере для проб (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2 % SDS, 10 % глицерина, 5 % β-меркаптоэтанола, 0.01 % бромфенолового синего) при 95 °C в течение 5 мин. Белки разделяли электрофоретически в 10 %-ном полиакриламидном геле в присутствии 0.1 % SDS, переносили на мембрану PVDF (Merck Millipore, США). Мембраны блокировали в течение 1.5 ч при комнатной температуре в блокирующем буфере (5 % обезжиренного сухого молока в PBST (PBS с 0.5 % Tween 20)) и инкубировали с первичными антителами, разведенными в 1–5 %-ном BSA/PBST, в течение ночи при 4 °C. Мембраны отмывали в PBST и инкубировали 1 ч при комнатной температуре в 5 %-ном молоке на PBST, содержащем вторые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch, Великобритания). Белки на мембранах выявляли методом усиления хемилюминесценции (Thermo Sci., США) и визуализировали на PXi6 Access (Syngene, Великобритания). В работе использовали антитела к Ad-2/5 E1A (M73, sc-25; Santa Cruz Biotechnology, США), каспазе 9 (#9504) и GAPDH (14C10, #2118) (Cell Signalling, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Получение клеток с индуцируемой экспрессией аденовирусного E1A.** Для исследования влияния аденовирусного белка E1A на пролиферацию опухолевых клеток колоректального рака человека был сконструирован вектор Tight-E1A, несущий ранний район E1A аденовируса 5 типа человека (Ad5) под контролем Tet-оператора, на основе вектора pLVX-Tight-Puro. Аденовирусный E1A экспрессируется с вектора Tight-E1A при добавлении антибиотика тетрациклинового ряда доксициклина. В присутствии доксициклина трансаактиватор Tet-On специфически связывается и активирует транскрипцию с индуцибельного промотора, который контролирует экспрессию интересующего гена. Необходимость индуцированной экспрессии E1A обусловлена тем, что E1A обладает достаточно выраженными проапоптотическими свойствами, в результате чего получение постоянной E1A-экспрессирующей клеточной линии может вызвать затруднения по причине спонтанной гибели клеток. Поэтому была получена клеточная линия НСТ116-E1A, в которой базальная экспрессия E1A подавлена, а ее активация происходит только в присутствии антибиотика доксициклина (рис. 1а). На рис. 1 представлены данные вестерн-блотинга, демонстрирующие накопление белка E1A аденовируса в зависимости от концентрации индуцирующего экспрессию антибиотика доксициклина (рис. 1б) и времени его действия в клетках НСТ116-E1A (рис. 1в).

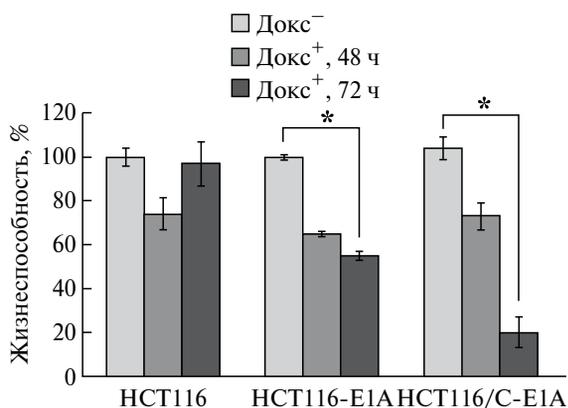
Анализ антипролиферативной способности аденовирусного E1A. Оценку влияния аденовирусного E1A на пролиферацию опухолевых клеток проводили, сравнивая жизнеспособность клеток НСТ116-E1A без экспрессии E1A или при индуцированной экспрессии E1A при добавлении доксициклина в среду культивирования, по изменению метаболической активности, определяемой по тесту МТТ и клоногенной активности.

Клетки НСТ116-E1A оставляли необработанными или обрабатывали доксициклином в концентрации 0.5–1 мкг/мл в течение 24–72 ч и проводили тест МТТ, позволяющий количественно измерить метаболическую активность клеток. Данные МТТ-анализа показывают, что при культивировании клеток НСТ116-E1A в присутствии доксициклина жизнеспособность популяции клеток снижается по сравнению с клетками, культивируемыми без доксициклина, а к 72 ч сокращается вдвое, что свидетельствует об индукции клеточной гибели (рис. 2). Еще более выраженное снижение жизнеспособности при экспрессии E1A показано для устойчивых к цисплатину клеток НСТ116/С-E1A, остаточная популяция которых



**Рис. 1.** Влияние доксициклина (Докс) на экспрессию гена *e1a* под Tet-регулируемым промотором. а — Вестерн-блот с антителами против белка аденовируса E1A экстрактов разных клонов клеток НСТ116-E1A, необработанных (–) или обработанных (+) 1 мкг/мл Докс в течение 18 ч; экстракт клеток HEK293 использовали в качестве положительного контроля к E1A-экспрессирующим клеткам. б, в — Вестерн-блоты с антителами против белка аденовируса E1A экстрактов клеток НСТ116-E1A, необработанных (–) или обработанных Докс в различных концентрациях: 0.1–1 мкг/мл в течение 18 ч (б) или 1 мкг/мл в течение различного времени (3–48 ч; в).

к 72 ч культивирования в присутствии доксициклина составляет 20% от исходной. Для того, чтобы исключить возможность токсического влияния доксициклина на клетки НСТ116, проводили тест МТТ с исходными клетками НСТ116, в которые не встраивали конструкцию с индуцируемой экспрессией E1A. Клетки НСТ116 также рассеивали и оставляли необработанными или обрабатывали доксициклином (1 мкг/мл) в течение 24–72 ч и проводили тест МТТ. Результаты показывают, что в клетках НСТ116



**Рис. 2.** Влияние доксициклина (Докс) на жизнеспособность клеток с индуцируемой экспрессией E1A (клетки HCT116-E1A и HCT116/C-E1A) и без нее (клетки HCT116).

Результаты теста МТТ представлены в виде графиков изменения оптической плотности, прямо пропорциональной жизнеспособности клеток, которую оценивали относительно контроля, принятого за 100%. Клетки оставляли необработанными (Докс<sup>-</sup>) или обрабатывали 1 мкг/мл Докс в течение 48–72 ч (Докс<sup>+</sup>). Здесь и на рис. 3, 4 представлены средние значения и их стандартные ошибки из 3–5 независимых экспериментов; сравнивали попарно значения для Докс<sup>-</sup> и Докс<sup>+</sup>, различия достоверны при  $p < 0.05$  (\*, тест Манна–Уитни).

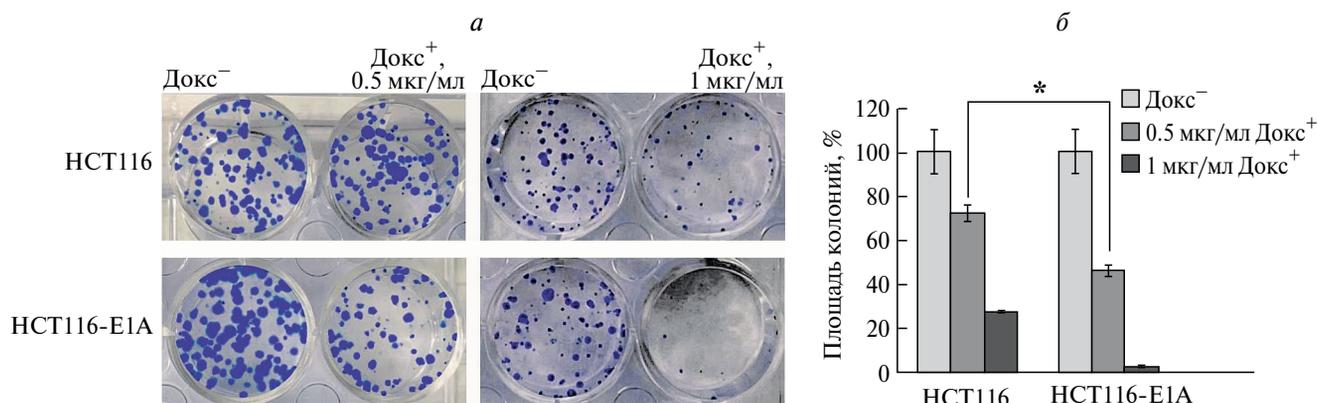
не происходит такого сильного сокращения популяции в присутствии доксициклина, как в клетках HCT116-E1A (рис. 2).

Полученные результаты свидетельствует о том, что экспрессия аденовирусного E1A приводит к сни-

жению жизнеспособности клеток колоректального рака HCT116.

Аденовирусный E1A снижает клоногенную активность клеток колоректального рака человека. Для подтверждения результатов об антипролиферативном действии E1A в клетках колоректального рака анализировали клоногенную выживаемость. Клоногенный анализ или анализ образования колоний представляет собой анализ выживания и пролиферации клеток *in vitro*, основанный на способности отдельной клетки вырастить в колонию, состоящую как минимум из 50 клеток. Анализ, по своей сути, проверяет, насколько отдельные клетки в популяции способны к «неограниченному» делению.

Для изучения влияния аденовирусного E1A на клоногенную активность опухолевых клеток, оценивали способность клеток HCT116-E1A расти в клональном посеве и образовывать колонии в отсутствие или в присутствии доксициклина. На рис. 3 представлены фотографии лунок с колониями клеток, окрашенных кристаллическим фиолетовым, а также гистограммы усредненных результатов подсчета колоний, сформированных при культивировании без или в присутствии различных концентраций доксициклина. Данные клоногенного анализа показывают, что клетки HCT116-E1A, которые культивировали без доксициклина, формировали множественные крупные колонии. Тогда как при культивировании клеток HCT116-E1A в присутствии доксициклина, индуцирующего экспрессию E1A, колонии практически не формировались, что свидетельствует о спо-



**Рис. 3.** E1A снижает клоногенную активность клеток колоректального рака. *a, в* — Фотографии чашек с клонами клеток, окрашенных кристаллическим фиолетовым. Клетки HCT116 или HCT116-E1A рассеивали в клональной плотности и оставляли для формирования колоний в течение 14 сут в отсутствие доксициклина (Докс<sup>-</sup>) или в его присутствии (Докс<sup>+</sup>) в концентрации 1 (*a*) или 0.5 (*в*) мкг/мл в среде культивирования. Клетки HCT116 использовали в качестве контроля для анализа возможного токсического влияния доксициклина. *б, г* — Диаграммы усредненных значений клоногенной активности клеток HCT116 и HCT116-E1A относительно значений контрольных необработанных клеток (Докс<sup>-</sup>), принятых за 100%.

способности аденовирусного E1A снижать выживаемость клеток колоректального рака *in vitro*.

Для того чтобы оценить влияние самого антибиотика доксициклина на клоногенную активность клеток, анализировали способность клеток НСТ116 образовывать колонии в присутствии различных концентраций доксициклина. При обработке доксициклином в концентрации 1 мкг/мл происходило сильное подавление клоногенной активности (рис. 3а, б), поэтому для уменьшения антипролиферативного эффекта доксициклина его концентрация была снижена до 0.5 мкг/мл (рис. 3в, г). Результаты показывают, что сам по себе доксициклин снижает клоногенную активность клеток НСТ116, но значительно меньше, чем в клетках НСТ116-E1A с индуцируемой экспрессией E1A, у которых клоногенная активность в присутствии 0.5 мкг/мл доксициклина снижается вдвое.

Ввиду выраженного антипролиферативного эффекта доксициклина, известного из данных литературы и подтвержденного нами, все эксперименты с использованием доксициклин-индуцируемых генно-инженерных конструкций, даже при использовании сниженных концентраций антибиотика, должны сопровождаться соответствующими контрольными данными, полученными на клеточных линиях, не несущих конструкцию. Все результаты *in vitro* экспериментов, представленных в данной работе, были проверены таким образом.

Полученные результаты показывают, что аденовирусный E1A проявляет антипролиферативную активность *in vitro* в клетках колоректального рака человека, снижая их жизнеспособность и клоногенную активность.

E1A замедляет рост опухоли в ксенографтных мышинных моделях. Влияние аденовирусного E1A на рост опухоли *in vivo* изучали на ксенографтных мышинных моделях. После подкожной инокуляции клеток колоректального рака человека НСТ116-E1A с регулируемой экспрессией E1A мышей делили на две группы. Одна группа получала с питьевой водой доксициклин для индукции экспрессии *e1a*, а вторая (контрольная) получала чистую питьевую воду. Наблюдение за животными показало отсутствие видимых побочных эффектов при внутриопухолевой экспрессии аденовирусного E1A. Реакцию животных оценивали визуально и по изменению массы тела, которая оставалась сравнимой у животных контрольной группы и группы, получавшей доксициклин для индукции *e1a*.

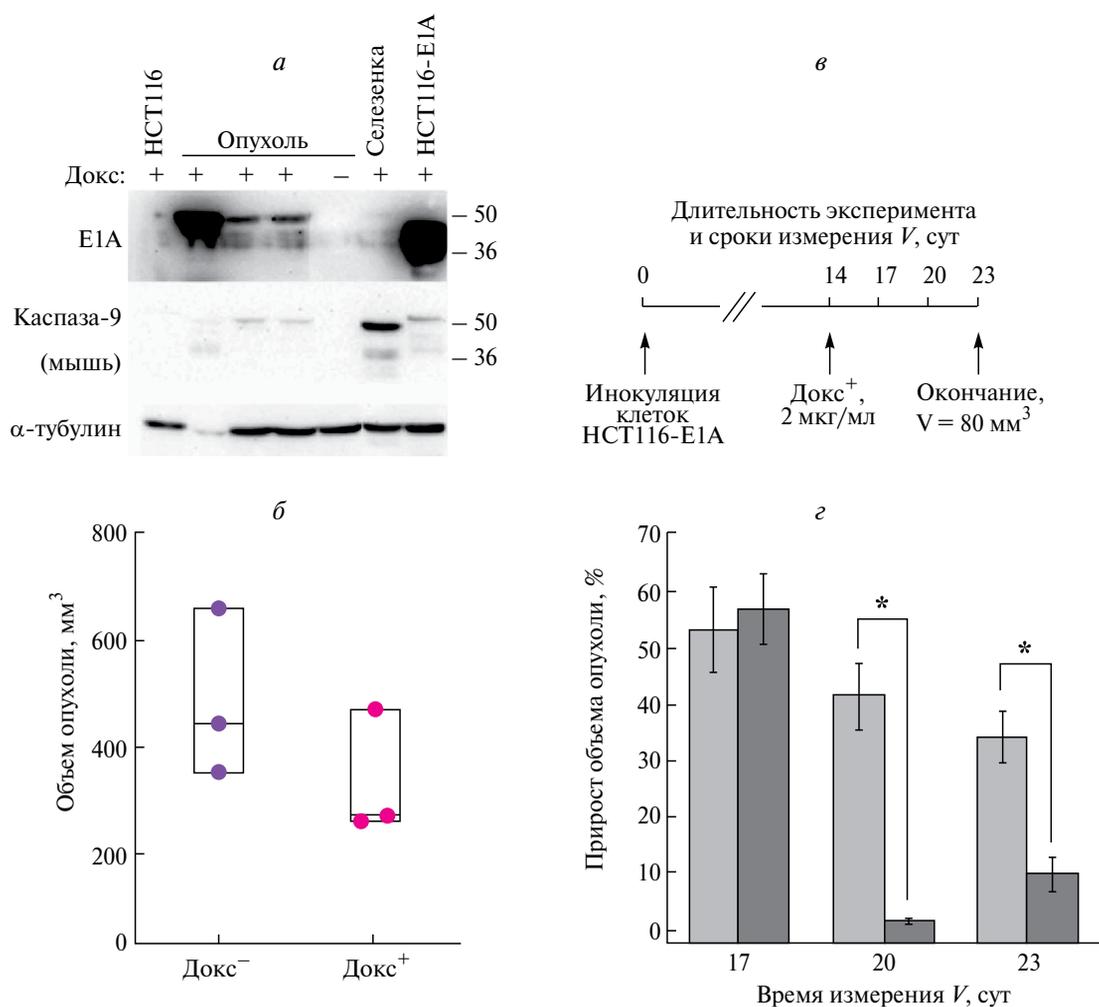
Результаты Вестерн-блот-анализа, приведенные на рисунке 4а, показывают, что у мышей, получавших с питьевой водой доксициклин, в биопсиях опухо-

лей присутствует белок E1A, тогда как в селезенке этих же животных E1A не выявляется, что говорит об отсутствии способности инокулированных клеток к метастазированию в присутствии E1A. При этом у животных, которые не получали доксициклин, E1A отсутствует в опухолевой биопсии. Визуальный анализ внутренних органов животных после эвтаназии также не показал наличия сформированных метастазов нигде в организме, опухоль имела четкую подкожную локализацию, была хорошо васкуляризована. Принимая во внимание способность E1A стимулировать переход покоящихся клеток в S-фазу клеточного цикла, можно предположить, что E1A может отменять потенциальную возможность клеток уйти в состояние покоя (дормантное). Тогда как процесс формирования метастазов подразумевает необходимость перехода клеток в состояние покоя на этапе после выхода клеток из кровотока (Gerstberger et al., 2023). Поэтому можно предположить, что при экспрессии E1A образование метастазов является маловероятным. Приведенные выше данные о влиянии E1A на клоногенную активность клеток (рис. 3) также могут служить аргументом в пользу участия E1A в снижении их метастатического потенциала.

Используя в вестерн-блотинге антитела, специфичные к белку каспазы 9 мышинного происхождения, было подтверждено, что препараты опухолевых биопсий не содержат мышинных клеток. Специфическая полоса, соответствующая каспазе 9, окрашивалась только на дорожке, нагруженной белками из селезенки экспериментального животного (рис. 4а). Для контроля нагрузки использовали антитела против белка цитоскелета альфа-тубулина, специфические в отношении белка мышцы и человека.

Через 20 сут после инокуляции измеряли объемы опухолей, сформировавшихся у экспериментальных животных. На диаграмме рисунка 4б представлен усредненный объем опухолей трех мышей каждой группы. Полученные результаты показывают разницу в скорости формирования опухоли в ксенографтных мышинных моделях в зависимости от экспрессии *e1a*. У мышей, которые не получали доксициклин, средний объем сформировавшихся опухолей превосходит средний объем опухолей мышей, которые получали доксициклин с водой. Таким образом, развитие опухоли под контролем E1A, экспрессирующегося при индукции доксициклином, происходит с меньшей скоростью, что является следствием его антипролиферативного воздействия на опухолевые клетки.

Для анализа влияния E1A на уже сформировавшуюся опухоль мышам мужского пола линии Balb/c-Nude тоже проводили подкожную инъекцию клеток



**Рис. 4.** E1A замедляет рост опухоли в ксенографтных моделях у мышей Balb/c-Nude с инокулированными клетками колоректального рака человека НСТ116-E1A. *а* — Вестерн-блот тотальных белков, выделенных из опухолей, а также из селезенки мышей, получавших с питьевой водой доксициклин (Докс<sup>+</sup>), или не получавших его (Докс<sup>-</sup>), с антителами против каспазы 9,  $\alpha$ -тубулина и E1A; в качестве позитивного контроля использованы экстракты клеток НСТ116-E1A, обработанные 1 мкг/мл Докс в течение 24 ч, в качестве негативного — экстракты клеток НСТ116 без E1A-конструкции. *б* — Диаграммы прироста объемов опухолей за 20 сут в зависимости от присутствия Докс в питьевой воде. *в* — Схема дизайна эксперимента *in vivo* показывает длительность эксперимента и в какие сроки (сут) измеряли объем опухоли V после инокуляции. *г* — Диаграммы прироста объема опухолей, выраженных в процентах от объема опухолей предыдущего измерения; светлые столбцы — прирост объема опухолей у мышей контрольной группы, которые не получали доксициклин; темные — у мышей, получавших доксициклин (2 мг/мл) с 14-х сут эксперимента.

колоректального рака человека НСТ116-E1A и давали сформироваться опухолям в течение 14 сут (схема эксперимента представлена на рис. 4*в*). После этого мышей с опухолями делили на две группы, одна из которых получала питьевую воду с доксициклином, а вторая — воду без доксициклина, и проводили измерения объемов опухолей каждые 3 сут. Эксперимент продолжали до тех пор, пока объем опухоли не достигал 800 мм<sup>3</sup>.

На рис. 4*г* представлен прирост объема опухолей в течение 10 сут с момента добавления доксициклина.

Из приведенных данных видно, что в течение первых трех суток прирост опухолей не зависит от E1A. Однако с течением времени скорость прироста контрольных опухолей остается примерно на одинаковом уровне, тогда как рост опухолей, в которых индуцирована экспрессия E1A, заметно снижается (рис. 4*г*).

Таким образом, используя полученные клетки колоректального рака с индуцируемой экспрессией аденовирусного E1A в экспериментах *in vivo*, мы продемонстрировали негативное влияние белка E1A на формирование опухолей, а также на скорость при-

роста уже сформированных опухолей в модели мышинных ксенографтов. Внутриопухолевая экспрессия аденовирусного E1A хорошо переносилась животными во время экспериментов, что подтверждает данные клинических исследований о безопасности экспрессии аденовирусного E1A в организме млекопитающего. В большинстве случаев наблюдали замедление роста опухоли, а в единичных — полную ее деградацию.

Таким образом, полученные результаты являются отправной точкой для дальнейшего изучения механизмов антипролиферативного и сенсibiliзирующего влияния E1A в опухолевых клетках и возможности использования введения E1A-экспрессирующих векторов для сдерживания роста и (или) элиминации опухоли в организме млекопитающего. Полученная генно-инженерная конструкция для индуцируемой экспрессии аденовирусного E1A в клетках является удобным и технологичным инструментом для таких исследований. В дальнейшем полученные результаты могут быть использованы для адаптации модельной системы к условиям опухоли *in vivo*. При этом используемая конструкция может быть оптимизирована с целью снижения нагрузки на нормальные ткани за счет использования опухолеспецифических промоторов для контроля экспрессии аденовирусного E1A.

Примерами опухолеспецифических промоторов являются промоторы генов белков hTERT, Sox-2, CXCR4 и VIRC5, для которых характерна сверхэкспрессия контролируемых ими генов во многих типах опухолей и отсутствие или минимальная экспрессия в нормальных тканях (Rein et al., 2004; Pleshkan et al., 2011). Большинство опухолеспецифических промоторов гораздо менее активны по сравнению с конститутивными сильными вирусными промоторами (Gu, Fang, 2003; Zhu et al., 2004; van Houdt et al., 2006; Копорка et al., 2009). В различных линиях опухолевых клеток активность промотора гена сурвивина варьирует от 0.3 до 16 % от активности промотора цитомегаловируса (CMV) (Zhu et al., 2004; Van Houdt et al., 2006), а эффективность работы промотора гена TERT, кодирующего обратную транскриптазу теломеразы, может различаться до 20 раз (Gu, Fang, 2003). Одним из подходов, позволяющих решить проблемы эффективности опухолеспецифических промоторов, является использование гибридных двойных промоторов, один из которых опухолеспецифический, тогда как другой — сильный неспецифический (Davis et al., 2006). Однако для предварительных исследований эффекта внутриклеточной экспрессии гена интереса, в нашем случае раннего района аденовируса E1A, удобно отдать предпочтение сильному промотору и пренебречь опухолеспецифичностью.

Несмотря на то, что генная терапия с использованием E1A еще не одобрена для клинического использования, полученные результаты имеют не только фундаментальное, но и потенциальное прикладное значение, так как могут быть использованы для поиска новых подходов к лечению рецидивирующих опухолей.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда № 22-25-20229 (<http://rscf.ru/project/22-25-20229/>) и Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 13 апреля 2022 г. № 05/2022.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводили в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Протокол с использованием животных был одобрен Комитетом по этике экспериментов на животных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия), протокол № 17/23 от 15 августа 2023 г.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Baluchamy S., Sankar N., Navaraj A., Moran E., Thimmapaya B.* 2007. Relationship between E1A binding to cellular proteins, c-myc activation and S-phase induction. *Oncogene*. V. 26. P. 781.
- Berhane S., Aresté C., Ablack J. N., Ryan G. B., Blackburn D. J., Mymryk J. S., Turnell A. S., Steele J. C., Grand R. J. A.* 2011. Adenovirus E1A interacts directly with, and regulates the level of expression of, the immunoproteasome component MECL1. *Virology*. V. 421. P. 149.
- Bernhard E. J., Hagner B., Wong C., Lubenski I., Muschel R. J.* 1995. The effect of E1A transfection on MMP-9 expression and metastatic potential. *Int. J. Cancer*. V. 60. P. 718.
- Chakraborty A. A., Tansey W. P.* 2009. Adenoviral E1A function through Myc. *Cancer Res*. V. 69. P. 6.
- Chang J. Y., Xia W., Shao R., Sorgi F., Hortobagyi G. N., Huang L., Hung M. C.* 1997. The tumor suppression activity of E1A in HER-2/neu-overexpressing breast cancer. *Oncogene*. V. 14. P. 561.
- Chang Y.-W., Hung M.-C., Su J.-L.* 2014. The anti-tumor activity of E1A and its implications in cancer therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. V. 62. P. 195.

- Cook J. L., Routes J. M. 2005. Adenovirus E1A gene-induced tumor cell rejection through cellular sensitization to immune and nonimmune apoptotic injuries. *Front. Biosci.-Landmark*. V. 10. P. 1396.
- Davis J. J., Wang L., Dong F., Zhang L., Guo W., Teraishi F., Xu K., Ji L., Fang B. 2006. Oncolysis and suppression of tumor growth by a GFP-expressing oncolytic adenovirus controlled by an hTERT and CMV hybrid promoter. *Cancer Gene Ther.* V. 13. P. 720.
- Deng J., Kloosterboer F., Xia W., Hung M.-C. 2002. The NH(2)-terminal and conserved region 2 domains of adenovirus E1A mediate two distinct mechanisms of tumor suppression. *Cancer Res.* V. 62. P. 346.
- Ferrari R., Su T., Li B., Bonora G., Oberai A., Chan Y., Sasidharan R., Berk A. J., Pellegrini M., Kurdistani S. K. 2012. Reorganization of the host epigenome by a viral oncogene. *Genome Res.* V. 22. P. 1212.
- Frisch S. M. 1994. E1a induces the expression of epithelial characteristics. *J. Cell Biol.* V. 127. P. 1085.
- Frisch S. M., Dolter K. E. 1995. Adenovirus E1a-mediated tumor suppression by a c-erbB-2/neu-independent mechanism. *Cancer Res.* V. 55. P. 5551.
- Frisch S. M., Reich R., Collier I. E., Genrich L. T., Martin G., Goldberg G. I. 1990. Adenovirus E1A represses protease gene expression and inhibits metastasis of human tumor cells. *Oncogene.* V. 5. P. 75.
- Gerstberger S., Jiang Q., Ganesh K. 2023. Metastasis. *Cell.* V. 186. P. 1564.
- Gu J., Fang B. 2003. Telomerase promoter-driven cancer gene therapy. *Cancer Biol. Ther.* V. 2. P. S64.
- Hendrickx R., Stichling N., Koelen J., Kuryk L., Lipiec A., Greber U. F. 2014. Innate Immunity to Adenovirus. *Hum. Gene Ther.* V. 25. P. 265.
- Hofer A., Crona M., Logan D. T., Sjöberg B.-M. 2012. DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* V. 47. P. 50.
- Hung M. C., Hortobagyi G. N., Ueno N. T. 2002. Development of clinical trial of E1A gene therapy targeting HER-2/neu-overexpressing breast and ovarian cancer. In: *Cancer gene therapy: past achievements and future challenges* (N. A. Habib, ed). NY: Springer US. pp. 171–180.
- Ikeda M. A., Nevins J. R. 1993. Identification of distinct roles for separate E1A domains in disruption of E2F complexes. *Mol. Cell. Biol.* V. 13. P. 7029.
- Konopka K., Spain C., Yen A., Overlid N., Gebremedhin S., Düzgüneş N. 2009. Correlation between the levels of survivin and survivin promoter-driven gene expression in cancer and non-cancer cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* V. 14. P. 70.
- Liao Y., Zou Y.-Y., Xia W.-Y., Hung M.-C. 2004. Enhanced paclitaxel cytotoxicity and prolonged animal survival rate by a nonviral-mediated systemic delivery of E1A gene in orthotopic xenograft human breast cancer. *Cancer Gene Ther.* V. 11. P. 594.
- Marthaler A. G., Adachi K., Tiemann U., Wu G., Sabour D., Velychko S., Kleiter I., Schöler H. R., Tapia N. 2016. Enhanced OCT4 transcriptional activity substitutes for exogenous SOX2 in cellular reprogramming. *Sci. Rep.* V. 6. P. 19415.
- Mendoza G., González-Pastor R., Sánchez J. M., Arce-Cerezo A., Quintanilla M., Moreno-Bueno G., Pujol A., Belmar-López C., de Martino A., Riu E., Rodríguez T. A., Martín-Duque P. 2023. The E1a adenoviral gene upregulates the Yamanaka factors to induce partial cellular reprogramming. *Cells.* V. 12. P. 1338.
- Pelka P., Ablack J. N. G., Fonseca G. J., Yousef A. F., Mymryk J. S. 2008. Intrinsic structural disorder in adenovirus E1A: a viral molecular hub linking multiple diverse processes. *J. Virol.* V. 82. P. 7252.
- Pelka P., Miller M., Cecchini M., Yousef A. F., Bowdish D., Dick F., Whyte P., and Mymryk J. S. 2011. Adenovirus E1A Directly Targets the E2F/DP-1 Complex. *J. Virol.* V. 85. P. 8841.
- Pleshkan V. V., V. P. V., Alekseenko I. V., V. A. I., Zinovyeva M. V., V. Z. M., Vinogradova T. V., V. V. T., Sverdlov E. D., D. S. E. 2011. Promoters with cancer cell-specific activity for melanoma gene therapy. *Acta Naturae.* V. 3. P. 13.
- Radke J. R., Cook J. L. 2018. Expression of adenoviral E1A throws the PIDD switch. *Cell Death Dis.* V. 8: e2527. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.445>
- Radko S., Jung R., Olanubi O., Pelka P. 2015. Effects of adenovirus type 5 e1a isoforms on viral replication in arrested human cells. *PLoS One.* V. 10: e0140124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140124>
- Rao L., Debbas M., Sabbatini P., Hockenbery D., Korsmeyer S., White E. 1992. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 89. P. 7742.
- Rein D. T., Breidenbach M., Nettelbeck D. M., Kawakami Y., Siegal G. P., Huh W. K., Wang M., Hemminki A., Bauerschmitz G. J., Yamamoto M., Adachi Y., Takayama K., Dall P., Curiel D. T. 2004. Evaluation of tissue-specific promoters in carcinomas of the cervix uteri. *J. Gene Med.* V. 6. P. 1281.
- Saito Y., Sunamura M., Motoi F., Abe H., Egawa S., Duda D. G., Hoshida T., Fukuyama S., Hamada H., Matsuno S. 2006. Oncolytic replication-competent adenovirus suppresses tumor angiogenesis through preserved E1A region. *Cancer Gene Ther.* V. 13. P. 242.
- Sánchez-Prieto R., Quintanilla M., Cano A., Leonart M. L., Martín P., Anaya A., Ramón y Cajal S. 1996. Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1A gene. *Oncogene.* V. 13. P. 1083.
- Shisler J., Duerksen-Hughes P., Hermiston T. M., Wold W. S., Gooding L. R. 1996. Induction of susceptibility to tumor necrosis factor by E1A is dependent on binding to either p300 or p105-Rb and induction of DNA synthesis. *J. Virol.* V. 70. P. 68.
- Singhal G., Leo E., Setty S. K. G., Pommier Y., Thimmapaya B. 2013. Adenovirus E1A oncogene induces rereplication of cellular DNA and alters DNA replication dynamics. *J. Virol.* V. 87. P. 8767.
- Sunamura M., Yatsuoka T., Motoi F., Duda D. G., Kimura M., Abe T., Yokoyama T., Inoue H., Oonuma M., Takeda K., Matsuno S. 2002. Gene therapy for pancreatic cancer based on genetic characterization of the disease. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* V. 9. P. 32.

- Tiainen M., Spitkovsky D., Jansen-Dürr P., Sacchi A., Crescenzi M. 1996. Expression of E1A in terminally differentiated muscle cells reactivates the cell cycle and suppresses tissue-specific genes by separable mechanisms. *Mol. Cell Biol.* V. 16. P. 5302.
- Van Houdt W.J., Haviv Y.S., Lu B., Wang M., Rivera A.A., Ulasov I.V., Lamfers M.L.M., Rein D., Lesniak M.S., Siegal G.P., Dirven C.M.F., Curiel D.T., Zhu Z.B. 2006. The human survivin promoter: a novel transcriptional targeting strategy for treatment of glioma. *J. Neurosurg.* V. 104. P. 583.
- White E. 1993. Regulation of apoptosis by the transforming genes of the DNA tumor virus adenovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* V. 204. P. 30.
- Whyte P., Ruley H.E., Harlow E. 1988. Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. *J. Virol.* V. 62. P. 257.
- Yamaguchi H., Chen C.-T., Chou C.-K., Pal A., Bornmann W., Hortobagyi G.N., Hung M.-C. 2010. Adenovirus 5 E1A enhances histone deacetylase inhibitors-induced apoptosis through Egr-1-mediated Bim upregulation. *Oncogene.* V. 29. P. 5619.
- Yu D., Wolf J.K., Scanlon M., Price J.E., Hung M.C. 1993. Enhanced c-erbB-2/neu expression in human ovarian cancer cells correlates with more severe malignancy that can be suppressed by E1A. *Cancer Res.* V. 53. P. 891.
- Zemke N.R., Hsu E., Barshop W.D., Sha J., Wohlschlegel J.A., Berk A.J. 2023. Adenovirus E1A binding to DCAF10 targets proteasomal degradation of RUVBL1/2 AAA+ ATPases required for quaternary assembly of multiprotein machines, innate immunity, and responses to metabolic stress. *J. Virol.* V. 97: e00993. <https://doi.org/10.1128/jvi.00993-23>
- Zhu Z.B., Makhija S.K., Lu B., Wang M., Kaliberova L., Liu B., Rivera A.A., Nettelbeck D.M., Mahasreshti P.J., Leath C.A., Yamamoto M., Alvarez R.D., Curiel D.T. 2004. Transcriptional targeting of adenoviral vector through the CXCR4 tumor-specific promoter. *Gene Ther.* V. 11. P. 645.

## CREATION OF A MODEL LINE OF TUMOR CELLS WITH INDUCIBLE EXPRESSION OF ADENOVIRAL E1A TO STUDY ITS ANTIPROLIFERATIVE AND CYTOTOXIC PROPERTIES IN VITRO AND IN VIVO

A.V. Morshneva<sup>a</sup>, A.M. Kozlova<sup>a</sup>, O.O. Gnedina<sup>a</sup>, M.V. Igotti<sup>a</sup>, \*

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

\* e-mail: marie.igotti@gmail.com

Over the past decades, gene therapy based on the adenoviral E1A has proven its benefit against a number of tumor diseases, both in animal models and in clinical studies. It has been shown that in addition to its own antiproliferative activity, E1A also has the ability to enhance the cytotoxic effect of some anticancer drugs. The use of E1A in combination therapy can solve a number of problems in clinical oncology, among which the most pressing is the problem of drug-resistance of tumor cells. This work describes the establishment of a cell model based on human colorectal cancer cells HCT116 and cisplatin-resistant HCT116/C cells with doxycycline-inducible expression of adenoviral E1A. We have shown the concentration-dependent and time-dependent dynamics of E1A expression upon doxycycline treatment, and shown the antiproliferative effect of adenoviral E1A in the HCT116-E1A and HCT116/C-E1A cells in vitro in experiments assessing viability in MTT and clonogenic activity tests and in vivo in xenograft mouse models. Thus, as a result of our work, a model was created to explore the antiproliferative and sensitizing properties of E1A in platinum-sensitive and platinum-resistant colorectal cancer cells and to search for new approaches to anticancer therapy both in vitro and in vivo. The resulting cell line is a convenient model for selecting the most promising combinations of cytostatic drugs with E1A-based gene therapy.

**Keywords:** adenoviral E1A, adenovirus, colorectal cancer, model cell line, antiproliferative effect, tumor cell sensitization

УДК 577.218

## МЕТОД EMSA–SELEX–SEQ ДЛЯ АНАЛИЗА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ В КОМПЛЕКСАХ ДНК–БЕЛОК

© 2024 г. И. Б. Назаров<sup>1,\*</sup>, М. Н. Гордеев<sup>1</sup>, А. А. Кузьмин<sup>1</sup>, Д. С. Зилов<sup>1</sup>, Е. В. Потапенко<sup>2</sup>,  
А. Н. Томилин<sup>1,\*\*</sup>

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

<sup>2</sup>Институт эволюционного развития, отдел эволюции и биологии окружающей среды Университета Хайфы, Хайфа,  
3498838, Израиль

\*E-mail: i.nazarov@incras.ru

\*\*E-mail: a.tomilin@incras.ru

Поступила в редакцию 06.12.2023

После доработки 08.12.2023

Принята к публикации 08.12.2023

Белок BOB1 (OBF1, OCA-B) представляет собой транскрипционный коактиватор двух POU-доменных белков: экспрессирующегося во всех клетках OBT1 и лимфоид-специфического OBT2. Взаимодействие BOB1 с OBT1/2 играет важную роль в регуляции иммунных ответов как в физиологическом, так и в патологическом контексте. Известно, что BOB1 образует тройной комплекс с OBT1/2 связанных с ДНК в мономерных и определенных димерных конфигурациях, меняя сиквенс-специфичность такого связывания. Для анализа последовательностей ДНК из этих комплексов в настоящей работе нами предложен метод EMSA-SELEX-seq, основанный на разделении OBT/BOB1 комплексов различного состава в неденатурирующем полиакриламидном геле (EMSA) с последующим выделением и амплификацией содержащихся в них олигонуклотидов (SELEX). На основании нескольких раундов такого обогащения с последующим NGS-секвенированием и биоинформатическим анализом были определены ДНК-последовательности и подтверждена релевантность данного подхода. Таким образом, предложенный метод EMSA-SELEX-seq позволяет проводить анализ последовательностей ДНК в сложных ДНК-белковых комплексах с различающейся мерностью его белковых компонентов.

**Ключевые слова:** EMSA, SELEX, NGS секвенирование, OBT1, OBT2, BOB1, OBF1, OCA-B

**Принятые сокращения:** ТФ – транскрипционные факторы; EMSA – метод сдвига электрофоретической подвижности (Electrophoretic Mobility Shift Assay); CAP – последовательная аффинная очистка (Consecutive Affinity Purification); SELEX – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment).

**DOI:** 10.31857/S0041377124030052, **EDN:** PEKAZN

Определение специфических последовательностей ДНК, связывающих одиночные транскрипционные факторы (ТФ) или комплексы таковых, является актуальной задачей многочисленных современных исследований. Большинство ТФ эукариот обладает довольно невысокой специфичностью при связывании с ДНК, допуская вариативность нуклеотидов во многих позициях сайтов узнавания (Weirauch et al., 2013; Kibet and Machanick, 2015; Meers et al., 2019). Более того, модуляция узнавания последовательностей при взаимодействии двух и более ТФ с ДНК может быть одним из важнейших комбинаторных механизмов регуляции транскрипции. Экспериментально было продемонстрировано, что специфичность узнавания последовательностей в ДНК в составе

димерных комплексов ТФ заметно отличается от таковой в случае отдельных ТФ (Jolma et al., 2015). Значительная часть таких данных была получена с использованием метода CAP-SELEX (consecutive affinity-purification systematic evolution of ligands by exponential enrichment) и последующего NGS-секвенирования. Однако не все ТФ, коактиваторы и другие ДНК-связывающие белки могут быть проанализированы с помощью данного подхода вследствие недостаточной аффинности одного из компонентов. Кроме того, исследование ДНК-последовательностей, специфически связываемых белками в мономерной, димерной, или более сложных конфигурациях (Luo et al., 1992; Gstaiger et al., 1995, 1996; Luo, Roeder, 1995; Strubin et al., 1995; Tomilin et al., 2000; Remenyi et

al., 2001), часто затруднено невозможностью разделения этих комплексов с помощью методов простой аффинной очистки, таких как CAP-SELEX. В настоящей работе мы показали, что указанные препятствия могут быть преодолены с помощью сочетания метода EMSA (electrophoretic mobility shift assay) — основного метода идентификации ДНК-белок комплексов *in vitro* — с процедурой SELEX и высокопроизводительным секвенированием. Мы использовали данный метод, названный EMSA-SELEX-seq, для оценки способности коактиватора BOB1 влиять на специфичность распознавания ДНК POU-доменными белками OCT1 и OCT2 в мономерной и димерной конфигурациях.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Плазмидные конструкторы, экспрессия и очистка белков.** Для клонирования были использованы последовательности, кодирующие POU-домены OCT1 (POU1) и OCT2 (POU2), а также полноразмерного BOB1. Для получения необходимой кДНК методом обратной транскрипции была выделена мРНК из лейкоцитов человека. Для экспрессии исследуемых белков были созданы следующие плазмидные конструкторы на основе вектора pET28a (Novagen, США): 1) 1t-POU1: 6xHis tag—thrombin site—POU1, 2) 2t-POU1: 6xHis tag—thrombin site—(20 aa + POU1 + 20 aa)—TEV site—SBP tag, 3) 2t-POU2: 6xHis tag—thrombin site—(20 aa + POU2 + 30 aa)—TEV site—SBP tag, 4) 1t-BOB1: 6xHis tag—thrombin site—BOB1, 5) 2t-BOB1: 6xHis tag—thrombin site—BOB1—TEV site—3x Flag tag. Цифрами перед аббревиатурой aa (amino acids) обозначено число примыкающих к POU-доменам аминокислот, включенных в указанные конструкторы. Корректность клонирования верифицировали секвенированием. Экспрессию белка индуцировали 1 mM IPTG в клетках *E. coli* BL21 (BL21(DE3) pLysS (Novagen, США) в течение 12—18 ч при температуре 25 °С. Белки очищали в денатурирующих условиях и ренатурировали с помощью медленного пошагового диализа. Для этого клетки собирали центрифугированием и лизировали в буфере A1 (8 M мочевины, 0.1 M натрий-фосфатный буфер, 0.01 M трис-Cl, pH 8.0, 5 mM β-меркаптоэтанол). Лизат клеток наносили на Ni-NTA His Bind Resin (Novagen, США), промывали буфером A2 (8 M мочевины, 0.1 M натрий-фосфатный буфер, 0.01 M трис-Cl pH 6.3, 5 mM β-меркаптоэтанол) и элюировали буфером A3 (8 M мочевины, 0.1 M натрий-фосфатный буфер, 0.01 M трис-Cl pH 4.5, 5 mM β-меркаптоэтанол).

Образцы белков затем подвергали четырехэтапному диализу против буферов с двукратным уменьшением концентрации мочевины и постепенным увеличением pH на каждом этапе. Конечную стадию диализа проводили против PBS, содержащего 5 mM β-меркаптоэтанол, в течение 12 ч. Для получения гомогенных и полноразмерных форм белков, POU-пробы дополнительно очищали с помощью Pierce Streptavidin Plus UltraLink Resin, а BOB1 — на AN-TI-FLAG M2 Affinity Gel. Условия очистки соответствовали рекомендациям изготовителей аффинных сорбентов. POU1(2) элюировали буфером, содержащим 10 mM биотина, а BOB1 — кислым буфером.

**EMSA.** 25 нг ДНК смешивали с 30 нг белка POU-белков и, где необходимо, 28 нг белка BOB1 в 10 мкл связывающего буфера: 20 mM Трис-НСl, pH 7.6, содержащий 10 % глицерина, 0.14 M NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.05 % Triton X-100, 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0.1 мг/мл поли(dI-dC) (Amersham, Великобритания), 5 mM ДТТ, и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем, смесь наносили на 5 %-ный полиакриламидный гель для электрофоретического разделения. Для визуализации ДНК и ДНК-белковых комплексов использовали флуоресцентно меченые ДНК пробы.

**CAP-SELEX.** Метод заключается в поэтапном обогащении случайных ДНК, последовательностями, которые аффинно взаимодействуют с исследуемыми белками. В первую очередь, нами была получена ДНК, содержащая случайную 35-нуклеотидную последовательность, фланкированную олигонуклеотидами с известной последовательностью, и предназначенных, как амплификации, так и для пробоподготовки в процессе NGS секвенирования. Для этого синтезирован олигонуклеотид 5'-ACGACGCTCTTCCGATCT(35N)GATCGGAAGAGCACACGTC-3' (Евроген, Москва), общей длиной 72 нуклеотида. Одноцепочечную ДНК переводили в двуцепочечную форму и амплифицировали с помощью ПЦП реакции используя Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). Реакцию связывания полученной ДНК для SELEX с исследуемыми белками проводили аналогично процедуре EMSA, за исключением того, что количество ДНК составляло 300 нг. После связывания комплексы выделяли с помощью 5 мкл Pierce Streptavidin Plus UltraLink Resin, используя взаимодействие с SBP-тегом рекомбинантных POU-белков. Затем, осадок тщательно отмывали, а элюцию комплексов проводили в связывающем буфере с 10 mM биотином. Следующий шаг представлял

собой повторное выделение комплексов, используя взаимодействие Flag-тега белка BOB1 с ANTI-FLAG M2 Affinity Gel. Для этого 5 мкл геля инкубировали с элюатом после первого выделения, гель отмывали, а связанную ДНК получали разрушением комплексов при нагревании проб до 95 °С в течение 20 мин. ДНК амплифицировали с помощью ПЦР.

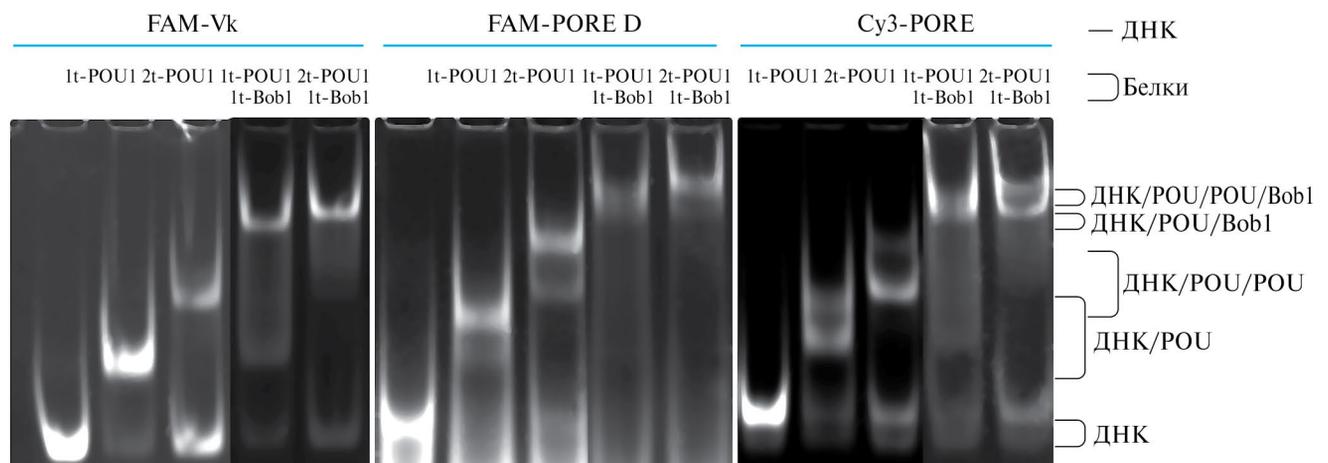
**EMSA-SELEX.** ДНК (300 нг) для SELEX инкубировали для связывания с исследуемыми белковыми факторами в объеме 20 мкл при условиях, аналогичных в методе EMSA. После этого образцы разделяли с помощью электрофореза в 6 %-ном нативном полиакриламидном геле, приготовленном на 0.5-кратном буфере TBE, в течение 50 мин при комнатной температуре. Чтобы избежать перекрестного загрязнения образцов, их наносили через одну пустую лунку. Затем гель разделяли на фрагменты, выделяли из них ДНК, амплифицировали её с помощью ПЦР, осаждали этанолом и использовали в следующем цикле обогащения. После четырех раундов EMSA-SELEX образцы секвенировали с помощью Illumina Solexa HiSeq1500 в компании «Геноаналитика» (Москва). Выявление мотивов было выполнено с помощью онлайн-инструмента MEME (Bailey, Elkan, 1994).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

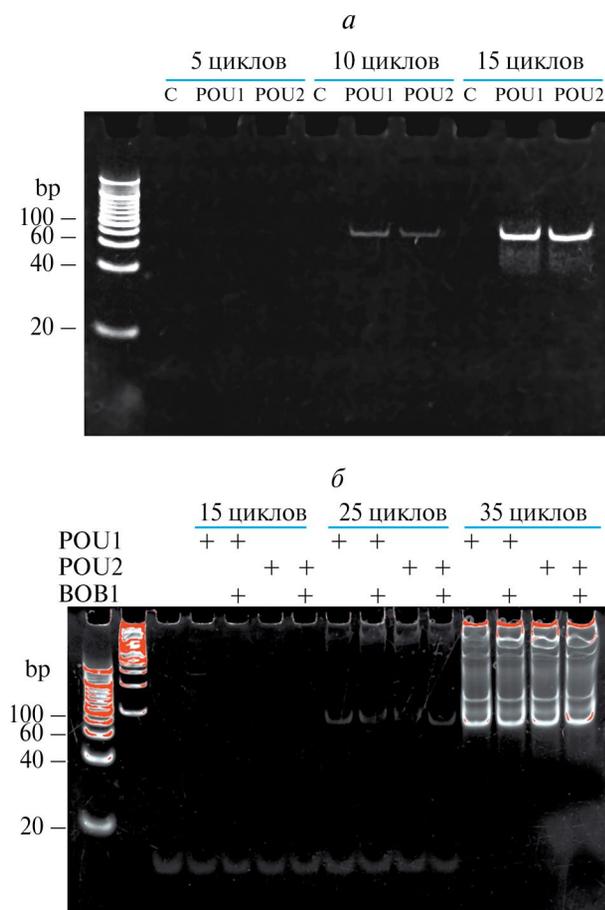
В результате экспрессии и очистки белков с использованием аффинных сорбентов были получены белки, содержащие только N-концевой His-тег (1t-POU1 и 1t-BOB1) и белки с двумя тегам:

N-концевой His-тег и C-концевой SBP-тег (2t-POU1 и 2t-POU2), N-концевой His-тег и C-концевой FLAG-тег (2t-BOB1). Взаимодействие полученных белков с ДНК было верифицировано с помощью EMSA. Типичные результаты EMSA представлены на рис. 1.

Первоначально для оценки способности коактиватора BOB1 влиять на специфичность распознавания ДНК POU-доменными белками OCT1 и OCT2 в мономерной и димерной конфигурациях нами была осуществлена попытка аффинного выделения ДНК-белковых комплексов с помощью метода CAP-SELEX (Jolma et al., 2013, 2015). Для этого были использованы дважды тегированные POU1, POU2 и BOB1. При выделении ДНК из комплексов ДНК/POU1(2)/POU(2) или ДНК/POU1(2)/POU1(2)/BOB1 позитивный результат наблюдается только в случае использования очистки за SBP-тега белков POU1 и POU2 (рис. 2а). Однако, при выделении ДНК из ДНК/POU1(2)/POU1(2)/BOB1 комплекса наблюдался только неспецифический сигнал (рис. 2б). По-видимому, аффинность взаимодействия белка BOB1 не является достаточной для выделения такого комплекса. Следует отметить, что при этом аффинная очистка Flag-тегированного белка BOB1 с использованием ANTI-FLAG M2 Affinity Gel прошла вполне успешно. Попытки изменения условий выделения ДНК из ДНК/POU1(2)/POU1(2)/BOB1 комплекса позитивного результата не принесли. В итоге нами был предложен альтернативный способ получения ДНК из комплексов ДНК/POU1(2)/POU1(2) и ДНК/POU1(2)/POU1(2)/BOB1, который дал положительный результат. Этот способ заключал-



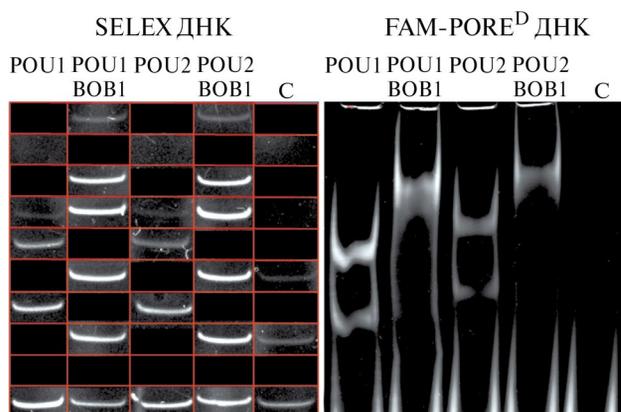
**Рис. 1.** Гель-ретардация (EMSA) препаратов указанных тегированных POU-белков и BOB1. В качестве ДНК-проб были использованы двуцепочечные флуоресцирующие олигонуклеотиды, которые связывают OCT-факторы в мономерной (Vk) и димерной (PORE и PORE<sup>D</sup>) конфигурациях (Botquin et al., 1998; Tomilin et al., 2000). Для визуализации, олигонуклеотиды были мечены флуоресцеином (FAM) или Cy3.



**Рис. 2.** ПЦР амплификация ДНК полученная после аффинной очистки ДНК-белковых комплексов. *а* — Очистка белков POU1 и POU2 с использованием SBP-тега на Pierce Streptavidin Plus UltraLink Resin. Сигналы специфичны. С — проба без добавления белков POU1 и POU2. *б* — Очистка белков POU1 и POU2 с использованием SBP-тега и последующей очистки белка BOB1 с использованием Flag-тега на ANTI-FLAG M2 Affinity Gel. Выявленные сигналы являются неспецифичными.

ся в использовании метода EMSA в качестве метода разделения комплексов ДНК-белок, вырезании зон геля, где мигрируют соответствующие комплексы, и последующем выделении и амплификации ДНК (рис. 3).

Используя такой подход, нами было проведено 4 цикла обогащения (SELEX) и последующей амплификации ДНК из комплексов ДНК/POU1(2)/POU1(2), свободных от BOB1 или включающих этот коактиватор. Полученные образцы ДНК были секвенированы с помощью NGS технологии. После соответствующей обработки данных секвенирования был проведен биоинформатический анализ последовательностей ДНК на наличие мотивов. Основные мотивы, выявленные с помощью онлайн-инстру-

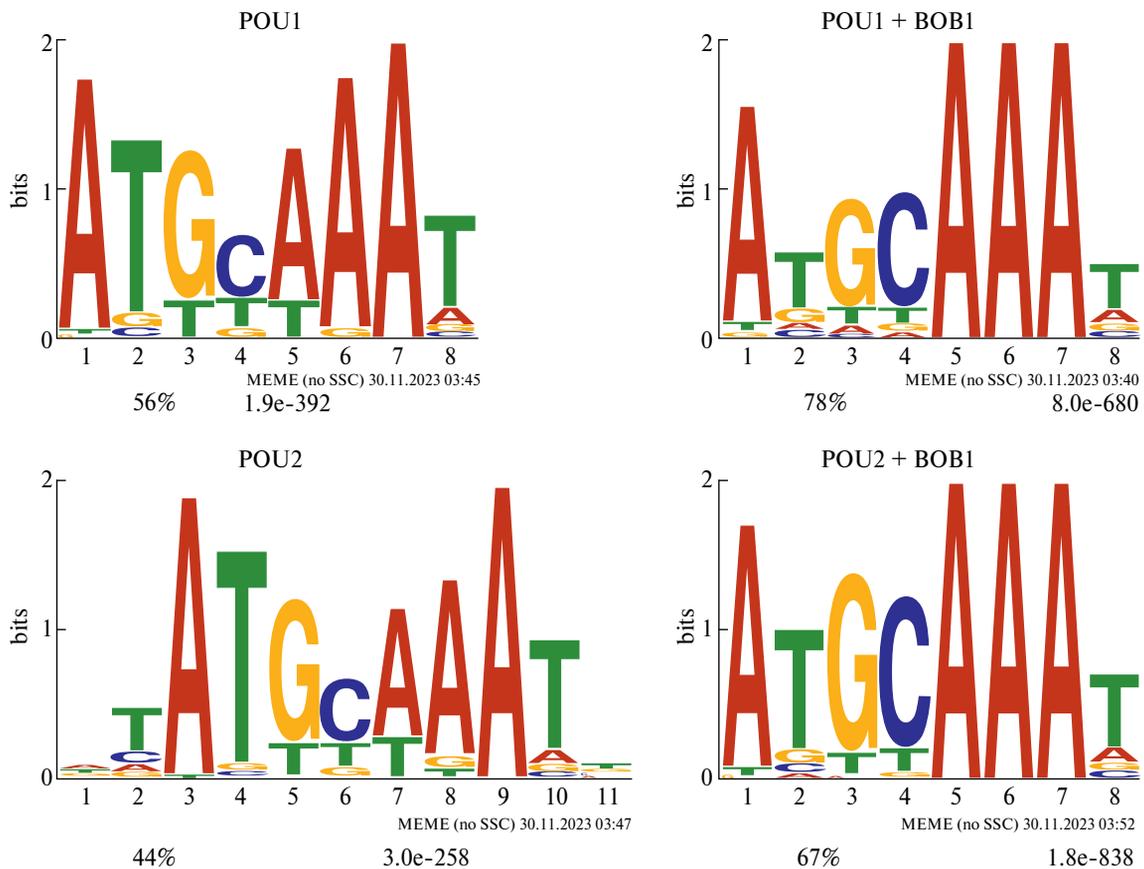


**Рис. 3.** Интенсивность сигналов при амплификации SELEX ДНК (10 циклов ПЦР), выделенной из фрагментов геля после EMSA (слева). Гель, в котором SELEX ДНК была заменена на FAM-PORER<sup>D</sup> ДНК (справа). С — дорожка для контрольной пробы с соответствующей ДНК без белков.

мента MEME (Bailey, Elkan, 1994) представлены на рис. 4.

Полученные в результате процедуры EMSA-SELEX-seq мотивы вполне соответствовали ожидаемым и имели значительное сходство с мотивами, полученными в других лабораториях, например, с мотивами, полученными с помощью CAP-SELEX-seq для POU1 и POU2 (Jolma et al., 2013), а также при анализе данных ChIP-seq для OCT1 (Song et al., 2021). Полученные результаты подтверждают релевантность использованного нами подхода. Например, данный метод позволяет выявлять повышение частоты встречаемости аденина в позиции 5 октамерного мотива, что характерно именно для тройных комплексов, включающих белок BOB1 (рис. 4). Этот факт был установлен уже более двух десятилетий назад и хорошо известен (Gstaiger et al., 1995, 1996). Также следует отметить, что присутствие BOB1 в комплексах ведет к направленному изменению частот нуклеотидов в позициях 2, 3 и 4 октамерного мотива, что предполагает смещение специфичности связывания с ДНК сайтами, и может являться предметом углубленного биоинформатического анализа.

Предлагаемый вариант SELEX процедуры превосходит возможности подхода CAP-SELEX, так как позволяет разделять мономерные и димерные комплексы, а также более сложные комплексы с разным количеством отдельных факторов. Разделение таких сложных комплексов является важной и актуальной задачей, поскольку известно, что при связывании двух и более ТФ, происходит значительное изменение специфичности узнавания последовательностей в ДНК (Jolma et al., 2015).



**Рис. 4.** Основные мотивы, выявленные с помощью онлайн-инструмента MEME (Bailey, Elkan, 1994) после обогащения с помощью EMSA-SELEX и NGS секвенирования. Под изображениями мотивов указана частота (%), слева) встречаемости данных мотивов в последовательностях и статистическая значимость мотива (E-value, справа).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-14-00369).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bailey T. L., Elkan C. 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. In: Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Menlo Park, California: AAAI Press. P. 28.
- Botquin V., Hess H., Fuhrmann G., Anastassiadis C., Gross M. K., Vriend G., Schöler H. R. 1998. New POU di-

mer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev.* V. 12. P. 2073.

- Gstaiger M., Georgiev O., van Leeuwen H., van der Vliet P., Schaffner W. 1996. The B cell coactivator Bob1 shows DNA sequence-dependent complex formation with Oct-1/Oct-2 factors, leading to differential promoter activation. *EMBO J.* V. 15. P. 2781.
- Gstaiger M., Knoepfel L., Georgiev O., Schaffner W., Hovens C. M. 1995. A B-cell coactivator of octamer-binding transcription factors. *Nature.* V. 373. P. 360.
- Jolma A., Yan J., Whittington T., Toivonen J., Nitta K. R., Rastas P., Morgunova E., Enge M., Taipale M., Wei G., Palin K., Vaquerizas J. M., Vincentelli R., Luscombe N. M., Hughes T. R., et al. 2013. DNA-binding specificities of human transcription factors. *Cell.* V. 152. P. 327.
- Jolma A., Yin Y., Nitta K. R., Dave K., Popov A., Taipale M., Enge M., Kivioja T., Morgunova E., Taipale J. 2015. DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their binding specificity. *Nature.* V. 527. P. 384.
- Kibet C. K., Machanick P. 2015. Transcription factor motif quality assessment requires systematic comparative analysis. *F1000Res.* V. 4: ISCB Comm J-1429.
- Luo Y., Fujii H., Gerster T., Roeder R. G. 1992. A novel B cell-derived coactivator potentiates the activation of im-

- munoglobulin promoters by octamer-binding transcription factors. *Cell*. V. 71. P. 231.
- Luo Y., Roeder R. G. 1995. Cloning, functional characterization, and mechanism of action of the B-cell-specific transcriptional coactivator OCA-B. *Mol. Cell Biol.* V. 15. P. 4115.
- Meers M. P., Janssens D. H., Henikoff S. 2019. Pioneer factor-nucleosome binding events during differentiation are motif encoded. *Mol. Cell*. V. 75. P. 562.
- Reményi A., Tomilin A., Pohl E., Lins K., Philippsen A., Reinbold R., Schöler H. R., Wilmanns M. 2001. Differential dimer activities of the transcription factor Oct-1 by DNA-induced interface swapping. *Mol. Cell*. V. 8. P. 569.
- Song S., Cao C., Choukrallah M. A., Tang F., Christofori G., Kohler H., Wu F., Fodor B. D., Frederiksen M., Willis S. N., Jackson J. T., Nutt S. L., Dirnhofer S., Stadler M. B., Matthias P. 2021. OBF1 and Oct factors control the germinal center transcriptional program. *Blood*. V. 137. P. 2920.
- Strubin M., Newell J. W., Matthias P. 1995. OBF-1, a novel B cell-specific coactivator that stimulates immunoglobulin promoter activity through association with octamer-binding proteins. *Cell*. V. 80 P. 497.
- Tomilin A., Reményi A., Lins K., Bak H., Leidel S., Vriend G., Wilmanns M., Schöler H. R. 2000. Synergism with the coactivator OBF-1 (OCA-B, BOB-1) is mediated by a specific POU dimer configuration. *Cell*. V. 103. P. 853.
- Weirauch M. T., Cote A., Norel R., Annala M., Zhao Y., Riley T. R., Saez-Rodriguez J., Cokelaer T., Vedenko A., Talukder S., DREAM5 Consortium, Bussemaker H. J., Morris Q. D., Bulyk M. L., Stolovitzky G. et al. 2013. Evaluation of methods for modeling transcription factor sequence specificity. *Nat. Biotechnol.* V. 31. P. 126.

## EMSA-SELEX-SEQ METHOD FOR ANALYSIS OF BINDING SITE SEQUENCES IN DNA-PROTEIN COMPLEXES

I. B. Nazarov<sup>a, \*</sup>, M. N. Gordeev<sup>a</sup>, A. A. Kuzmin<sup>a</sup>, D. S. Zilov<sup>a</sup>, E. V. Potapenko<sup>b</sup>, A. N. Tomilin<sup>a, \*\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, Russia

<sup>b</sup>Institute of Evolution, Department of Evolutionary and Environmental Biology, University of Haifa, Haifa, 3498838, Israel

\*e-mail: i.nazarov@incras.ru

\*\*e-mail: a.tomilin@incras.ru

The BOB1 protein (OBF1, OCA-B) is a transcriptional coactivator of two POU domain proteins — OCT1, expressed in all cells, and lymphoid-specific OCT2. The interaction of BOB1 with OCT1/2 plays an important role in the regulation of immune responses in both physiological and pathological contexts. BOB1 is known to form a ternary complex with OCT1/2 bound to DNA in monomeric and certain dimeric configurations, changing the sequence specificity of the binding. To analyze DNA sequences from these complexes, in this work we proposed the EMSA-SELEX-seq method, based on the separation of OCT/BOB1 complexes of various compositions in a non-denaturing polyacrylamide gel (EMSA) followed by the isolation and amplification of the oligonucleotides that they contain (SELEX). Based on several rounds of the enrichment followed by the NGS sequencing and bioinformatics analysis, the DNA sequences were determined and the relevance of this approach was confirmed. Thus, the proposed EMSA-SELEX-seq method allows the analysis of DNA sequences in DNA-protein complexes with varying dimensions of its protein components.

**Keywords:** EMSA, SELEX, NGS sequencing, OCT1, OCT2, BOB1, OBF1, OCA-B

УДК 577.334

## N-АЦИЛПРОИЗВОДНЫЕ 2-АМИНО-4,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛФЕНОЛА – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТЕКТОРЫ ПРИ ИНДУЦИРУЕМОМ НЕЙТРОФИЛАМИ ГАЛОГЕНИРУЮЩЕМ СТРЕССЕ

© 2024 г. Г. Н. Семенкова<sup>1</sup>, И. И. Жолнеревич<sup>2</sup>, Е. И. Коваленко<sup>2</sup>, Г. А. Ксендзова<sup>3</sup>, В. Л. Сорокин<sup>2</sup>, Н. В. Амаэгбери<sup>2,\*</sup>, А. В. Климович<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательская лаборатория Белорусского государственного медицинского университета, Минск, 220083, Белоруссия

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск, 220030, Белоруссия

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, 220030, Белоруссия

\*E-mail: n.amaegberi@gmail.com

Поступила в редакцию 20.11.2023

После доработки 28.11.2023

Принята к публикации 06.12.2023

Изучено влияние N-ацилпроизводных 2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенола на функции нейтрофилов. Установлено, что производные со свободной гидроксильной группой в бензольном кольце, в отличие от O-метилированных, модифицируют свойства клеток, снижая генерацию хлорноватистой кислоты в процессе формирования респираторного взрыва. Эти соединения являются перехватчиками  $\text{HOCl/OCl}^-$ , генерируемых стимулированными нейтрофилами, и снижают секрецию миелопероксидазы (МПО) клетками. Показано, что наиболее эффективным перехватчиком хлорноватистой кислоты является N-(3,5-ди-трет-бутил-2-гидроксифенил)ацетамид. Это вещество значительно подавляет секреторную дегрануляцию нейтрофилов и оказывает цитопротекторное действие в условиях галогенирующего стресса.

**Ключевые слова:** аминофенолы, нейтрофилы, активные формы кислорода и хлора, секреторная дегрануляция, жизнеспособность

**Принятые сокращения:** АФКХ — активные формы кислорода и хлора; ДМСО — диметилсульфоксид; МПО — миелопероксидаза; ПМР — протонный магнитный резонанс; СБСРЭ — сбалансированный буферный солевой раствор Эрла; ХЛ — хемилюминесценция, Люм-ХЛ — люминолзависимая хемилюминесценция, Люц-ХЛ — люцигенинзависимая хемилюминесценция; ЯМР — ядерный магнитный резонанс; PBS — фосфатный буферный раствор; PI — йодистый пропиций.

DOI: 10.31857/S0041377124030068, EDN: PEJNHM

Активные формы галогенов образуются в организме человека и животных при активации миелопероксидазы (МПО) нейтрофилов, моноцитов, макрофагов и пероксидазы эозинофилов (Durgé-Crochet et al., 2013; Morris et al., 2022). Наибольшее количество МПО содержится в нейтрофилах. Эти клетки первыми мигрируют в очаг инфицирования, где утилизируют микроорганизмы, продукты цитодеструкции и другие чужеродные для организма объекты посредством респираторного взрыва с участием активных форм кислорода и галогенов (Arnhold, 2020; Rizo-Télez et al., 2022). Активация нейтрофилов сопровождается усилением секреторной дегрануляции, в результате чего во внеклеточное пространство высвобождаются гидролитические ферменты (например, лизоцим, эластаза

и др.), а также МПО (Mayadas et al., 2014). МПО в галогенирующем цикле катализирует реакции образования гипогалогенитов, используя в качестве субстратов пероксид водорода и галогенид-ионы. Поскольку в организме концентрация хлоридов много выше, чем других галогенидов, основным продуктом этих реакций является  $\text{HOCl/OCl}^-$ . Как и пероксид водорода, хлорноватистая кислота является сильным окислителем и в зависимости от концентрации может стимулировать функциональную активность клеток или вызывать их разрушение (Gamaley et al., 1994; Kuznetsova et al., 2017; Hawkins, 2020).

Известно, что у пожилых людей, пациентов с астмой, ревматоидным артритом, сердечно-сосудистыми, нейродегенеративными и онкологическими

патологиями происходит усиление секреции МПО из нейтрофилов, что приводит к повышению уровня гипохлорита в крови и очаге воспаления и, как следствие, к развитию галогенирующего стресса (Malle et al., 2000; Nussbaum et al., 2013; Tzikas et al., 2014; Davies, Hawkins, 2020; Ramachandra et al., 2020). Поэтому актуальным является поиск веществ, способных с высокой специфичностью предотвращать избыточное образование хлорноватистой кислоты в организме, либо выполнять функцию селективных ловушек  $\text{HOCl}/\text{ClO}^-$ .

К таким соединениям могут относиться синтезированные нами ранее N-ацильные производные 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола (Шадыро и др., 2008), поскольку они являются эффективными регуляторами свободнорадикальных реакций, протекающих с участием кислород- и углеродцентрированных органических радикалов (Shadyro et al., 2008). Наличие N-ацилированной аминогруппы в структуре соединений может приводить к высокой реакционной способности веществ по отношению к  $\text{HOCl}/\text{ClO}^-$ , как это показано для других аминоксодержащих соединений (Hawkins et al., 2003; Shadyro et al., 2015). Дополнительной мотивацией для исследования N-ацильных производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола послужило то, что некоторые из них, обладая низкой цитотоксичностью *in vivo* и *in vitro*, проявляют противовирусную активность в отношении вируса гриппа A/FPV/Rostock/34 (H7N1) и вируса простого герпеса 1-го типа (Шадыро и др., 2019).

В настоящей работе с целью поиска потенциальных протекторов для предотвращения последствий галогенирующего стресса исследованы структурные закономерности влияния N-ацилпроизводных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола на процессы генерации активных форм кислорода и хлора (АФКХ) в нейтрофилах, секреторную дегрануляцию и жизнеспособность клеток в норме и в условиях галогенирующего стресса, индуцируемого гипохлоритом натрия  $\text{NaClO}$ .

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Реактивы.** В работе использовали декстран, гистопак-1077, люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион), люцигенин (10,10'-диметил-9,9'-биакридиния динитрат), Нерес, RPMI-1640, ДМСО, TritonX-100, пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), гипохлорит натрия ( $\text{NaOCl}$ ), йодистый пропилий (PI), бактерии *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, USA). Компоненты для приготовления

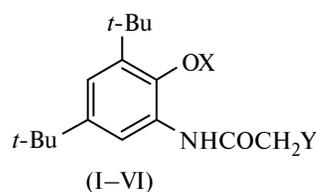
фосфатного буферного раствора (PBS) и сбалансированного буферного солевого раствора Эрла (СБСРЭ) (Анализ Х, Белоруссия).

**Синтез N-ацилпроизводных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола.** Структурные формулы исследуемых в работе соединений представлены на рис. 1. Синтез N-ацильных производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола I—III был осуществлен взаимодействием 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола с уксусным ангидридом (I), а также с хлорангидридами пропановой (II) и н-бутановой (III) кислот в присутствии триэтиламина в качестве акцептора выделяющегося хлороводорода по описанным ранее методикам (Шадыро и др., 2008).

O-метилированные производные 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола IV—VI были получены реакцией метилирования соединений I—III с использованием диметилсульфата, как описано ниже. Структура o-метилированных соединений была подтверждена методами ЯМР  $^1\text{H}$  и масс-спектроскопии. Спектральные характеристики для каждого полученного соединения приведены в скобках.

**Получение соединения N-(3,5-ди-*трет*-бутил-2-метоксифенил)ацетамид (IV).** Смесь 0.1 г (0.38 ммоль) N-(3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенил)ацетамида (I), 0.26 г (1.9 ммоль) карбоната калия и 0.1 г (0.79 ммоль) диметилсульфата в 5 мл сухого ацетона кипятили в течение 6 ч. Затем осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, остаток дважды перекристализовывали из водно-этанольной смеси. Получали 0.06 г (57%) соединения IV в виде белого порошка с температурой плавления 190 °C. (Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , м. д.: 8.02 д (1H, CH; J = 2.0), 7.40 уш с (1H, NH), 7.09 д (1H, CH; J = 2.0), 3.73 с (3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.20 с (3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.31 с (9H,  $3\text{CH}_3$ ), 1.27 с (9H,  $3\text{CH}_3$ ). Масс-спектр, m/z ( $I_{\text{отн}}$ , %): 277 (37)  $[\text{M}]^+$ .  $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_2$  — брутто-формула соединения IV).

**Получение соединения N-(3,5-ди-*трет*-бутил-2-метоксифенил)пропанамида (V).** Раствор 0.5 г (1.8 ммоль) N-(3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенил)



- I: X = H, Y = H;
- II: X = H, Y =  $\text{CH}_3$ ;
- III: X = H, Y =  $\text{CH}_2\text{C}$ ;
- IV: X =  $\text{CH}_3$ , Y = H;
- V: X =  $\text{CH}_3$ , Y = CH;
- VI: X =  $\text{CH}_3$ , Y = CH

**Рис. 1.** Структурная формула N-ацильных производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола (I—VI), исследуемых в работе.

пропанамид (II) и 0.45 г (3.60 ммоль) диметилсульфата в 15 мл сухого ацетона кипятили в течение 6 ч с 1.25 г (9.0 ммоль) карбоната калия. Затем реакционную смесь отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, а остаток дважды перекристаллизовывали из водно-этанольной смеси. Получали 0.44 г (85 %) соединения V в виде белого порошка с температурой плавления 125—126 °С. (Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , м. д.: 8.17 с (1H, NH), 7.45 с (1H, CH), 7.10 с (1H, CH), 3.73 с (3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.45 кв (2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.40 с (9H,  $3\text{CH}_3$ ), 1.26 т (3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.26 с (9H,  $3\text{CH}_3$ ). Масс-спектр,  $m/z$  ( $I_{\text{отн}}$ , %): 291 (43)  $[\text{M}]^+$ .  $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NO}_2$  — брутто-формула соединения V).

**Получение соединения N-(3,5-ди-трет-бутил-2-метоксифенил)бутанамид (VI).** Раствор 0.5 г (1.72 ммоль) N-(3,5-ди-трет-бутил-2-гидроксифенил)бутанамид (III) и 0.43 г (3.44 ммоль) диметилсульфата в 15 мл сухого ацетона кипятили 6 ч с 1.19 г (8.6 ммоль) карбоната калия. Затем реакционную смесь отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, а остаток дважды перекристаллизовывали из водно-этанольной смеси. Получали 0.37 г (71 %) соединения VI в виде белого порошка с температурой плавления 118—119 °С. (Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , м. д.: 8.16 с (1H, NH), 7.42 с (1H, CH), 7.15 с (1H, CH), 3.79 с (3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.40 т (2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.80 кв (2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.42 с (9H,  $3\text{CH}_3$ ), 1.27 с (9H,  $3\text{CH}_3$ ), 1.10 т (3H,  $\text{CH}_3$ ). Масс-спектр,  $m/z$  ( $I_{\text{отн}}$ , %): 305 (35)  $[\text{M}]^+$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{NO}_2$  — брутто-формула соединения VI).

Состав и строение всех полученных соединений подтверждены совокупностью данных ЯМР  $^1\text{H}$ - и масс-спектрометрии. Спектры протонного магнитного резонанса растворов веществ в  $\text{CDCl}_3$  были сняты на спектрометре Bruker ARX-400 (США) с рабочей частотой 400 МГц, химические сдвиги ( $\delta$ , м. д.) приведены относительно сигнала тетраметилсилана. Масс-спектры были получены на спектрометре Shimadzu QP-5000 (Япония) с использованием техники прямого ввода образцов в ионный источник при температуре источника 200 °С и энергии ионизации 70 эВ. Температуры плавления определяли на нагревательном столике Voetius (Германия). Контроль за ходом реакций и чистотой полученных соединений осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol UV-254 (Чехия) в системе циклогексан-изопропанол-водный аммиак (4:1:0.001); пластинки проявляли в парах йода.

Рабочие растворы аминифенолов готовили в ДМСО или в 10 %-ном растворе ДМСО в 0.15 моль/л NaCl. Соответствующую смесь ДМСО

в 0.15 М растворе NaCl вносили во все контрольные образцы.

**Выделение нейтрофилов из периферической крови.** Нейтрофилы выделяли из крови здоровых людей в градиенте плотности гистопак-1077 по стандартной методике (Вюит, 1976). Из осадка, содержащего нейтрофилы, удаляли примесь эритроцитов с помощью гипотонического лизиса, после чего восстанавливали осмотическую активность раствора добавлением 0.3 М раствора NaCl. Суспензию клеток дважды отмывали в 0.15 М растворе NaCl. Полученную фракцию клеток суспензировали в среде RPMI-1640 (pH 7.4). Перед определением функциональных свойств клетки переводили в соответствующий буферный раствор (СБСРЭ или PBS). Содержание нейтрофилов в клеточной суспензии составляло не менее 96 %. Ко всем контрольным образцам добавляли соответствующий для аминифенола растворитель.

**Получение из нейтрофилов лизата, содержащего МПО.** Суспензию нейтрофилов ( $2 \cdot 10^6$  кл/мл) в среде RPMI-1640 подвергали трехкратному замораживанию — размораживанию с целью разрушения клеток. Полученную смесь центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин. Супернатант, содержащий МПО, использовали для анализа.

**Оценка генерации АФКХ нейтрофилами.** Образование АФКХ изучали методом хемилюминесценции (ХЛ) на биохемилюминиметре БХЛ-1 (БГУ, Белоруссия) с использованием системы сбора и обработки данных Юнихром (Новые аналитические системы, Белоруссия). Генерацию АФКХ регистрировали с помощью люминолзависимой хемилюминесценции (Люм-ХЛ), используя 25 мкМ люминола. Образование супероксидных анион-радикалов оценивали по люцигенинзависимой ХЛ (Люц-ХЛ) с использованием люцигенина в концентрации 10 мкМ. Интегральную интенсивность ХЛ определяли как площадь под кинетической кривой ХЛ, зарегистрированной в течение 10 мин, и обозначали  $I_{\kappa}$  и  $I$  для контрольного и опытного образцов соответственно. Суммарные ( $\Sigma$ ) Люм-ХЛ и Люц-ХЛ представляют собой интегральные интенсивности, выраженные в процентах от интегральной интенсивности ХЛ контрольных образцов. Суспензию клеток предварительно инкубировали в СБСРЭ pH 7.4, 37 °С с растворами аминифенолов в течение 10 мин. Генерацию АФКХ в нейтрофилах индуцировали адгезией клеток к поверхности стекла в СБСРЭ (Liu et al., 1996; Kavalenka et al., 2007).

**Влияние производных аминифенола на свободнорадикальные процессы в реакции окисления люминола при действии  $\text{H}_2\text{O}_2$  или NaOCl.** В СБСРЭ (pH 7.4, объем

1 мл) вносили 25 мкМ люминола и 1 мкМ раствора соответствующего производного аминифенола, после чего регистрировали фоновую ХЛ. Затем добавляли в темноте 100 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  или  $\text{NaOCl}$  и регистрировали ХЛ в течение 7 мин. Интегральную интенсивность ХЛ определяли как  $\Sigma I / \Sigma I_k \cdot 100\%$ , где  $\Sigma I$  и  $\Sigma I_k$  — интегральная интенсивность ХЛ в реакции окисления люминола  $\text{H}_2\text{O}_2$  или  $\text{NaOCl}$  соответственно в присутствии и отсутствие соответствующего аминифенола. Из полученных значений интегральной интенсивности вычитали фоновую интенсивность.

**Влияние производных аминифенола на свободнорадикальные процессы в галогенирующем цикле МПО.** В СБСРЭ (рН 5.2, 1 мл) добавляли 25 мкМ люминола и 50 мкл супернатанта нейтрофилов, содержащего МПО, вносили исследуемые аминифенолы в соответствующих концентрациях, после чего регистрировали фоновую ХЛ. Затем в кювету в темноте вносили 100 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и регистрировали кинетическую зависимость интенсивности ХЛ, обусловленную ферментативным окислением люминола  $\text{H}_2\text{O}_2$  с образованием преимущественно  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ . Параметры интенсивности ХЛ определяли, как описано выше.

**Оценка секреторной дегрануляции нейтрофилов.** Секреторную дегрануляцию определяли по выходу лизоцима из клеток (Shugart, 1952). Активность лизоцима в супернатанте оценивали по скорости лизиса клеточных стенок бактерий *Micrococcus lysodeikticus* спектрофотометрически при длине волны 450 нм на спектрофлуориметре СМ 2203 («Солар», Минск, Белоруссия). Предварительно свежеизолированные нейтрофилы обрабатывали растворами аминифенолов или соответствующим растворителем и инкубировали в СБСРЭ рН 7.4, 37 °С в течение 10 мин.

**Оценка жизнеспособности клеток.** Использовали флуоресцентный метод, спектрофлуориметр СМ 2203 («Солар», Минск, Белоруссия), PI (при длине волны возбуждения и испускания 530 и 640 нм соответственно), молекулы которого проникают в клетку при повреждении цитоплазматических мембран и встраиваются между нуклеотидами в ДНК и РНК (реакция интеркалирования). После выдерживания клеток в растворах анализируемых веществ в стеклянных пробирках в течение 1 ч при 37 °С в суспензию клеток вносили 10 мкМ раствора PI. Клетки перемешивали, выдерживали в течение 5 мин и измеряли интенсивность флуоресценции (при длине волны возбуждения и испускания 532 и 630 нм соответственно). На 5-й мин измерения в кювету вносили 30 мкл 10%-ного Тритона X-100 для разрушения оставшихся клеток (Kato et al., 1999). Жизнеспособность клеток определяли по формуле:

$$\frac{(F_{I1} - F_{I2}) - (F_{d1} - F_{d2})}{(F_{I1} - F_{I2})} \cdot 100\%,$$

где  $F_{d1}$ ,  $F_{I1}$  и  $F_{d2}$ ,  $F_{I2}$  — параметры интенсивности флуоресценции PI в отсутствие и в присутствии Тритона X-100 соответственно.

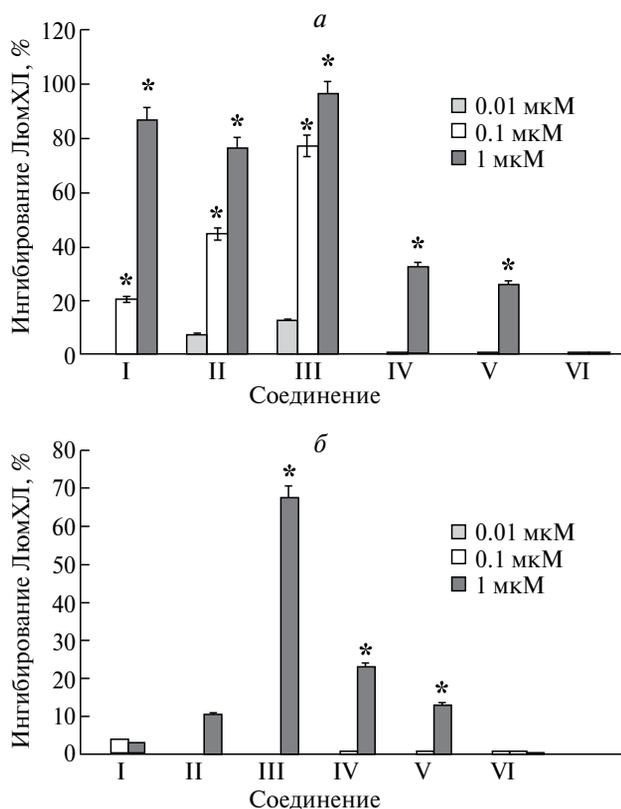
Жизнеспособность нейтрофилов в условиях галогенирующего стресса определяли методом флуоресцентной микроскопии. Нейтрофилы ресуспендировали в PBS в концентрации  $1 \cdot 10^4$  кл./мл. Полученную суспензию разделяли на 4 пробирки. В каждую из пробирок добавляли: 1) растворитель; 2) 3 мкМ соединения I; 3) 300 мкМ  $\text{NaOCl}$  и 4) 3 мкМ соединения I и 300 мкМ  $\text{NaOCl}$  совместно. Затем клеткам давали адгезировать на поверхности стекла в течение 10 мин при 37 °С, добавляли 10 мкМ раствора PI и инкубировали ещё 5 мин. Образцы анализировали с помощью конфокального сканирующего микроскопа NanoFinder High End (Tokyo Instruments, Япония—LotisTII, Белоруссия). Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения NanoFinder Data Viewer (Tokyo Instruments, Япония—LotisTII, Белоруссия) для определения интегральной интенсивности флуоресценции PI. Интегральную интенсивность PI определяли, сканируя не менее 20 клеток для каждого варианта.

**Статистическая обработка результатов.** Использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Различия между контрольной и экспериментальной группой анализировали с помощью теста Даннета. Данные представлены как среднее значение из трех и более независимых экспериментов и стандартного отклонения. Результаты считали достоверными при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы изучили влияние N-ацильных производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола (I—VI) на генерацию АФКХ нейтрофилами, стимулированными к фагоцитозу адгезией на поверхности стекла (рис. 2). Известно, что люминол является ХЛ-индикатором всех типов АФКХ, однако он наиболее эффективно взаимодействует с  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  (Рошупкин и др., 2006). Люцигенин широко используется для ХЛ-детектирования супероксидных анион-радикалов (Li et al., 1998).

Из рис. 2а видно, что соединение I в диапазоне концентраций 0.1—1 мкМ, а аминифенолы II и III в концентрации от 0.01 до 1 мкМ дозозависимо уменьшают интенсивность Люм-ХЛ и, как след-



**Рис. 2.** Ингибирующее действие (в %) соединений I—V на люминолзависимую (Люм-ХЛ, а) и люцигенинзависимую (Люц-ХЛ, б) хемилюминесценцию стимулированных нейтрофилов. Ингибирования Люм-ХЛ и Люц-ХЛ в контрольных образцах не наблюдали. Концентрация клеток: 1 млн/мл, раствор СБСРЭ (рН 7.4). Концентрация люминола и люцигенина — 25 и 10 мкМ соответственно. Время инкубирования с добавками — 10 мин. Здесь и на рис. 3, 5: (\*) — Различия с контролем (К) достоверны при  $P < 0.05$  (тест Даннета).

ствие, продукцию хлорноватистой кислоты. Причем степень ингибирования Люм-ХЛ максимальна для соединений I, II, III в концентрации 1 мкМ. Влияние аминифенолов на интенсивность Люц-ХЛ нейтрофилов, обусловленную образованием клетками супероксидных анион-радикалов, представлено на рис. 2б. Видно, что вещества I, II, III в концентрациях 0.01 и 0.1 мкМ практически не ингибируют продукцию нейтрофилами  $O_2^{\cdot -}$ . Только в концентрации 1 мкМ соединение II и в большей степени соединение III снижают этот параметр. Соединения IV и V (метилированные производные I и II соответственно) в концентрации 1 мкМ практически в 3 раза слабее, чем I и II, ингибируют Люм-ХЛ клеток и в меньшей степени подавляют Люц-ХЛ, тогда как 1 мкМ соединения VI (метилированное производное вещества III) не влияет на исследуемый процесс.

Известно, что формирование респираторного взрыва в нейтрофилах инициируется сборкой НАДФН-оксидазного комплекса, в результате чего происходит генерация супероксидных анион-радикалов (Babior, 2000; Zeng et al., 2019). Под действием супероксиддисмутазы эти радикальные частицы дисмутируют с образованием  $H_2O_2$ , который является субстратом МПО, катализирующей образование  $HOCl$  в галогенирующем цикле этого фермента (Arnhold, 2020). Из данных, представленных на рис. 2, следует, что аминифенолы I—III дозозависимо снижают образование хлорноватистой кислоты. Причём ингибирующее действие этих соединений повышается с увеличением алкильного радикала в N-ацильной группе. Подобная зависимость от структуры бокового заместителя этих соединений в концентрации 1 мкМ наблюдается при изучении образования  $O_2^{\cdot -}$  клетками. При более низких концентрациях аминифенолы I—III не оказывали влияния на выход этих радикалов. O-метилированные производные IV—VI ингибировали образование хлорноватистой кислоты в меньшей степени, а их влияние на продукцию  $O_2^{\cdot -}$  и  $HOCl$  уменьшалось с увеличением алкильного радикала. Причём ингибирующее действие веществ IV—VI было зарегистрировано нами при концентрации этих соединений не ниже 1 мкМ.

Ранее нами показано, что производные аминифенолов со свободной гидроксильной группой в отличие от их O-метилированных производных эффективно ингибируют радикальные реакции с участием кислород- и углеродцентрированных органических радикалов (Shadyro et al., 2008). Было также установлено, что ряд производных 2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенола, включая I и III, в интервале концентраций 0.001—10 мкМ практически не оказывает влияния на ХЛ перитонеальных макрофагов крысы (Shadyro et al., 2008; Бизунок и др., 2011). Следует отметить, что в этих клетках образование АФКХ осуществляется преимущественно за счет активации НАДФН-оксидазы, так как МПО в них присутствует в незначительных количествах. Поскольку в нейтрофилах МПО содержится в высокой концентрации, мы предположили, что аминифенолы I—III способны взаимодействовать с хлорноватистой кислотой, влиять на активность МПО, уменьшать количество пероксида водорода, как главного субстрата этого фермента.

Для проверки этого предположения было изучено влияние соединений I—V на свободнорадикальные реакции в системах люминол —  $NaOCl$ , люминол —  $H_2O_2$  и МПО — люминол —  $H_2O_2$  (табл. 1).

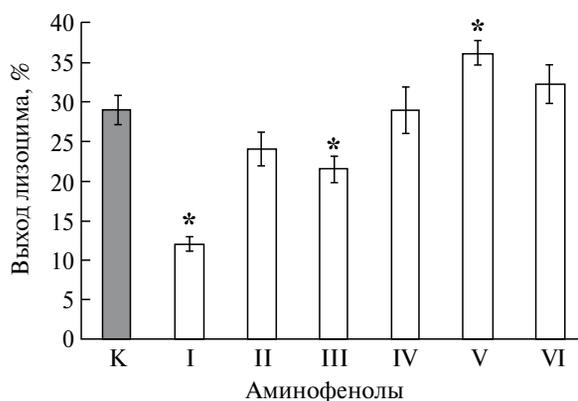
**Таблица 1.** Степень ингибирования суммарной интенсивности ХЛ в модельных системах при действии аминофенолов I–V

| Соединение | Ингибирование в системе, % |                                       |   |
|------------|----------------------------|---------------------------------------|---|
|            | Люминол—NaOCl              | Люминол—H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | МПО—люминол—H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| I          | 78.1 ± 1.0                 | 3.8 ± 4.8                             | 54.2 ± 5.1                                |
| II         | 58.3 ± 2.1                 | 5.2 ± 4.2                             | 42.8 ± 3.5                                |
| III        | 48.3 ± 2.6                 | 8.5 ± 4.6                             | 68.4 ± 5.5                                |
| IV         | 0                          | 2.3 ± 0.4                             | 12.7 ± 4.1                                |
| V          | 0                          | 6.3 ± 2.3                             | 3.8 ± 1.2                                 |
| VI         | 0                          | 4.5 ± 1.2                             | 6.7 ± 2.8                                 |

**Примечание.** Концентрация: люминола — 25 мкМ, NaOCl и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — 100 мкМ, соединений I–V — 1 мкМ.

Из результатов, представленных в табл. 1, видно, что соединения I, II и III в концентрации 1 мкМ эффективно подавляют Люм-ХЛ под действием NaOCl (I > II > III), незначительно ингибируют образование свободных радикалов при добавлении к люминолу H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и снижают выход радикальных промежуточных продуктов в галогенирующем цикле МПО (в системе МПО—люминол—H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). В то же время соединения IV, V и VI не влияют на свободнорадикальные процессы в системе люминол—NaOCl, слабо ингибируют реакцию люминола с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и ферментативную реакцию с участием МПО. Из этих данных следует, что соединения I–III можно рассматривать в качестве высокоэффективных ловушек HOCl/OCl<sup>-</sup>, причем уменьшение алкильного фрагмента в боковой цепи N-ацилпроизводных аминофенолов приводит к увеличению степени ингибирования радикальных продуктов в реакциях с участием NaOCl. Уменьшение выхода свободных радикалов после введения соединений I–III в систему, содержащую МПО, может быть обусловлено как утилизацией основного продукта этой реакции — NaOCl, так и способностью этих веществ ингибировать фермент.

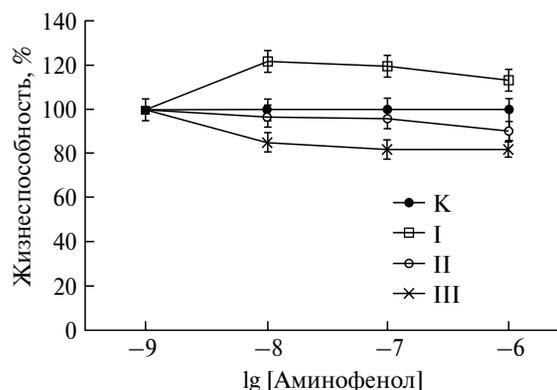
Важным свойством активированных фагоцитов является секреторная дегрануляция, в результате которой во внеклеточное пространство наряду с гидролазами высвобождается МПО (Bedouhène et al., 2020; Lacy, 2006). Избыточное количество МПО вне клеток может приводить к гиперпродукции хлорноватистой кислоты и, как следствие, к цитодеструкции и разрушению тканей (Davies, Hawkins, 2020). На рис. 3 показано влияние соединений I–V на секреторную дегрануляцию нейтрофилов, которую мы оценивали по выходу лизоцима из клеток. Видно, что при действии на клетки аминофенолов со свободной



**Рис. 3.** Влияние соединений I–V на секреторную дегрануляцию нейтрофилов. Концентрация клеток 1 млн/мл в расворе СБСРЭ (рН 7.4), аминофенолов — 1 мкМ. Время действия соединений 10 мин при 37 °С.

ОН-группой выход лизоцима снижается, причем вещество I подавляет секрецию лизоцима в 2.4 раза. Соединения IV–VI либо не влияют, либо усиливают секрецию этого фермента из нейтрофилов.

Результаты, полученные при изучении секреторной дегрануляции, позволили предположить, что соединение I, в отличие от II и III, способно увеличивать выживаемость клеток в условиях окислительного стресса. Для проверки этого предположения мы определили жизнеспособность нейтрофилов с помощью PI после действия на них соединений I–III в течение 1 ч с (рис. 4). Выявлено, что вещество I в диапазоне концентраций 0.01–1 мкМ увеличивает жизнеспособность клеток на 20%. Соединение II практически не влияет, а III уменьшает на 17% количество живых нейтрофилов. Следует отметить, что инкубирование нейтрофилов сопровождается адгезией клеток к поверхности стекла, в результате чего происходит



**Рис. 4.** Влияние соединений I–III на жизнеспособность нейтрофилов. Концентрация клеток 1 млн/мл в расворе СБСРЭ (рН 7.4). Время действия соединений 1 ч при 37 °С.

генерация АФКХ и усиливается секреторная дегрануляция (Kavalenka et al., 2007; Kuznetsova et al., 2017). Очевидно, что при адгезии в течение 1 ч часть клеток разрушается от последствий окислительного стресса. В нашем случае количество PI-позитивных клеток в контрольном образце составляло 24%. Вероятно, соединение I за счёт высокоэффективной утилизации  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  и значительного подавления секреторной дегрануляции способствует увеличению выживаемости нейтрофилов.

По данным авторов (da Cruz Nizer et al., 2020) 1 млн нейтрофилов в физиологических условиях продуцирует 0.1 мкМ/ч хлорноватистой кислоты. Скорость образования  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  в очаге воспаления достигает 25–50 мМ/ч (Ulfig, Leichert, 2021). Нами проанализировано влияние вещества I на жизнеспособность нейтрофилов в условиях галогенирующего стресса, смоделированного добавлением в среду инкубирования (PBS, pH 7.4) 300 мкМ NaOCl (рис. 5).

На рис. 5а представлены микроскопические изображения нейтрофилов, предварительно обработанных 300 мкМ аминофенола I и/или 300 мкМ NaOCl и адгезированных к поверхности стекла, а затем обработанных PI. На рис. 5б приведены количественные данные суммарной интенсивности флуоресценции PI в каждом из четырёх типов образцов.

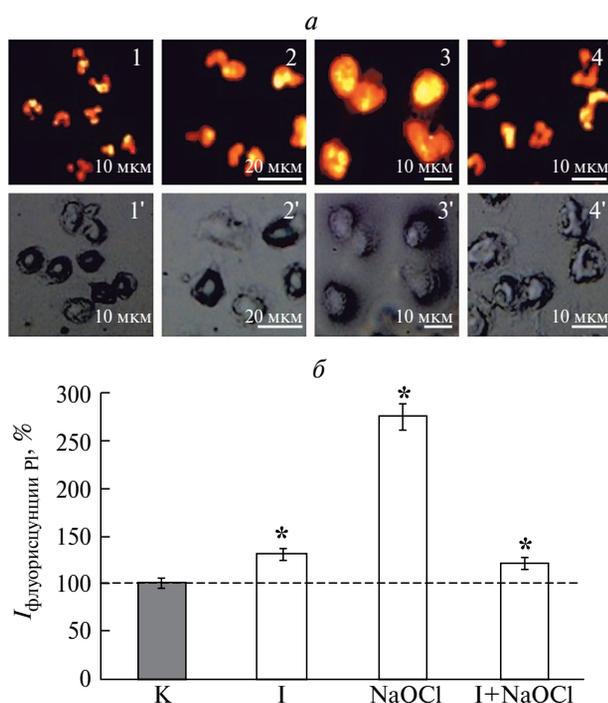
Видно, что действие на клетки клетки 300 мкМ соединения I приводит к повышению интенсивности флуоресценции PI, что свидетельствует о токсичности этого вещества. Обработка клеток NaOCl в эквимолярной концентрации (300 мкМ) вызывает снижение жизнеспособности нейтрофилов в 2.4 раза. Однако после сочетанной обработки клеток аминофенолом I и NaOCl изучаемый параметр приближается к контрольным значениям, что свидетельствует о высокой выживаемости нейтрофилов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании показано, что N-ацильные производные 2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенола со свободной гидроксильной группой в бензольном кольце, в отличие от O-метилированных, модифицируют свойства нейтрофилов, что приводит к снижению генерации хлорноватистой кислоты в процессе формирования респираторного взрыва. Эти соединения являются перехватчиками  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ , генерируемых нейтрофилами в процессе активации к фагоцитозу, и снижают секрецию МПО из клеток. Наиболее эффективным перехватчиком хлорноватистой кислоты является N-(3,5-ди-трет-бутил-2-гидроксифенил)ацетамид. Это вещество значительно подавляет секреторную дегрануляцию нейтрофилов и оказывает цитопротекторное действие в условиях галогенирующего стресса. Таким образом, N-(3,5-ди-трет-бутил-2-гидроксифенил)ацетамид можно рассматривать в качестве потенциального средства для снижения последствий галогенирующего стресса.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственной программы научных исследований «Биотехнологии-2» Министерства образования Республики Белоруссии (задание 1.6.2). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.



**Рис. 5.** Флуоресцентные изображения нейтрофилов, окрашенных йодистым пропидием (PI), необработанных (1, 2) и обработанных (3, 4) 300 мкМ NaOCl в отсутствие (1, 3) и присутствии (2, 4) 300 мкМ соединения I (а) и количественная оценка интенсивности (I) флуоресценции PI в нейтрофилах (б). Время действия вещества I и/или NaOCl 20 мин при 37 °С в растворе СБСРЭ (pH 7.4). а — Изображения 1–4 получены при длине волны возбуждения и эмиссии 532 и 630 нм соответственно, 1–4 — в проходящем свете.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

С.Г.Н.: оригинальная идея и схема экспериментов, анализ и интерпретация полученных данных, написание рукописи. Ж.И.И.: изучение генерации АФКХ нейтрофилами и секреторной дегрануляции, флуоресцентная микроскопия, интерпретация результатов. К.Е.И.: исследование жизнеспособности нейтрофилов, обсуждение результатов. С.В.Л. и К.Г.А.: химический синтез N-ацилпроизводных пространственно экранированного амина фенола. А.Н.В.: изучение влияния амина фенолов на свободнорадикальные процессы в модельных системах. К.А.В.: выделение клеток, подготовка образцов для анализа, проведение измерений. Все авторы прочитали окончательную версию рукописи и согласились с ней.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бизунок Н. А., Дубовик Б. В., Ксендзова Г. А., Сорокин В. Л., Шадыро О. И. 2011. Антиоксидантный потенциал аминсодержащих производных фенола на модели генерации активных форм кислорода фагоцитами. Известия НАН Беларуси, серия мед. наук. Т. 2011. № 4. С. 61. (Bizunok N. A., Dubovik B. V., Ksendzova G. A., Sorokin V. L., Shadyro O. I. 2011. Antioxidant potential of amino-containing phenol derivatives on the model on of reactive oxygen species generation by phagocytes. № 4. P. 61.)
- Рощупкин Д. И., Белакина Н. С., Мурина М. А. 2006. Усиленная люминолом хемилуминесценция полиморфноядерных лейкоцитов кролика: природа оксидантов, непосредственно вызывающих окисление люминола. Биофизика. Т. 51. № 1. С. 99. (Roshchupkin D. I., Belakina N. S., Murina M. A. 2006. Luminal-enhanced chemiluminescence of rabbit polymorphonuclear leukocytes: the nature of oxidants directly responsible for luminal oxidation, Biofizika. V. 51. № 1. P. 99.)
- Шадыро О. И., Сорокин В. Л., Ксендзова Г. А., Савинова О. В., Самович С. Н., Бореко Е. И. 2019. Сравнительная оценка противогерпетической активности веществ с различным механизмом действия. Химико-фарм. ж. Т. 53. № 7. С. 45. (Shadyro O. I., Sorokin V. L., Ksendzova G. A., Savinova O. V., Samovich S. N., Boreko E. I. 2019. Comparative evaluation of the antiherpes activity of compounds with different mechanisms of action. Pharm. Chem. J. V. 53. P. 646.)
- Arnhold J. 2020. The dual role of myeloperoxidase in immune response. Int. J. Mol. Sci. V. 21: 8057.
- Babior B. M. 2000. Phagocytes and oxidative stress. Am. J. Med. V. 109. P. 33.
- Bedouhène S, Dang P. M., Hurtado-Nedelec M., El-Benna J. 2020. Neutrophil degranulation of azurophil and specific granules. Methods Mol. Biol. V. 2087. P. 215.
- Böyum A. 1976. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand. J. Immunol. V. 5. P. 9.
- Da Cruz Nizer W. S., Inkovskiy V., Overhage J. 2020. Surviving reactive chlorine stress: responses of gram-negative bacteria to hypochlorous acid. Microorganisms. V. 8: 1220.
- Davies M. J., Hawkins C. L. 2020. The role of myeloperoxidase in biomolecule modification, chronic inflammation, and disease. Antioxid. Redox. Signal. V. 32. P. 957.
- Dupré-Crochet S., Erard M., Nüße O. 2013. ROS production in phagocytes: why, when, and where? J. Leukoc. Biol. V. 94. P. 657.
- Gamaley I. A., Kirpichnikova K. M., Klyubin I. V. 1994. Activation of murine macrophages by hydrogen peroxide. Cell Signal. V. 6. P. 949.
- Hawkins C. L. 2020. Hypochlorous acid-mediated modification of proteins and its consequences. Essays Biochem. V. 64. P. 75.
- Hawkins C. L., Pattison D. I., Davies M. J. 2003. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. Amino Acids. V. 25. P. 259.
- Kato F., Tanaka M., Nakamura K. 1999. Rapid fluorometric assay for cell viability and cell growth using nucleic acid staining and cell lysis agents. Toxicol. in Vitro. V. 13. P. 923.
- Kavalenka A. I., Semenkova G. N., Cherenkevich S. N. 2007. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro. Cell Tiss. Biol. V. 1. P. 551.
- Kuznetsova T., Kulahava T., Zholnerevich I., Amaegberi N., Semenkova G., Shadyro O., Arnhold J. 2017. Morphometric characteristics of neutrophils stimulated by adhesion and hypochlorite. Mol. Immunol. V. 87. P. 317.
- Lacy P. 2006. Mechanisms of degranulation in neutrophils. Allergy Asthma Clin. Immunol. V. 2. P. 98.
- Li Y., Zhu H., Kuppasamy P., Roubaud V., Zweier J. L., Trush M. A. 1998. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. J. Biol. Chem. V. 273. P. 2015.
- Liu L., Dahlgren C., Elwing H., Lundqvist H. 1996. A simple chemiluminescence assay for the determination of reactive oxygen species produced by human neutrophils. J. Immunol. Meth. V. 192. P. 173.
- Malle E., Waeg G., Schreiber R., Gröne E. F., Sattler W., Gröne H. J. 2000. Immunological evidence for the my-

- eloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/halide system in human atherosclerotic lesions. *Eur. J. Biochem.* V. 267. P. 4495.
- Mayadas T. N., Cullere X., Lowell C. A. 2014. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* V. 9. P. 181.
- Morris G., Gevezova M., Sarafian V. Maes M. 2022. Redox regulation of the immune response. *Cell Mol. Immunol.* V. 19. P. 1079.
- Nussbaum C., Klinke A., Adam M., Baldus S., Sperandio M. 2013. Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. *Antioxid. Redox Signal.* V. 18. P. 692.
- Ramachandra C. J. A., Ja K. P. M. M., Chua J., Cong S., Shim W., Hausenloy D. J. 2020. Myeloperoxidase as a multifaceted target for cardiovascular protection. *Antioxid. Redox Signal.* V. 32(15). P. 1135.
- Rizo-Téllez S. A., Sekheri M., Filep J. G. 2022. Myeloperoxidase: Regulation of neutrophil function and target for therapy. *Antioxidants.* V. 11(11). P. 2302.
- Shadyro O., Lisovskaya A., Semenkova G., Edimecheva I., Amaegberi N. 2015. Free-radical destruction of sphingolipids resulting in 2-hexadecenal formation. *Lipid Insights.* V. 8. P. 1.
- Shadyro O. I., Ksendzova G. A., Polozov G. I., Sorokin V. L., Boreko E. I., Savinova O. V., Dubovik B. V., Bizunok N. A. 2008. Synthesis and study of anti-radical and antiviral properties of aminophenol derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* V. 18. P. 2420.
- Shugar D. 1952. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 8. P. 302.
- Tzikas S., Schlak D., Sopova K., Gatsiou A., Stakos D., Stamatelopoulos K., Stellos K., Laske C. 2014. Increased myeloperoxidase plasma levels in patients with Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* V. 39. P. 557.
- Ulfig A., Leichert L. I. 2021. The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 78. P. 385.
- Zeng M. Y., Miralda I., Armstrong C. L., Uriarte S. M., Bagaitkar J. 2019. The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Mol. Oral Microbiol.* V. 34(2). P. 27.

## N-ACYL DERIVATIVES OF 2-AMINO-4,6-DI-TERT-BUTYLPHENOL — POTENTIAL PROTECTORS UNDER NEUTROPHIL-INDUCED HALOGENATING STRESS

G. N. Semenkova<sup>a</sup>, I. I. Zholnerevich<sup>b</sup>, E. I. Kovalenko<sup>b</sup>, G. A. Ksendzova<sup>c</sup>, V. L. Sorokin<sup>b</sup>,  
N. V. Amaegberi<sup>b</sup>\*, A. V. Klimovich<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Research Laboratory of the Belarusian State Medical University, Minsk, 220083, Belarus

<sup>b</sup> Belarusian State University, Minsk, 220030, Belarus

<sup>c</sup> Research Institute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk, 220030, Belarus

\*e-mail: n.amaegberi@gmail.com

The effect of N-acyl derivatives of 2-amino-4,6-di-tert-butylphenol on the functions of neutrophils was studied. It has been established that these derivatives with a free hydroxyl group in the benzene ring, in contrast to O-methylated ones, modify the properties of cells, which is expressed in a decrease in hypochlorous acid generation during the "respiratory burst" formation. These compounds are scavengers of HOCl/OCl<sup>-</sup> generated by activated neutrophils and reduce the secretion of myeloperoxidase (MPO) from cells. N-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)acetamide has been shown to be the most effective hypochlorous acid scavenger. This substance significantly suppresses the secretory degranulation of neutrophils and has a cytoprotective effect under conditions of halogenating stress.

**Keywords:** aminophenols, neutrophils, reactive oxygen and chlorine species, secretory degranulation, viability

УДК: 612.622.3:576.311.31

## ГРАНУЛЯЦИЯ ЦИТОПЛАЗМЫ ООЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА НА СТАДИИ ЗАРОДЫШЕВОГО ПУЗЫРЬКА КАК ПРЕДИКТОР СПОСОБНОСТИ К СПОНТАННОМУ СОЗРЕВАНИЮ В СТИМУЛИРОВАННЫХ ЦИКЛАХ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

© 2024 г. Д. Ф. Салимов<sup>1, \*</sup>, И. О. Боголюбова<sup>2, 3</sup>, Д. С. Боголюбов<sup>2, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Клинический институт репродуктивной медицины,  
Екатеринбург, 620014, Россия

<sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,  
Санкт-Петербург, 194100, Россия

\*E-mail: dfsalimov@mail.ru

\*\*E-mail: dbogol@mail.ru

Поступила в редакцию 01.02.2024

После доработки 25.02.2024

Принята к публикации 26.02.2024

Несмотря на то, что в программах экстракорпорального оплодотворения обычно используют зрелые ооциты, находящиеся на стадии метафазы II мейоза, возможно использование диплотенных ооцитов на стадии зародышевого пузырька (germinal vesicle, GV) после их созревания *in vitro* (in vitro maturation, IVM). Морфологическая характеристика нативных GV-ооцитов перспективна с точки зрения выявления предикторов для прогнозирования их способности к самопроизвольному созреванию в стимулированных циклах. Целью работы являлся анализ паттернов грануляции цитоплазмы GV-ооцитов, различающихся по способности к возобновлению и завершению мейотического созревания *in vitro*. Показано, что центральный паттерн грануляции негативно коррелирует со способностью GV-ооцитов к спонтанному созреванию *in vitro*.

**Ключевые слова:** ооциты человека, ядро ооцита, зародышевый пузырек, цитоплазматическая грануляция, созревание ооцитов

**Принятые сокращения:** ЭКО — экстракорпоральное оплодотворение; ИКСИ — интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида; CLCG — центрально локализованная цитоплазматическая грануляция (centrally located cytoplasmic granulation); DIC — дифференциально-интерференционный контраст (differential interference contrast); GV — зародышевый пузырек (germinal vesicle); GVBD — дезинтеграция ядерной оболочки ооцита перед делением созревания (дословно: разрушение зародышевого пузырька, germinal vesicle breakdown); IVM — созревание *in vitro* (in vitro maturation); MI/МII — метафаза I/II деления мейоза.

**DOI:** 10.31857/S0041377124030076, **EDN:** РЕНВСВ

В настоящее время не существует единой системы оценки качества ооцитов на стадии зародышевого пузырька (germinal vesicle, GV) и их потенциала к возобновлению мейоза и дальнейшему развитию. При этом изменения морфологических параметров GV-ооцитов, наряду с оценкой ооцитов на стадии метафазы II, могли бы быть критерием для оценки качества ответа на гормональную стимуляцию супер-овуляции. В литературе периодически обсуждается возможность применения незрелых ооцитов (на стадиях GV и MI) в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). В частности, показано потенциальное увеличение на 5.6% уровня живорождения

(live birth rate, LBR) при использовании GV-ооцитов (Martin-Palomino Olid et al., 2019), а также увеличение среднего количества доступных ооцитов на стадии МII, что в конечном итоге позволяет получить одну дополнительную бластоцисту на цикл. Использование GV-ооцитов, полученных в стимулированном цикле, носит название GV rescue (спасение GV-ооцитов) (Escrich et al., 2018) и может рассматриваться в качестве дополнительного источника зрелых ооцитов. Согласно опубликованным данным, GV-ооциты способны к спонтанному созреванию, достигая стадии МII, если они были выделены из фолликулов размером более 3 мм (Escrich et al., 2011). В случае стимулированных

циклов созревание GV-ооцитов происходит в 60–80% случаев в течение 30–40 ч их культивирования *in vitro* (Ortega-Hrepich et al., 2013). В то же время показатели имплантации после созревания ооцитов *in vitro* — как в стимулированном цикле (GV rescue), так и в классическом нестимулированном цикле IVM (*in vitro* maturation) — невысоки по сравнению с обычным циклом ЭКО (Gremeau et al., 2012; Das et al., 2014). Такие показатели, как количество и качество blastocyst после IVM, также ниже, нежели в цикле ЭКО (Reader et al., 2017). Это повышает актуальность выявления эффективных морфологических предикторов качества GV-ооцитов, которые позволили бы прогнозировать успешность их созревания и дальнейшего развития.

Одним из таких возможных предикторов может выступать цитоплазматическая грануляция, которая является общепризнанным морфологическим критерием оценки зрелых ооцитов в программах ЭКО (Rienzi et al., 2012). Целью настоящей работы являлся анализ зависимости между паттерном грануляции GV-ооцитов, полученных в стимулированных циклах ЭКО, и их способностью к самопроизвольному возобновлению и завершению мейоза.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Дизайн исследования.** Проведено проспективное когортное исследование с использованием ооцитов человека на стадии GV, полученных при проведении стимуляции суперовуляции в программах ЭКО. GV-ооциты не используются в программе экстракорпорального оплодотворения и подлежат утилизации или использованию в научных целях, о чем пациентки подписывали информированное согласие перед вступлением в программу ЭКО. Протокол исследования и форма информированного согласия были одобрены локальным этическим комитетом ООО «Клинический институт репродуктивной медицины» (г. Екатеринбург, Россия).

Всего в исследование было включено 123 ооцита, полученных от 64 пациенток. Каждый ооцит рассматривали как отдельный клинический случай. Все ооциты были поделены на 3 группы в зависимости от их способности к возобновлению мейоза и созреванию *in vitro* (табл. 1). В группу I вошли 90 GV-ооцитов от 55 пациенток, завершившие спонтанное созревание экстружией первого полярного тельца. В группу II включены 14 ооцитов от 12 пациенток, возобновившие созревание, но остановившиеся в развитии до выделения первого полярного тельца (блок MI). В группу III вошли 19 ооцитов от 14 пациенток, остановившиеся на стадии GV (блок GVBD).

**Таблица 1.** Анализируемые группы ооцитов

| Группа I                                 | Группа II         | Группа III          |
|--|-------------------|---------------------|
| Возобновление мейотического созревания   | Блок на стадии MI | Блок на стадии GVBD |
| Завершение первого мейотического деления |                   |                     |
| <i>n</i> = 90                            | <i>n</i> = 14     | <i>n</i> = 19       |

**Гормональная стимуляция, получение и культивирование ооцитов.** С целью контролируемой стимуляции овуляции использовали «длинные» протоколы с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ) и «короткие» протоколы с антагонистами ГнРГ. Суммарная доза гонадотропинов составляла  $\geq 1500$  МЕ. При достижении тремя и более доминантными фолликулами диаметра 17–18 мм в качестве триггера овуляции назначали хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) (Овитрель, Мерк Сероно, Италия; Прегнил, Органон, Нидерланды) или агонист ГнРГ (Декапептил; Ферринг, Германия; Диферелин; Ипсен, Франция) при росте 15 и более доминантных фолликулов. Трансвагинальную пункцию фолликулов проводили через 36 ч после назначения триггера. Собранные ооцит–кумуляционные комплексы отмывали в многоцелевой культуральной среде МНМ (Multipurpose Handling Medium Complete, Irvine, США) для работы с гаметам и эмбрионами вне инкубатора. Затем в однолуночных чашках (Nunc, США) в среде НТФ (Human tubal fluid, Irvine, США) ооцит–кумуляционные комплексы помещали на 2 ч в CO<sub>2</sub>-инкубатор (6.0% CO<sub>2</sub>; 37 °C), после чего проводили денудацию ооцитов согласно рекомендациям производителя культуральных сред путем пипетирования в растворе гиалуронидазы (hyaluronidase solution, 80 МЕ/мл, Irvine, США) с использованием стерильных капилляров диаметром 170 мкм и 140 мкм (Origio Inc, США). Затем после трехкратной отмывки в МНМ оценивали стадии зрелости ооцитов с использованием инвертированного микроскопа Nikon Ti (Nikon, Япония) с установленной системой модуляционного (рельефного) контраста Хоффмана. Ооциты с одним полярным тельцем оценивали как ооциты на стадии MII (Rienzi et al., 2012) и использовали в дальнейшем в программе ЭКО + ИКСИ при бесплодии. Ооциты без полярного тельца и с интактным ядром (GV) использовали для научных целей. Для этого GV-ооциты в среде НТФ помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (6.0% CO<sub>2</sub>, 37 °C) в культуральных чашках с микролунками (Vitrolife, Швеция) и проводили серийную съемку с временным интервалом (time lapse) с частотой 1 кадр в 10 мин на протяжении следующих 48 ч культивирования. Для оценки

морфодинамических параметров созревания ооцитов оценивали следующие показатели: время начала разрушения зародышевого пузырька (germinal vesicle breakdown, GVBD) ( $T_{GVBD}$ , мин) и время начала экструзии первого полярного тела ( $T_{PBEX}$ , мин).

**Определение паттерна грануляции.** Для оценки паттерна грануляции использовали дифференциальную интерференционно-контрастную (DIC) микроскопию (Nikon Eclipse Ti-U, поляризатор T-P2, объектив 40×/0.60 DIC Plan Fluor, Япония), ооциты при этом находились в культуральных чашках со стеклянным дном (WilCoDish, США). При микроскопии качественную оценку всех GV-ооцитов проводили два независимых оператора; визуально отмечали наличие четко выраженной гранулированной области.

**Статистическая обработка данных.** Для статистического анализа данных использовали пакеты прикладных программ IBM SPSS Statistics v.20.0. Статистическую достоверность различий между частотой встречаемости разных паттернов грануляции в анализируемых группах ооцитов оценивали с помощью критерия  $\chi^2$  с поправкой Йетса и точного критерия Фишера. Морфодинамические показатели ооцитов тестировали на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Учитывая, что распределение у части количественных признаков достоверно отличалось от нормального, статистический анализ проводили с помощью непараметрических критериев. Данные представлены в виде медианы (М) и границ межквартильного интервала: М (25% ÷ 75%). Статистическую достоверность различий между морфодинамическими показателями

ооцитов оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

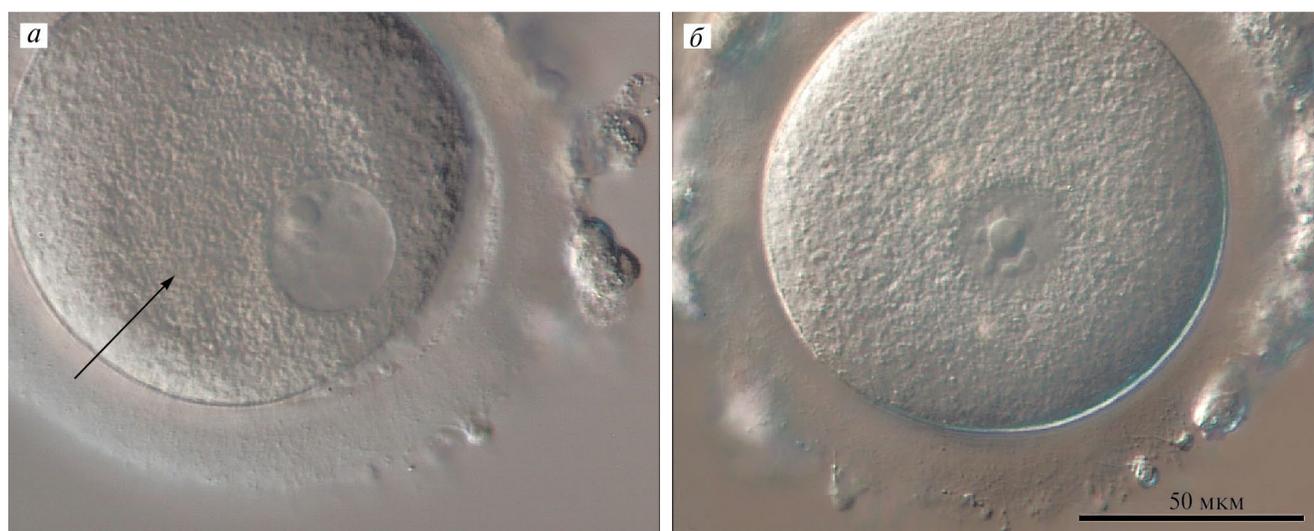
## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате прижизненной микроскопии GV-ооцитов наблюдали два основных типа локализации цитоплазматической грануляции: паттерн А — четко выраженная перинуклеарная область грануляции; паттерн Б — гомогенно распределенная по всей цитоплазме грануляция. Репрезентативные изображения ооцитов с разными паттернами грануляции представлены на рис. 1.

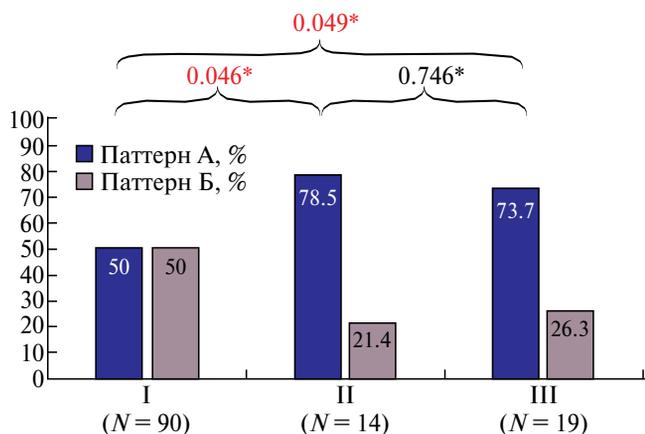
Частота встречаемости GV-ооцитов с различными паттернами грануляции в группах, различающихся по своим способностям к возобновлению и завершению мейотического созревания, представлена на рис. 2.

GV-ооциты, возобновившие мейоз и завершившие созревание выбросом первого полярного тельца (группа I), только в 50.0% случаев имели перинуклеарный тип грануляции (паттерн А), тогда как в группах II и III этот паттерн грануляции встречался в 78.6% ( $p = 0.046$ ) и 73.7% ( $p = 0.049$ ) случаев соответственно. Отмеченные выше различия статистически достоверны. В то же время частота встречаемости ооцитов с разными паттернами грануляции в группе II и группе III достоверно не различается.

Морфодинамические показатели GV-ооцитов представлены в табл. 2. Время до вступления в GVBD в группе II статистически достоверно больше, чем в группе I. Среди всех GV-ооцитов, вступивших



**Рис. 1.** GV-ооциты с различными паттернами грануляции. а — Паттерн А с четко выраженной перинуклеарной областью грануляции в цитоплазме (отмечена стрелкой); б — паттерн Б с гомогенно распределенной по всей цитоплазме грануляцией.



**Рис. 2.** Процентное соотношение паттернов грануляции А и Б в исследуемых группах GV-ооцитов. (\*) — Различия статистически достоверны,  $p < 0.05$ .

в созревании и закончивших его выбросом полярного тела (группа I), время от начала GVBD до выброса первого полярного тела составило 995 (930–1077) мин, что составляет примерно 16.6 ч.

**Таблица 2.** Временные характеристики созревания GV-ооцитов в анализируемых группах

| Время T, мин                                       | Группа I         | Группа II          | Группа III |
|--|------------------|--------------------|------------|
| T <sub>GVBD</sub> (до GVBD)                        | 220.5* (106–454) | 1478.0* (551–3415) | —          |
| T <sub>РВЕХ</sub> (до экстррузии полярного тельца) | 995.0 (930–1077) | —                  | —          |

\*Различия между группами I и II достоверны ( $p = 0.00001$ )

### ОБСУЖДЕНИЕ

Выраженная грануляция центральной части цитоплазмы, наблюдаемая в некоторых ооцитах человека на стадии МII, первоначально была описана Сералем с соавторами (Serhal et al., 1997), которые, однако, не вводили какого-либо специального термина и/или аббревиатуры для этой морфологической особенности женских половых клеток. В настоящее время центрально локализованная цитоплазматическая грануляция (centrally located cytoplasmic granulation, CLCG) рассматривается как одна из наиболее часто встречающихся морфологических аномалий ооцитов человека на стадии МII и широко обсуждается в литературе в связи с неблагоприятными исходами IVF (Kahraman et al., 2000; Merviel et al., 2017; Yi et al., 2019; Sun et al., 2022; Zhang et al., 2022; Wang et al., 2023). Хотя изначально CLCG была описана для ооцитов, находящихся на стадии МII, в которых она в полном соответствии со своим названием располагается в центре клетки (Serhal et al., 1997),

позднее этот термин был использован и для ранних эмбрионов человека в период дробления (Sun et al., 2022). Можно полагать, что описанный нами для GV-ооцитов паттерн А — с четко выраженной перинуклеарной областью грануляции в цитоплазме — соответствует CLCG в МII-ооцитах.

Вопрос о механизмах формирования цитоплазматической грануляции в ооцитах до сих пор можно считать открытым, несмотря на выраженный интерес клинических эмбриологов к этой морфологической аномалии. Анализ литературы позволяет полагать, что в основе гетерогенной грануляции цитоплазмы ооцитов при сходных морфологических проявлениях могут лежать совершенно разные субклеточные механизмы. В частности, некоторые авторы (Rienzi et al., 2012) указывают на необходимость различать грануляцию цитоплазмы, визуализация которой зависит от настроек оптической системы при световой микроскопии, и грануляцию, обусловленную кластеризацией органелл.

Особое внимание уделяется возможной роли митохондрий в формировании цитоплазматической грануляции ооцита (Van Blerkom, Runner, 1984; Wilding et al., 2001). Выделяют два паттерна распределения митохондрий: гомогенный (равномерное распределение) и гетерогенный (центральная или перинуклеарная локализация) (Sun et al., 2001; Wilding et al., 2001). Считается, что более ранний — гомогенный — паттерн распределения митохондрий в процессе роста и созревания ооцита сменяется на гетерогенный перинуклеарный паттерн (Sánchez et al., 2015). Предположительная причина такой смены локализации митохондрий — более высокие потребности в АТФ для обеспечения процессов GVBD и формирования веретена деления (Van Blerkom, Runner, 1984; Yu et al., 2010). Обнаружено, что в GV-ооцитах, не компетентных к вступлению в созревание, митохондрии локализируются вокруг ядра достоверно реже (Sánchez et al., 2015). Однако более поздние исследования показали, что динамика митохондрий в ооцитах может иметь более сложный характер: сначала действительно происходит смена их гомогенного распределения на центральную локализацию, но затем, непосредственно перед GVBD, распределение митохондрий вновь быстро приобретает гомогенный характер (Takahashi et al., 2016).

Вероятно, смена гетерогенной грануляции на гомогенную обусловлена завершающейся подготовкой к началу редукционного деления и связанными с этим потребностями в синтезе ферментных систем, а также белков цитоскелета и сократительного аппарата веретена деления (Van Blerkom, Runner, 1984;

Yu et al., 2010). С этим предположением хорошо согласуется зарегистрированное нами увеличение времени до начала GVBD в группе II, то есть в ооцитах, развитие которых остановилось на стадии MI. Можно предполагать, что в использованных нами GV-ооцитах, полученных в стимулированных циклах, разные паттерны грануляции также определяются особенностями распределения митохондрий. Однако это предположение требует дальнейшей проверки, например, с помощью электронной микроскопии или специфических маркеров митохондрий.

Наши результаты указывают на возможность использовать паттерн грануляции цитоплазмы в качестве предиктора созревания *in vitro* GV-ооцитов, полученных в стимулированных циклах. Ооциты с центральной локализованной (перинуклеарной) грануляцией (паттерн А) реже вступают в созревание по сравнению с ооцитами с равномерно распределенной грануляцией (паттерн Б). При этом необходимо отметить, что для ооцитов человека, используемых в программах классического IVM (без использования гормональной стимуляции), показана обратная зависимость (Sánchez et al., 2015). В GV-ооцитах, не компетентных к возобновлению и завершению мейоза, митохондрии концентрируются вокруг ядра достоверно реже. Это противоречие, по-видимому, можно объяснить различной динамикой развития ооцитов, получаемых в классических и стимулированных циклах IVM. Тем не менее, учитывая сложную динамику перераспределения митохондрий в цитоплазме развивающихся ооцитов, для прогнозирования успешности их мейотического созревания паттерн грануляции следует использовать в сочетании с другими морфологическими предикторами, например со степенью конденсации хроматина в GV (Salimov et al., 2023).

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа частично выполнена в рамках бюджетного финансирования Института цитологии РАН (тема FMFU-2024-0012).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры соответствовали Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым этическим стандартам. От каждого участника, включенного в исследование, было получено информированное письменное согласие. Исследование одобрено протоколом заседания локального этического комитета ООО «Клинический институт репродуктивной медицины» от 3 марта 2021 г.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Das M., Son W. Y., Buckett W., Tulandi T., Holzer H. 2014. In vitro maturation versus IVF with GnRH antagonist for women with polycystic ovary syndrome: treatment outcome and rates of ovarian hyperstimulation syndrome. *Reprod. Biomed Online*. V. 29. P. 545.
- Escrich L., Galiana Y., Grau N., Insua F., Soler N., Pellicer A., Escrivá M. 2018. Do immature and mature sibling oocytes recovered from stimulated cycles have the same reproductive potential? *Reprod. Biomed. Online*. V. 37. P. 667.
- Escrich L., Grau N., Mercader A., Rubio C., Pellicer A., Escrivá M. 2011. Spontaneous in vitro maturation and artificial activation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *J. Assist. Reprod. Genet.* V. 28. P. 111.
- Greteau A. S., Andreadis N., Fatum M., Craig J., Turner K., McVeigh E., Child T. 2012. In vitro maturation or in vitro fertilization for women with polycystic ovaries? A case — control study of 194 treatment cycles. *Fertil. Steril.* V. 98. P. 355.
- Kahraman S., Yakin K., Dönmez E., Samli H., Bahçe M., Cengiz G. 2000. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* V. 15. P. 2390.
- Martin-Palomino Olid N., García D., Rodríguez A., Vassena R. 2019. Could fertility clinics offer a sizable improvement of live birth rates by maturing post-GVBD oocytes in vitro? *J. Assist. Reprod. Genet.* V. 36. P. 1927.
- Merviel P., Cabry R., Chardon K., Haraux E., Scheffler F., Mansouri N. B. 2017. Impact of oocytes with CLCG on ICSI outcomes and their potential relation to pesticide exposure. *J. Ovarian Res.* V. 10. P. 42.
- Ortega-Hrepich C., Stoop D., Guzmán L., Van Landuyt L., Tournaye H., Smits J., De Vos M. 2013. A 'freeze-all' embryo strategy after in vitro maturation: a novel approach in women with polycystic ovary syndrome? *Fertil. Steril.* V. 100. P. 1002.
- Reader K. L., Stanton J. L., Juengel J. L. 2017. The role of oocyte organelles in determining developmental competence. *Biology (Basel)*. V. 18: 35.
- Rienzi L., Balaban B., Ebner T., Mandelbaum J. 2012. The oocyte. *Hum. Reprod.* V. 27. No. S1. P. i2.
- Salimov D., Lisovskaya T., Otsuki J., Gzgzyan A., Bogolyubova I., Bogolyubov D. 2023. Chromatin morphology in human germinal vesicle oocytes and their competence to mature in stimulated cycles. *Cells*. V. 12: 1976.
- Sánchez F., Romero S., De Vos M., Verheyen G., Smits J. 2015. Human cumulus-enclosed germinal vesicle oocytes from early antral follicles reveal heterogeneous cellular and molecular features associated with in vitro maturation capacity. *Hum. Reprod.* V. 30. P. 1396.
- Serhal P. F., Ranieri D. M., Kinis A., Marchant S., Davies M., Khadum I. M. 1997. Oocyte morphology predicts outcome

- of intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* V. 12. P. 1267.
- Sun F., Cun J., Huang R., Chen Y., Verwoerd G., Yu Y. 2022. Different occurrence rates of centrally located cytoplasmic granulation in one cohort oocytes show distinctive embryo competence and clinical outcomes. *Reprod. Biol.* V. 22. P. 100649.
- Takahashi Y., Hashimoto S., Yamochi T., Goto H., Yamanaka M., Amo A., Matsumoto H., Inoue M., Ito K., Nakaoka Y., Suzuki N., Morimoto Y. 2016. Dynamic changes in mitochondrial distribution in human oocytes during meiotic maturation. *J. Assist. Reprod. Genet.* V. 33. P. 929.
- Van Blerkom J., Runner M. N. 1984. Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. *Am. J. Anat.* V. 171. P. 335.
- Wang Y., Chen D., Cai B., Huang D., Xu Y., Ding C. 2023. Effects of different oocyte cytoplasmic granulation patterns on embryo development and euploidy: a sibling oocyte control study. *Arch. Gynecol. Obstet.* V. 308. P. 1593.
- Wilding M., Dale B., Marino M., di Matteo L., Alviggi C., Pisaturo M. L., Lombardi L., de Placido G. 2001. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* V. 16. P. 909.
- Yi X. F., Xi H. L., Zhang S. L., Yang J. 2019. Relationship between the positions of cytoplasmic granulation and the oocytes developmental potential in human. *Sci. Rep.* V. 9: 7215.
- Yu Y., Dumollard R., Rossbach A., Lai F. A., Swann K. 2010. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *J. Cell Physiol.* V. 224. P. 672.
- Zhang L., Zeng L., Liu H., Jia H., Wu Y., He C. 2022. Effects of oocyte cytoplasmic central granulation on embryonic development, blastocyst formation, and pregnancy outcome in assisted reproductive technology and its mechanism. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* V. 68. P. 161.

## CYTOPLASMIC GRANULATION OF HUMAN OOCYTES AT THE GERMINAL VESICLE STAGE AS A PREDICTOR OF THEIR ABILITY TO SPONTANEOUS MATURATION IN STIMULATED CYCLES OF IN VITRO FERTILIZATION

D. F. Salimov<sup>a, \*</sup>, I. O. Bogolyubova<sup>b, c</sup>, D. S. Bogolyubov<sup>b, \*\*</sup>

<sup>a</sup>Clinical Institute of Reproductive Medicine, 620014, Yekaterinburg, Russia

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

<sup>c</sup>St. Petersburg State Pediatric Medical University, 194100, St. Petersburg, Russia

\* e-mail: dfsalimov@mail.ru

\*\* e-mail: dbogol@mail.ru

Although in vitro fertilization (IVF) programs usually use mature (metaphase II, MII) oocytes, it is also possible to use diplotene oocytes at the germinal vesicle (GV) stage after their in vitro maturation (IVM). Morphological characteristics of native GV oocytes are promising predictors their capacity of spontaneous maturation in stimulated cycles. The purpose of this work was to analyze the patterns of cytoplasmic granulation of GV oocytes that differ in their ability to resume and complete meiotic maturation in vitro. It has been shown that the central granulation pattern negatively correlates with the ability of GV oocytes to spontaneously mature in vitro.

**Keywords:** human oocytes, oocyte nucleus, germinal vesicle, cytoplasmic granulation, oocyte maturation

УДК 57.085.23, 57.085.25

## IN VITRO СКРИНИНГ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЭХИНОХРОМА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЛАЗ

© 2024 г. Э. И. Александер-Синклер<sup>1,\*</sup>, С. А. Александрова<sup>1</sup>, Д. М. Дарвиш<sup>1</sup>, Н. В. Едоменко<sup>1</sup>, В. И. Горбач<sup>2</sup>, А. О. Кравченко<sup>2</sup>, И. М. Ермак<sup>2</sup>, Н. А. Михайлова<sup>1</sup>, М. И. Блинова<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, 690022, Россия

\*E-mail: elga.aleks@gmail.com

Поступила в редакцию 15.08.2022

После доработки 28.11.2023

Принята к публикации 01.03.2024

Важной задачей местного применения лекарств для лечения глаз является достижение компромисса между их эффективностью и безопасностью. Разработка новых многофункциональных местных офтальмологических систем доставки лекарств и скрининг *in vitro* потенциальных лекарственных глазных средств являются ключевыми направлениями в решении этой задачи. В настоящем исследовании был проведен первичный *in vitro* скрининг влияния эхинохрома (Ech), комплекса каррагинана (CRG) и Ech и его липосомной формы (CRG/Ech-Lip) на культивируемые эпителиальные клетки наружной оболочки глазного яблока — клетки эпителия конъюнктивы (Chang Conjunctiva, Clone 1—5c-4) и эпителия роговицы человека (HCE). Оценивали жизнеспособность клеток по их морфологии и метаболической активности с использованием световой микроскопии и МТТ-теста. Выявлена прямая зависимость интенсивности проявления цитотоксического действия Ech относительно его концентрации в питательной среде, формы использования, клеточной тест-системы и времени воздействия Ech на клетки. Ech в форме спиртового раствора в питательной среде в конечной концентрации 0.1 мг/мл проявляет выраженную цитотоксичность в отношении обеих клеточных тест-систем. Такая же концентрация Ech в питательной среде в составе комплекса CRG/Ech оказалась критичной только для жизнеспособности эпителиальных клеток роговицы, в то время как выживаемость клеток конъюнктивы в этом случае составляла около 50%. Выявлена высокая биосовместимость липосомной формы каррагинанового комплекса эхинохрома CRG/Ech-Lip с клетками обеих тест-систем и стимулирующее цитопротекторное действие в отношении клеток эпителия конъюнктивы.

**Ключевые слова:** каррагинан, эхинохром, каррагинановый комплекс эхинохрома, липосомы, системы доставки офтальмологических препаратов, цитотоксичность, клеточные культуры, эпителий глазной поверхности

**Принятые сокращения:** CRG — каррагинан; CRG/Ech — каррагинановый комплекс эхинохрома; CRG/Ech-Lip — липосомная форма комплекса CRG/Ech; Ech — эхинохром; Lip — липосомы.

**DOI:** 10.31857/S0041377124030085, **EDN:** PEBSAD

Заболевания глаз представляют собой обширный спектр разнородной патологии, поэтому для их лечения используют различные методы и средства. Многие глазные заболевания удается вылечить при помощи консервативного лечения. Для этого широко используются различные группы лекарственных средств местного применения: глазные капли, мази, иногда инъекции в ткани, окружающие глазное яблоко (Егоров, 2004). Тем не менее оптимальная рациональная фармакотерапия в офтальмологии до настоящего момента является проблемой из-за сложной природы и структуры глаза. Большинство лекарств для лечения заболевания переднего отрезка глаза применяется в виде глазных капель. Они

удобны в применении, однако быстро удаляются из конъюнктивальной полости. Время поглощения лекарства составляет всего несколько минут, при этом биодоступность лекарства очень низка. В итоге для достижения терапевтического эффекта требуется несколько применений в день. При заболеваниях заднего отдела глаза в большинстве случаев применяют интравитреальное введение высоких доз препаратов. Постоянное или непрерывное применение высоких концентраций лекарственных средств в течение определенного периода времени, необходимое для достижения терапевтического эффекта, сопряжено с риском возникновения побочных эффектов (Seyfoddin et al., 2010; Лепарская

и др., 2011). Достижение высоких терапевтически обусловленных концентраций препарата без повреждения поверхности глаза и других нежелательных реакций организма является важной задачей при лечении глаз (Mishra et al., 2011). На мировом фармацевтическом рынке представлено большое количество офтальмологических лекарственных средств и ежегодно появляются новые. Для возможности осуществления рационального выбора Всемирной Организацией Здравоохранения был разработан ряд критериев оценки лекарственных средств. Среди этих критериев, помимо эффективности и стоимости, важное место занимают биодоступность, приемлемость и безопасность (Фитилев и др., 2017). С учетом этих критериев в настоящее время активно разрабатываются как новые лекарственные средства, так и совершенствуются лекарственные формы уже используемых средств. Одним из таких способов совершенствования является разработка многофункциональных систем доставки лекарств.

Эхинохром (Ech) является одним из самых распространенных и наиболее фармакологически изученных хиноидных пигментов морских ежей, из панцирей и перивисцеральной жидкости которых он впервые был получен в 1883 г., а строение его молекулы установлено в 1939 г. (Anderson et al., 1969; Thomson, 1971). Несмотря на столь долгую историю, Ech, благодаря своим свойствам, остается флагманом в разработке новых лекарственных препаратов на основе морских продуктов (Ковалев и др., 2016; Kim et al., 2021). Исследования последних десятилетий демонстрируют, что Ech обладает антиоксидантными, противомикробными, противовирусными, противовоспалительными, противоопухолевыми и хелатирующими свойствами. Все это делает Ech интересным объектом для создания на его основе новых лекарственных препаратов для терапии широкого спектра заболеваний: офтальмологических, сердечно-сосудистых, цереброваскулярных, воспалительных, метаболических, онкологических и т. д. (Тедеева и др., 2014; Талалаева и др., 2017). В 1999 г. в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН на основе гидрофобного Ech разработаны лекарственные средства инъекционной формы серии Гистохром®, которые уже показали свою эффективность при лечении различных заболеваний, в том числе кардиологических и офтальмологических (Elyakov et al., 2002, 2004, 2007). Однако инъекционная форма препарата не всегда является оптимальной для его использования в клинической практике. Учитывая разнообразие вызываемых Ech терапевтических эффектов, перспективным становится создание новых

неинвазивных лекарственных форм на его основе. В то же время следует отметить, что еще одним препятствием для широкого применения Ech является его окисление и плохая растворимость. При разработке новых лекарственных форм Ech следует учитывать различные компоненты, которые могут быть использованы для повышения его растворимости и биодоступности при сохранении или усилении его фармакологических свойств (Kim et al., 2021).

Ранее было показано, что включение Ech в гранулы каррагинана (CRG) защищает его от окислительного разрушения (Yermak et al., 2021). CRG представляют собой семейство водорастворимых линейных сульфатированных галактанов, экстрагированных из красных водорослей, и ценятся за структурное разнообразие, связанное с большим набором физико-химических свойств и биологической активности. Они состоят из чередующихся G-звеньев (3-связанных  $\beta$ -D-галактопираноз) и D-звеньев (4-связанных  $\alpha$ -D-галактопираноз) или DA-звеньев (4-связанных 3,6-ангидро- $\alpha$ -D-галактопираноз), образующих дисахаридное повторяющееся звено CRG. Наиболее распространенные типы CRG называются каппа-, йота- и лямбда-CRG на основе структуры основных повторяющихся единиц дисахарида (Knutsen et al., 1994). У CRG многообещающее будущее в фармацевтической промышленности. Они уже включены в Европейскую фармакопею 7.0 (EP7.0), Британскую фармакопею 2012 (BP2012) и Фармакопею США 35 — Национальный формуляр 30 S1 (USP35-NF30 S1) (Knutsen et al., 1994). Известно, что фармацевтические полимеры в течение нескольких десятилетий успешно используются для создания новых мукоадгезивных лекарственных форм, в том числе и офтальмологических, с целью оптимизации доставки лекарств во время лечения глазных патологий (Khutoryanskiy, 2011). Предложено использовать CRG и в офтальмологической композиции (Lang et al., 1993).

В исследованиях *in vivo* и *in vitro* было показано, что гелеобразная смесь природных полисахаридов геллановой камеди и каппа-CRG успешно взаимодействует с катионами слезной жидкости и длительное время остается на поверхности глаза. Кроме того, показана ее безопасность на офтальмологическом уровне и способность контролировать высвобождение лекарственного средства. Полученные данные свидетельствуют о высоком потенциале использования природных полисахаридов в составе офтальмологических препаратов, особенно тех, которые необходимо вводить часто для достижения эффективности (Fernández-Ferreiro et al., 2015).

Еще одним перспективным направлением фармацевтических технологий в области разработки форм направленной доставки лекарственных средств является наноструктурное направление. Для производства нанофармпрепаратов могут применяться различные наноструктурные компоненты: дендримеры, нанокристаллы, мицеллы, полимерные наночастицы, липосомы. Липосомы — одни из наиболее исследованных наночастиц, которые рассматривают в качестве эффективных средств доставки различных препаратов с минимальными побочными эффектами (Мельникова и др., 2018; Kaldybekov et al., 2018). Активному развитию этого направления послужило сходство липосом с клеточной мембраной и способность включать в себя самые разные вещества практически без каких-либо ограничений в отношении их химической природы, свойств и размера молекул (Tang et al., 2009). Положительным моментом является также тот факт, что заключенные в липосомы препараты высвобождаются постепенно, в нужных дозах и в течение требуемого промежутка времени. Это делает возможной контролируемую адресную доставку и повышает биодоступность лекарственного средства (Барсуков, 1998; Kaldybekov et al., 2018).

Липосомные препараты уже успешно используются в различных областях медицины при наружном и системном применении. Использование липосом в качестве средств доставки лекарственных препаратов для местного лечения заболеваний глаз также является актуальным, т. к. препараты, включенные в липосомы, обеспечивают значительно большую концентрацию лекарственного средства в средах глаза по сравнению с растворами. В связи с этим различные офтальмологические препараты (антибиотики, антимиотики, противовирусные препараты, иммунодепрессанты, антиметаболиты) были исследованы в липосомной форме (Schaffer, Krohn, 1982; Pleyer et al., 1991; Ebrahim et al., 2005; Nurul Alimah et al., 2013; Аляутдин и др., 2014). В настоящее время известны такие липосомные препараты для лечения заболеваний переднего отрезка глазного яблока, как липосомный баларпан (протектор роговицы глаза) и липосомная форма циклоспорина — циклолип (иммунодепрессант). Для фотодинамической терапии в офтальмологии применяют липосомную форму вертепорфина визудин (Лепарская и др. 2011).

Однако, несмотря на то что липосомы полностью биоразлагаемы и относительно нетоксичны, до недавнего времени существовал ряд ограничений возможности широкого применения их в терапевтических целях. Одним из основных ограничений является

вопрос об их химической и физической стабильности: липосомы могут стать нестабильными как из-за гидролиза или окисления составляющих их ненасыщенных липидов, так и из-за утечки лекарственного средства (Agarwal et al., 2016). Следует отметить, что покрытие липосом различными полимерами может значительно улучшить также и долговременную стабильность самих липосом (Adamczak et al., 2017).

Ранее нами была показана возможность включения в липосомы водонерастворимого Ecb в составе его комплекса CRG/Ecb, для создания которого были использованы анионные сульфатированные полисахариды красных водорослей (Yermak et al., 2018). Липосомные лекарственные формы, как правило, отличаются меньшей токсичностью, возможностью адресной доставки лекарственного средства и меньшим риском развития нежелательных реакций. Вместе с тем увеличение сложности структуры лекарственного средства, как следствие приводит к увеличению числа критических точек производства, а также к расширению списка параметров, подлежащих контролю (Мельникова и др., 2018). Независимо от предполагаемых целей дальнейшего применения, любое новое химическое соединение должно быть охарактеризовано с точки зрения его биологической активности и возможной токсичности. В первую очередь это касается потенциальных лекарственных средств (Киселев и др. 2006).

В офтальмологии вопрос безопасности лекарственного средства требует особого внимания, так как при местном введении препаратов в конъюнктивальную полость происходит их непосредственное воздействие на эпителий конъюнктивы и роговицы (Александрова и др., 2015). Данные экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют, что длительное применение местных препаратов может вызывать нежелательные изменения глазной поверхности (Pellegrini et al., 2014). Поэтому достижение компромисса между эффективностью и безопасностью является важной задачей местного применения лекарств при лечении глаз.

В течение многих лет в разработках и исследованиях офтальмологических препаратов и систем их доставки приоритетными являются эксперименты *in vivo* на животных. Однако исследования, проводимые с использованием животных моделей, нельзя считать корректными из-за анатомо-биохимических различий глаза человека и животных. Кроме того, они имеют этические ограничения и высокую стоимость. Поэтому в последние годы разрабатывается множество альтернативных методов для точной оценки токсичности и эффективности офтальмологических

препаратов (Shafaie et al., 2016; Lieto et al., 2022; Van Meenen et al., 2022). Целый ряд новых возможностей напрямую связан с развитием клеточных технологий. В частности, стратегию на основе культивируемых клеток человека успешно используют для создания эквивалентов тканей глазной поверхности разных уровней сложности, которые могут быть использованы в качестве потенциальных моделей *in vitro* для исследования механизмов реэпителизации глазной поверхности и скрининга фармакологических и токсикологических свойств лекарственных препаратов (Rönkkö et al., 2016). Монослойные культуры клеточных линий человека хорошо зарекомендовали себя для первичного скрининга токсичности. Их преимущества включают в себя скорость, низкую стоимость, воспроизводимость результатов и возможность сравнить их с данными обширной литературы (Bonneau et al., 2022; Lieto et al., 2022).

Целью данного исследования был первичный скрининг с использованием клеточных тест-систем *in vitro* потенциальных систем доставки Ech (комплексов CRG/Ech и его липосомной формы CRG/Ech-Lip), разрабатываемых для местной терапии заболеваний глаз, позволяющий получить сведения об их влиянии на эпителиальные клетки наружной оболочки глазного яблока человека.

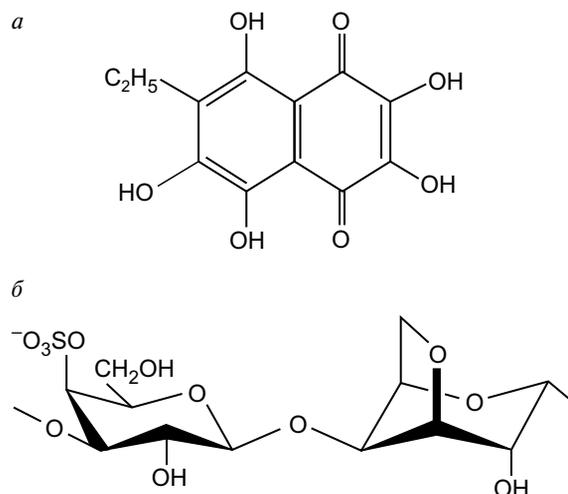
## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Объектом исследования** служили комплекс CRG/Ech, его липосомная форма CRG/Ech-Lip и отдельные структурные компоненты, используемые при разработке этих систем: Ech, этанол, CRG, липосомы. Ech — стандартизированное вещество (2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон) (рис. 1а), регистрационный номер в РФ Р N002362/01 (Российский государственный реестр лекарственных средств по состоянию на 5 декабря 2016 г., часть 2), был получен в виде порошка в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН. Исходный раствор (10 мг/мл) готовили в 96 %-ном этаноле. Использовали этанол качества Medical Grade. CRG экстрагирован из красной водоросли *Chondrus armatus* (семейство *Gigartinales*), разделен на фракции в 4 %-ном KCl с последующим центрифугированием и отделением желирующего слоя (нерастворимой фракции) от нежелирующего (растворимой фракции). Растворимую в KCl фракцию очищали от низкомолекулярных примесей фильтрованием через мембрану Vivaflow200 (Sartorius, Германия) с размером пор по мол. массе 100 кДа. Строение растворимого в KCl полисахара

ряда исследовали методами ЯМР-спектроскопии ( $^{13}\text{C}$ -ЯМР, спектрометр DRX 500; Bruker, Германия) и ИК-Фурье-спектроскопии (спектрометр Equinox 55; Bruker, Германия). Полученные спектры сравнивали со спектрами полисахаридов, выделенных ранее из этих видов водорослей (Yermak et al., 1999). Согласно полученным данным, выделенный полисахарид представляет собой каппа-CRG, молекулярная структура которого показана на рис. 1б.

В работе использовали лиофилизированный CRG. Исходный раствор готовили растворением лиофилизата CRG в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) в концентрации 10 мг/мл. Комплекс CRG/Ech получали путем смешивания исходных растворов CRG и Ech в соотношении 10:1. При смешивании эти компоненты вступают во взаимодействие по ионному механизму, а также посредством межмолекулярных водородных связей. Взаимодействие CRG и Ech с образованием комплекса подтверждено ранее спектрофотометрически (Yermak et al., 2017).

Липосомы получены из растворов яичного лецитина и холестерина в смеси хлороформа и метанола с использованием стандартной тонкопленочной гидратации и метода обработки ультразвуком, как описано ранее (Yermak et al., 2018). Для уменьшения гетерогенности липосом использовали метод экструзии, пропуская их через мембраны с порами 0.4 мкм. Полученную полидисперсную суспензию частиц со средним гидродинамическим диаметром  $430.3 \pm 29.8$  нм лиофилизировали. Для получения липосомной формы комплекса (CRG/Ech-Lip) водный раствор комплекса CRG/Ech помещали в липосомы стандартным тонкопленочным методом



**Рис. 1.** Структура эхинохрома (Ech, а) и дисахаридного повторяющегося звена каппа-карагинана ( $\kappa$ -CRG, б).

вслед за сонификацией (Yermak et al., 2018). Путем экструзии получали полидисперсную суспензию частиц CRG/Ech-Lip со средним гидродинамическим диаметром  $419.5 \pm 12.0$  нм. Суспензию лиофильно высушивали в течение 12 ч.

Концентрацию содержащихся в липосомах действующих веществ (CRG и Ech) определяли следующим образом. Высушенные CRG/Ech-Lip суспендировали в воде и добавляли к суспензии *n*-бутанол. Затем смесь подкисляли 3 М раствором HCl, встряхивали, выдерживали 10 мин на ультразвуковой бане и центрифугировали 20 мин при 15000 *g*. Верхний бутанольный слой использовали для определения концентрации Ech спектрофотометрически (спектрофотометр Unicam 2 UV/VIS, Великобритания) по спектрам поглощения при 468 нм по калибровочной кривой. Для определения концентрации CRG липосомы суспендировали в воде и определяли содержание полисахарида фенол-серным методом, используя галактозу в качестве стандарта, согласно протоколу (DuBois et al., 1956). В соответствии с полученными данными, в лиофилизованном комплексе CRG/Ech-Lip содержится 15.4 % CRG и 1.2 % Ech.

Перед проведением исследований анализируемые вещества стерилизовали. Стерилизацию лиофилизованного CRG проводили озонированием в течение 1 ч 30 мин. Лиофилизованные липосомы и CRG/Ech-Lip стерилизовали УФ-облучением в течение 15 мин. Этанол и раствор Ech не стерилизовали.

CRG и Ech анализировали в диапазоне концентраций 0.016–1.0 мкг/мл (табл. 1). Рабочие растворы получали путем разбавления исходных растворов соответствующим количеством питательной среды. Для оценки влияния этанола, входящего в состав Ech в качестве растворителя, исследовали растворы этанола в диапазоне концентраций, эквивалентных раствору Ech. Для приготовления комплекса CRG/Ech исходный раствор CRG в PBS разбавляли питательной средой для получения растворов с концентрациями 1.0 и 0.1 мг/мл. Затем исходный раствор Ech в этаноле добавляли к соответствующим растворам CRG, доводя концентрацию Ech до 0.1 и 0.01 мг/мл при соотношении CRG/Ech в каждом растворе — 10:1; содержание этанола в этих растворах составляло 1 и 0.1 % соответственно (табл. 2). Смесь растворов CRG и Ech инкубировали в течение 30 мин. Для скрининга липосом и CRG/Ech-Lip лиофилизаты разводили питательной средой до получения следующих концентраций: 0.1, 0.5 и 1 мг/мл. Содержание CRG и Ech в CRG/Ech-Lip, согласно полученным данным и расчетам, приведено в табл. 3.

**Таблица 1.** Концентрации исследуемых веществ

| Вещество        | Концентрация |       |       |       |      |     |     |
|-----------------|--------------|-------|-------|-------|------|-----|-----|
|                 | 0.016        | 0.031 | 0.062 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1.0 |
| Ech, мг/мл      | 0.016        | 0.031 | 0.062 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1.0 |
| Этанол, % (v/v) | 0.16         | 0.31  | 0.62  | 1.25  | 2.5  | 5.0 | 10  |
| CRG, мг/мл      | 0.016        | 0.031 | 0.062 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1.0 |

**Таблица 2.** Концентрации компонентов комплекса CRG/Ech в тестируемых растворах

| Компонент комплекса CRG/Ech | Концентрация, мг/мл |
|-----------------------------|---------------------|
|                             | 10.1                |
| CRG, мг/мл                  | 10.1                |
| Ech, мг/мл                  | 0.10.01             |
| Этанол, % (v/v)             | 10.1                |

**Таблица 3.** Концентрации компонентов CRG/Ech-Lip в тестируемых растворах

| Компонент | Концентрация, мг/мл |
|-----------|---------------------|
|           | 0.10.51             |
| CRG       | 0.0150.0770.154     |
| Ech       | 0.0010.0060.12      |

**Клеточные культуры.** В качестве клеточных тест-систем в исследовании использовали иммортализованные линии эпителиальных клеток наружной оболочки глазного яблока человека: HCE (эпителий роговицы) и Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4 (эпителий конъюнктивы). HCE получены Araki-Sasaki (Araki-Sasaki et al., 1995) и любезно предоставлены нам д-ром. P. Reined (США). Клетки Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4 получены из Коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных (НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, Москва). Клетки выращивали при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> в соответствующих питательных средах. Для HCE это среда Keratinocyte-SFM (Gibco, США), содержащая 15 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США); для Clone 1-5c-4 — Игла MEM («Биолот», Россия), содержащая 10 % FBS (HyClone, США).

Для скрининга исследуемых веществ клетки HCE высевали в 96-луночные платы (TPP, Швейцария) при плотности 15 тыс./луночка, а клетки Clone 1-5c-4 — 10 тыс./луночка в 100 мкл соответствующей полной питательной среды и культивировали до формирования субконфлюэнтного монослоя. Затем среду заменяли на ту же (100 мкл), но содержащую исследуемое

вещество в соответствующей концентрации и культивировали клетки далее в течение 24 и 48 ч; контролем служили клетки, культивируемые в соответствующих питательных средах без добавления исследуемых веществ. В процессе культивирования анализировали общепринятыми методами световой микроскопии морфологию клеток. По истечении 24 ч и 48 ч культивирования методом МТТ с использованием реактива thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с общеизвестным протоколом (Mosmann, 1983), проводили анализ метаболической активности клеток.

**Статистическую обработку** данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism версии 8.0.0 для Windows (GraphPad, Сан-Диего, Калифорния, США). Различия между группами определяли с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по критерию Бенджамини–Кригера–Иекутелли и считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании был проведен первичный *in vitro* скрининг потенциальных офтальмологических систем доставки Ech (CRG/Ech и CRG/Ech-Lip) и отдельных структурных компонентов, использованных при разработке этих систем. МТТ-тест, широко известный как скрининговый метод измерения выживаемости клеток и включенный в большинство протоколов и методов молекулярной биологии и медицины (Langdon, 2004), выявил что направленность и сила воздействия исследуемых веществ на культивируемые клетки зависят от самих объектов исследования, их концентрации, времени воздействия на клетки и клеточных тест-систем.

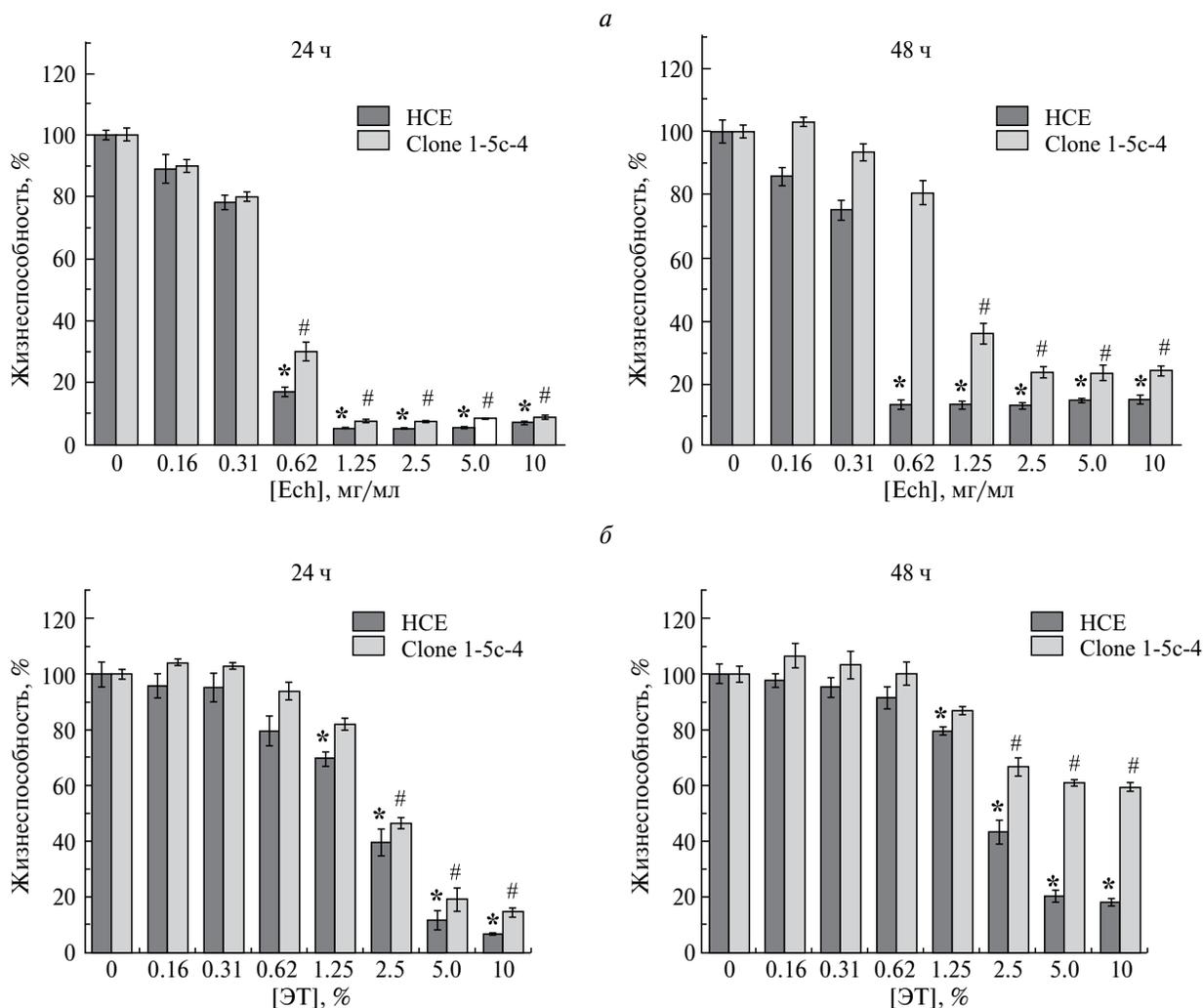
Нами выявлено, что Ech в форме спиртового раствора в питательной среде в диапазоне конечных концентраций Ech от 0.016 до 1 мг/мл оказывает различное по интенсивности цитотоксическое действие в отношении клеток НСЕ и Clone 1-5с-4, культивируемых в его присутствии в течение 24 и 48 ч (рис. 2а). Во временной точке 48 ч клетки эпителия роговицы оказались менее жизнеспособными, чем клетки эпителия конъюнктивы, хотя в целом жизнеспособность клеток обеих клеточных тест-систем при 48-часовом культивировании была выше, чем в случае 24 ч. Относительно безопасными концентрациями Ech в форме спиртового раствора для культивируемых клеток оказались концентрации 0.016 и 0.032 мг/мл. Для НСЕ критичным для жизнеспособности клеток

оказалось присутствие Ech в диапазоне концентраций 0.062–1 мг/мл, для Clone 1-5с-4 — в диапазоне концентраций 0.125–1 мг/мл.

Известно, что Ech является витаминоподобным природным веществом, сходным по химическому строению с витаминами группы К и С (El'kin et al., 2011). Он может проникать в клетку теми же транспортными путями, что витамин С, а его ферментативная модификация в клетке сопровождается снижением уровня  $O_2$  и образованием  $H_2O_2$ , выполняющей роль вторичного месенджера, индуцирующей выработку пероксисомами транскрипционных факторов (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  и PPAR $\gamma$ ), играющих ключевую роль в регуляции метаболизма клетки и снижении воспаления. Вместе с тем показана способность Ech участвовать в прекращении цепных реакций перекисного окисления липидов в клетках, причем сразу несколькими способами. Во-первых, он может перехватывать свободные радикалы, хелатировать металлы — основные инициаторы неферментативного процесса окисления мембранных липидов. Во-вторых, может ингибировать ферменты липоксигеназы, от активности которых во многом зависит окислительный статус клеток. Кроме того, он способен синергически активироваться фосфолипидами плазматических мембран (Бочков и др., 2016; Ковалев и др., 2016). Выполнение Ech в клетке функций витаминов группы К и антиоксидантов позволяет отнести его к лекарственным препаратам группы корректоров метаболизма (Кривошапко, Попов, 2011).

В биологических исследованиях при скрининге потенциальных лекарственных препаратов, слаборастворимых в воде, необходимы органические растворители. Для этих целей чаще всего применяют диметилсульфоксид, метанол или этанол. Хотя все они в разной степени токсичны для клеток *in vitro*, они по-прежнему необходимы для растворения лекарственных средств в биологических исследованиях (Nguyen et al., 2020). Для растворения липофильного Ech мы использовали этанол. Несмотря на свою токсичность, этанол часто используется в качестве растворителя растительных экстрактов и компонентов растительного происхождения (Liu, 2008).

Мы предположили, что воздействие раствора Ech на культивируемые клетки может быть связано с его растворителем этанолом. Известно, что этанол, вмешиваясь в структуру холестерина — мажорного липида клеточной мембраны — разжижает ее. Это приводит к нарушению потока трансмембранных белков и вызывает функциональные клеточные изменения (Ingram, 1976; Cartwright et al., 1986). Такое



**Рис. 2.** Жизнеспособность клеток линий HCE и Clone 1-5c-4 при культивировании в присутствии эхинохрома (Ech, *a*) и этанола (ЭТ, *б*) в течение 24 и 48 ч. МТТ-тест. Различия с контролем (точка 0) для клеток HCE (\*) и Clone 1-5c-4 (#) достоверны при  $P < 0.05$  ( $n = 5$ ).

действие этанола в отношении клеточной мембраны может усилить действие растворенного в нем лекарственного средства, что, в свою очередь, приведет к искажению результатов.

Для правильной оценки эффективности или цитотоксичности потенциального лекарственного средства в эксперименте необходимо определить оптимальные концентрации его растворителя (Nguyen et al., 2020). Поэтому мы исследовали влияние на клетки самого этанола в диапазоне концентраций 0.16–10%, что соответствует концентрациям этанола в спиртовом растворе Ech (табл. 1). Было выявлено, что в его присутствии в течение 48 ч клетки HCE менее жизнеспособны, чем Clone 1-5c-4, хотя в целом жизнеспособность клеток обеих тест-систем была выше, чем во временной точке 24 ч (рис. 2б). Эти данные совпали с данными, полученными при исследовании спиртового раствора Ech. Критичным

для жизнеспособности клеток оказалось присутствие этанола в питательной среде только в концентрации 5 и 10%: для клеток HCE — в обеих временных точках, а для Clone 1-5c-4 — только при 24-часовом культивировании. Это соответствовало конечным концентрациям 0.5 и 1 мг/мл Ech в форме спиртового раствора. Таким образом, можно предположить, что выраженный цитотоксический эффект Ech (0.062–0.25 мг/мл) в отношении клеточных тест-систем, выявленный нами при исследовании его спиртового раствора связан не с токсичностью самого этанола, а с его возможным взаимодействием с Ech, или с токсичностью самого Ech при этих концентрациях.

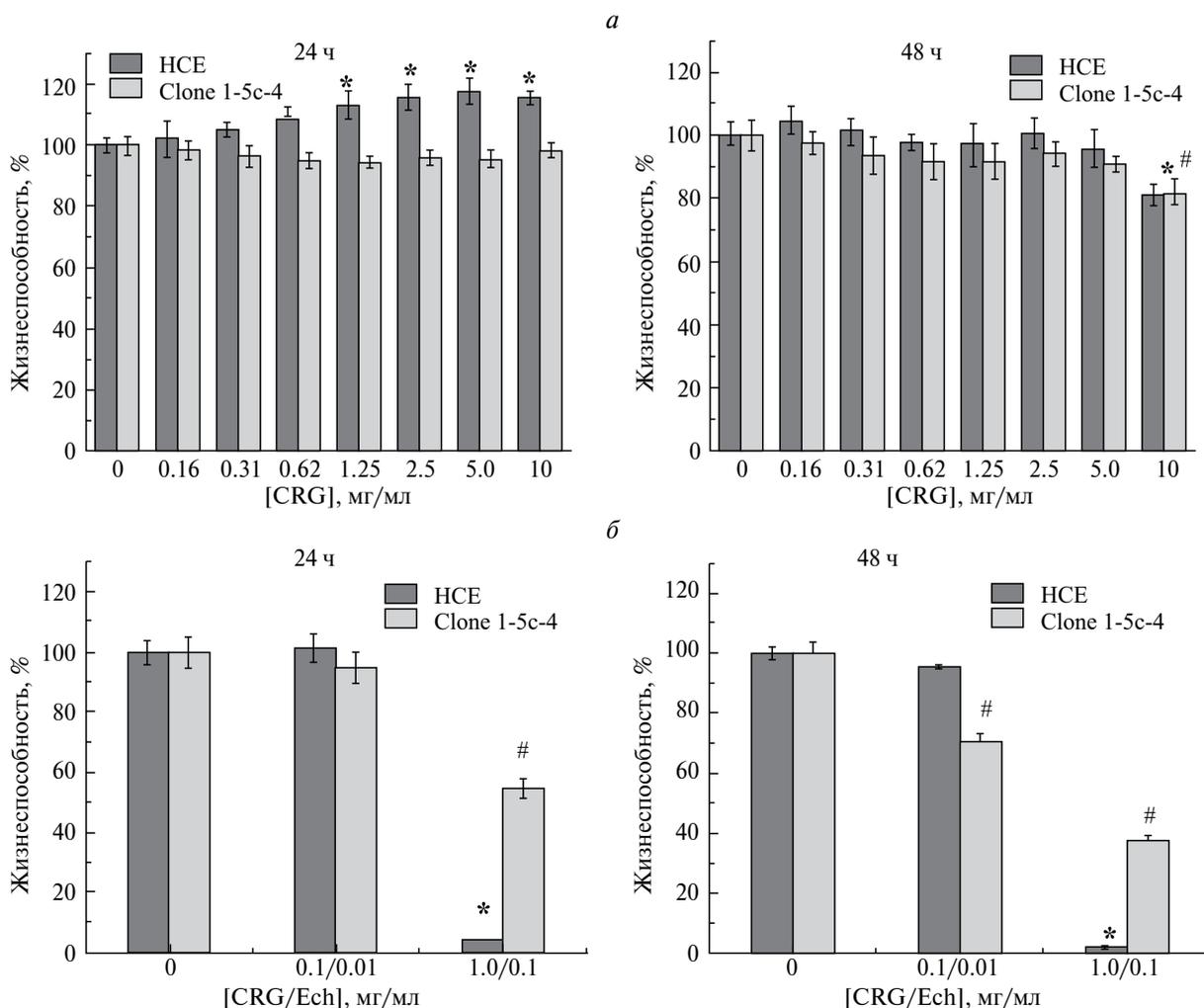
На цитотоксичность или терапевтическую эффективность разрабатываемых лекарственных препаратов помимо растворителя может влиять их модификация с помощью полимерных систем. Природные

полимеры в этом отношении интересны тем, что для них характерна высокая адгезивность, биосовместимость, способность образовывать гидрогели. Все это актуально при разработке систем доставки лекарств (Shit, Shah, 2014). В качестве такой модификации для Ech были предложены системы полимерных матриц на основе полисахаридов из красных водорослей — CRG (Yermak et al., 2017). Мы изучали влияние на жизнеспособность культивируемых клеток как комплекса CRG/Ech, так и самого CRG, который является основным по массовой доле структурным компонентом CRG/Ech (табл. 2).

При исследовании влияния на клетки CRG в диапазоне конечных концентраций 0.016—1 мг/мл среды был выявлен незначительный цитотоксический эффект в отношении клеток обеих тест-систем, культивируемых в течение 48 ч при концентрации CRG 1 мг/мл (рис. 3а). В то же время при 24-часовом

культивировании выявлено стимулирующее действие CRG при концентрации от 0.125 до 1 мг/мл на клетки HCE: жизнеспособность клеток возрастала, составляя 112—123 % от контроля. При этом CRG не оказал значимого действия на жизнеспособность клеток линии Clone 1-5c-4 во всем диапазоне концентраций (0.016—1 мг/мл) в обеих временных точках (24 ч и 48 ч).

Влияние комплекса CRG/Ech на культивируемые клетки мы исследовали в двух концентрациях: 0.1 и 1 мг/мл, рассчитанных по концентрации CRG в комплексе, содержание Ech в которых соответствовало 0.01 и 0.1 мг/мл (табл. 2). Присутствие Ech в концентрации 0.1 мг/мл в составе CRG/Ech не было критичным для клеток Clone 1-5c-4: их жизнеспособность составила около 55 % через 24 ч и около 37 % через 48 ч (рис. 6). В то время как такая же концентрация Ech вне комплекса с CRG была критичной



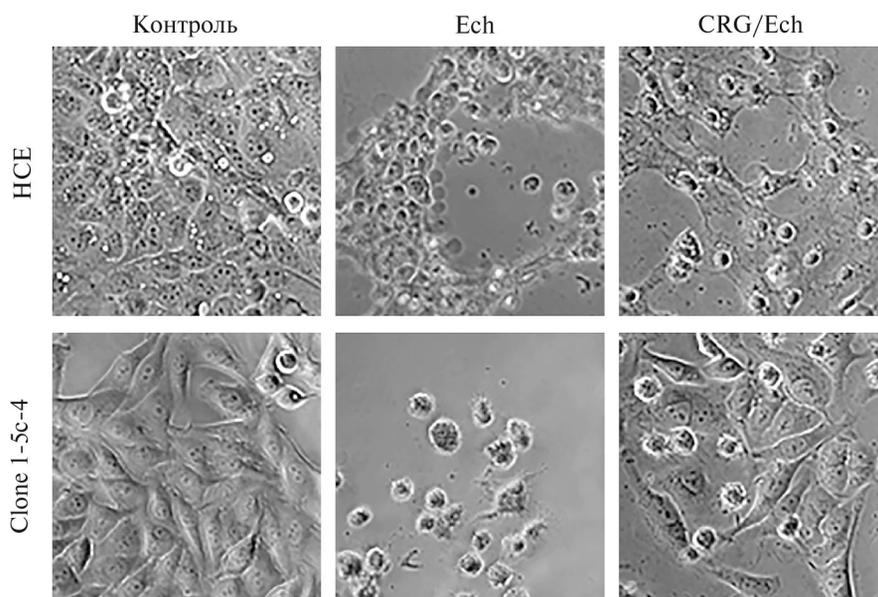
**Рис. 3.** Жизнеспособность клеток линий HCE и Clone 1-5c-4 при культивировании в присутствии каппа-каррагинана (CRG, а) и каррагинанового комплекса CRG/Ech (б) в течение 24 и 48 ч. МТТ-тест. Различия с контролем (точка 0) для клеток HCE (\*) и Clone 1-5c-4 (#) достоверны при  $P < 0.05$ ;  $n = 5$  (а) и  $n = 10$  (б).

для жизнеспособности этих клеток при 24-часовом культивировании (рис. 3б). Для клеток НСЕ такой закономерности не было: Ech в концентрации 0.1 мг/мл как в составе комплекса CRG/Ech, так и вне его проявил сильное цитотоксическое действие.

Результаты МТТ теста согласуются с результатами оценки морфологического состояния клеток. На рис. 4 представлены данные прижизненного наблюдения, полученные через 24 ч культивирования клеток в присутствии Ech в концентрации 0.1 мг/мл как в составе комплекса CRG/Ech, так и вне его. Как можно видеть на фотографиях, клетки обеих линий в контроле имеют типичную эпителиоподобную морфологию, хорошо распластаны и в процессе культивирования (24 ч) сформировали конфлюэнтный монослой. Воздействие Ech в течение 24 ч на клетки НСЕ и Clone 1-5с-4 различается по характеру и силе, которые, в свою очередь, зависят от формы применения Ech. Присутствие в питательной среде Ech в концентрации 0.1 мг/мл во всех его формах (в составе комплекса CRG/Ech и вне его) спровоцировало деструкцию монослоя эпителия роговицы с образованием пустот. Большая часть клеток округлилась и флотирует. Морфологическое состояние сохранившегося монослоя свидетельствует о процессах дегенерации: структура клеток зернистая, ядра набухшие, а сами клетки уплощенные; в среде вокруг клеток много артефактов. Все это может свидетельствовать, что Ech в концентрации 0.1 мг/мл вне зависимости

от формы его применения оказывает сильное цитотоксическое действие на клетки эпителия роговицы человека. Присутствие в питательной среде Ech в концентрации 0.1 мг/мл оказалось также критичным для клеток эпителия конъюнктивы. Но при этом наблюдали полную деструкцию монослоя: клетки округлились и практически все открепилась от поверхности. В то же время присутствие в среде Ech в этой же концентрации, но в составе комплекса CRG/Ech уже не было столь фатальным для клеток эпителия конъюнктивы. В этом случае деструкция монослоя частичная: лишь половина клеток округляется и флотирует. Прикрепленные клетки хорошо распластаны, однако их морфологическое состояние отличается от контроля: структура клеток зернистая, с вакуолями, что является признаком угнетенного состояния клеток. В питательной среде вокруг клеток выявлено много артефактов. Все это позволяет предположить, что Ech в концентрации 0.1 мг/мл в составе комплекса CRG/Ech оказывает цитотоксическое действие на клетки эпителия конъюнктивы человека, но менее выраженное, чем в той же концентрации вне комплекса. Известно, что Ech, взаимодействуя с CRG, встраивается в его структуру. Включение Ech в комплексы с CRG повышает его растворимость и уменьшает окислительную деструкцию (Yermak et al., 2017).

Липосомы представляют собой многофункциональную систему доставки лекарств, которую можно моделировать, изменяя липидный состав и размер

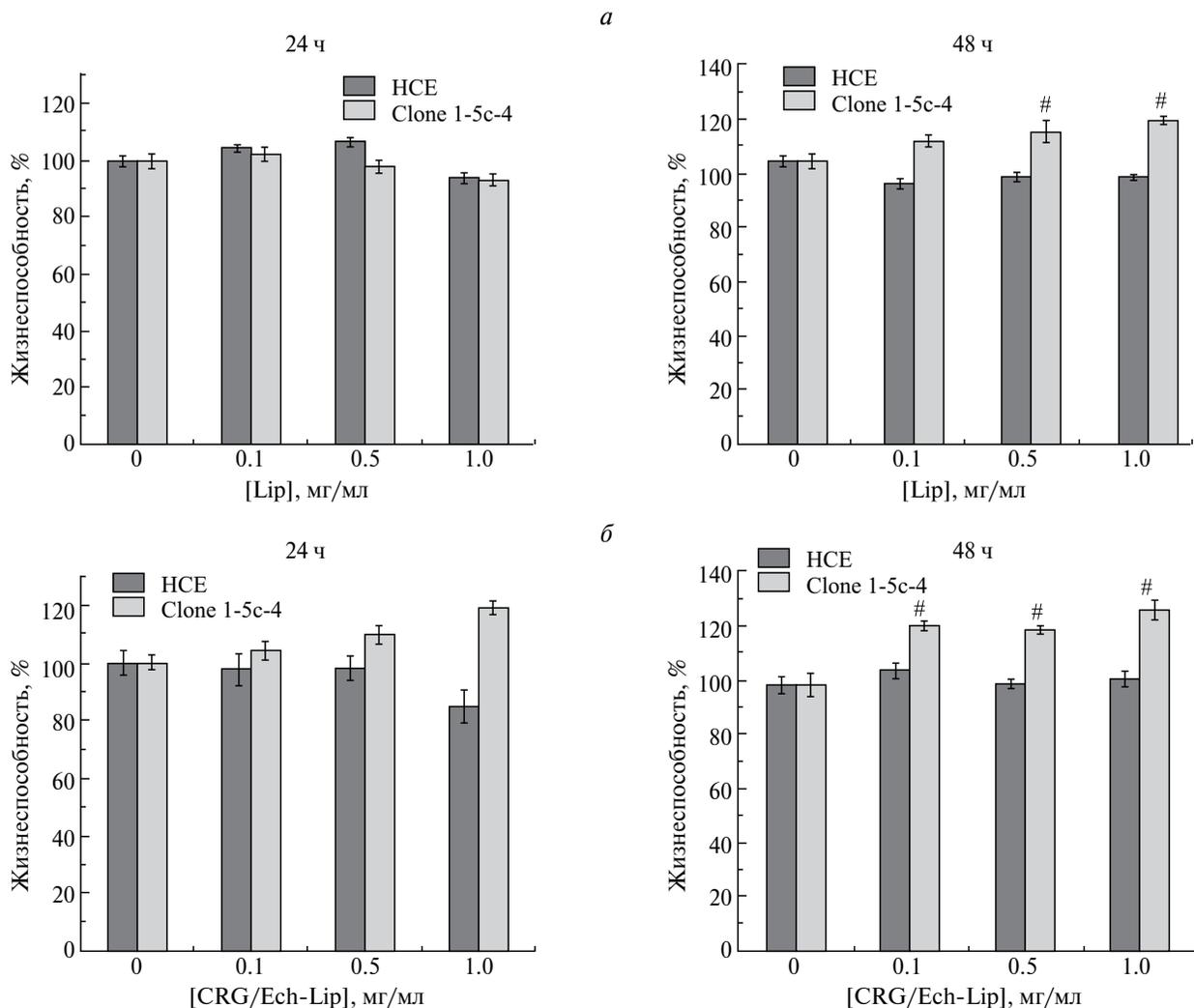


**Рис. 4.** Морфология клеток линий НСЕ и Clone 1-5с-4, культивируемых в течение 24 ч в питательной среде, содержащей эхинохром в концентрации 0.1 мг/мл в форме спиртового раствора (Ech) и его каррагинанового комплекса (CRG/Ech). Световая микроскопия. Увел. об.: 20х.

липосом, электрический заряд, текучесть мембраны и конъюгацию со слоями поверхностного покрытия (Manconi et al., 2007). Мы использовали липосомные композиции, содержащие фиксированное количество яичного лецитина и холестерина, которые готовили методом тонкопленочной гидратации. Для получения CRG/Ech-Lip водные растворы CRG/Ech загружали в состав приготовленных липосом с использованием стандартного тонкопленочного метода с последующей обработкой ультразвуком. Липосомы, как правило, нетоксичны, биodeградебельны, их мембрана может сливаться с клеточной мембраной, что способствует внутриклеточной доставке содержимого липосом. При правильном подборе компонентов липосом их введение в организм не вызывает негативных реакций (Fielding, 1991; Свистельник, Ханин, 2014). Однако их физико-химическая характеристика

не гарантирует отсутствия цитотоксических побочных эффектов, которые должны быть проверены *in vitro* (Angius, Floris, 2015). Поэтому наравне с исследованием влияния разрабатываемой липосомной формы комплекса (CRG/Ech-Lip) на культивируемые клетки необходимо было оценить влияние на них самой потенциальной системы доставки лекарственной композиции — пустых липосом.

Результаты выявили ряд различий в ответах модельных клеточных тест-систем (рис. 5а, б). Присутствие в питательной среде липосом или CRG/Ech-Lip в диапазоне концентраций 0.1–1.0 мг/мл не оказало значимого действия на клеточную тест-систему HCE. Жизнеспособность клеток линии Clone 1-5c-4, культивируемых в течение 24 ч в среде, содержащей пустые липосомы, также была сопоставима с контролем. Однако через 48 ч, согласно МТТ-



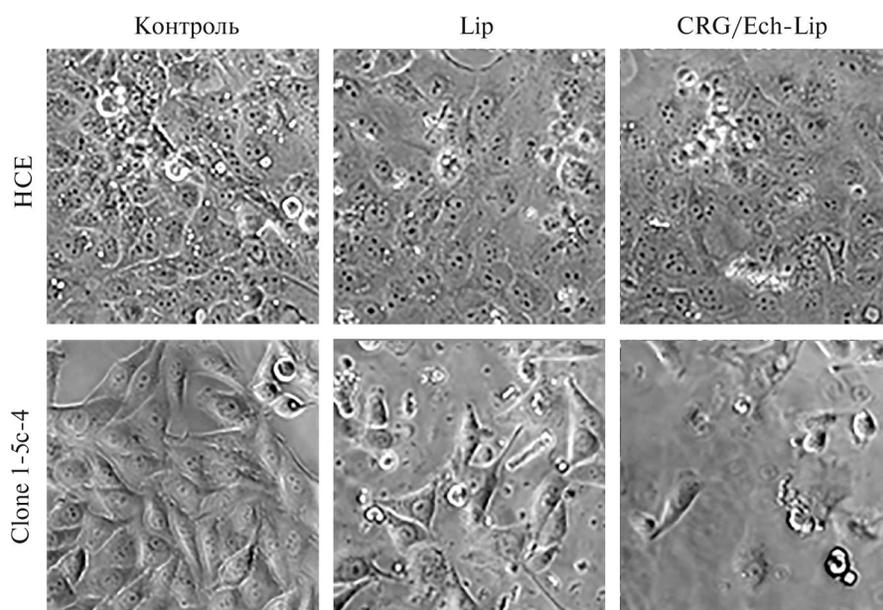
**Рис. 5.** Жизнеспособность клеток линий HCE и Clone 1-5c-4 при культивировании в присутствии липосом (Lip, а) и липосомной формы CRG/Ech-комплекса (CRG/Ech-Lip) (б) в течение 24 и 48 ч. МТТ-тест. Различия с контролем (точка 0) для клеток HCE (\*) и Clone 1-5c-4 (#) достоверны при  $P < 0.05$ ;  $n = 10$ .

анализу, жизнеспособность клеток увеличивалась от 110 до 120 % с увеличением концентрации липосом (рис. 5а). Комплекс CRG/Ech-Lip при концентрации 1 мг/мл оказывал стимулирующее действие на эту модельную систему уже через 24 ч: жизнеспособность клеток составила 120 %. Во второй временной точке (48 ч) при всех исследуемых концентрациях CRG/Ech-Lip жизнеспособность клеток составила от 120 % до 128 % (рис. 5б).

Результаты МТТ-теста в целом согласуются с результатами оценки морфологического состояния клеток. На рис. 6 представлены данные прижизненного наблюдения, полученные через 24 ч культивирования клеток в присутствии в питательной среде как пустых липосом, так и CRG/Ech-Lip в концентрации 0.5 мг/мл. Как можно видеть на фотографиях, клетки обеих линий в контроле имеют типичную эпителиоподобную морфологию, хорошо распластаны и в процессе культивирования (24 ч) формируют конфлюэнтный монослой. Морфологическое состояние клеток эпителия роговицы, культивируемых в питательной среде, содержащей пустые липосомы или CRG/Ech-Lip в концентрации 0.5 мг/мл сопоставимо с контролем. То же относится к морфологическому состоянию клеток эпителия конъюнктивы, культивируемых в этих же условиях, однако монослой визуально выглядит более плотным, чем в контроле. Последний факт хорошо согласуется с приведенными выше результатами МТТ-теста.

Вместе с тем в литературе приводятся данные, которые показывают, что клетки, инкубированные даже с пустыми липосомами, могут более интенсивно по отношению к контролю восстанавливать МТТ до формазана, значения которого увеличиваются с увеличением концентрации липосом. Однако это может быть связано не с увеличением жизнеспособности клеток, обусловленным стимулирующим цитопротекторным действием на них липосом, а с прямым вмешательством их в анализ МТТ из-за их липидной природы (Soenen, De Cuyper, 2009; Angius, Floris, 2015). Известно, что внутриклеточное хранение формазана зависит от наличия внутриклеточных липидов и липидных капель: формазан в силу своей липофильной природы накапливается в липидных каплях и в клеточных мембранах с появлением в цитоплазме мелких темных гранул (Diaz et al., 2007; Stockert et al., 2012). Сделано предположение (Angius, Floris, 2015), что по этой же причине МТТ может проникать в липосомы, взвешенные в питательной среде, накапливаться в них, а далее в их составе проникать в клетки по эндо (лизосомному) пути. Таким образом, липосомы вызывают увеличение запасов формазана в клетках, что приводит к явному увеличению показателей их жизнеспособности (Angius, Floris, 2015).

В свете этих данных более интенсивное не только в контроле, но и в эксперименте с пустыми липосомами восстановление МТТ до формазана, демонстрируемое клетками эпителия конъюнктивы



**Рис. 6.** Морфология клеток линий HCE и Clone 1-5c-4, культивируемых в течение 24 ч в питательной среде, содержащей пустые липосомы (Lip) и липосомную форму комплекса CRG/Ech-Lip в концентрации 0.5 мг/мл. Световая микроскопия. Увел. об.: 20×.

при действии на них CRG/Ech-Lip, можно связать с повышением стабильности самих Lip, покрытых полимерами (Adamczak et al., 2017), и, как следствие, увеличением количества липосом, способных взаимодействовать с монослоем клеток. Этот вопрос требует дальнейшего изучения. Различия в ответах модельных клеточных тест-систем могут быть связаны с более высокими мукоадгезивными свойствами клеток эпителия конъюнктивы по сравнению с клетками эпителия роговицы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках разработки потенциальных офтальмологических систем доставки эхинохрома проведено исследование *in vitro* влияния на культивируемые клетки эпителия роговицы и конъюнктивы человека комплекса CRG/Ech, его липосомной формы и отдельных структурных компонентов этих систем. Показано, что первичный скрининг *in vitro* с использованием тест-систем на основе иммортализованных линий эпителиальных клеток наружной оболочки глазного яблока человека (HCE и Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4) является оптимальным инструментом для изучения цитотоксичности потенциальных офтальмологических препаратов, в том числе Ech, CRG/Ech и CRG/Ech-Lip. Изучение их потенциальной эффективности при местном применении в офтальмологии — тема комплекса дальнейших исследований.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-74-20019).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют исследования человека или животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Александрова О. И., Хорольская Ю. И., Майчук Д. Ю., Блинова М. И. 2015. Исследование общей цитотоксичности антибиотиков аминогликозидного и фторхинолонового ряда на клеточных культурах. Вестник оф-

тальмологии. Т. 131. № 5. С. 43. (Alexandrova O. I., Khorolskaya Y. I., Maychuk D. Y., Blinova M. I. 2015. Study of common cytotoxicity of aminoglycoside and fluoroquinolone antibiotics in cell cultures. Vestnik oftal'mol. V. 131. No. 5. P. 43.) <https://doi.org/10.17116/oftalma2015131543-53>

Аляутдин Р. Н., Иежица И. Н., Агарвал Р. 2014. Транспорт лекарственных средств через роговицу глаза: перспективы применения липосомных лекарственных форм. Вестник офтальмологии. Т. 130. № 4. С. 117. (Aliautdin R. N., Iezhitsa I. N., Agarval R. 2014. Transcorneal drug delivery: prospects for the use of liposomes. Vestnik Oftalmologii. V. 130. No. 4. P. 117.)

Барсуков Л. И. Липосомы. Соросовский образовательный журнал. № 10. С. 2. (Barsukov L. I. 1998. Liposomy. (in Russian). Sorosovskii obrazovatel'nyi jurnal. No. 10. P. 2.)

Егоров Е. А. (ред.). 2004. Рациональная фармакотерапия в офтальмологии: Руководство для практикующих врачей. М.: Литтерра. Т. 7. (Egorov E. A. (Ed.) 2004. Rational pharmacotherapy in ophthalmology: handbook for practicing doctors. Moscow: Litterra. Vol. 7.)

Бочков П. О., Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Жердев В. П., Шевченко Р. В. 2016. Влияние высокомолекулярных вспомогательных веществ на оптимизацию фармакокинетических свойств лекарственных препаратов. Фармакокинетика и фармакодинамика. № 1. С. 3. (Bochkov P., Kolyvanov G., Litvin A., Zherdev V., Shevchenko R. 2016. Effects of the high-molecular excipients on optimization of the pharmacokinetic properties of drugs. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. (In Russian). No. 1. P. 3.)

Киселев О. И., Еропкина Е. М., Смирнова Т. Д., Еропкина М. Ю., Ильинская Е. В., Сухинин В. П., Прочуханова А. Р., Зарубаев, В. В. 2006. Оценка метаболических показателей *in vitro* как модельная система тестирования цитотоксичности противовирусных препаратов. Экспериментальная и клиническая фармакология. Т. 69. № 1. С. 65. (Kiselev O. I., Eroпкиna E. M., Smirnova T. D., Eroпкиn M. Yu., Ilyinskaya E. V., Sukhinin V. P., Prochukhanova A. R., Zarubaev, V. V. 2006. Assessment of metabolic parameters *in vitro* as a model system for testing the cytotoxicity of antiviral drugs. Exper. Clinical Pharmacol. (in Russian). V. 69. No. 1. P. 65.) <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2006-69-1-65-70>

Ковалев Н. Н., Крыжановский С. П., Кузнецова Т. А., Костецкий Э. Я., Беседнова Н. Н. 2016. Морские ежи: биомедицинские аспекты практического применения. Владивосток: Дальнаука. (Kovalev N. N., Kryzhanovskiy S. P., Kuznetsova T. A., Kostetsky E. Ya., Besednova N. N. 2016. Sea urchins: biomedical aspects of practical application. Vladivostok: Dalnauka.)

Кривошапко О. А., Попов А. М. 2011. Лечебные и профилактические свойства липидов и антиоксидантов, выделенных из морских гидробионтов. Вопр. питания. № 2. С. 4. (Krivoshapko O. A., Popov A. M. 2011. Therapeutic and preventive properties of lipids and antioxidants isolated from marine aquatic organisms. Question nutrition. No. 2. P. 4.)

- Лепарская Н. Л., Сорокоумова Г. М., Сычева Ю. В., Хорошилова-Маслова И. П., Каплун А. П., Кереев И. И., Гундорова Р. А., Нероев В. В., Швец В. И.* 2011. Липосомы, содержащие дексаметазон: получение, характеристика и использование в офтальмологии. Вестник МИТХТ им. МВ Ломоносова. Т. 6. № 2. С. 37. (*Leparskaya N. L., Sorokoumova G. M., Sycheva Y. V., Khoroshilova-Maslova I. P., Kaplun A. P., Kereev I. I., Gundorova R. A., Neroev V. V., Shvets V. I.* 2011. Liposomes containing dexamethasone: obtaining, characterization and use in ophthalmology. Vestnik Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, V. 7. P. 37.)
- Мельникова Е. В., Горячев Д. В., Чапленко А. А., Водякова М. А., Сайфутдинова А. Р., Меркулов В. А.* 2018. Разработка липосомных форм лекарственных препаратов: методы оценки и показатели качества. Вестник Российского государственного медицинского университета. № 6. С. 35. (*Melnikova E. V., Goryachev D. V., Chaplenko A. A., Vodyakova M. A., Sayfutdinova A. R., Merkulov V. A.* 2018. Development of liposomal drug formulations: quality attributes and methods for quality control. Bulletin of Russian State Medical University. No. 6. P. 33.)  
<https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.092>
- Свистельник А. В., Ханин А. Л.* 2014. Липосомные лекарственные препараты: возможности и перспективы. Медицина в Кузбассе. № 2. С. 7. (*Svistelnik A. V., Khanin A. L.* 2014. Liposomal drugs: opportunities and prospects. Medicine in Kuzbass. No. 2. P. 7).
- Талалаева О. С., Зверев Я. Ф., Брюханов В. М.* 2017. Клеточно-молекулярные механизмы, обеспечивающие терапевтическую эффективность гистохрома. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. Т. 15. № 4. С. 58. (*Talalaeva O. S., Zverev Y. F., Bryukhanov V. M.* 2017. The cellular and molecular mechanisms providing therapeutic efficiency of gistokhrom (in Russian). Rev. Clinical Pharmacol. Drug Ther. Vol. 15. No. 4. P. 58–68.)  
<https://doi.org/10.17816/RCF15458-68>
- Тедеева Н. С., Мельников В. Я., Догадова Л. П.* 2014. Применение гистохрома в офтальмологии. Тихоокеанский медицинский журнал. Т. 4. № 58. С. 17. (*Tedeeva N. S., Melnikov V. Y., Dogadova L. P.* 2014. Using of histochrom in ophthalmology. Pacific Medical Journal. V. 4. No. 58. P. 17.)
- Фитилев С. Б., Шкробнева И. И., Возжаев А. В.* 2017. Основы рациональной фармакотерапии. Проблемный метод преподавания клинической фармакологии. М: РУДН. (*Fitilev S. B., Shkrebneva I. I., Vozzhaev A. V.* 2017. Fundamentals of rational pharmacotherapy (in Russian). Moscow: RUDN Med. Institute.)
- Adamczak M. I., Martinsen Ø. G., Smistad G., Hiorth M.* 2017. Polymer coated mucoadhesive liposomes intended for the management of xerostomia. Int. J. Pharmaceutics. V. 527. P. 72. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.032>
- Agarwal R., Iezhitsa I., Agarwal P., Abdul Nasir N. A., Razali N., Alyauidin R., Ismail N. M.* 2016. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update. Drug Deliv. V. 23. No. 4. P. 1075. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.943336>
- Anderson H. A., Mathieson J. W., Thomson R. H.* 1969. Distribution of spinochrome pigments in echinoids. Compar. Biochem. Physiol. V. 28. P. 333. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(69\)91347-4](https://doi.org/10.1016/0010-406X(69)91347-4)
- Angius F., Floris A.* 2015. Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair. Toxicol In Vitro. V. 29. No. 2. P. 314.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.11.009>
- Araki-Sasaki K., Ohashi Y., Sasabe T., Hayashi K., Watanabe H., TaNo. Y., Handa H.* 1995. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. V. 36. No. 3. P. 614.
- Bonneau N, Baudouin C, Réaux-Le Goazigo A, Brignole-Baudouin F.* 2022. An overview of current alternative models in the context of ocular surface toxicity. J. Appl. Toxicol. V. 42. No. 5. P. 718.
- Cartwright C. P., Juroszek J.-R., Beavan M. J., Ruby F. M. S., De Moraes S. M. F., Rose A. H.* 1986. Ethanol dissipates the proton-motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. V. 132. I. 2. P. 369.
- Diaz G., Melis M., Musin A., Piludu M., Piras M., Falchi A. M.* 2007. Localization of MTT formazan in lipid droplets. An alternative hypothesis about the nature of formazan granules and aggregates. Eur. J. Histochem. V. 51. No. 3. P. 213.
- DuBois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F.* 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. V. 28. No. 3. P. 350. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Ebrahim S., Peyman G. A., Lee P. J.* 2005. Applications of liposomes in ophthalmology. Surv. Ophthalmol. V. 50. No. 2. P. 167.
- El'kin Yu. N., Cherednichenko A. I., Kol'tsova E. A., Artyukov A. A.* 2011. Electron capture mass spectrometry of echinochrome. A. J. Anal. Chem. V. 66. P. 1477. <https://doi.org/10.1134/S1061934811140073>
- Elyakov G., Maximov O., Mischenko N., Koltsova E., Fedoreev S., Glebko L., Krasovskaya N., Artjukov A.* 2002. Histochochrome and its therapeutic use in ophthalmology. U. S. Patent 6384084.
- Elyakov G., Maximov O., Mischenko N., Koltsova E., Fedoreev S., Glebko L., Krasovskaya N., Artjukov A.* 2004. Composition comprising di- and trisodium salts of echinochrome for treating ocular conditions. Eur. Patent EP 1 121 929 B1.
- Elyakov G. B., Maximov O. B., Mischenko N. P., Koltsova E. A., Fedoreev S. A., Glebko L. I., Krasovskaya N., Artjukov A.* 2007. Drug preparation "Histochochrome" for treating acute myocardial infarction and ischemic heart diseases. Eur. Patent 1121930.
- Fernández-Ferreiro A., González Barcia M., Gil-Martínez M., Vieites-Prado A., Lema I., Argibay B., Blanco Méndez J., Lamas M. J., Otero-Espinar F. J.* 2015. In vitro and in vivo ocular safety and eye surface permanence determination by direct and magnetic resonance imaging of ion-sensitive hydrogels based on gellan gum and kappa-carrageenan. Eur. J. Pharm. and Biopharm. V. 94. P. 342.
- Fielding R. M.* 1991. Liposomal drug delivery. Advantages and limitations from a clinical pharmacokinetic and therapeutic perspective. Clin. Pharmacokinet. V. 21. No. 3. P. 155.

- Ingram L. O. 1976. Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J. Bacteriol.* V. 125. No. 2. P. 670.
- Kaldybekov D. B., Tonglairoum P., Opanasopit P., Khutoryanskiy V. V. 2018. Mucoadhesive maleimide-functionalised liposomes for drug delivery to urinary bladder. *Eur. J. Pharmac. Sc.* V. 111. P. 83. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.039>
- Khutoryanskiy V. V. 2011. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. *Macromol. Biosci.* V.11. P. 748. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000388>
- Kim H. K., Vasileva E. A., Mishchenko N. P., Fedoreyev S. A., Han J. 2021. Multifaceted clinical effects of echinochrome. *Marine Drugs.* V. 19. P. 412. <https://doi.org/10.3390/md19080412>
- Knutsen S. H., Myslabodski D. E., Larsen B., Usov A. I. 1994. A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica Marina.* V. 37. No. 2. P. 163
- Lang J. C., Keister J. C., Missel P. J. T., Stancioff D. J. 1993. Use of carrageenans in topical ophthalmic compositions. Patent US5403841A.
- Langdon S. P. (Ed.). 2004. Cancer cell culture: methods and protocols. Seiten: Humana Press Inc. (Hersteller).
- Lieto K., Skopek R., Lewicka A., Stelmasiak M., Klimaszewska E., Zelent A., Szymański Ł., Lewicki S. 2022. Looking into the eyes — in vitro models for ocular research. *Int. J. Mol. Sc.* V. 23. No. 16. P. 9158. <https://doi.org/10.3390/ijms23169158>
- Liu Z. 2008. Preparation of botanical samples for biomedical research. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.* V. 8. P. 112. <https://doi.org/10.2174/187153008784534358>
- Manconi M., Isola R., Falchi A. M., Sinico C., Fadda A. M. 2007. Intracellular distribution of fluorescent probes delivered by vesicles of different lipidic composition. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* V. 57. No. 2. P. 143.
- Mishra G. P., Bagui M., Tamboli V., Mitra A. K. 2011. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J. Drug Delivery.* V. 2011. P. 1. <https://doi.org/10.1155/2011/863734>
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Methods.* V. 65. P. 55.
- Nguyen S. T., Nguyen H. T.-L., Truong K. D. 2020. Comparative cytotoxic effects of metanol, etanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomed. Res. Ther.* V. 7. P. 3855. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v7i7.614>
- Nurul Alimah A. N., Alyautdin R., Agarwal R. 2013. Ocular tissue distribution of liposomes containing lipophilic dye: pegylated versus non-pegylated. In: Proc. Int. Symposium Ocular Pharmacol. Therap. 7–10th March 2013, Paris (additionally enclosed pages).
- Pellegrini G., Rama P., Rocco A., Panaras A., Luca M. 2014. Concise review: hurdles in a successful example of limbal stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cells.* V. 32. P. 26. Pleyer U., Rückert D., Bachmann W., Schmidt K. H., Thiel H. J. 1991. Intraokulare verfügbare liposomenverkapselfter monoklonare antikerper in kanunuchenmodel. Ergebnisse einer pilotstude (Germany). *Fortschr. Ophthalmol.* V. 88. P. 870.
- Rönkkö S., Vellonen K. S., Järvinen K., Toropainen E., Urtti A. 2016. Human corneal cell culture models for drug toxicity studies. *Drug Deliv. Transl. Res.* V. 6. No. 6. P. 660. <https://doi.org/10.1007/s13346-016-0330-y>
- Schaffer Y. E., Krohn D. L. 1982. Liposomes in topical drug delivery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* V. 22. P. 220.
- Seyfoddin A., Shaw J., Al-Kassas R. 2010. Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery. *Drug delivery.* V. 17. P. 467. <https://doi.org/10.3109/10717544.2010.483257>
- Shafaie S., Hutter V., Cook M. T., Brown M. B., Chau D. Y. 2016. In vitro cell models for ophthalmic drug development applications. *Biores. Open Access.* V. 5. No. 1. P. 94. <https://doi.org/10.1089/biores.2016.0008>
- Shit S. C., Shah P. M. 2014. Edible polymers: challenges and opportunities. *J. Polymers.* V. 2014. P. 1. <https://doi.org/10.1155/2014/427259>
- Soenen S. J., De Cuyper M. 2009. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. *Contrast Media Mol. Imaging.* V. 4. No. 5. P. 207. <https://doi.org/10.1002/cmim.282>
- Stockert J. C., Blázquez-Castro A., Cañete M., Horobin R. W., Villanueva A. 2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* V. 114. No. 8. P. 785.
- Tang B. C., Dawson M., Lai S. K., Wang Y.-Y., Suk J. S., Yang M., Zeitlin P., Boyle M. P., Fu J., Hanes J. 2009. Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* V. 106. P. 19268.
- Thomson R. H. (Ed.) 1971. Naturally Occurring Quinones. London: Academic Press.
- Van Meenen J., Ni Dhubghaill S., Van den Bogerd B., Koppen C. 2022. An Overview of advanced in vitro corneal models: implications for pharmacological testing. *Tissue Eng. Part B Rev.* V. 28. No. 3. P. 506. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2021.0031>
- Yermak I., Gorbach V., Glazunov V., Kravchenko A., Mishchenko N., Pimenova E., Davydova V. 2018. Liposomal form of the echinochrome-carrageenan complex. *Mar. Drugs.* V. 16. P. 324. <https://doi.org/10.3390/md16090324>
- Yermak I., Mischchenko N., Davydova V., Glazunov V., Tarbeeva D., Kravchenko A., Pimenova E., Sorokina, I. 2017. Carrageenans-sulfated polysaccharides from red seaweeds as matrices for the inclusion of echinochrome. *Marine Drugs.* V. 15. P. 337.
- Yermak I. M., Gorbach V. I., Karnakov I. A., Davydov V. N., Pimenova E. A., Chistyulin, D. A.; Isako, V. V., Glazunov V. P. 2021. Carrageenan gel beads for Echinochrome inclusion: Influence of structural features of carrageenan. *Carbohydrate Polymers.* V. 272: 118479. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118479>
- Yermak I. M., Kim Y. H., Titlynov E. A., Isakov V. V., Solov'eva T. F. 1999. Chemical structure and gel properties of carrageenans from algae belonging to the *Gigartinales* and *Tichocarpaceae*, collected from the Russian Pacific Coast. *J. Applied Phycol.* V. 11. P. 41. <https://doi.org/10.1023/A:1008071925884>

## IN VITRO SCREENING OF POTENTIAL ECHINOCHROME DELIVERY SYSTEMS FOR THE TREATMENT OF EYE DISEASES

E. I. Alexander-Sinklair<sup>a, \*</sup>, S. A. Aleksandrova<sup>a</sup>, D. M. Darvish<sup>a</sup>, N. V. Edomenko<sup>a</sup>, V. I. Gorbach<sup>b</sup>,  
A. O. Kravchenko<sup>b</sup>, I. M. Yermak<sup>b</sup>, N. A. Mikhailova<sup>a</sup>, and M. I. Blinova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences,*

*St. Petersburg, 194064, Russia*

<sup>b</sup> *Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,*

*Vladivostok, 690022, Russia*

*\*e-mail: elga.aleks@gmail.com*

An important task of topical application of medicines in the treatment of eyes is to achieve a compromise between their effectiveness and safety. The development of new multifunctional local ophthalmic drug delivery systems and in vitro screening of potential medicinal eye products are key areas in solving this problem. In this study, primary in vitro screening of the effect of echinochrome (Ech), the carrageenan complex of echinochrome (CRG/Ech) and its liposomal form (CRG/Ech-Lip) was performed on cultured epithelial cells of the outer shell of the eyeball: conjunctival epithelial cells (Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4) and corneal epithelium human (HCE). The cell viability was assessed by their morphology and metabolic activity using light microscopy and MTT test methods. The direct dependence of the intensity of the cytotoxic effect of Ech on its concentration in the nutrient medium, the form of use, the cellular test system and the incubation time of cells was revealed. Ech in the form of an alcoholic solution in its final concentration of 0.1 mg/ml of the nutrient medium exhibits pronounced cytotoxicity against both cellular test systems. The same final concentration of Ech in the nutrient medium, but already as part of the carrageenan complex of echinochrome (CRG/Ech), turned out to be critical only for the viability of corneal epithelial cells, the survival rate of conjunctival cells under these conditions was about 50%. A high biocompatibility of the liposomal form of the carrageenan complex of echinochrome (CRG/Ech-Lip) with cells of both test systems and a stimulating cytoprotective effect against the cells of the conjunctiva epithelium was revealed.

**Keywords:** carrageenan, echinochrome, echinochrome carrageenan complex, liposomes, ophthalmic drug delivery systems, cytotoxicity, cell cultures, ocular surface epithelium

УДК 618.396:616.132.018.61:575.21]-092.9:599.323.4

## ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ФЕНОТИПА И УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ГЛАДКИХ МИОЦИТОВ ВОСХОДЯЩЕЙ ЧАСТИ АОРТЫ ПРЕЖДЕВРЕМЕННО РОЖДЕННЫХ КРЫС

© 2024 г. О. Н. Серебрякова<sup>1, \*</sup>, В. В. Иванова<sup>1</sup>, И. В. Мильто<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета,  
Томск, 634050, Россия

<sup>2</sup>Отдел молекулярной и клеточной радиобиологии Северского биофизического научного центра ФМБА России, Северск,  
636013, Россия

\*E-mail: oserebryakovan@gmail.com

Поступила в редакцию 26.10.2023

После доработки 06.12.2023

Принята к публикации 12.12.2023

Преждевременное рождение может способствовать развитию болезней системы кровообращения во взрослом возрасте в связи с незавершенностью морфогенеза стенки кровеносных сосудов. Гладкие миоциты являются ведущей клеточной популяцией в средней оболочке стенки аорты и являются пластичными по своей природе, т. е. они способны менять свой фенотип в зависимости от их микроокружения. Наличие синтетически активных гладких миоцитов в стенке аорты взрослого индивида является предиктором формирования широкого спектра сердечно-сосудистых заболеваний. Целью нашего исследования является изучение особенностей молекулярного фенотипа и ультраструктуры гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс, рожденных на 12 и 24 ч раньше срока. В работе представлены результаты иммуногистохимического и морфометрического, а также ультраструктурного анализа стенки восходящей части аорты крыс Вистар, рожденных на 12 ч и 24 ч раньше срока. Показано, что преждевременное рождение приводит к более поздней смене фенотипа гладких миоцитов с синтетического на сократительный, что может негативно отразиться на морфофункциональном состоянии сердечно-сосудистой системы.

**Ключевые слова:** аорта, преждевременное рождение, крысы, фенотип, гладкие миоциты

**DOI:** 10.31857/S0041377124030091, **EDN:** PEVMSK

Люди, рожденные недоношенными, подвергаются повышенному риску развития сердечно-сосудистых заболеваний в более позднем возрасте, включая увеличение среднего артериального давления, неоптимальную работу сердца, а также различные патологии сосудистой сети (Bensley et al., 2016). Преждевременное рождение способствует ремоделированию стенки аорты в постнатальном периоде онтогенеза, что в свою очередь приводит к формированию сердечно-сосудистых патологий, однако механизмы данного процесса на сегодняшний день не ясны (Barnard et al., 2020).

Основными продуцентами волокнистого компонента межклеточного вещества средней оболочки стенки аорты, дезорганизация которых приводит к ремоделированию сосуда, являются васкулярные гладкие миоциты (Wagenseil, Mecham, 2009). Васкулярным гладким миоцитам свойственна фенотипическая пластичность. Данный тип клеток

может переходить от сократительного (покоящегося) фенотипа к синтетическому (пролиферативному) фенотипу в ответ на различные физиологические или патологические стимулы (Rensen et al., 2007). В пренатальном периоде онтогенеза гладкие миоциты средней оболочки стенки аорты крыс имеют преимущественно синтетический фенотип. В первые 2–4 недели постнатального периода онтогенеза крыс гладкие миоциты средней оболочки аорты в физиологических условиях постепенно снижают интенсивность эластогенеза и коллагеногенеза, переключаясь на сократительный фенотип (Wang et al., 2015). Помимо этого, гладкие миоциты способны менять свой фенотип в зависимости от условий окружающей их среды. Так, в ответ на стресс или повреждение сосудов гладкие миоциты изменяют сократительный фенотип на синтетический, в результате чего приобретают пролиферативные, миграционные и синтетические свойства, необходимые

для восстановления тканей (Lesauskaite et al., 2001). Дисбаланс фенотипического переключения гладких миоцитов может привести к различным патологическим процессам (например, кальцификация, рестеноз) или сердечно-сосудистым заболеваниям (например, атеросклероз, аневризма аорты) (Shi et al., 2020).

Полностью дифференцированные гладкие миоциты продуцируют большое количество сократительных белков, таких как  $\alpha$ -гладкомышечный актин, киназа легких цепей миозина, тяжелая цепь миозина и гладкомышечный кальпонин, необходимых для выполнения сократительной функции (Gabbiani et al., 1981). Синтетические гладкие миоциты продуцируют сниженное количество сократительных белков и большое количество белков внеклеточного матрикса. Помимо этого, при переключении фенотипа происходит смена белков промежуточных филаментов гладких миоцитов (Balint et al., 2023). В гладких миоцитах стенки аорты, имеющих синтетический фенотип, преобладают виментиновые промежуточные филаменты, тогда как в гладких миоцитах, имеющих сократительный фенотип — десминовые (Fujimoto et al., 1987; Osborn et al., 1987). В связи с этим изменения количества сократительных белков и состава белков промежуточных филаментов гладких миоцитов часто используют для маркировки их фенотипов.

Целью настоящего исследования является изучение особенностей молекулярного фенотипа и ультраструктуры гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс, рожденных на 12 и 24 ч раньше срока, и сравнение их с молекулярными фенотипами и ультраструктурой аналогичных клеток доношенных особей.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Дизайн исследования.** Эксперимент проводили на 84 крысах-самцах Вистар, из которых формировали 3 группы: контрольная группа (доношенные животные, 22 сут беременности,  $n = 30$ ), 1-я группа (недоношенные на 12 ч крысы, 21.5 сут беременности,  $n = 28$ ) и 2-я группа (недоношенные на 24 ч крысы, 21 сут беременности,  $n = 26$ ). Более выраженная степень недоношенности (более 1 сут) у крыс приводит к преждевременному рождению нежизнеспособного потомства. Для получения потомства к самкам крыс (3 мес., вес  $180 \pm 20$  г), находившимся на стадии проэструса полового цикла, подсаживали на ночь самцов крыс Вистар (2 мес. вес  $180 \pm 20$  г). На следующие сутки с утра, самкам делали влагалищные

мазки и при обнаружении в мазке сперматозоидов, начинали отсчет первых суток беременности.

Индукцию преждевременных родов осуществляли подкожным введением самкам крыс мифепристона (1 мл, 10 мг на 1 кг массы тела; Sigma-Aldrich, США) за 48 ч (группа 2, недоношенные на 24 ч) и 36 ч (группа 1, недоношенные на 12 ч) до предполагаемого срока родов. Выведение потомства из эксперимента осуществляли на 1, 2, 4, 8 и 24 неделю постнатального периода онтогенеза асфиксией  $\text{CO}_2$ . Животных содержали в стандартных условиях вивария с 12-часовой продолжительностью светового дня и свободным доступом к пище и воде. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (№ 8473/1 от 30.11.2020).

**Иммуногистохимическое и морфометрическое исследование.** Фрагменты восходящей части аорты фиксировали в 10 %-ном водном нейтральном (pH 7.4) формалине («БиоВитрум», Россия) в течение 24 ч при температуре 4 °C, после чего промывали в проточной воде, проводили через Isoprep («БиоВитрум», Россия) и пропитывали в парафиновой смеси HISTOMIX («БиоВитрум», Россия). Срезы толщиной 4 мкм, приготовленные на автоматическом ротационном микротоме (HM 355S Thermo Fisher Scientific, США), монтировали на предметные стекла с полилизинным адгезивным покрытием. После депарафинизации срезов проводили высокотемпературную демаскировку антигенов в цитратном буфере (0.01 M; pH 6.0). Эндогенную пероксидазу блокировали с помощью Hydrogen Peroxide Block (Abcam, Великобритания) в течение 10 мин. Неспецифическое окрашивание минимизировали за счет инкубации срезов с Protein Block (Abcam, Великобритания) в течение 10 мин. Во влажной камере на срезы наносили по 50 мкл разведенных в ИНС Diluent (Novocastra, Великобритания) в соответствии с рекомендациями производителей первичных антител: анти-виментин (1:200, 45 мин) и анти- $\alpha$ -гладкомышечный актин (1:150, 45 мин). Использовали моноклональные мышинные антитела Anti-Vimentin antibody (NCL-L-VIM-572; Leica, Великобритания) и поликлональные кроличьи Anti-alpha smooth muscle Actin antibody (ab5694; Abcam, Великобритания) соответственно. После инкубации с первичными антителами, срезы промывали в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), дополнительно на срезы с антителами к виментину наносили Mouse Specifying Reagent (Complement) на 30 мин. После промывки в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4) наносили на срезы полимерный комплекс Goat anti-rabbit HRP-Conjugate на 30 мин и в качестве визуализирующей системы — диаминобензидин (Abcam, Великобритания) на 5 мин.

Иммуноферментную реакцию останавливали, промывая срезы в фосфатно-солевом буфере (рН 7.4), ядра докрашивали гематоксилином Джилла. Окрашенные срезы исследовали с помощью светового микроскопа Axioscope 40 (Zeiss, Германия) с последующей фотосъемкой на цифровую камеру CanonG5 (Canon, Китай). На срезах оценивали интенсивность (легкая, умеренная или выраженная) иммунопозитивного окрашивания клеток средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс и подсчитывали количество иммунопозитивных клеток на  $1 \text{ мм}^2$ .

**Ультроструктурное исследование.** Для трансмиссионного электронно-микроскопического исследования фрагменты восходящей части аорты крыс фиксировали в 4%-ном водном растворе параформальдегида (Serva, Германия) 24 ч при  $4^\circ\text{C}$ , отмывали буфером Хэнкса (Gibco, Великобритания), постфиксацию проводили в 1%-ном  $\text{OsO}_4$  (SPI, США) 1.5 ч при  $4^\circ\text{C}$ . Фрагменты восходящей части аорты дегидратировали и заливали в смесь смол Epon 812-Araldite 502-DDSA (SPI Supplies, США). На ультратоме Leica EM UC7 (Leica, Австрия) готовили ультратонкие срезы (70 нм), которые помещали на гексагональные медные сетки и контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, а затем просматривали на электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония). Фотосъемку осуществляли при увеличении 15 000, 20 000 и 25 000 $\times$  при ускоряющем напряжении 80 кВ.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку количественных данных производили с помощью статистического пакета GraphPad Prism 8.0. Данные представляли в виде медианы, а также первого и третьего квартилей —  $Me (Q_1; Q_3)$ . Проверку на нормальность распределения определяли критерием Шапиро–Уилка, статистическую значимость выявляли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с последующим *post-hoc* тестом Бонферрони для уменьшения ошибки множественных сравнений. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Иммуногистохимическое выявление виментина в стенке восходящей части аорты крыс.** Виментин является белком промежуточных филаментов и содержится в клетках мезенхимного происхождения. Замещение виментиновых промежуточных филаментов на десминовые происходит при смене фенотипа васкулярных гладких миоцитов с синтетического на сократительный (Schmid et al., 1987). Иммунопозитивное цитоплазматическое окрашивание на виментин выявляется во всех оболочках стенки восходящей части аорты доношенных и недоношенных крыс. Во внутренней и наружной оболочках стенки аорты на протяжении всего эксперимента выявляются виментин-позитивные эндотелиоциты и интерстициальные клетки с умеренной и выраженной интенсивностью окрашивания. Количество виментин-позитивных клеток в средней оболочке стенки восходящей части аорты крыс всех групп уменьшается в течение эксперимента. У доношенных особей в течение эксперимента количество виментин-позитивных клеток в средней оболочке стенки восходящей части аорты уменьшается в несколько раз, также снижается интенсивность иммунного окрашивания с умеренной до легкой (рис. 1).

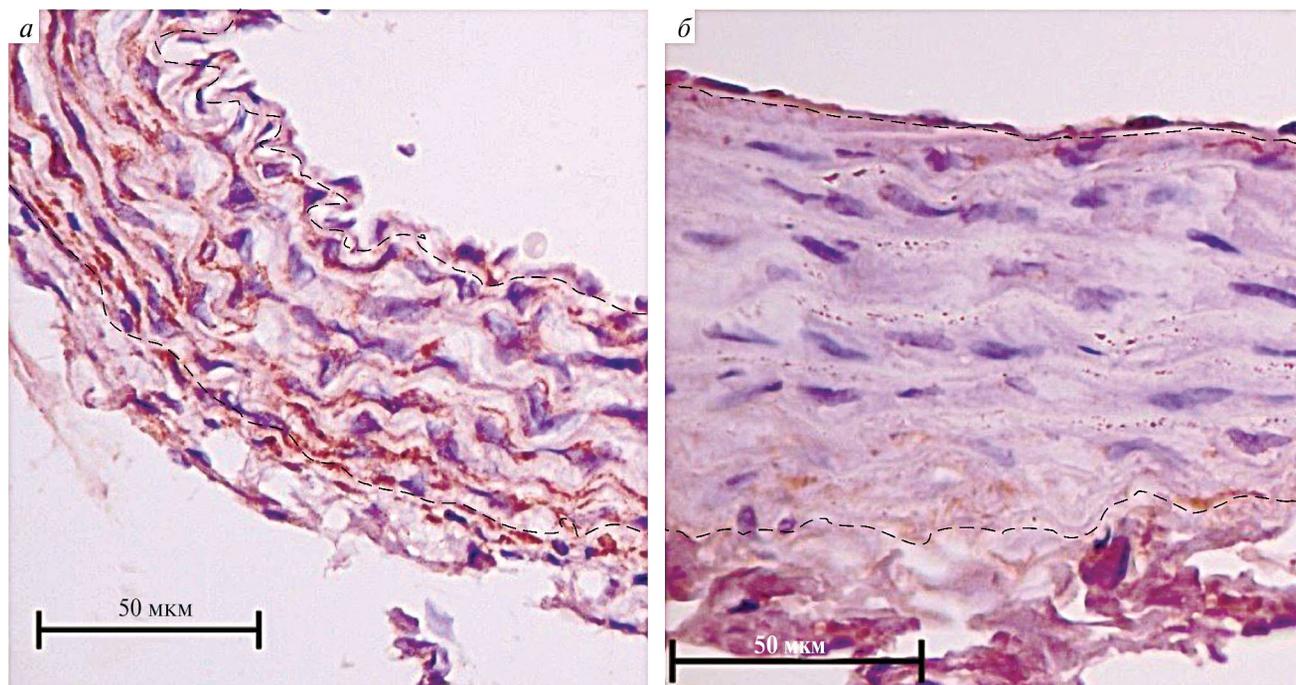
Количество виментин-позитивных клеток в средней оболочке стенки восходящей части аорты крыс 1-й группы больше со 2-й по 8-ю нед. эксперимента в сравнении с контрольными животными (табл. 1). На протяжении всего эксперимента количество иммунопозитивных клеток в средней оболочке стенки восходящей части аорты крыс 2-й группы больше, чем аналогичный показатель доношенных особей.

Интенсивность иммунопозитивного окрашивания гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс 1-й и 2-й групп на протяжении всего эксперимента остается выраженной в большинстве клеток и умеренной в единичных клетках (рис. 2).

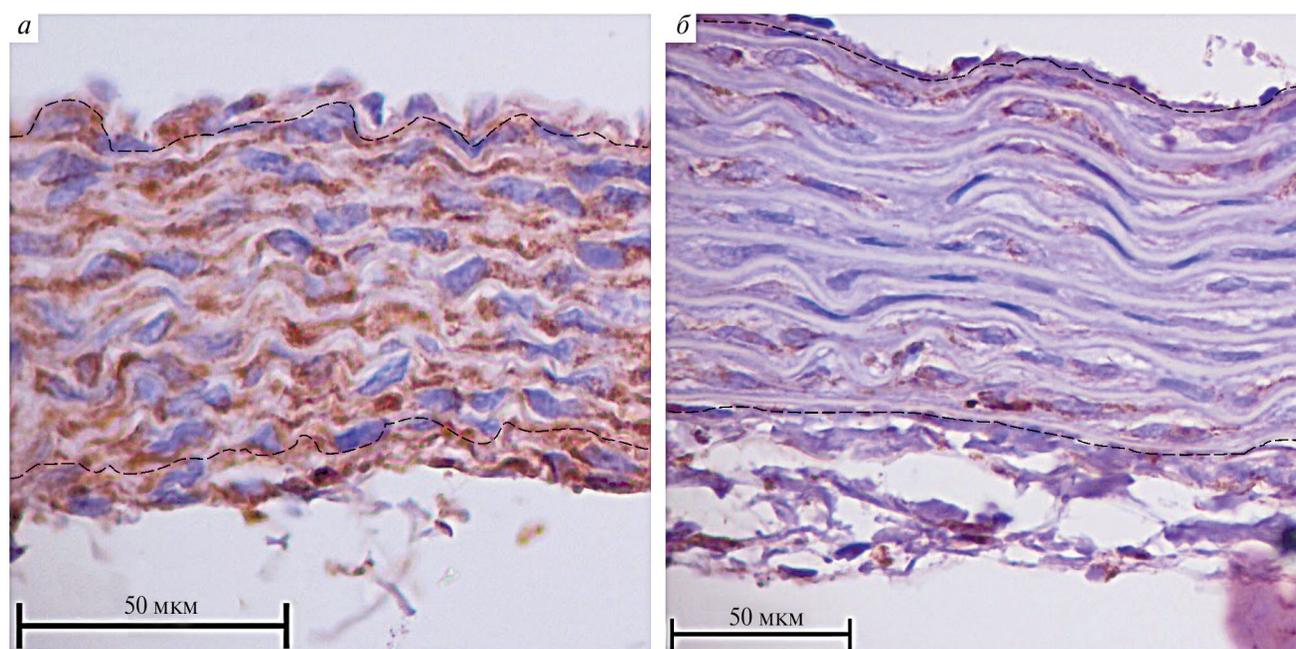
**Таблица 1.** Число виментин-позитивных клеток в средней оболочке стенки восходящей части аорты доношенных (контрольная группа), а также недоношенных на 12 (1-я группа) и 24 ч (2-я группа) животных на  $1 \text{ мм}^2$  среза

| Экспериментальная группа         | Число окрашенных клеток на $1 \text{ мм}^2$ среза ( $Me; Q_1; Q_3$ ) на сроке эксперимента, нед. |                                     |                                  |                                  |                                  |
|----------------------------------|--|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                                  | 1  | 2                                   | 4                                | 8                                | 24                               |
| Контрольная группа               | 647.0 (628; 684)   | 388.2 (367; 402) <sup>a</sup>       | 200.2 (182; 204) <sup>a</sup>    | 107.4 (99; 113) <sup>a</sup>     | 61.2 (54; 68)                    |
| 1-я группа (12 ч недоношенности) | 695.4 (659; 721)   | 585.8 (512; 654) <sup>a, б</sup>    | 403.2 (372; 435) <sup>a, б</sup> | 227.4 (232; 241) <sup>a, б</sup> | 119.8 (108; 138) <sup>a</sup>    |
| 2-я группа (24 ч недоношенности) | 794.8 (789; 806) <sup>б, в</sup>   | 518.2 (499; 554) <sup>a, б, в</sup> | 387.4 (389; 405) <sup>a, б</sup> | 329.6 (292; 355) <sup>б, в</sup> | 158.6 (151; 168) <sup>a, б</sup> |

<sup>a</sup> — отличие от показателя предыдущего срока этой же группы; <sup>б</sup> — отличие от соответствующего показателя крыс контрольной группы; <sup>в</sup> — отличие от соответствующего показателя крыс 1 группы;  $p < 0.05$ .



**Рис. 1.** Стенка восходящей части аорты доношенных крыс. *a, б* — 1 и 24 нед. эксперимента соответственно. Виментин-позитивное окрашивание эндотелиоцитов внутренней оболочки, гладких миоцитов средней оболочки и интерстициальных клеток наружной оболочки стенки восходящей части аорты крыс. Оболочки стенки аорты разделены штриховой линией. В течение эксперимента наблюдается уменьшение количества виментин-позитивных клеток в средней оболочке и снижение интенсивности иммунопозитивной реакции. Иммуногистохимическая реакция на виментин с докраской гематоксилином Джилла.



**Рис. 2.** Стенка восходящей части аорты недоношенных на 24 ч крыс. *a, б* — 1 и 24 нед. эксперимента соответственно. Виментин-позитивное окрашивание эндотелиоцитов внутренней оболочки, гладких миоцитов средней оболочки и интерстициальных клеток наружной оболочки стенки восходящей части аорты. Оболочки стенки аорты разделены штриховой линией. Наблюдается уменьшение количества виментин-позитивных клеток, интенсивность иммуногистохимической реакции остается выраженной на протяжении всего эксперимента. Иммуногистохимическая реакция на виментин с докраской гематоксилином Джилла.

### Иммуногистохимическое выявление $\alpha$ -гладкомышечного актина в стенке восходящей части аорты крыс.

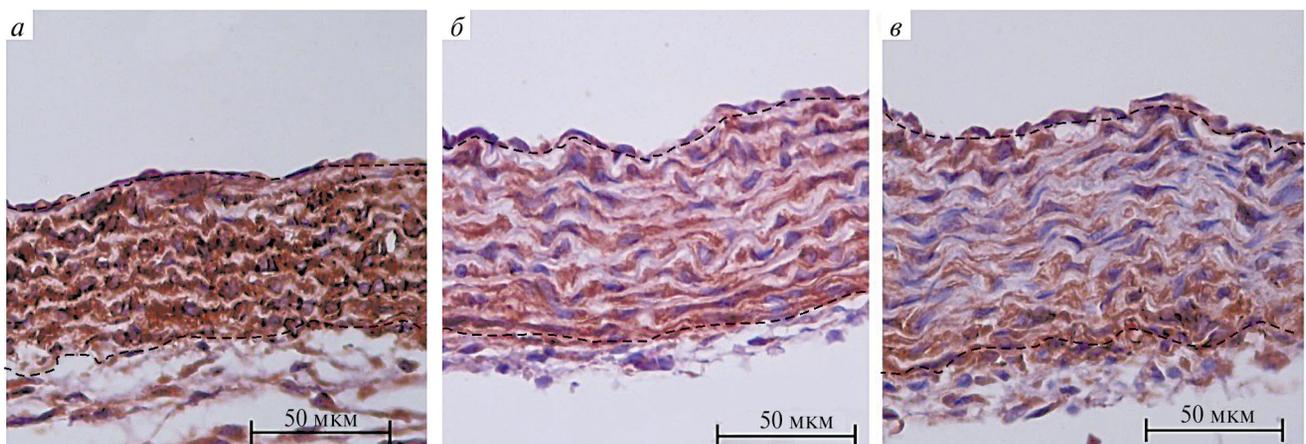
$\alpha$ -Гладкомышечный актин является изоформой мышечного актина, формирует микрофиламенты и является маркером сократительного, непролиферативного фенотипа васкулярных гладких миоцитов в стенке аорты (Nalauko et al., 1996). Позитивное иммунное окрашивание на  $\alpha$ -гладкомышечный актин выявляется в 100% гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс всех групп. Интенсивность иммунной реакции вышеуказанных

клеток в стенке аорты увеличивается на протяжении всего эксперимента у крыс 1-й и 2-й групп от слабой до выраженной, тогда как у крыс контрольной группы практически все клетки имеют выраженную интенсивность иммунного окрашивания на протяжении всего эксперимента (табл. 2). Интенсивность  $\alpha$ -гладкомышечный актин-положительного иммунного окрашивания гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты меньше в 1-й и 2-й группах, в сравнении с аналогичными клетками животных контрольной группы на 1 неделю эксперимента (рис. 3).

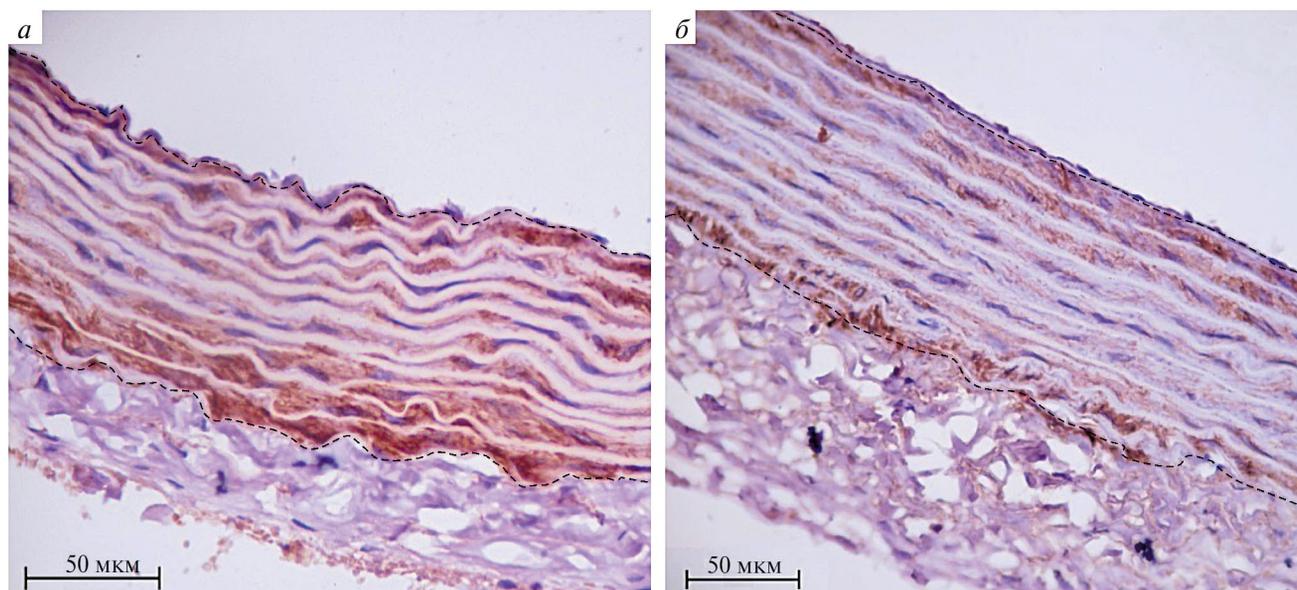
**Таблица 2.** Число иммуноокрашенных на  $\alpha$ -гладкомышечный актин клеток в стенке восходящей части аорты доношенных (контрольная группа), а также недоношенных на 12 ч (1-я группа) и 24 ч (2-я группа) крыс на 1 мм<sup>2</sup> среза

| Экспериментальная группа                 | Интенсивность | Число окрашенных клеток на 1 мм <sup>2</sup> среза (Me; Q <sub>1</sub> ; Q <sub>3</sub> ) на сроке эксперимента, нед. |                                |                                  |                                  |                               |
|--|---------------|---|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
|  |               | 1   | 2                              | 4                                | 8                                | 24                            |
| Контрольная группа (доношенные животные) | Легкая        | 0 (0; 0)  | 0 (0; 0)                       | 1.2 (0; 2)                       | 0.2 (0; 0)                       | 0.4 (0; 1)                    |
|  | Умеренная     | 0 (0; 0)  | 1.8 (0; 2)                     | 7 (1; 11)                        | 11.6 (5; 18)                     | 26 (16; 29)                   |
|  | Выраженная    | 946.8 (932; 964) <sup>a</sup>   | 756.4 (616; 868) <sup>a</sup>  | 476 (488; 517) <sup>a</sup>      | 314.6 (278; 337) <sup>a</sup>    | 355.8 (324; 400)              |
| 1-я группа (12 ч недоношенности)         | Легкая        | 706.2 (618; 879) <sup>b</sup>   | 678.4 (612; 711) <sup>b</sup>  | 141.2 (112; 159) <sup>a, б</sup> | 38.6 (30; 51) <sup>б</sup>       | 35.6 (19; 53) <sup>б</sup>    |
|  | Умеренная     | 93.2 (55; 128) <sup>б</sup>   | 218.2 (185; 248) <sup>б</sup>  | 408.4 (368; 417) <sup>б</sup>    | 223.8 (198; 243) <sup>a, б</sup> | 241.2 (197; 284) <sup>б</sup> |
|  | Выраженная    | 53 (24; 73) <sup>б</sup>  | 72.2 (65; 74) <sup>б</sup>     | 190.2 (194; 217) <sup>a, б</sup> | 264 (218; 307)                   | 201.6 (198; 214) <sup>б</sup> |
| 2-я группа (24 ч недоношенности)         | Легкая        | 623.8 (547; 661) <sup>б</sup>   | 317 (199; 357) <sup>b, c</sup> | 115.8 (84; 156) <sup>б</sup>     | 50.4 (27; 55) <sup>б</sup>       | 27.6 (14; 39)                 |
|  | Умеренная     | 97.8 (75; 98) <sup>б</sup>  | 299.8 (259; 378) <sup>б</sup>  | 228 (189; 312) <sup>б, в</sup>   | 97.2 (61; 115) <sup>б, в</sup>   | 164.4 (140; 198) <sup>б</sup> |
|  | Выраженная    | 46.6 (18; 74) <sup>б</sup>  | 136.8 (100; 152) <sup>б</sup>  | 260 (248; 294) <sup>a, б</sup>   | 280.8 (256; 288)                 | 306.8 (285; 317) <sup>в</sup> |

<sup>a</sup> — отличие от показателя предыдущего срока этой же группы; <sup>б</sup> — отличие от соответствующего показателя крыс контрольной группы; <sup>в</sup> — отличие от соответствующего показателя крыс 1-й группы;  $p < 0.05$ .



**Рис. 3.** Стенка восходящей части аорты на 1 нед. эксперимента. *a* — Контрольная группа (доношенные особи); *б* — 1-я группа (животные недоношенные на 12 ч); *в* — 2-я группа (животные недоношенные на 24 ч).  $\alpha$ -гладкомышечный актин-позитивное окрашивание гладких миоцитов средней оболочки и интерстициальных клеток наружной оболочки стенки восходящей части аорты крыс. Оболочки стенки аорты разделены штриховой линией. В клетках средней оболочки доношенных животных наблюдается выраженная иммуногистохимическая реакция, в клетках преждевременно рожденных крыс обнаруживается менее интенсивная иммуногистохимическая реакция. Иммуногистохимическая реакция на  $\alpha$ -гладкомышечный актин с докраской гематоксилином Джилла.



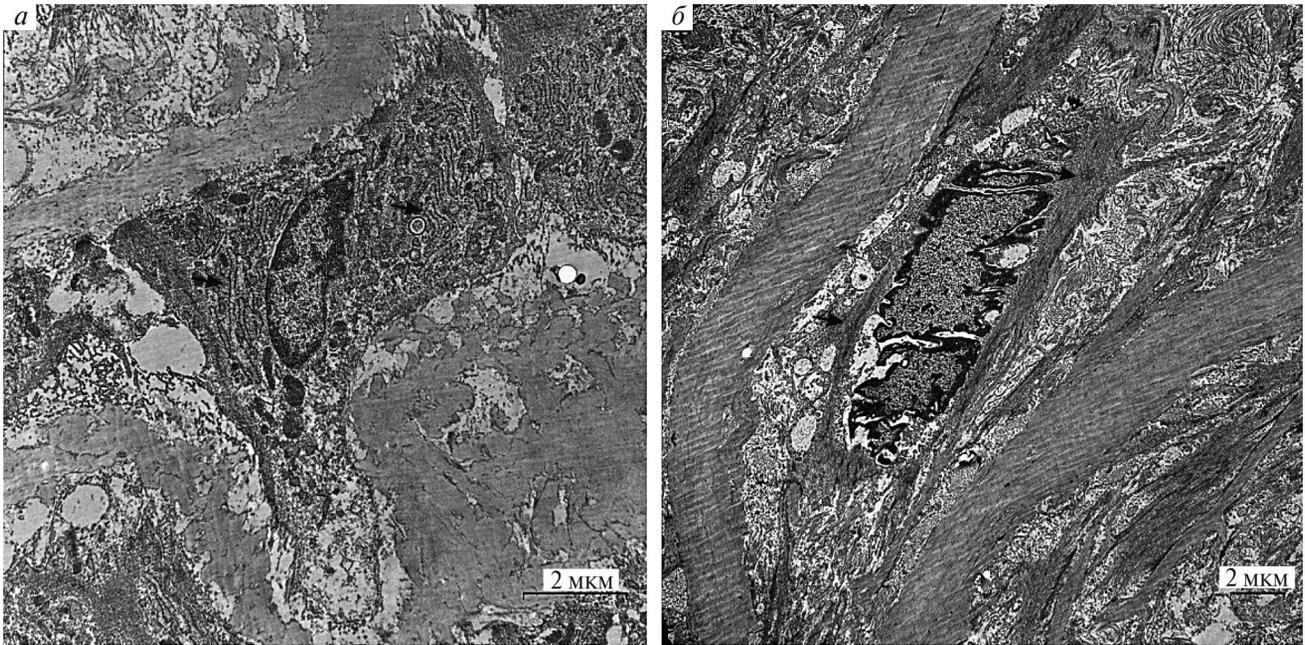
**Рис. 4.** Стенка восходящей части аорты на 24 неделю эксперимента: *а* — контрольная группа (доношенные особи); *б* — 1-я группа (животные недоношенные на 12 ч).  $\alpha$ -Гладкомышечный актин-позитивное окрашивание гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс. Оболочки стенки аорты разделены штриховой линией. В средней оболочке доношенных животных преобладают клетки с выраженной интенсивностью, у преждевременно рожденных крыс — с умеренной интенсивностью иммунной реакции. Иммуногистохимическая реакция на  $\alpha$ -гладкомышечный актин с докраской гематоксилином Джилла.

В 1-ю неделю эксперимента в средней оболочке стенки восходящей части аорты крыс 1-й и 2-й групп определяются гладкие миоциты преимущественно со слабой и умеренной интенсивностью иммуногистохимической реакции, к 8-й неделе эксперимента интенсивность  $\alpha$ -гладкомышечный актин-позитивного окрашивания вырастает до преимущественно выраженной и умеренной. На 24-ю нед. эксперимента в средней оболочке стенки аорты крыс 1-й группы преобладают клетки с умеренной интенсивностью иммуногистохимической реакции на  $\alpha$ -гладкомышечный актин в сравнении с доношенными особями в стенке аорты которых преобладают клетки с выраженной интенсивностью (рис. 4).

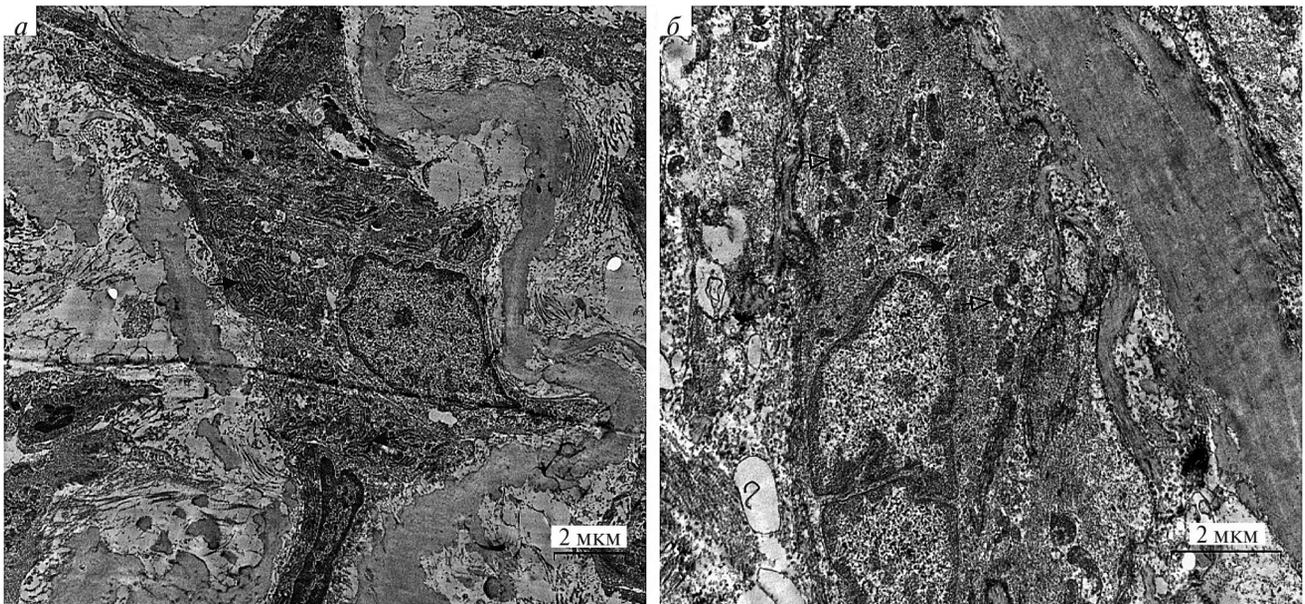
**Ультраструктурный анализ гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты.** Средняя оболочка стенки восходящей части аорты крыс всех групп состоит из эластических мембран, разделенных слоями гладких миоцитов. На 1-й нед. эксперимента клетки средней оболочки стенки восходящей части аорты доношенных крыс представлены гладкими миоцитами с синтетическим фенотипом, которые характеризуются округлой или отростчатой формой, овальным ядром с 1—2 ядрышками и умеренным содержанием гетерохроматина. Цитоплазма этих гладких миоцитов имеет развитый синтетический аппарат: крупные цистерны гранулярной эндоплазматической

сети, большое количество рибосом, а также выраженный пластинчатый комплекс и большое количество транспортных везикул (рис. 5). Энергетический аппарат представлен многочисленными митохондриями с ламеллярными кристами. Сократительный аппарат слабо выражен, миофиламенты определяются на периферии цитоплазмы, под плазматической мембраной. На 24-й нед. эксперимента гладкие миоциты средней оболочки стенки восходящей части аорты доношенных крыс представлены гладкими миоцитами с сократительным фенотипом, имеющими вытянутую веретеновидную форму и крупные сигарообразные ядра. Сократительный аппарат в этих клетках хорошо выражен и занимает всю цитоплазму клеток. Определяется небольшое количество митохондрий и единичные компоненты синтетического аппарата.

Гладкие миоциты средней оболочки стенки восходящей части аорты крыс, недоношенных на 12 и 24 ч, на 1 неделе эксперимента имеют выраженный синтетический фенотип: неправильная форма и крупные ядра с 1—2 ядрышками. Всю площадь цитоплазмы занимает синтетический аппарат, представленный гранулярной эндоплазматической сетью, множеством рибосом и пластинчатым комплексом (рис. 6). Также в цитоплазме определяется большое количество мелких митохондрий и транспортных везикул. На 24-й неделе эксперимента гладкие миоциты средней



**Рис. 5.** Фрагмент средней оболочки стенки восходящей части аорты доношенных крыс: *a* — 1-я неделя эксперимента (черными стрелками отмечен синтетический аппарат, представленный цистернами гранулярной эндоплазматической сети); *б* — 24-я нед. эксперимента (черными стрелками отмечен сократительный аппарат, представленный миофиламентами). Трансмиссионная электронная микроскопия.



**Рис. 6.** Фрагмент средней оболочки стенки восходящей части аорты недоношенных на 12 ч крыс. *a* — 1-я нед. эксперимента (черная стрелка указывает на развитую гранулярную эндоплазматическую сеть); *б* — 24-я нед. эксперимента (черная стрелка указывает на гранулярную эндоплазматическую сеть, стрелка с черным контуром на митохондрии). Трансмиссионная электронная микроскопия.

оболочки стенки восходящей части аорты недоношенных на 12 и 24 ч крыс имеют синтетический фенотип и представлены вытянутыми овальными клетками, содержащими округлые ядра с 1 крупным ядрышком.

В перинуклеарной области цитоплазма этих клеток содержит развитый синтетический аппарат и большое количество крупных митохондрий, периферию цитоплазмы клеток занимают миофиламенты.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Гладкие миоциты являются основными продуцентами коллагена и эластина в средней оболочке стенки аорты. Эластогенез в стенке аорты крыс начинается с 15—17 сут пренатального периода онтогенеза и заканчивается к 7—14 сут постнатального периода развития (Berry et al., 1992). Коллагеногенез в стенке аорты крыс также начинается в пренатальном периоде онтогенеза и продолжается в течение всего постнатального периода онтогенеза с низкой интенсивностью (Looker, Berry, 1997). Таким образом, наиболее выраженная синтетическая активность гладких миоцитов в стенке аорты наблюдается в пренатальном периоде, а также в первые недели постнатального периода онтогенеза. Позднее гладкие миоциты меняют свой фенотип с синтетического на сократительный и выполняют сократительную функцию. При повреждении стенки сосуда, либо недостаточности какого-либо компонента внеклеточного матрикса гладкие миоциты способны дедифференцироваться и изменять свой фенотип с сократительного на синтетический или же сохранять преимущественно синтетический фенотип без дальнейшей дифференцировки (Tang et al., 2022).

Эластичность стенки артерий обуславливается сокращением гладких миоцитов и упругостью эластических мембран, состоящих из эластических волокон и связанных с ними коллагеновых волокон. Сокращение гладких миоцитов в стенке сосудов позволяет регулировать их диаметр, величину артериального давления и распределение кровотока. Снижение количества миофиламентов в гладких миоцитах стенки аорты приводит к их неспособности обеспечить достаточную сократительную силу, чтобы восстановить первоначальный диаметр сосуда после прохождения пульсовой волны. В результате иммуногистохимического и электронномикроскопического исследований нами показано, что гладкие миоциты средней оболочки стенки аорты преждевременно рожденных крыс имеют менее выраженный сократительный аппарат, чем у доношенных особей.

Синтетический фенотип гладких миоцитов характеризуется пролиферативной и секреторной активностью, а также выраженной способностью к миграции (Johnson et al., 2021). Вследствие измененного фенотипа гладкие миоциты с синтетическим фенотипом имеют слабую связь с компонентами внеклеточного матрикса, а значит в меньшей степени распределяют нагрузку при прохождении пульсовой волны, что отражается на функционировании сердечно-сосудистой системы (Сао et al., 2022). При расслоении аорты, гладкие миоциты с синтетическим

фенотипом увеличивают синтез коллагена и матриксной металлопротеиназы-2, что способствует отложению коллагена и деградации эластина, влияя на структуру и функции сосудистой стенки (Wang et al., 2012). В настоящем исследовании показано, что у недоношенных особей в позднем постнатальном периоде онтогенеза гладкие миоциты с синтетическим фенотипом в средней оболочке стенки восходящей части аорты определяются в большом количестве, чем у доношенных крыс.

Ремоделирование стенки артерий является основой патогенеза некоторых сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз, сосудистый рестеноз, артериальная гипертензия, лёгочная гипертензия, расслоение аорты и аневризма (Zhang et al., 2013). Дедифференцированные гладкие миоциты теряют свои сократительные свойства и приобретают синтетический (секреторный, пролиферативный и мигрирующий) фенотип, играя ключевую роль в патогенезе ремоделирования стенки артерий (Ye et al., 2014; Petsophonsakul et al., 2019). Васкулярные гладкие миоциты с синтетическим фенотипом секретируют во внеклеточное пространство большое количество компонентов внеклеточного матрикса, включая белки (например, коллаген I, III, IV, ламинин), а также протеогликаны (например, перликан) и гликозаминогликаны (например, гиалуронан) (Merrilees et al., 1990; Figueroa et al., 2004). Показано, что гладкие миоциты с синтетическим фенотипом секретируют или связывают с поверхностью плазматической мембраны несколько матриксных металлопротеиназ (ММП) и соответствующих им тканевых ингибиторов матриксных металлопротеаз (ТИМП), чтобы обеспечить правильное восстановление и ремоделирование растущих или повреждённых кровеносных сосудов. Выявлено, что хронический избыток провоспалительных цитокинов и факторов роста может вызывать нарушение регуляции активности как ММП, так и ТИМП, что может способствовать неадекватному ремоделированию сосудов (Wilson, 2011). Имеются данные о влиянии митохондриальной дисфункции и окислительного стресса как триггеров трансформации фенотипа гладких миоцитов, приводящие к инициации и развитию ремоделирования артерий (Qin et al., 2023). Ранее нами было показано, что в средней оболочке стенки восходящей части аорты недоношенных крыс определяется дисбаланс компонентов внеклеточного матрикса с преобладанием коллагенового компонента над эластическим, что согласуется с обнаруженным большим количеством синтетически активных гладких миоцитов, как основных продуцентов коллагена (Серебрякова и др., 2023).

При анализе ультраструктурной организации гладких миоцитов с синтетическим фенотипом выявлено, что они имеют неправильную форму, крупные округлые ядра с 1–2 ядрышками и развитый синтетический аппарат, в то время как гладкие миоциты с сократительным фенотипом имеют веретеновидную форму с вытянутым овальным ядром без ядрышек и развитым сократительным аппаратом (Thyberg et al., 1985; Kanda, Matsuda, 1994; Sweeney et al., 2006). Ультраструктурный анализ гладких миоцитов средней оболочки стенки восходящей части аорты преждевременно рожденных крыс 1-я и 2-я групп подтверждает наличие синтетически активных гладких миоцитов с малым количеством миофиламентов в позднем постнатальном периоде онтогенеза, в то время как в контрольной группе на аналогичные сроки ведущим является сократительный фенотип гладких миоцитов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате настоящего исследования было обнаружено большое количество гладких миоцитов с синтетическим фенотипом в средней оболочке стенки восходящей части аорты преждевременно рожденных крыс на поздних этапах постнатального периода онтогенеза, что может способствовать ремоделированию стенки сосуда и служить предиктором развития широкого круга сердечно-сосудистых заболеваний.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 24-25-0001.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание, питание, уход и выведение животных из эксперимента осуществляли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ № 755 от 12.08.1987) и Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997. Протокол исследования (№ 8473/1 от 30.11.2020) одобрен этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России, Томск.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Серебрякова О.Н., Иванова В.В., Мильто И.В.* 2023. Особенности строения стенки восходящей части аорты преждевременно рожденных крыс. Цитология. Т. 65. № 6. С. 593. (*Serebryakova O.N., Ivanova V.V., Milto I.V.* 2023. Structural features of ascending aorta wall in premature born rats. Tsitologiya. V. 65. P. 593–600.)
- Balint B., Bernstorff I.G., Schwab T., Schäfers H.J.* 2023. Age-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells in the normal ascending aorta. Front. Cardiovasc. Med. V. 10: 1114355. doi: 10.3389/fcvm.2023.1114355
- Barnard C., Peters M., Sindler A., Farrell E., Baker K., Palta M., Stauss H., Dagle J., Segar J., Pierce G., Eldridge M., Bates M.* 2020. Increased aortic stiffness and elevated blood pressure in response to exercise in adult survivors of prematurity. Physiol. Rep. V. 8: e14462. doi: 10.14814/phy2.14462
- Bensley J., De Matteo R., Harding R., Black M.* 2016. The effects of preterm birth and its antecedents on the cardiovascular system. Acta Obstet. Gynecol. Scand. V. 95. P. 652.
- Berry C., Looker T., Germain J.* 1992. The growth and development of the rat aorta. J. Anat. V. 113. P. 1.
- Cao G., Xuan X., Hu J., Zhang R., Jin H., Dong H.* 2022. How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease. Cell Commun. Signal. V. 20: 180. doi: 10.1186/s12964-022-00993-2
- Figuroa J., Oubre J., Vijayagopal P.* 2004. Modulation of vascular smooth muscle cells proteoglycan synthesis by the extracellular matrix. J. Cell Physiol. V. 198. P. 302.
- Fujimoto T., Tokuyasu K.T., Singer S.J.* Direct morphological demonstration of the coexistence of vimentin and desmin in the same intermediate filaments of vascular smooth muscle cells. J. Submicrosc. Cytol. 1987. V. 19. P. 1.
- Gabbiani G., Schmid E., Winter S., Chaponnier C., de Chastanay C., Vandekerckhove J., Weber K., Franke W.W.* Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 298.
- Halayko A., Salari H., Ma X., Stephens N.* 1996. Markers of airway smooth muscle cell phenotype. Am. J. Physiol. V. 270. P. 1040.
- Johnson R., Solanki R., Warren D.* 2021. Mechanical programming of arterial smooth muscle cells in health and ageing. Biophys. Rev. V. 13. P. 757.
- Kanda K., Matsuda T.* Mechanical stress-induced orientation and ultrastructural change of smooth muscle cells cultured in three-dimensional collagen lattices. 1994. Cell Transplant. V. 3. P. 481.
- Lesauskaite V., Tanganelli P., Sassi C., Neri E., Diciolla F., Ivanoviene L., Epistolato M.C., Lalinga A.V., Alessandrini C., Spina D.* 2001. Smooth muscle cells of the media in the dilatative pathology of ascending thoracic aorta: morphology, immunoreactivity for osteopontin, matrix metalloproteinases, and their inhibitors. Hum. Pathol. V. 32. P. 1003.
- Looker T., Berry C.* 1997. The growth and development of rat aorta. J. Anat. V. 113. P. 17.

- Merrilees M., Campbell J., Spanidis E., Campbell G.* 1990. Glycosaminoglycan synthesis by smooth muscle cells of differing phenotype and their response to endothelial cell conditioned medium. *Atherosclerosis*. V. 81. P. 245.
- Osborn M., Caselitz J., Puschel K., Weber K.* 1987. Intermediate filament expression in human vascular smooth muscle and in arteriosclerotic plaques. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* V. 411. P. 449.
- Petsophonsakul P., Furmanik M., Forsythe R., Dweck M., Schurink G. W., Natour E., Reutelingsperger C., Jacobs M., Mees B., Schurgers L.* 2019. Role of vascular smooth muscle cell phenotypic switching and calcification in aortic aneurysm formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* V. 39. P. 1351.
- Qin H., Bao J., Tang J., Xu D., Shen L.* 2023. Arterial remodeling: the role of mitochondrial metabolism in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* V. 324. P. 183.
- Rensen S., Doevendans P., van Eys G.* 2007. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth. Heart J. V.* 15. P. 100.
- Schmid E., Osborn M., Runger-Brändle E., Gabbiani G., Weber K., Franke W.* 1982. Distribution of vimentin and desmin filaments in smooth muscle tissue of mammalian and avian aorta. *Exp. Cell Res.* V. 137. P. 329.
- Shi J., Yang Y., Cheng A., Xu G., He F.* 2020. Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* V. 319. P. 613.
- Sweeney M., Jones C., Greenwood S., Baker P., Taggart M.* 2006. Ultrastructural features of smooth muscle and endothelial cells of isolated isobaric human placental and maternal arteries. *Placenta*. V. 27. P. 635.
- Tang H., Chen A., Zhang H., Gao X., Kong X., Zhang J.* 2022. Vascular smooth muscle cells phenotypic switching in cardiovascular diseases. *Cells*. V. 11: 4060. doi: 10.3390/cells11244060
- Thyberg J., Nilsson J., Palmberg L., Sjölund M.* 1985. Adult human arterial smooth muscle cells in primary culture. Modulation from contractile to synthetic phenotype. *Cell Tissue Res.* V. 239. P. 69.
- Wagenseil J., Mecham R.* Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. 2009. *Physiol. Rev.* V. 89. P. 957.
- Wang G., Jacquet L., Karamariti E., Xu Q.* 2015. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *J. Physiol.* V. 14. P. 3013.
- Wang L., Zhang J., Fu W., Guo D., Jiang J., Wang Y.* 2012. Association of smooth muscle cell phenotypes with extracellular matrix disorders in thoracic aortic dissection. *J. Vasc. Surg.* V. 56. P. 1698.
- Wilson D.* 2011. Vascular smooth muscle structure and function. In: *Mechanisms of vascular disease: A reference book for vascular specialists.* University of Adelaide Press. P. 13.
- Ye G., Nesmith A., Parker K.* 2014. The role of mechanotransduction on vascular smooth muscle myocytes cytoskeleton and contractile function. *Anat. Rec.* V. 297. P. 1758.
- Zhang J., Wang L., Fu W., Wang C., Guo D., Jiang J., Wang Y.* 2013. Smooth muscle cell phenotypic diversity between dissected and unaffected thoracic aortic media. *J. Cardiovasc. Surg.* V. 54. P. 511.

## FEATURES OF MOLECULAR PHENOTYPE AND ULTRASTRUCTURE OF SMOOTH MUSCLE CELLS IN ASCENDING AORTA IN PREMATURE BORN RATS

O. N. Serebryakova<sup>a, \*</sup>, V. V. Ivanova<sup>a</sup>, I. V. Milto<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Department of Morphology and General Pathology of the Siberian State Medical University, Tomsk, 634050, Russia

<sup>b</sup>Department of Molecular and Cellular Radiobiology of the Seversk Biophysical Research Center of the FMBA of Russia, Seversk, 636013, Russia

\*e-mail: oserebryakovan@gmail.com

Preterm birth can contribute to the development of diseases of circulatory system in adulthood due to the incompleteness of the morphogenesis of the blood vessels wall. Smooth muscle cells are the leading cell population in the middle shell of the aortic wall and are plastic in nature, i. e. they are able to change their phenotype depending on the conditions of their environment. The presence of synthetically active smooth muscle cells in the aortic wall of an adult individual is a predictor of the formation of a wide range of cardiovascular diseases. The aim of our study is to identify the morphofunctional features of molecular phenotype and ultrastructure of smooth muscle cells of ascending aorta wall in rats born 12 and 24 hours prematurely. The paper presents the results of immunohistochemical and morphometric, as well as ultrastructural analysis of ascending aorta wall in Wistar rats born 12 and 24 hours prematurely. It has been shown that preterm birth leads to a later change in the phenotype of smooth muscle cells from synthetic to contractile, which can negatively affect the morphofunctional state of the cardiovascular system.

**Keywords:** aorta, preterm birth, rats, phenotype, smooth muscle cells

УДК 57.087.3

## МЕТОДЫ АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР АКТИНА, МЕЧЕННОГО ФАЛЛОИДИНОМ

© 2024 г. А. В. Ревитцер<sup>1, \*</sup>, Ю. А. Негуляев<sup>1</sup>

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

\*E-mail: eetytnet@gmail.com

Поступила в редакцию 22.12.2023

После доработки 13.02.2024

Принята к публикации 16.02.2024

Клетка — это сложно организованная трехмерная система, обладающая целым рядом высокодинамичных структур, морфология которых сложна для описания, так как является протяженной, изрезанной, неровной. Актиновый цитоскелет, состоящий из фибриллярного и глобулярного актина, а также вспомогательных белков, регулирующих его организацию, является одной из таких структур. Изучение его организации и динамики — актуальный вопрос современной цитологии. Форма и перестройки актинового цитоскелета тесно связаны с функционированием клетки. Возможность какой-либо (качественной или количественной) характеристики изменений актинового цитоскелета позволяет подтверждать или опровергать гипотезы в ходе исследований, а также делать новые предположения. Количественная характеристика помогает объективно и непредвзято сравнивать актиновые структуры в различных экспериментах, выявляя воздействия биологических, химических и физических стимулов. В настоящее время для численной оценки актиновых структур клетки существует несколько доступных и легко реализуемых подходов с помощью бесплатного программного продукта ImageJ. В представленном обзоре обобщены методы анализа изображений внутриклеточных структур актина, меченных фаллоидином, с помощью ImageJ. Рассмотренные методы позволяют получать количественную характеристику организации актиновых структур для дальнейшей оценки и сравнения результатов экспериментов.

**Ключевые слова:** фибриллярный актин, количественная характеристика организации актиновых структур, фрактальная размерность Минковского

**Принятые сокращения:** МСК — мезенхимные стволовые клетки; GV (grey value) — интенсивность серого; MGV (mean grey value) — относительная интенсивность серого; L (length) — суммарная длина актиновых фибрилл клетки; D (dimension) — фрактальная размерность Минковского.

DOI: 10.31857/S0041377124030101, EDN: PDYRCM

Актиновый цитоскелет является белковой каркасной структурой, находящейся в клетке. Кроме очевидной каркасной функции он участвует и в других клеточных процессах — подвижности немышечных клеток, сигналинге, эндоцитозе и экзоцитозе, делении клетки (Dominguez, Holmes, 2011). Актиновые структуры в клетке представлены глобулярным и фибриллярным актином, находящимися в постоянном динамическом балансе — в присутствии АТФ происходит полимеризация актина на одном конце нити и деполимеризация на другом. Кроме глобулярного и фибриллярного актина в формировании актиновых фибрилл участвуют другие белки, называемые актин-связывающими, которые обеспечивают кэпирование, ветвление и объединение актиновых фибрилл (Vallénus, 2013; Dominguez, Holmes, 2011). Актиновые фибриллы в клетке — высокодинамичная структура, реагирующая на изменения биохими-

ческого и физического окружения, поэтому важной задачей при изучении актина в клетке является регистрация его состояний до и после различных воздействий в ходе эксперимента.

Организацию актина в клетке возможно выявлять с помощью Вестерн-блоттинга фибриллярного и глобулярного актина (Domanski et al., 2016). Но чаще всего организацию актина оценивают на основании визуализации структур, используя микрофотографии, полученные с помощью широкопольного или конфокального микроскопа. Для выявления фибриллярного актина его окрашивают с помощью цветных флуоресцентных меток, соединенных со специфическими антителами или фаллоидином, который специфично связывается с фибриллярным актином (Vallénus, 2013; Mishra et al., 2019). После этого по полученным фотографиям актиновые фибриллы оценивают визуально или прибегают к цифровым

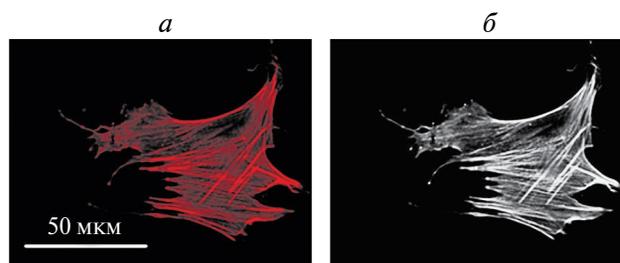
методам, самым популярным из которых является вычисление относительной интенсивности флуоресценции. Но кроме этого метода, который дает минимум структурной информации, существуют и другие, несколько реже используемые — расчет суммарной длины актиновых филаментов в клетке и фрактальная размерность Минковского для изображений фибриллярного актина.

В научной среде широко известен свободно распространяемый программный продукт ImageJ (НИН, США) (Schneider et al., 2012), и разнообразные плагины, интегрированные в эту систему, позволяющие реализовать более специфичные подходы к вычислениям; кроме этого, существуют и отдельные программные решения. Целью данной обзорной статьи является обобщение информации о реализации в программе ImageJ трех самых популярных методов цифрового анализа перестроек актиновых структур. Приведены основные алгоритмы обработки изображений с использованием микрофотографий клеток, окрашенных родамином, конъюгированным с фаллоидином.

### ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ИНТЕНСИВНОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФИБРИЛЛЯРНОГО АКТИНА

Измерение относительной интенсивности флуоресценции фибриллярного актина является наиболее распространенным методом для количественной оценки фибриллярного актина в клетке в настоящее время. Подход вычисления относительной интенсивности флуоресценции основан на кодировании яркости изображений: например, для изображения в оттенках серого глубина цвета одного пикселя принимает значение от 0 до 255 при 8-битном кодировании; при суммировании этих значений яркости и делении полученной суммы на количество пикселей вычисляется относительная интенсивность флуоресценции (рис. 1).

**Реализация вычислений относительной интенсивности флуоресценции в ImageJ.** Расчет в ImageJ производится согласно следующим этапам: в меню Analyze выбираются настройки Set\_Measurements, а в них — подпункт MGV. Затем необходимо выбрать и открыть обрабатываемое изображение (например, для серий изображений, полученных с помощью микроскопов Olympus через плагин Olympus\_Viewer в меню Plugins), после чего через меню Image — подменю Channels и функции Split\_Channels; разделить выбранное изображение по каналам, далее выбрать канал, содержащий изображение фибриллярного актина, затем, используя функцию Freehand\_Selections, обвести по периметру изображение клетки и в меню Analyze выбрать Measure;



$$MGV = \frac{\sum_{i=1}^N GV_i}{N}$$

|                      |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |   |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|---|
| Количество серого, % | 100 | 90  | 80  | 70  | 60  | 50  | 40  | 30 | 20 | 10 | 0 |
| Значение пикселя     | 255 | 229 | 204 | 178 | 153 | 128 | 102 | 76 | 51 | 25 | 0 |
| Оттенок              |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |   |

**Рис. 1.** Схематическая визуализация вычисления средней интенсивности флуоресценции фибриллярного актина мезенхимной стволовой клетки (МСК). *a* — Микрофотография МСК, окрашенной родамином, конъюгированным с фаллоидином. *b* — Перевод канала, содержащего изображение фибриллярного актина, в оттенки серого. *v* — Формула для вычисления относительной интенсивности флуоресценции (MGV, mean grey value), где GV (grey value) — численный эквивалент яркости пикселя, а *N* — число пикселей в изображении цитоскелета. *z* — Примеры кодирования численных эквивалентов цветов пикселей для 8-битного изображения (GV).

результат вычисления относительной интенсивности флуоресценции появится во всплывающем окне, после чего его следует записать в программу, работающую с табличными данными (например, Excel (Microsoft, USA), но в ImageJ также можно проводить расчеты), и переходить к следующему измерению, после получения достаточного числа измерений вычисляется среднegrupповое значение, которое впоследствии сравнивается с вычисленным средним для других групп.

Средняя интенсивность флуоресценции — интуитивно понятный подход, позволяющий численно охарактеризовать изменения при сборке или разборке фибриллярного актина, так как чем больше в клетке окрашенного фибриллярного актина, тем больше относительная интенсивность флуоресценции (Hao et al., 2012). Этот подход хорошо себя зарекомендовал, и его интуитивно понятная реализация активно используется при оценке организации фибриллярного актина во многих других работах (Numasawa et al., 2011; Liu et al., 2015; Lu et al., 2015; Revittser et al., 2020). Часто этот метод служит единственным подходом для измерения и количественного подтверждения

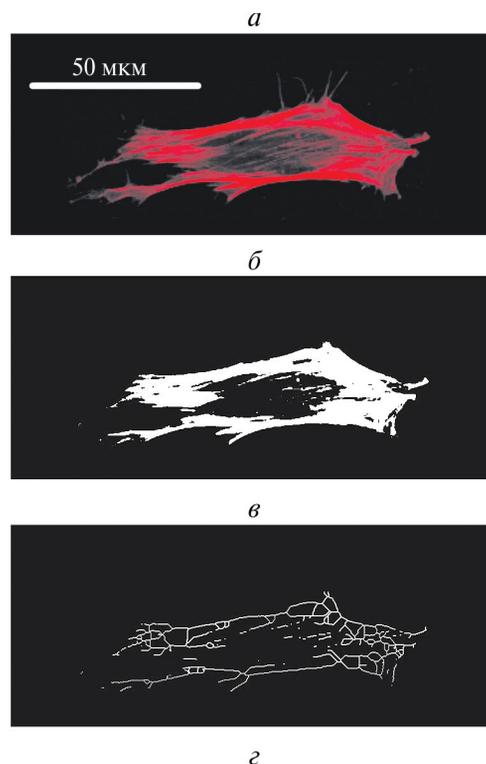
наблюдаемой сборки или разборки микрофиламентов, как, например, в предшествующих исследованиях перестроек цитоскелета, инициированных деструкцией рафтов (Chubinskiy et al., 2013) или селективной активацией ионных каналов (Chubinskiy et al., 2019).

Вычисление относительной интенсивности флуоресценции как метод имеет существенное преимущество — независимость результата от размера клетки и ее формы, доступность программного обеспечения и простая реализация вычислений. Однако есть и недостатки: результат сильно зависит от параметров, выставляемых при получении микрофотографии, таких как выдержка, интенсивность лазера (при использовании конфокальной микроскопии), поэтому очень важно следить за тем, чтобы все группы микрофотографий были получены при одинаковых параметрах. Очевидной и самой существенной особенностью метода является факт, что полученные измерения в большей степени будут свидетельствовать о количественном значении фибриллярного актина, но не будут содержать качественную информацию о распределении или форме фибрилл. Эти ограничения делают необходимым поиск и развитие новых современных подходов, включающих анализ организации и динамики фибриллярных структур в клетке.

## РАСЧЕТ СУММАРНОЙ ДЛИНЫ АКТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ В КЛЕТКЕ

Суммарная длина фибриллярного актина является информативным параметром для оценки изменений, возникающих в структуре актинового цитоскелета клетки. Данный показатель рассчитывается как сумма длин всех фибрилл, выявленных на микрофотографии клетки (Lichtenstein et al., 2003; Vindin et al., 2014). Реализация этого расчета возможна при использовании плагина `Measure_Skeleton_Length` (Niemistö et al., 2005) (рис. 2).

**Реализация вычислений суммарной длины фибриллярного актина ( $L$ ) клетки с помощью плагина `Measure_Skeleton_Length` в `ImageJ`.** Порядок вычисления параметра состоит из предобработки изображения с помощью `ImageJ`. Выбранную для расчетов микрофотографию необходимо открыть, далее необходимо выбрать и отделить от остальных канал, в котором находится изображение фибриллярного актина (в меню `Image` подменю `Channels`, в нем — функция `Split_Channels`), после этого полученное изображение перевести в формат без оттенков серого — бинаризовать (`Binarize`), а затем провести построение множества пикселей, равноудаленных от границ фигуры — скелета фигуры (функция `Skeletonize`). Затем в изображении нужно выделить



$$L = \sum_{i=1}^N l_i; L = \sum_{j=1}^{N'} p_j$$

**Рис. 2.** Вычисление суммарной длины фибриллярного актина клетки. *a* — МСК, окрашенная родамином, конъюгированным с фаллоидином. *б* — Бинаризованное изображение фибриллярного актина. *в* — Скелет фигуры. *г* — Формула для расчета суммарной длины фибриллярного актина клетки, где  $L$  — суммарная длина фибриллярного актина в клетке,  $l$  — длина отдельных филаментов,  $N$  — количество отдельных филаментов,  $N'$  — количество отдельных пикселей, принадлежащих скелету фигуры,  $p$  — пиксель.

клетку (используя `Freehand_Selections`) и рассчитать длину с помощью кнопки плагина `Measure_Skeleton_Length` с изображением скелета фигуры. Безусловно, скелет фигуры — это приблизительное, а не точное изображение фибрилл. Тем не менее даже такой параметр может дать представление об организации, расположении и количестве фибрилл в клетке и позволяет сравнивать результаты контрольных и экспериментальных групп (Lichtenstein et al., 2003).

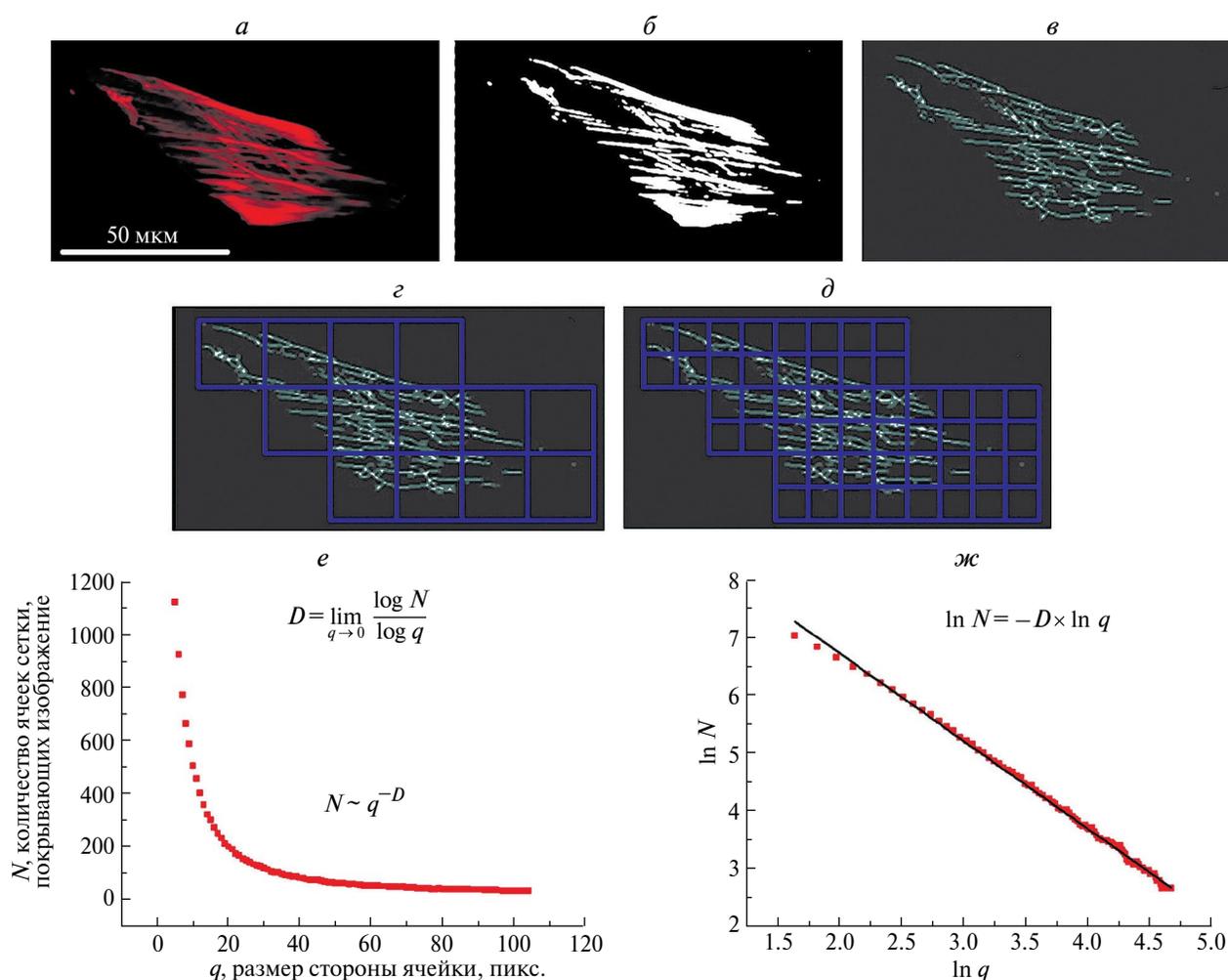
Некоторые исследовательские группы развили и улучшили этот подход в собственных программных продуктах. Например, реализован автоматизированный подход, позволяющий определять границы клеток на микрофотографии, выделять в них филаменты и подсчитывать их длину (Vindin et al., 2014). Кроме того, использован метод, позволяющий учитывать значения не только длины, но и ширины актиновых филаментов при анализе (Alioscha-Perez et al., 2016).

## ВЫЧИСЛЕНИЕ ФРАКТАЛЬНОЙ РАЗМЕРНОСТИ МИНКОВСКОГО

Актиновый цитоскелет клетки обладает сложной изрезанной формой, которая может изменяться при воздействии различных биологически активных веществ, при этом их изменения не всегда можно охарактеризовать количественно с помощью относительной интенсивности флуоресценции (Revittser et al., 2021). Существует фрактальная размерность Минковского — коэффициент, описывающий структуры на основе количественной оценки их сложности в контексте расположения в пространстве (Longley, Batty, 1989), описывающий количественную связь между масштабом и детализацией изображения. Изображение окрашенного фибриллярного актина на микрофотографии, полученное с помощью флуоресцентной

микроскопии, подлежит оценке с помощью этого метода (Smith et al., 1996).

Само вычисление фрактальной размерности происходит следующим образом: на изображение накладывается сетка из квадратных ячеек, происходит подсчет ячеек, содержащих изображение, далее размер ячейки уменьшается (например, в два раза или на три пикселя, правило может быть любым); снова происходит подсчет ячеек, содержащих изображение, и далее после изменения размера сетки процесс повторяется еще несколько раз. Далее строится зависимость количества ячеек сетки, необходимых для покрытия изображения от их размера. Эта зависимость аппроксимируется прямой по методу наименьших квадратов; коэффициент фрактальной размерности Минковского вычисляется как тангенс угла наклона этой прямой (рис. 3) (Bishop, Peres, 2016).



**Рис. 3.** Этапы вычисления фрактальной размерности Минковского в плагине FracLac. *a* — Микрофотография МСК окрашенного родамином, конъюгированным с фаллоидином. *б* — Результат операции бинаризации изображения на рисунке *a*. *в* — Результат операции скелетонизации изображения (*б*). *г, в* — Сетка для вычисления фрактальной размерности Минковского, наложенная на изображение *в*. *е* — График зависимости количества ячеек сетки ( $N$ ), покрывающих изображение, от размера стороны ячейки ( $q$ ). *ж* — Тот же график (*е*) построенный в логарифмических координатах, приближенный аппроксимирующей прямой; фрактальная размерность Минковского ( $D$ ) рассчитывается как тангенс угла наклона этой прямой (относительно горизонтальной оси).

**Реализация вычислений фрактальной размерности Минковского с помощью плагина FracLac для ImageJ.** Самый широко используемый программный продукт из свободно распространяемых инструментов для подсчета фрактальной размерности Минковского — это плагин FracLac (Karperien et al., 2013) для программы ImageJ (рис. 3). Порядок обработки изображения с помощью плагина состоит из первоначальной подготовки изображения с помощью ImageJ. Пользователем выбирается изображение для расчетов, далее его необходимо открыть в приложении, после чего через меню Image, подменю Channels и функции Split\_Channels выбранное изображение разделяется по цветовым каналам, далее в канале, содержащем изображение фибриллярного актина, производится бинаризация (Binarize) и далее построение скелета полученной фигуры (Skeletonize). Затем в изображении выделяется область интересующей клетки с помощью инструмента Freehand\_Selection. Далее необходимо открыть плагин FracLac в ImageJ, выбрать меню BC (box-counting — еще одно название фрактальной размерности Минковского), установить размеры ячеек для расчета в специальном окошке и произвести расчет через кнопку ОК. Эти действия позволят получить результат вычисления фрактальной размерности Минковского для выбранного изображения клетки (Revittser et al., 2022). Далее полученный результат из всплывающего окна необходимо перенести в программу, работающую с табличными данными.

Плагин FracLac является доступным и понятным инструментом, позволяющим провести необходимые вычисления (Fuseler et al., 2007; Qian et al., 2012), однако они могут сильно зависеть от параметров, выбираемых пользователем при расчётах, что может привести к недостоверным результатам. Вопрос подбора параметров решен в программном продукте (Revittser et al., 2021), подбор положения и размера ячеек полностью автоматизирован, для расчета необходимо только выбрать микрофотографию интересующей клетки, но для его запуска необходим коммерческий продукт MATLAB (MathWorks, США) — программная среда, в которой он реализован.

Вычисление фрактальной размерности Минковского является менее популярным подходом по сравнению с вычислением средней интенсивности флуоресценции и суммарной длиной актиновых фибрилл ввиду его менее понятной на интуитивном уровне и более сложной математической реализации, тем не менее есть основания полагать, что он позволяет выявлять изменения цитоскелета, недоступные для квантификации с помощью относительной интен-

сивности флуоресценции (Revittser et al., 2021). Так как коэффициент фрактальной размерности Минковского характеризует самоподобие изображения в определенных масштабах, с его помощью возможно выявить изменения, связанные с реорганизацией фибриллярного актина.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Некоторые изменения актинового цитоскелета возможно увидеть глазом, в то время как для менее выраженных изменений организации такая оценка может оказаться недостаточной и, кроме того, она субъективна и зависит от опыта и конкретных предпочтений наблюдателя (Revittser et al., 2021). С помощью квантификации возможно получить объективный численный эквивалент наблюдаемых изменений. Например, увеличение параметра относительной интенсивности флуоресценции и суммарной длины фибриллярного актина говорит о сборке актинового цитоскелета (Lichtenstein et al., 2003; Fuseler et al., 2007; Revittser et al., 2022); уменьшение фрактальной размерности Минковского может говорить как о разборке, так и о изменении организации расположения фибриллярного актина в клетке (Fuseler et al., 2007; Qian et al., 2012).

Цифровые подходы для квантификации изменений применимы не только к актиновому цитоскелету (Fuseler et al., 2007; Alioscha-Perez et al., 2016; Zonderland et al., 2019; Revittser et al., 2022), но и к многим другим клеточным структурам: микротрубочкам (Shu et al., 2021; Huang et al., 2021), дендритам нейронов (Ristanović et al., 2014; Rajković et al., 2017), распределению ионов кальция в клетке (Miroshnikova et al., 2021).

Для всех описанных выше подходов возможно найти улучшенные версии (Vindin et al., 2014; Alioscha-Perez et al., 2016; Liu et al., 2018; Revittser et al., 2021), однако обычно они не связаны с ImageJ, а реализованы в собственных программных продуктах, которые чаще всего находятся и в закрытом доступе, и требуют работы с платными программными средами, что снижает их доступность для исследовательских групп.

Помимо рассмотренных выше методов появляются и более сложные, например, классификация изображений фибриллярного актина с помощью машинного обучения и искусственного интеллекта (Nanguneri et al., 2019; Oei et al., 2019; Liu et al., 2022; Bhavna et al., 2023) для реализации которых необходимо иметь специальное оборудование и более узкие знания для точной настройки и интерпретации

результатов, но, возможно, в ближайшем будущем подобные полностью автоматизированные подходы станут общедоступными.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность Морачевской Елене Алексеевне за помощь в написании обзора.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Института цитологии РАН. Никакого дополнительного финансирования на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alioscha-Perez M., Benadiba C., Goossens K., Kasas S., Dietler G., Willaert R., Sahli H. 2016. A robust actin filaments image analysis framework. *PLOS Comput. Biol.* V. 12: e1005063.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005063>
- Bhavna R., Sonawane M. 2023. A deep learning framework for quantitative analysis of actin microridges. *Npj Systems Biol. Applications.* V 9. P. 21.  
<https://doi.org/10.1038/s41540-023-00276-7>
- Bishop C. J., Peres Y. 2016. Minkowski and Hausdorff dimensions in fractals in probability and analysis. Cambridge: Cambridge University Press. P. 1.  
<https://doi.org/10.1017/9781316460238.002>
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Efremova T.N., Khaitlina S.Y., Morachevskaya E.A. 2013. Functional impact of cholesterol sequestration on actin cytoskeleton in normal and transformed fibroblasts. *Cell Biol. Int.* V. 37. P. 617  
<https://doi.org/10.1002/cbin.10079>
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Vasileva V. Y., Vassilieva I. O., Sudarikova, A.V., Morachevskaya E.A., Negulyaev Y.A. 2019. Agonist-induced Piezo1 activation suppresses migration of transformed fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 514. P. 173.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.139>
- Domanski D., Zegrocka-Stendel O., Perzanowska A., Dutkiewicz M., Kowalewska M., Grabowska I., Maciejko D., Fogtman A., Dadlez M., Koziak K. 2016. Molecular mechanism for cellular response to  $\beta$ -escin and its therapeutic implications. *PloS One.* V. 11. P. e0164365.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164365>
- Dominguez R., Holmes C. K. 2011. Actin structure and function. *Ann. Rev. Biophys.* V. 40. P. 169  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359>
- Fuseler J. W., Millette C. F., Davis J. M., Carver W. 2007. Fractal and image analysis of morphological changes in the actin cytoskeleton of neonatal cardiac fibroblasts in response to mechanical stretch. *Microscopy and Microanalysis.* V. 13. P. 133.  
<https://doi.org/10.1017/S1431927607070225>
- Hao X., Wu J., Shan Y., Cai M., Shang X., Jiang J., Wang H. 2012. Caveolae-mediated endocytosis of biocompatible gold nanoparticles in living HeLa cells. *J. Physics. Condensed Matter.* V. 24. 164207  
<https://doi.org/10.1088/0953-8984/24/16/164207>
- Huang Q., Chai H., Wang S., Sun Y., Xu W. 2021. 0.5-Gy X-ray irradiation induces reorganization of cytoskeleton and differentiation of osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* V 23. P. 379.  
<https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12018>
- Karperien A., Ahammer H., Jelinek H. F. 2013. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Frontiers Cell. Neurosci.* V. 7. P. 3.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00003>
- Lichtenstein N., Geiger B., Kam Z. 2003. quantitative analysis of cytoskeletal organization by digital fluorescent microscopy. *Cytometry.* V. 54. P. 8.  
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.10053>
- Liu C., Fan Y., Zhou L., Zhu H., Song Y., Hu L., Wang Y., Li Q. 2015. Pretreatment of mesenchymal stem cells with angiotensin ii enhances paracrine effects, angiogenesis, gap junction formation and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* V. 188. P. 22.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.03.425>
- Liu Y., Mollaeian K., Ren J. 2018. An image recognition-based approach to actin cytoskeleton quantification. *Electronics.* V. 7. P. 443.  
<https://doi.org/10.3390/electronics7120443>
- Liu Y., Zhang J., Bharat C., Ren J. 2022. Cellular actin cytoskeleton morphology identification for mechanical characterization using deep learning. *IEEE Access.* V. 10: 97408.  
<https://doi.org/10.1109/ACCESS.2022.3203720>
- Longley P.A., Batty M. 1989. Fractal measurement and line generalization. *Computers & Geosci.* V. 15. P. 167.  
[https://doi.org/10.1016/0098-3004\(89\)90032-0](https://doi.org/10.1016/0098-3004(89)90032-0)
- Lu A., Wang L., Qian L. 2015. The role of eNOS in the migration and proliferation of bone-marrow derived endothelial progenitor cells and in vitro angiogenesis. *Cell Biol Int.* V. 39. P. 484.  
<https://doi.org/10.1002/cbin.10405>
- Miroshnikova Y.A., Manet S., Li X., Wickström S.A., Faurobert E., Albiges-Rizo C. 2021. Calcium signaling mediates a biphasic mechanoadaptive response of endothelial cells to cyclic mechanical stretch. *Mol. Biol. Cell.* V. 32. P. 1724  
<https://doi.org/10.1091/mbc.E21-03-0106>

- Mishra P., Martin D. C., Androulakis I. P., Moghe P. V.* 2019. Fluorescence imaging of actin turnover parses early stem cell lineage divergence and senescence. *Sci. Reports*. V. 9. P. 10377.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46682-y>
- Nanguneri S., Pramod R. T., Efimova N., Das D., Jose M., Svitkina T., Nair D.* 2019. Characterization of nanoscale organization of F-Actin in morphologically distinct dendritic spines in vitro using supervised learning. *eNeuro*. V. 6: ENEURO.0425-18.2019.  
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0425-18.2019>
- Niemistö A., Dunmire V., Yli-Harja O., Zhang W., Shmulevich I.* 2005. Robust Quantification of in vitro angiogenesis through image analysis. *IEEE Transactions on Medical Imaging*. V. 24. P. 549.  
<https://doi.org/10.1109/tmi.2004.837339>
- Numasawa Y., Kimura T., Miyoshi S., Nishiyama N., Hida N., Tsuji H., Tsuruta H., Segawa K., Ogawa S., Umezawa A.* 2011. Treatment of human mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blocker improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and improved cardiac function via angiogenesis. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. V. 29. P. 1405.  
<https://doi.org/10.1002/stem.691>
- Oei R. W., Hou G., Liu F., Zhong J., Zhang J., An Z., Xu L., Yang Y.* 2019. Convolutional neural network for cell classification using microscope images of intracellular actin networks. *PLoS One*. V. 14: e0213626.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213626>
- Qian A. R., Li D., Han J., Gao X., Di S. M., Zhang W., Hu L. F., 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 Transactions Bio-Med. Eng*. V. 59. P. 1374.  
<https://doi.org/10.1109/TBME.2012.2187785>
- Rajković N., Krstonošić B., Milošević N.* 2017. Box-counting method of 2D neuronal image: method modification and quantitative analysis demonstrated on images from the monkey and human brain. *Comput. Mathemat. Methods Med.* V. 2017: 8967902.  
<https://doi.org/10.1155/2017/8967902>
- Revittser A. V., Chubinskiy-Nadezhdin V. I., Negulyaev Yu. A.* 2022. Analysis of fibrillar-actin rearrangements in fetal human mesenchymal stem cells using the Minkowski fractal dimension. *Cell Tiss. Biol.* V. 16. P. 576.  
<https://doi.org/10.1134/S1990519X22060074>
- Revittser A. V., Chubinsky-Nadezhdin V. I., Negulyaev Yu. A.* 2020. The Effect of atrial natriuretic peptide on reorganization of actin cytoskeleton and migration of human mesenchymal stem cells. *Cell Tiss. Biol.* V. 14. P. 154.  
<https://doi.org/10.1134/S1990519X20020091>
- Revittser A., Selin I., Negulyaev Y., Chubinskiy-Nadezhdin V.* 2021. The analysis of F-actin structure of mesenchymal stem cells by quantification of fractal dimension. *PLoS One*. V. 16: e0260727.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260727>
- Ristanović D., Stefanović B. D., Puškaš N.* 2014. Fractal analysis of dendrite morphology using modified box-counting method. *Neurosci. Res.* V. 84. P. 64.  
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.04.005>
- Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W.* 2012. NIH image to imagej: 25 years of image analysis. *Nature methods*. V. 9. P. 671. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5554542/>
- Shu S. T., Li W. F., Smithgall T. E.* 2021. Visualization of host cell kinase activation by viral proteins using GFP fluorescence complementation and immunofluorescence microscopy. *bio-protocol*. V. 11: e4068  
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4068>
- Smith T. G., Lange G. D., Marks W. B.* 1996. Fractal methods and results in cellular morphology — dimensions, lacunarity and multifractals. *J. Neurosci. Methods*. V. 69. P. 123.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(96\)00080-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(96)00080-5)
- Vallenius T.* 2013. Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells. *Open Biol.* V. 3: 130001.  
<https://doi.org/10.1098/rsob.130001>
- Vindin H., Bischof L., Gunning P., Stehn J.* 2014. Validation of an algorithm to quantify changes in actin cytoskeletal organization. *J. Biomol. Screening*. V. 19. P. 354.  
<https://doi.org/10.1177/1087057113503494>
- Zonderland J., Wieringa P., Moroni L.* 2019. A quantitative method to analyse F-actin distribution in cells. *Methods X*. V. 6. P. 2562.  
<https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.10.018>

## METHODS FOR IMAGE ANALYSIS OF INTRACELLULAR STRUCTURES OF ACTIN LABELED WITH PHALLOIDIN

A. V. Revittser<sup>a</sup>, \*, Y. A. Negulyaev<sup>a</sup>

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

*\*e-mail: eetytnet@gmail.com*

A cell is a complex three-dimensional system, which possesses a number of highly dynamic structures with extended, rugged, and uneven morphology. The actin cytoskeleton consists of fibrillar and globular actin, as well as auxiliary proteins that regulate organization. The shape and the rearrangements of actin cytoskeleton are closely related to functioning of the cell. The ability to characterize these changes allows scientists to confirm or refute any hypotheses in the research. Obtaining a numerical equivalent of the actin cytoskeleton organization could help compare actin structures in biological experiments (example: exposure to biologically active substances). The review summarizes methods for analyzing images of intracellular actin structures labeled with phalloidin using ImageJ. The methods considered make it possible to obtain a quantitative characteristic of the organization of actin structures for further evaluation and comparison of experimental results.

**Keywords:** fibrillar actin, quantitative values of the organization of actin structures, Minkowski fractal dimension