

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Турищева Екатерина Павловна

**Влияние растительных гормонов на дифференцировку
культивируемых дермальных фибробластов человека**

1.5.22 – клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Диссертация подготовлена на кафедре клеточной биологии и гистологии
биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

**Научный
руководитель** – *Смирнова Елена Александровна, доктор биологических наук*

**Официальные
оппоненты** – *Александрова Антонина Юрьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов канцерогенеза НИИ канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России*

Андреева Елена Ромуальдовна, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук

Буторина Нина Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных и молекулярных основ гистогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук

Защита диссертации состоится «14» ноября 2023 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.9 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: dis_kalsov@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.9/2656>

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.Н. Калистратова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Поддержание на оптимальном уровне секреторно-синтетических процессов у дифференцированных клеток с повышенной биосинтетической активностью важно для нормального функционирования многих органов и тканей. Нарушение регуляции секреторно-синтетической активности, вызванное изменением дифференцировочного статуса клеток или изменением количества дифференцированных клеток, может приводить к развитию патологических состояний, таких как фиброз, снижение регенеративного потенциала, диабет II-го типа, остеопороз и многим другим (Hinz, 2016). Так, например, избыточная дифференцировка фибробластов в миофибробласты вызывает фиброз, характеризующийся повышенной продукцией внеклеточного матрикса, а пониженная активность миофибробластов и/или их недостаточное количество приводит к подавлению регенеративных процессов и развитию хронических ран.

Для дифференцировки клеток с высокой секреторной активностью необходима активация сигнального каскада, носящего название «ответ на неправильно свёрнутые белки», или UPR (Турищева и др., 2022). В связи с этим разработка новых подходов, способных нормализовать секреторную активность клеток и оказывать влияние на уровень их дифференцировки за счёт воздействия на UPR, может оказаться перспективным направлением для решения проблем, связанных с терапией многих патологий, в частности фиброза и развития хронических ран.

Известно, что растительные гормоны, или фитогормоны могут оказывать разностороннее влияние на жизнеспособность и метаболизм клеток человека. Так фитогормоны абсцизовая кислота (АБК) и гиббереллиновая кислота (ГК) способны влиять на секреторно-синтетическую активность некоторых типов культивируемых клеток человека (мезенхимных стромальных клеток, β -клеток островков Лангерганса, энтероэндокринных клеток), а ГК также способна активировать UPR и дифференцировку в нормальных и опухолевых клетках эпидермоидного происхождения (Bruzzone et al., 2008; 2015; Vildanova et al., 2021). Это даёт

основание полагать, что АБК и ГК могут стать агентами коррекции секреторно-синтетической активности и дифференцировочного статуса фибробластов.

Целью работы является исследование влияния растительных гормонов АБК и ГК на секреторно-синтетическую активность и признаки дифференцировки культивируемых дермальных фибробластов человека в миофибробласты.

Задачи исследования

- 1) оценить влияние АБК и ГК на уровень экспрессии генов, кодирующих маркеры UPR – сигнального каскада, необходимого для дифференцировки фибробластов;
- 2) охарактеризовать морфологические проявления стресса ЭПР (UPR) в дермальных фибробластах после действия АБК и ГК, как потенциальных индукторов UPR, и после индукции UPR с помощью дитиотреитола (ДТТ);
- 3) оценить влияние АБК и ГК на уровень синтеза и секреции белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами;
- 4) проанализировать влияние АБК и ГК на уровень синтеза маркера миофибробластов гладкомышечного актина α (α -SMA) и количество миофибробластов в популяции фибробластов.

Объект и предмет исследования. **Объектом исследования** являются дермальные фибробласты человека. **Предметом исследования** являются экспрессия генов маркеров UPR, морфология компонентов биосинтетической системы и цитоскелета, секреторно-синтетическая активность, уровень синтеза маркера миофибробластов α -SMA и количество миофибробластов в клеточной популяции.

Научная новизна. Впервые показана способность фитогормонов АБК и ГК активировать стресс ЭПР (UPR) в дермальных фибробластах человека и обнаружена способность АБК вызывать стресс ЭПР (UPR) в клетках человека. Впервые в клетках человека в условиях стресса ЭПР (UPR) детально проанализированы морфологические изменения биосинтетической системы и компонентов цитоскелета, задействованных в работе биосинтетической системы, и показано, что UPR, вызываемый АБК и ГК и индуктором стресса ЭПР ДТТ в дермальных фибробластах, сопровождается разными морфологическими изменениями. Впервые обнаружено, что UPR, вызываемый АБК и ГК, имеет разное происхождение и разный

сигналинг, а также оказывает противоположное действие на дифференцировочный статус фибробластов: АБК стимулирует дифференцировку фибробластов в миофибробласты, а ГК снижает уровень синтеза маркера миофибробластов α -SMA. Также впервые показано, что АБК и ГК являются модуляторами секреторно-синтетической активности фибробластов, причём оказывают на неё противоположное влияние: АБК – стимулирующее, а ГК – подавляющее.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в данной работе результаты расширяют знания о влиянии фитогормонов АБК и ГК на клетки человека соединительнотканного происхождения. Кроме того, продемонстрировано, что UPR, вызываемый разными агентами, может иметь разное происхождение, сигналинг, морфологические проявления и последствия, что важно как для понимания механизмов развития UPR и его многообразия с фундаментальной точки зрения, так и для регулирования и тонкой настройки этого процесса при использовании UPR в качестве мишени при разработке лекарственных препаратов. В частности, стимулирующее влияние АБК на дифференцировку фибробластов может быть использовано при разработке препаратов для ускорения заживления ран и лечения хронических ран при диабете, сосудистых заболеваниях, тяжёлых травмах и ожогах, а на способность ГК снижать уровень синтеза маркера миофибробластов α -SMA следует обратить внимание при поиске способов предотвращения и лечения фиброза и, в частности, образования рубцов.

Методология и методы исследования. Приведённые в данной диссертационной работе исследования выполнены на модели *in vitro* (метод культуры клеток). В работе применены классические методы клеточной биологии, биохимии и молекулярной биологии. Анализ данных проводился с помощью релевантных методов статистической обработки данных.

Достоверность. Результаты диссертационной работы обладают высокой степенью достоверности и получены с использованием широко применяемых методов клеточной биологии, биохимии и молекулярной биологии. Эксперименты выполнены в трёх – семи повторах, результаты хорошо воспроизводимы. В экспериментах использована выборка, достаточная для получения достоверных

результатов. Статистическая обработка данных выполнена с использованием современной компьютерной программы с применением адекватных критериев.

Апробация работы. По результатам данной работы было сделано 5 докладов на российских конференциях, международной конференции и национальном конгрессе.

Публикации. По материалам работы были опубликованы 4 научные работы, все 4 статьи опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

Личный вклад автора в проведение исследования. Автору диссертационного исследования принадлежит основная роль в анализе литературных данных, постановке задач исследования, подготовке и проведении экспериментов, статистической обработке данных, подготовке тезисов и публикаций по теме исследования.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Растительные гормоны АБК и ГК вызывают активацию UPR в дермальных фибробластах человека.
- 2) Индукция UPR в присутствии АБК стимулирует дифференцировку дермальных фибробластов в миофибробласты, повышая их секреторно-синтетическую активность и уровень синтеза маркера миофибробластов α -SMA.
- 3) Индукция UPR в присутствии ГК подавляет секреторно-синтетическую активность дермальных фибробластов и снижает уровень синтеза маркера миофибробластов α -SMA.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Культивирование дермальных фибробластов человека. Дермальные фибробласты культивировали в среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки телёнка (HyClone, США), 2 mM L-глутамина (ПанЭко) и коммерческой смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (ПанЭко) в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂). Клетки 5–8 пассажей высаживали в чашки

Петри ($d = 60$ мм) и 24-луночные планшеты в концентрации 50 000 клеток/мл или в чашки Петри ($d = 35$ мм) с покровными стёклами в концентрации 40 000 клеток/мл и культивировали в течение 24 ч. Затем в культуральную среду добавляли стоковые спиртовые растворы АБК (189 мМ) и ГК (500 мМ) (Merck, США) до конечной концентрации 1, 2 или 4 мМ или заменяли культуральную среду на свежую среду, содержащую 2 мМ ДТТ (PanReasAppliChem, Германия). Время культивирования с фитогормонами составляло 24, 48, 72, 96 ч или 7 сут, с ДТТ - 24 ч. Для контрольных точек вместо фитогормонов в культуральную среду добавляли соответствующий объём 96% этанола, а в качестве контроля для ДТТ использовали свежую среду без ДТТ.

Оценка метаболической активности клеток. Фибробласты высаживали в 24-луночные планшеты. После культивирования с фитогормонами в каждую лунку добавляли раствор МТТ (метилтиазолилдифенилтетразолий бромид, 98%) (ПанЭко) на культуральной среде до конечной концентрации 0,25 мг/мл и культивировали 1 ч при 37°C. Затем из каждой лунки отбирали среду и добавляли по 240 мкл ДМСО (ПанЭко) на 15 мин для растворения гранул образовавшегося формазана. Оптическую плотность полученного раствора определяли на спектрофотометре Униплан (Пикон, Россия) при длине волны 530 нм.

Количественная ПЦР в реальном времени. ПЦР проводили по описанной ранее схеме (Vildanova et al., 2021), используя наборы RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) для выделения РНК, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США) для обратной транскрипции и «ПЦР-Комплект (R-402)» (Синтол, Россия) для ПЦР. Гены *HPRT*, *GAPDH* и *YWHAZ* использовали в качестве референсных генов. ПЦР для каждого образца проводили в трёх технических повторях. Результаты ПЦР анализировали по методике Vandesompele et al. (Vandesompele et al., 2002).

Флуоресцентный анализ. Съёмку препаратов проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия; объектив 63x PlanApo NA 1.40 Oil), снабжённого чёрно-белой цифровой камерой Zeiss AxioCam 202 mono (Carl Zeiss) и программным обеспечением Zeiss

ZEN 3.3 (blue edition) (Microscope Software, Германия). Для **прижизненного выявления** ЭПР использовали краситель ER-Tracker Red (Thermo Fisher Scientific) в конечной концентрации 1 мкМ. Для **иммуноцитохимического выявления** белков клетки фиксировали 4% формалином (MP Biochemical, Франция) и пермеабилizировали 0,5% Triton X-100 (Serva, Германия). Затем проводили последовательную инкубацию в первичных и вторичных антителах. Для **цитохимического выявления** полимеризованного F-актина после фиксации 4% формалином клетки инкубировали с 0,005 мг/мл фаллоидина, меченного TRITC (Merck). Ядра визуализировали с помощью DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндо́л) (Merck) (конечная концентрация 0,1 мкг/мл); препараты заключали в Mowiol (Hoechst, Германия).

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Клетки фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом (Ted Pella Inc., США) с добавлением 2% формалина, дофиксировали в 1% OsO₄ (Serva), обезвоживали и заключали в Эпон 812 (Fluka Chemicals/Merck, США) по стандартной методике. Ультратонкие срезы залитых в Эпон образцов контрастировали 1,5% раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу. Срезы исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL, Япония) с цифровой фотокамерой GATAN ES500W, работающей под управлением программы Digital Micrograph фирмы GATAN.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Клетки фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом, обезвоживали в холодном (+4°C) этаноле возрастающей концентрации (от 40% до 96% с шагом в 10%), проводили по смесям ацетона с этанолом с последовательно возрастающей концентрацией ацетона (1:3, 1:1, 3:1), помещали в чистый ацетон и затем высушивали в критической точке. Высушенные образцы покрывали 1–2 нм Au-Pd плёнкой. Образцы анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (SEI mode, JEOL, Япония).

Проточная цитофлуориметрия. Клетки снимали с поверхности чашек Петри смесью растворов трипсина и Версена (ПанЭко), фиксировали ледяным 70% этанолом в течение ночи при +4°C и окрашивали раствором йодида пропидия (PI; Carl Roth GmbH & Co. KG, Германия) на PBS (в конечной концентрации PI

30 мкг/мл), содержащем РНКазу А (в конечной концентрации 10 мкг/мл) в течение ночи в темноте при комнатной температуре. Далее образцы отмывали от красителя PBS и анализировали на проточном сортере FACS Aria (Beckton Dickinson, США).

Иммуноферментный анализ (ИФА). Анализ уровня секреции проколлагена I и фибронектина проводили с помощью коммерческих наборов Human Pro-Collagen I alpha 1 SimpleStep ELISA[®] Kit и Human Fibronectin SimpleStep ELISA[®] Kit (Abcam) согласно протоколам, приложенным к наборам. Оптическую плотность измеряли с помощью анализатора иммуноферментных реакций Униплан (Пикон) при длине волны 450 нм.

Вестерн-блоттинг. Клетки лизировали в лизирующем буфере RIPA, добавляли в лизат буфер Лэммли (Bio-Rad, США), инкубировали лизат при 65°C 5 мин и дополнительно денатурировали 2 мин при -20°C. Белки разделяли с помощью вертикального электрофореза, используя 8% или 10% полиакриламидные гели, и переносили на ПВДФ-мембрану (Bio-Rad). Далее ПВДФ-мембраны блокировали обезжиренным молоком, инкубировали с первичными антителами в течение ночи при +4°C и затем со вторичными антителами 1 ч при комнатной температуре. Для выявления белков использовали Novex[™] ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific) и систему визуализации ChemiDoc[™] (Bio-Rad). Полученные значения для целевых белков нормировали на GAPDH.

Колориметрический полуколичественный анализ общей продукции коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса. Дермальные фибробласты высаживали в 24-луночные планшеты и после добавления фитогормонов культивировали в течение 7 сут. Далее клетки промывали тёплым PBS, фиксировали насыщенным раствором пикриновой кислоты (Merck) в течение 30 мин, промывали дистиллированной водой и окрашивали 0,1%-ми растворами Sirius Red F3BA или Fast Green FCF (Merck) на насыщенной пикриновой кислоте в течение 30 мин при комнатной температуре на ротационном шейкере для выявления коллагеновых и неколлагеновых белков соответственно. В качестве контроля использовали раствор насыщенной пикриновой кислоты, не содержащий красителей. После окрашивания клетки промывали дистиллированной водой и

фотографировали на инвертированном микроскопе Eclipse Ti-U (Nikon, Япония; объектив Nikon Plan Fluor 10×/0.30). Затем красители, связавшиеся с белками внеклеточного матрикса, растворяли в смеси 0,1% NaOH и ледяного абсолютного метанола (1/1). Оптическую плотность полученного элюата анализировали с помощью микропланшетного ридера Microplate Reader PR2100 (BioRad) при 550 нм (Sirius Red) и 620 нм (Fast Green). Для нормирования полученных значений оптической плотности на количество клеток проводили окрашивание 0,5% Crystal Violet (Merck), разведённом на абсолютном метаноле, в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем краситель отмывали дистиллированной водой, и клетки фотографировали на микроскопе Eclipse Ti-U. Далее связавшийся краситель растворяли в 96% этаноле, и оптическую плотность элюата анализировали с помощью микропланшетного ридера при 550 нм.

Обработка изображений и статистический анализ. Полученные изображения анализировали с помощью программы Fiji. Статистический анализ проводили в программе RStudio 1.4.1717 (R 4.1.1) и Microsoft Excel. Для проверки достоверности различий между контрольными и экспериментальными значениями использовали непараметрический двусторонний U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

1. Анализ уровня экспрессии генов, кодирующих маркеры UPR

Для анализа возможного токсического действия фитогормонов на дермальные фибробласты мы оценили метаболическую активность этих клеток при культивировании в присутствии 1, 2 или 4 мМ АБК и ГК в течение 24, 48, 72 и 96 часов с помощью МТТ-теста. Диапазон концентраций и времени воздействия был выбран на основании данных литературы (Kasamatsu et al., 2012; Vildanova et al., 2021). Мы обнаружили, что АБК и ГК не оказывали токсического влияния на фибробласты при длительном культивировании и однократном введении в среду культивирования. Так как ранее было показано, что культивирование с 2 мМ ГК в течение 24 часов вызывало активацию UPR в клетках эпидермоидного

происхождения (Vildanova et al., 2021), мы проверили, будет ли наблюдаться сходный эффект у дермальных фибробластов. С помощью ПЦР мы провели оценку уровня экспрессии маркеров UPR – шаперона люмена ЭПР *GRP78* и транскрипционных факторов *ATF4*, *sXBP1* (результат сплайсинга *XBP1*) и *CHOP* – после 24-часового воздействия на дермальные фибробласты 2 мМ АБК и ГК (рис. 1).

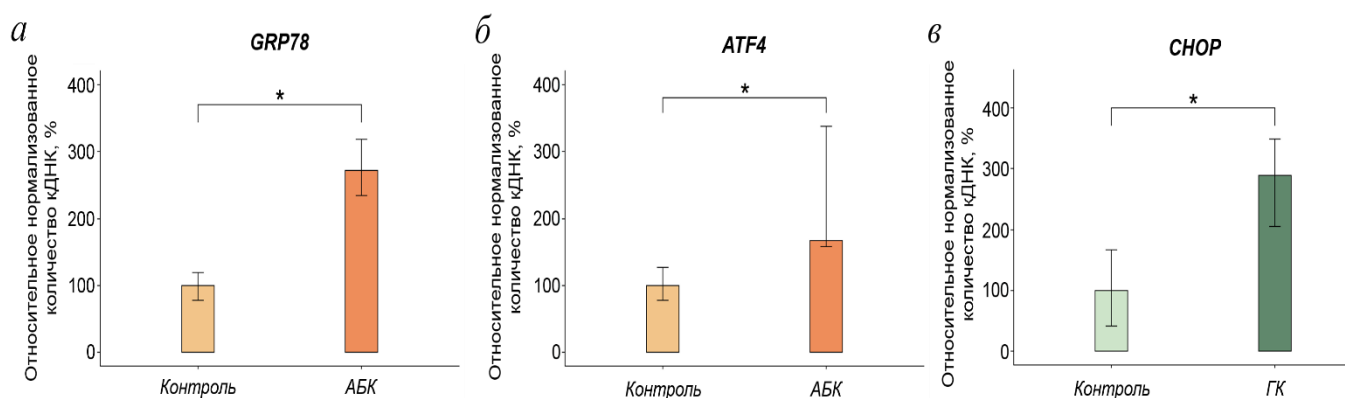


Рис. 1. Уровень экспрессии генов, кодирующих маркеры UPR *GRP78* (а), *ATF4* (б) и *CHOP* (в) после 24-часового воздействия АБК (а, б) и ГК (в). Показаны медианы и интерквартильные размахи; * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 7 независимых экспериментов.

Мы обнаружили, что АБК и ГК активировали экспрессию генов, кодирующих маркеры UPR в дермальных фибробластах, однако паттерны активации изученных генов у АБК и ГК различались: АБК вызывала повышение экспрессии генов *GRP78* и *ATF4* в 2,7 и 1,7 раза соответственно (рис. 1, а, б) и не оказывала значимого влияния на количество *sXBP1* и уровень экспрессии *CHOP*; ГК, напротив, оказывала влияние на уровень экспрессии только *CHOP*, повышая его в 2,9 раза (рис. 1, в). Эти данные свидетельствуют об активации UPR в дермальных фибробластах при действии АБК и ГК. В отличие от *ATF4* и *sXBP1*, *CHOP* считается проапоптотическим фактором, однако с помощью МТТ-теста мы показали, что однократное введение в среду культивирования 2 мМ ГК на срок 24-96 часов не вызывает снижения метаболической активности, отражающей жизнеспособность клеток, а, следовательно, и гибели, дермальных фибробластов. По-видимому, фибробласты «справляются» со стрессом ЭПР, индуцированным ГК, без активации гибели клеток. Механизмы, с помощью которых АБК и ГК вызывают активацию UPR, неизвестны,

но можно предположить, что эти фитогормоны активируют транскрипцию генов белков-участников UPR или вызывают стресс ЭПР, нарушая сворачивание белков в ЭПР.

2. Анализ морфологии органелл фибробластов

Известно, что UPR может сопровождаться морфологическими изменениями ЭПР, в частности, набуханием его цистерн (Osowski and Urano, 2011). Для того, чтобы выяснить, сопровождается ли UPR, вызываемый АБК и ГК, изменениями морфологии ЭПР, мы провели прижизненное выявление ЭПР с помощью ЭПР-трекера и исследовали ультраструктуру ЭПР с помощью ТЭМ.

Прижизненное выявление ЭПР в дермальных фибробластах показало, что АБК и ГК не вызывали заметных изменений в его распределении и морфологии. При анализе состояния ЭПР с помощью ТЭМ оказалось, что по сравнению с контролем (рис. 2, а) АБК не вызвала заметных изменений состояния цистерн ЭПР, однако в цитоплазме многих клеток мы обнаружили скопления везикулярных структур со скрученными в виде концентрических колец мембранами внутри (рис. 2, б), в англоязычной литературе часто называемые «whorls» (Guo et al., 2022). В контрольных образцах «whorls» тоже присутствовали, но в единичном количестве.

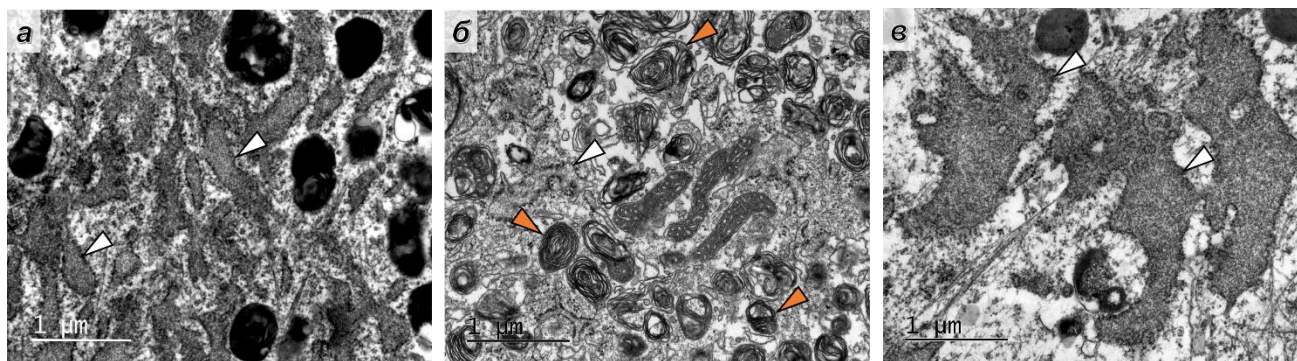


Рис. 2. Ультраструктура ЭПР в дермальных фибробластах. *а* – Контроль; *б* – АБК; *в* – ГК. Белые стрелки указывают на цистерны ЭПР; оранжевые стрелки указывают на «whorls». Масштабный отрезок: 1 мкм.

Метод ТЭМ не позволяет сделать однозначное заключение о том, происходило ли накопление «whorls» во всех клетках, или только в некоторых клетках из всей популяции, однако известно, что такие мембранные структуры появляются в клетках

разного происхождения при обработке индукторами стресса ЭПР (UPR) и могут быть одним из вариантов ответа клеток на стресс ЭПР (Guo et al., 2022). Образование структур типа «whorls» *in vitro* и *in vivo* происходит в ходе дифференцировки миобластов из-за временного снижения концентрации кальция в люмене ЭПР, а также в пролиферирующих миоблестах при индукции стресса ЭПР с помощью ингибиторов кальциевых АТФаз (Nakanishi et al., 2015). Это может послужить объяснением образования «whorls» в фибробластах при действии АБК, так как известно, что при действии АБК происходит снижение концентрации кальция в люмене ЭПР (Вильданова и Смирнова, 2016). ГК не стимулировала образование «whorls», однако вызывала расширение цистерн ЭПР (рис. 2, в), по крайней мере в некоторых клетках.

Для того, чтобы выяснить, отличается ли реакция ЭПР клеток при индукции UPR с помощью АБК и ГК и с помощью канонических индукторов стресса ЭПР, мы проанализировали состояние ЭПР после воздействия ДТТ (рис. 3). ДТТ вызывает стресс ЭПР, блокируя образование дисульфидных связей между остатками цистеина в белках, из-за чего нарушается их сворачивание и происходит накопление не свёрнутых белков в ЭПР (Ren et al., 2018). Время инкубации (24 часа) и концентрация ДТТ (2 мМ) были выбраны на основании данных литературы (Benedetti et al., 2000; Vildanova et al., 2021).

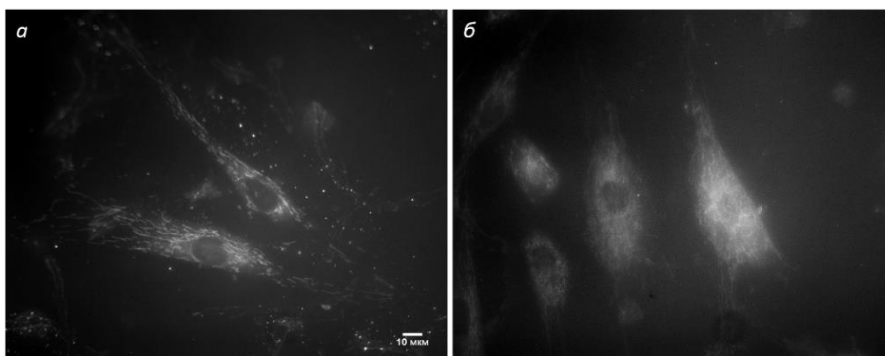


Рис. 3. Прижизненное выявление ЭПР в дермальных фибробластах с помощью ЭПР-трекера (ER-Tracker Red). *а* – Контроль; *б* – ДТТ. Масштабный отрезок: 10 мкм.

Оказалось, при действии ДТТ сеть ЭПР фрагментировалась и распадалась на более мелкие цистерны (рис. 3, *а*, *б*), что является одним из изменений морфологии ЭПР, характерных для клеток в состоянии стресса ЭПР (Ha et al., 2020).

В клетках, в которых ЭПР сохранял вид сети, повышался уровень фонового окрашивания, сеть становилась тоньше, часто принимая вид «перепутанных» нитей (рис. 3, б). Таким образом, при действии разных индукторов стресса ЭПР и UPR (АБК, ГК и ДТТ) наблюдаются различные морфологические состояния ЭПР.

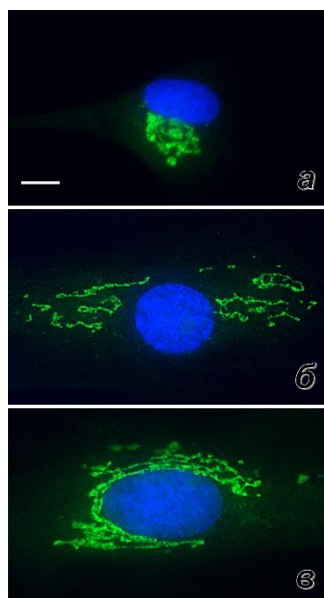


Рис. 4. Аппарат Гольджи в дермальных фибробластах.

а-в - Иммуноцитохимическое выявление аппарата Гольджи (зелёный; ядра окрашены в синий цвет DAPI) с помощью антител к белку GM130 и типы его расположения: полярное (*а*), биполярное (*б*), неполярное (*в*). Масштабный отрезок – 10 мкм.

Изменение состояния ЭПР при действии АБК и ГК может влиять на состояние другого компонента биосинтетической системы – **аппарата Гольджи**. Иммуноцитохимическое окрашивание показало, что в популяции дермальных фибробластов вид и расположение аппарата Гольджи относительно ядра было различным. Для оценки изменений состояния аппарата Гольджи расположение этой органеллы относительно ядра было условно разделено на 1) полярное (аппарат Гольджи занимает не более половины окружности ядра), 2) биполярное (аппарат Гольджи выявляется как два скопления на противоположных сторонах ядра) и 3) неполярное (аппарат Гольджи занимает больше половины окружности ядра) (рис. 4, *а-в*).

После воздействия АБК и ГК клеток с полярным типом расположения аппарата Гольджи становилось меньше на 13,5% и 8,1%, а клеток с неполярным типом - больше на 11% и 8% соответственно. Доля клеток с биполярным расположением аппарата Гольджи после воздействия АБК и ГК не изменялась. При этом на ультраструктурном уровне значительных изменений морфологии аппарата Гольджи после действия фитогормонов обнаружено не было.

Вклад в разнообразие формы и расположения аппарата Гольджи может вносить его динамика в клеточном цикле, а также состояние системы микротрубочек и

актиновых филаментов (Ravichandran et al., 2020). Поэтому мы провели исследование распределения популяции клеток по фазам клеточного цикла после культивирования с фитогормонами в течение 24 часов методом проточной цитофлуориметрии, а также провели выявление **актиновых филаментов** и **микротрубочек** с помощью TRITC-фаллоидина и антител к тубулину соответственно. Оказалось, что 24-часовое воздействие АБК и ГК не приводило к задержке клеточного цикла и не вызывало изменений в состоянии микротрубочек и актинового цитоскелета. Следовательно, перераспределение аппарата Гольджи относительно ядра после воздействия фитогормонов, по-видимому, вызвано непосредственно влиянием АБК и ГК. Например, оно может быть следствием воздействия АБК и ГК на белки, участвующие в поддержании структурной целостности аппарата Гольджи (гольджины) или антероградном транспорте, а также следствием стресса ЭПР или стресса самого аппарата Гольджи (Petrosyan, 2019).

При индукции UPR с помощью АБК и ГК изменений формы и состояния цитоскелета фибробластов не наблюдалось, однако при анализе фибробластов, которые культивировали с 2 мМ ДТТ в течение 24 часов, мы обнаружили, что ДТТ вызывал реорганизацию актинового цитоскелета – пучки актина, характерные для контрольных клеток, становились менее выраженными или отсутствовали - что сопровождалось сжатием клеток, изменением их формы и поверхности (рис. 5), уменьшением площади распластывания и числа фокальных контактов.

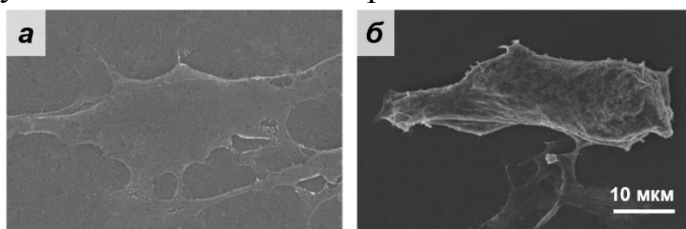


Рис. 5. Влияние ДТТ на микрорельеф клеточной поверхности дермальных фибробластов, СЭМ. *a* – Контроль; *б* -24 часа воздействия ДТТ. Масштабный отрезок: 10 мкм.

Изменение формы клеток при действии индукторов стресса ЭПР не считается характерным морфологическим признаком стресса ЭПР и UPR, однако есть данные о поджатии нормальных и опухолевых клеток при действии некоторых индукторов стресса ЭПР,

имеющих разный механизм активации стресса ЭПР (Kohn et al., 1979; Földi et al., 2013). Тем не менее, механизмы таких изменений формы до сих пор неизвестны.

Таким образом, морфологические изменения в клетках при стрессе ЭПР (UPR) различаются при действии АБК, ГК и индуктора стресса ЭПР ДТТ, что может быть связано с разными механизмами запуска стресса ЭПР, а также воздействиями этих агентов, связанными с их химическими свойствами. Это свидетельствует о том, что стресс ЭПР и UPR не могут быть охарактеризованы общими морфологическими критериями.

3. Анализ секреторно-синтетической активности фибробластов

Отсутствие заметных морфологических изменений биосинтетической системы клеток при UPR, вызываемом АБК и ГК, не означает, что такие изменения отсутствуют на функциональном уровне. Фибробласты синтезируют и секретируют компоненты внеклеточного матрикса, среди которых наиболее распространёнными в соединительной ткани являются проколлаген I и фибронектин (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014). В связи с этим мы сравнили распределение проколлагена I и фибронектина в дермальных фибробластах после воздействия АБК и ГК с помощью иммуноцитохимического окрашивания, а затем оценили уровень секреции и синтеза этих белков.

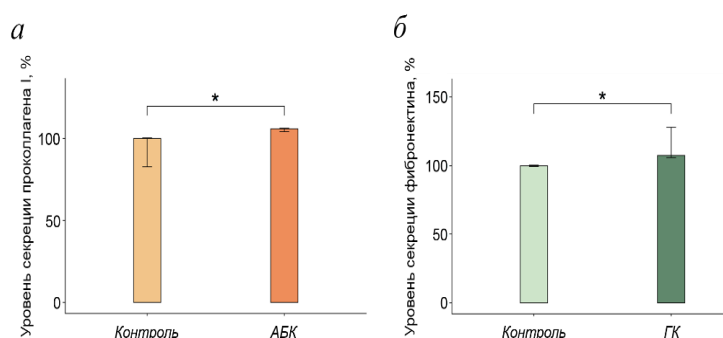


Рис. 6. Влияние АБК и ГК на уровень секреции проколлагена I и фибронектина в дермальных фибробластах. *а* – уровень секреции проколлагена I после 48 ч воздействия АБК; *б* – уровень секреции фибронектина после 48 ч воздействия ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 5 независимых экспериментов.

Оказалось, что 24-часовое воздействие АБК и ГК не вызывало изменений распределения проколлагена I и фибронектина, выявляемых с помощью иммуноцитохимического окрашивания, а также изменений в уровне секреции. Однако культивирование с АБК в течение 48 часов приводило к повышению уровня секреции проколлагена I на 6,1% (рис. 6, *а*) и не влияло на уровень секреции фибронектина.

Культивирование с ГК в течение 48 часов приводило к повышению уровня секреции фибронектина на 7,2% (рис. 6, б) и не влияло на уровень секреции проколлагена I. Таким образом, АБК и ГК оказывали влияние на секреторную активность дермальных фибробластов, причём АБК стимулировала секрецию проколлагена I, а ГК стимулировала секрецию фибронектина.

Повышение уровня секреции проколлагена I и фибронектина может свидетельствовать о повышении уровня синтеза этих белков. Поэтому мы провели оценку уровня синтеза проколлагена I и фибронектина с помощью вестерн-блоттинга после 48 ч инкубации фибробластов с АБК и ГК (рис. 7). Оказалось, что АБК увеличивала уровень синтеза проколлагена I и фибронектина в 29,4 раза (рис. 7, а) и в 1,6 раза (рис. 7, в) соответственно. При этом ГК снижала уровень синтеза проколлагена I в 1,6 раза (рис. 7, б), а также снижала уровень синтеза фибронектина (рис. 7, г), но статистически недостоверно.

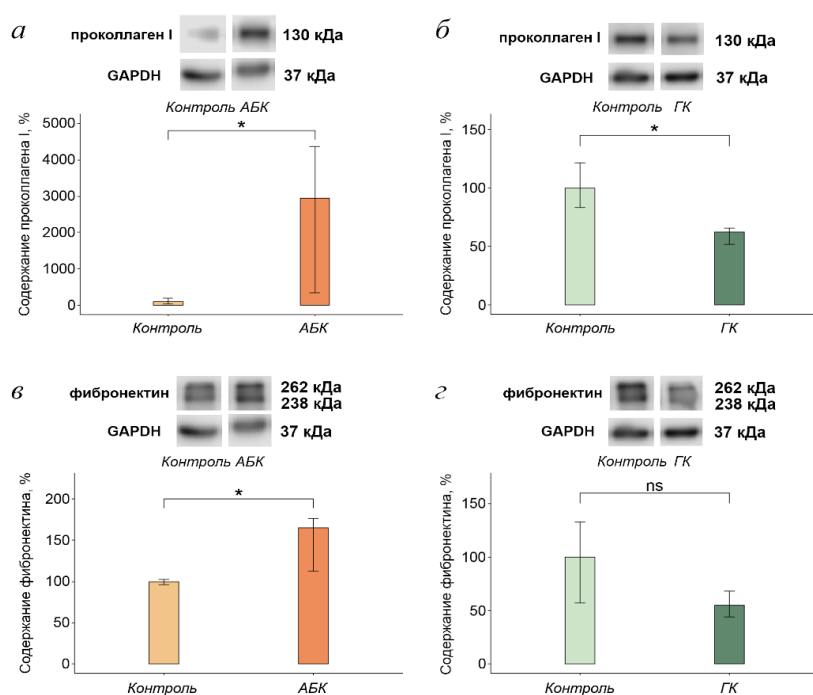


Рис. 7. Влияние 48-часовой инкубации с АБК и ГК на уровень синтеза проколлагена I и фибронектина в дермальных фибробластах. *а* – Содержание проколлагена I после воздействия АБК; *б* – содержание проколлагена I после воздействия ГК; *в* - содержание фибронектина после воздействия АБК; *г* - содержание фибронектина после воздействия ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; ns – not significant (не значимо); * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 5 независимых экспериментов.

Во внеклеточном матриксе, формируемом фибробластами, проколлаген I и фибронектин являются преобладающими коллагеновыми и неколлагеновыми белками соответственно (Vonnans et al., 2014). Для оценки влияния АБК и ГК на общую продукцию коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами был проведён полуколичественный анализ (рис. 8). Срок инкубации с фитогормонами в данном эксперименте составлял 7 суток, что позволило выявить накопление анализируемых белков как вблизи поверхности фибробластов, так и внутри клеток. Красители Sirius Red и Fast Green, связавшиеся с коллагеновыми и неколлагеновыми белками внеклеточного матрикса соответственно, элюировали и затем анализировали оптическую плотность образцов.

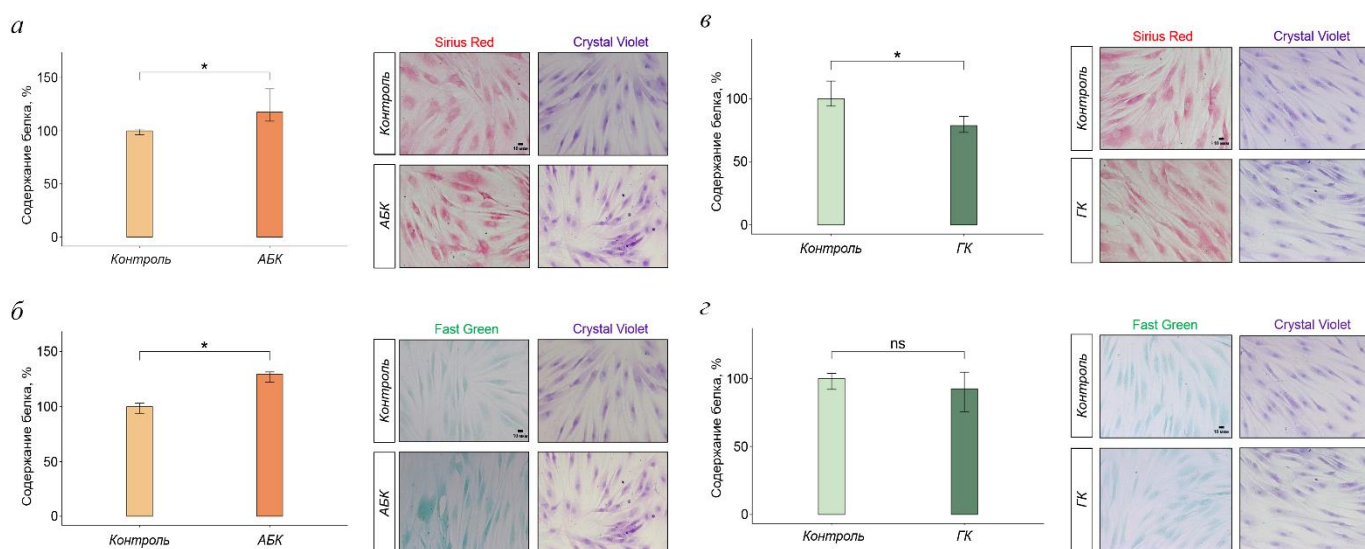


Рис. 8. Влияние 7-суточной инкубации с АБК (*а, б*) и ГК (*в, з*) на общую продукцию коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами. Представлены репрезентативные изображения окрашивания клеток Sirius Red (выявление коллагеновых белков), Fast Green (выявление неколлагеновых белков) и Crystal Violet (оценка количества клеток). *а, в* - Содержание коллагеновых белков; *б, з* – содержание неколлагеновых белков. Показаны медианы и интерквартильные размахи; ns – not significant (не значимо); * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 5 независимых экспериментов. Масштабный отрезок: 10 мкм.

Для нормирования полученных значений на количество клеток использовали окрашивание красителем Crystal Violet, оптическая плотность элюата которого пропорциональна количеству клеток (Vega-Avila and Pugsley, 2011). После

культивирования фибробластов с АБК общее содержание коллагеновых белков внеклеточного матрикса возрастало на 17,4%, а содержание неколлагеновых белков возрастало на 29,5% (рис. 8, *а* и *б*). После культивирования фибробластов с ГК содержание коллагеновых белков внеклеточного матрикса, наоборот, снижалось на 21,0% (рис. 8, *в*). Содержание неколлагеновых белков также снижалось, но изменение было статистически недостоверным (рис. 8, *г*).

Таким образом, АБК стимулирует синтез и секрецию проколлагена I и синтез фибронектина, а также повышает общую продукцию коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса. ГК, напротив, снижает уровень синтеза проколлагена I и продукцию коллагеновых белков внеклеточного матрикса. Однако ГК стимулирует секрецию фибронектина, хотя уровень синтеза фибронектина при её воздействии не повышается, а имеет тенденцию к снижению. Следует отметить, что изменение секреторно-синтетической активности фибробластов при действии АБК и ГК происходило позже, чем активация UPR, регистрируемая через 24 часа воздействия фитогормонов. Этим может объясняться отсутствие изменений в распределении проколлагена и фибронектина, выявляемых с помощью иммуноцитохимического окрашивания через 24 часа культивирования с АБК и ГК, а также отсутствие заметных морфологических изменений компонентов секреторно-синтетической системы.

4. Оценка уровня синтеза α -SMA и доли миофибробластов в популяции фибробластов

Изменение секреторно-синтетической активности, наблюдаемое при действии АБК и ГК в настоящем исследовании, может быть связано с изменением количества миофибробластов в популяции дермальных фибробластов, так как для миофибробластов характерен повышенный, по сравнению с фибробластами, уровень синтеза проколлагена I и фибронектина (Desai et al., 2014). Основным маркером миофибробластов является гладкомышечный α -актин (Hinz, 2016), поэтому была проведена оценка уровня синтеза α -SMA после 48-часового воздействия АБК и ГК с помощью вестерн-блоттинга (рис. 9, *а*, *б*).

Как видно из рис. 9, при действии АБК уровень синтеза α -SMA повышался на 38,5% (рис. 9, а), а при действии ГК – снижался на 5,4% (рис. 9, б).

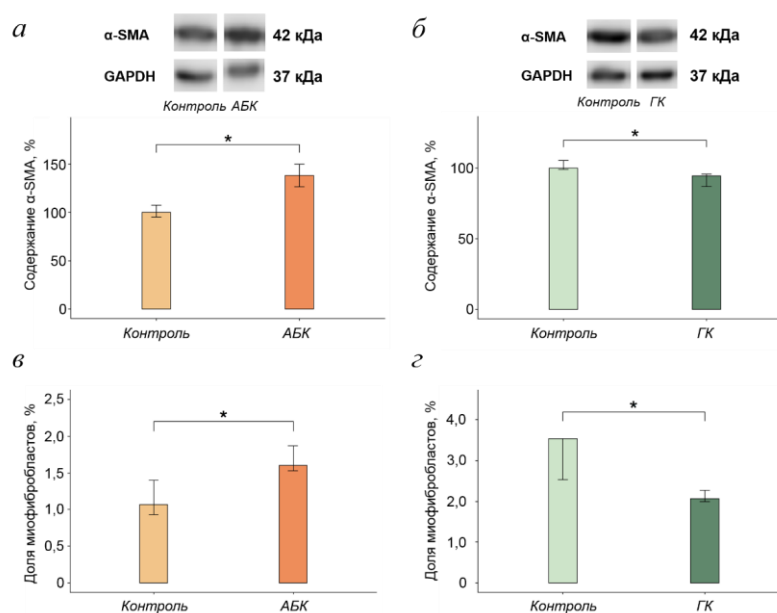


Рис. 9. Влияние 48-часовой инкубации с АБК (а, в) и ГК (б, г) на уровень синтеза α -SMA и долю миофибробластов в популяции дермальных фибробластов. а, б – Содержание α -SMA; в, г – доля миофибробластов. Показаны медианы и интерквартильные размахи; * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 5 независимых экспериментов.

В миофибробластах α -SMA встроен в стресс-фибриллы (Hinz, 2016). Для того, чтобы выяснить, происходит ли встраивание новосинтезированного α -SMA в стресс-фибриллы фибробластов через 48 часов культивирования с АБК и уменьшается ли количество фибробластов с α -SMA-положительными стресс-фибриллами через 48 часов культивирования с ГК, был произведён подсчёт доли миофибробластов в популяции дермальных фибробластов после 48-часового воздействия АБК и ГК с помощью иммуоцитохимического выявления α -SMA (рис. 9, в, г). Подсчёт миофибробластов показал, что при действии АБК доля миофибробластов возрастала в 1,5 раза (рис. 9, в), а при действии ГК – снижалась на 41,5% (рис. 9, г).

Таким образом, при действии АБК уровень синтеза α -SMA в фибробластах повышался, а при действии ГК снижался, что коррелирует с данными об изменении секреторно-синтетической активности. В связи с этим можно заключить, что наблюдаемое при действии АБК повышение секреторно-синтетической активности

фибробластов по крайней мере частично связано с дифференцировкой фибробластов в миофибробласты. Наблюдаемое при действии ГК снижение секреторно-синтетической активности фибробластов может быть обусловлено уменьшением количества миофибробластов в популяции дермальных фибробластов. Кроме того, наши данные свидетельствуют о том, что UPR предшествует дифференцировке или сопровождает дифференцировку, индуцированную АБК, и возможно, АБК может запускать эту дифференцировку, активируя UPR. В свою очередь, UPR, индуцируемый ГК в дермальных фибробластах, связан не с активацией дифференцировки и секреторно-синтетической активности клеток, а с подавлением этих процессов.

Полученные нами данные дают основание полагать, что АБК и/или ГК могут стать агентами коррекции секреторно-синтетической активности и дифференцировочного статуса фибробластов. Стимулирующее влияние АБК на дифференцировку фибробластов может быть использовано при разработке препаратов для ускорения заживления ран и лечения хронических ран при диабете, сосудистых заболеваниях, тяжёлых травмах и ожогах. На способность ГК снижать уровень синтеза маркера миофибробластов α -SMA следует обратить внимание при поиске способов предотвращения и лечения фиброза и, в частности, образования рубцов.

Выводы

1. При однократном добавлении в среду культивирования растительные гормоны АБК и ГК в концентрациях 1-4 мМ и инкубации до 96 часов не оказывают токсического влияния на культивируемые дермальные фибробласты человека.
2. Добавление на 24 часа в среду культивирования 2 мМ АБК и ГК вызывает активацию UPR у фибробластов, причём паттерны активации генов UPR у АБК и ГК различаются: при действии АБК повышается экспрессия генов *GRP78* и *ATF4*, а при действии ГК повышается экспрессия *CHOP*.
3. Индукция UPR с помощью АБК, ГК и стандартного химического индуктора стресса ЭПР ДТТ имеет разные морфологические проявления.

4. АБК оказывает стимулирующее влияние на секреторно-синтетическую активность дермальных фибробластов, повышая в них уровень секреции и синтеза проколлагена I и уровень синтеза фибронектина, а также общую продукцию коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса.
5. ГК подавляет секреторно-синтетическую активность дермальных фибробластов, снижая уровень синтеза проколлагена I, а также общей продукции коллагеновых белков внеклеточного матрикса, однако увеличивает уровень секреции фибронектина.
6. АБК стимулирует дифференцировку фибробластов в миофибробласты, повышая уровень синтеза маркера миофибробластов α -SMA; ГК снижает уровень синтеза α -SMA.
7. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что АБК и ГК оказывают влияние на секреторно-синтетическую активность и дифференцировочный статус дермальных фибробластов, но их действие носит противоположный характер.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова

1. **Турищева Е. П.,** Ашниев Г. А., Вильданова М. С., Смирнова Е. А. Индуктор стресса эндоплазматического ретикулума дитиотреитол влияет на морфологию и подвижность культивируемых дермальных фибробластов человека и клеток фибросаркомы линии НТ1080 // Онтогенез. – 2023. – Т. 54, №. 5. – С. 341-357. **IF (РИНЦ) = 0,728. (1,62/0,98)***
2. **Турищева Е. П.,** Вильданова М. С., Вишнякова П. А., Матвеева Д. К., Саидова А. А., Онищенко Г. Е., Смирнова Е. А. Фитогормоны оказывают влияние на дифференцировочный статус дермальных фибробластов человека путём активации UPR // Биохимия. – 2023. – Т. 88, №. 6. – С. 995-1010. **IF (РИНЦ) = 2,908. (1,75/1,31)**
3. **Турищева Е. П.,** Вильданова М. С., Онищенко Г. Е., Смирнова Е. А. Роль стресса эндоплазматического ретикулума в дифференцировке клеток мезенхимного происхождения // Биохимия. – 2022. – Т. 87, №. 9. – С. 1203-1222. **IF (РИНЦ) = 2,908. (2,91/2,18)**
4. **Турищева Е. П.,** Вильданова М. С., Поташникова Д. М., Смирнова Е. А. Различная реакция биосинтетической системы дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы человека на действие растительных гормонов // Цитология. – 2020. – Т. 62, №. 8. – С. 566-580. **IF (РИНЦ) = 0,64. (1,59/1,2)**

**В скобках приведён объём публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.*