

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Турищева Екатерина Павловна

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

1.5.22 – клеточная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Смирнова Елена Александровна

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
2. ВВЕДЕНИЕ.....	7
2.1. Актуальность	7
2.2. Степень разработанности темы	9
2.3. Цели и задачи.....	10
2.4. Объект и предмет исследования.....	11
2.5. Научная новизна.....	11
2.6. Теоретическая и практическая значимость работы.....	12
2.7. Методология и методы диссертационного исследования	13
2.8. Личный вклад автора в проведение исследования	14
2.9. Положения, выносимые на защиту	14
2.10. Степень достоверности результатов	14
2.11. Апробация результатов	14
2.12. Публикации по теме работы	15
3. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
3.1. Дифференцировка фибробластов в миофибробласты	16
3.1.1. Характеристика фибробластов и миофибробластов	16
3.1.2. Фиброз.....	17
3.1.3. Снижение регенеративного потенциала.....	18
3.1.4. Стресс ЭПР и UPR	19
3.1.5. Роль UPR в дифференцировке фибробластов в миофибробласты	23
3.2. Фитогормоны в клетках растений.....	28
3.3. Фитогормоны и клетки животных	30
3.3.1. Абсцизовая кислота	30
3.3.2. Гиббереллиновая кислота	49
3.4. Заключение	52
4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	54
4.1. Культивирование дермальных фибробластов человека	54
4.2. Оценка метаболической активности клеток	55
4.3. Количественная ПЦР в реальном времени.....	55
4.4. Флуоресцентный анализ.....	56
4.5. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)	58

4.6. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).....	58
4.7. Проточная цитофлуориметрия	59
4.8. Иммуноферментный анализ (ИФА).....	59
4.9. Вестерн-блоттинг	59
4.10. Колориметрический полуколичественный анализ общей продукции коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса	60
4.11. Обработка изображений и статистический анализ.....	61
5. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	62
5.1. Оценка метаболической активности культивируемых дермальных фибробластов.....	62
5.2. Анализ уровня экспрессии генов, кодирующих маркеры UPR, при действии АБК и ГК.....	64
5.3. Структурное состояние ЭПР при действии АБК и ГК.....	66
5.4. Структурное состояние ЭПР при действии ДТТ	69
5.5. Структурное состояние аппарата Гольджи при действии АБК и ГК.....	71
5.6. Распределение дермальных фибробластов по фазам клеточного цикла.....	73
5.7. Организация сети микротрубочек и актиновых филаментов при действии АБК и ГК.....	75
5.8. Структурное состояние актинового цитоскелета при действии ДТТ	76
5.9. Характеристика фокальных контактов при действии ДТТ	78
5.10. Оценка площади клеток при действии ДТТ	80
5.11. Анализ клеточной поверхности при действии ДТТ с помощью СЭМ.....	81
5.12. Анализ распределения проколлагена I и фибронектина при действии АБК и ГК.....	83
5.13. Оценка уровня секреции проколлагена I и фибронектина при действии АБК и ГК.....	86
5.14. Оценка уровня синтеза проколлагена I и фибронектина при действии АБК и ГК.....	88
5.15. Оценка общей продукции коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса при действии АБК и ГК с помощью колориметрического анализа.....	89
5.16. Оценка уровня синтеза α -SMA и доли миофибробластов в популяции фибробластов при действии АБК и ГК.....	92
6. ОБСУЖДЕНИЕ	96
6.1. АБК и ГК вызывают активацию UPR	97

6.2. Морфология органелл фибробластов, сопровождающая активацию UPR...	99
6.3. Влияние АБК и ГК на секреторно-синтетическую активность фибробластов	108
6.4. Влияние АБК и ГК на дифференцировку фибробластов.....	112
7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
8. ВЫВОДЫ	118
9. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ	119
9.1. Статьи.....	119
9.2. Тезисы докладов.....	119
10. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121

1. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК – абсцизовая кислота

АФК – активные формы кислорода

ГК – гиббереллиновая кислота

ДТТ – дитиотреитол

ИФА – иммуноферментный анализ

МСК – мезенхимные стромальные клетки

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ADPRC - АДФ-рибозил циклаза (ADP-ribosyl cyclase)

АМРК – белковая киназа, активируемая 5' аденозин монофосфатом (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase)

ATF4 – активирующий фактор транскрипции 4 (activating transcription factor 4)

ATF6 – активирующий фактор транскрипции 6 (transcription factor 6)

BiP – белок, связывающий иммуноглобулин (immunoglobulin binding protein)

cADPR – циклическая АДФ-рибоза (cyclic ADP ribose)

СНОР – ССААТ/белок, гомологичный энхансер-связывающему белку (ССААТ/enhancer-binding protein homologous protein)

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

eIF2 α – фактор инициации трансляции эукариот 2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α)

ERAD – ЭПР-ассоциированная деградация (ER-associated degradation)

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

GM130 – белок матрикса Гольджи 130 (Golgi matrix protein 130)

GRP78 – белок 78 кДа, регулируемый глюкозой (glucose-regulated protein 78)

IRE1 – требующий инозитол белок 1 (inositol-requiring protein 1)

JNK – c-Jun N-терминальная киназа (c-Jun N-terminal kinase)

LANCL2 – лантанинсинтетазы C-подобный белок 2 (lanthionine synthetase C-like protein 2)

МАРК – митоген-активируемая белковая киназа (mitogen-activated protein kinase)

МСР-1 – хемоаттрактант моноцитов 1 (monocyte chemoattractant protein-1)

4-РВА – 4-фенилмасляная кислота (4-phenylbutyric acid)

PERK – киназа ЭПР, подобная белковой киназе RNA (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase)

PPAR γ – рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)

TNF – фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor)

sXBP1 – сплайсированный X-бок-связывающий белок 1 (spliced X-box-binding protein 1)

TGF- β – трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor- β)

UPR – ответ на неправильно свёрнутые белки (unfolded protein response)

XBP1 – X-бок-связывающий белок 1 (X-box-binding protein 1)

α -SMA – гладкомышечный актин α (α -smooth muscle actin)

2. ВВЕДЕНИЕ

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

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.

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.

2.1. Актуальность

Дифференцировка (дифференциация) – это процесс, в ходе которого клетки приобретают специализацию, превращаясь из клеток одного типа в клетки другого типа. Дифференцировка имеет место как в эмбриогенезе, в ходе которого зигота путём последовательных делений превращается в организм, состоящий из клеток различных типов, так и во взрослом организме, где она является ключевым фактором, необходимым для регенерации, самоподдержания обновляющихся тканей, формирования иммунокомпетентных клеток и других процессов. В ходе дифференцировки происходит изменение степени дифференцированности клетки – её дифференцировочного статуса. 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 широкого спектра патологических состояний, таких как фиброз, снижение регенеративного потенциала и развитие хронических ран, диабет II-го типа, остеопороз и многим другим. Так, например, дифференцировка фибробластов в миофибробласты необходима для заживления ран (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014), однако избыточная дифференцировка фибробластов в миофибробласты вызывает фиброз, характеризующийся повышенной продукцией внеклеточного матрикса и нерегулируемой сократительной активностью фибробластов (Desai et al., 2014; Heindryckx et al., 2016). Фиброз может развиваться при нарушении нормального процесса заживления ран,

при хроническом воспалении, вызванном механическими повреждениями или инфекциями, а также при развитии аутоиммунных заболеваний, таких как склеродермия, ревматоидный артрит, болезнь Крона и язвенный колит. Избыточное отложение внеклеточного матрикса и контракция тканей при фиброзе приводят к повреждению тканей и дисфункции органов. В то же время пониженная активность миофибробластов и/или их недостаточное количество при диабете, сосудистых заболеваниях, тяжёлых травмах и ожогах приводит к подавлению регенеративных процессов и развитию хронических ран (Hinz, 2016; Ko et al., 2019; Las Heras et al., 2020; Zou et al., 2021). Таким же пагубным для функционирования органов и тканей является снижение секреторно-синтетической активности входящих в их состав клеток. Так, например, дедифференцировка (возвращение дифференцированных клеток в менее дифференцированное состояние) β -клеток островков Лангерганса, секретирующих инсулин, является одной из причин, вызывающих диабет II-го типа (Talchai et al., 2012; Efrat, 2019; Lenghel et al., 2021), а снижение активности остеобластов в менопаузе ведёт к развитию остеопороза (Eastell et al., 2016).

Следует отметить, что для дифференцировки многих клеток с высокой секреторной активностью, таких как фибробласты, предшественники β -клеток и преостеобласты, необходима активация сигнального каскада, носящего название «ответ на неправильно свёрнутые белки», или UPR (Zhang et al., 2006; Saito et al., 2011; Baek et al., 2012; Jang et al., 2012; Chan et al., 2013; Matsuzaki et al., 2015; Heindryckx et al., 2016; Chen et al., 2019a; Турищева и др., 2022). UPR представляет собой адаптивный ответ клетки на стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР), то есть нарушение гомеостаза ЭПР, вызванное накоплением в люмене ЭПР не свёрнутых и/или неправильно свёрнутых белков (Sicari et al., 2020; Турищева и др., 2022). Показано, что помимо контроля сворачивания белков, UPR играет ключевую роль в различных физиологических процессах, в частности в дифференцировке клеток (Hetz, 2012). При этом до настоящего времени неизвестно, является ли активация UPR индуктором дифференцировки клеток или же UPR запускается из-за повышенного синтеза секреторных белков в ходе

дифференцировки (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 молекулярные компоненты UPR, может оказаться перспективным направлением для решения проблем, связанных с терапией многих патологий (Saito et al., 2011; Baek et al., 2012; Talchai et al., 2012; Desai et al., 2014; Lenghel et al., 2021; Турищева и др., 2022).

2.2. Степень разработанности темы

Биологически активные молекулы, обнаруженные в различных видах растений, являются объектом пристального внимания в биологии и медицине и довольно давно используются для создания медицинских препаратов (Budovsky et al., 2015; Alamgir, 2018; Addis et al., 2020; Sharma et al., 2021). Среди них определённый интерес представляют растительные гормоны (фитогормоны). Это сигнальные молекулы, производимые растениями и регулирующие их рост, дифференцировку и устойчивость к абиотическим и биотическим стрессовым факторам (Wang and Irving, 2011; Atamian and Harmer, 2016). Исследования показали, что фитогормоны оказывают разностороннее влияние на жизнеспособность и метаболизм клеток человека. В частности, эти соединения участвуют в регуляции поглощения глюкозы, протекании воспаления, в прохождении клеток по клеточному циклу (Lin and Tan, 2011; Chanclud and Lacombe, 2017), а также оказывают влияние на секреторно-синтетическую активность и дифференцировочный статус некоторых культивируемых клеток животных, в том числе и человека. Так, например, фитогормон гиббереллиновая кислота (ГК) повышает содержание α -амилазы в мезенхимных стромальных клетках человека, выделенных из жирового тела Биша (Kasamatsu et al., 2012) и активирует UPR и дифференцировку в культивируемых нормальных и опухолевых клетках человека эпидермоидного происхождения (Vildanova et al., 2021). Другой фитогормон, абсцизовая кислота (АБК), стимулирует секрецию инсулина β -клетками островков Лангерганса и секрецию гастроинтестинального гормона энтероэндокринными клетками (Bruzzzone et al., 2008; Bruzzzone et al., 2015). Кроме

того, было показано, что АБК в микромолярных концентрациях нормализует аномально повышенную секреторную активность, вызывая снижение отложения коллагена у фибробластов, полученных от больных системным склерозом (Bruzzone et al., 2012a). Согласно данным этих же авторов, АБК не влияет на секреторную активность фибробластов, полученных от здоровых доноров. Однако низкие концентрации и короткая продолжительность воздействия (24 часа) не позволяют сделать однозначных выводов о характере влияния АБК на данный тип клеток, так как анализ изменения секреторной активности фибробластов обычно проводится через 48 и более часов инкубации с исследуемыми агентами (Zhang et al., 2010; Baek et al., 2012; Heindryckx et al., 2016). Кроме этого, авторы исследования не определяли изменение содержания в популяции миофибробластов, для которых характерна повышенная секреторно-синтетическая активность (Desai et al., 2014; Matsuzaki et al., 2015). Поэтому влияние АБК на секреторную активность и дифференцировочный статус фибробластов требует более глубокого изучения.

Таким образом, имеющиеся научные данные указывают на то, что растительные гормоны могут влиять на секреторно-синтетическую активность и дифференцировочный статус некоторых типов культивируемых клеток, а также активировать в них UPR. Это даёт основание полагать, что АБК и/или ГК могут стать агентами коррекции секреторно-синтетической активности и дифференцировочного статуса фибробластов.

2.3. Цели и задачи

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

В работе поставлены следующие задачи:

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.

2.4. Объект и предмет исследования

Объектом исследования данной диссертационной работы являются дермальные фибробласты человека, предоставленные В.Ю. Сыроевой (факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова) и Е.Р. Андреевой (ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН), и дермальные фибробласты человека линии HdFb (d75), полученные из Уникальной научной установки «Коллекция клеточных культур» Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Предметом исследования в диссертации являются уровень экспрессии генов маркеров UPR в дермальных фибробластах человека, морфология компонентов биосинтетической системы и цитоскелета в этих клетках, их секреторно-синтетическая активность, уровень синтеза маркера миофибробластов α -SMA и количество миофибробластов в клеточной популяции.

2.5. Научная новизна

Впервые показана способность растительных гормонов АБК и ГК активировать стресс ЭПР (UPR) в дермальных фибробластах человека. При этом впервые изучена 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. Впервые показано, что UPR, вызываемый фитогормонами АБК и ГК и индуктором

стресса ЭПР ДТТ в дермальных фибробластах, сопровождается разными морфологическими изменениями: АБК вызывает формирование везикул со скрученными мембранами внутри («whorls»), ГК вызывает набухание цистерн ЭПР, при этом оба фитогормона стимулируют перераспределение аппарата Гольджи относительно ядра и не влияют на состояние актинового цитоскелета, а ДТТ вызывает реорганизацию актинового цитоскелета, что сопровождается сжатием клеток, изменением их формы и поверхности.

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.

Впервые показано, что АБК и ГК являются модуляторами секреторно-синтетической активности фибробластов, причём оказывают на неё противоположное влияние: АБК – стимулирующее, а ГК – подавляющее.

2.6. Теоретическая и практическая значимость работы

Человек постоянно контактирует с растительными гормонами: они попадают в его организм в составе растительных продуктов и используются в сельском хозяйстве. Полученные в данной работе результаты расширяют знания о влиянии растительных гормонов 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.

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. При этом следует обратить внимание как на возможность введения АБК в рану в составе лекарственных препаратов для стимуляции дифференцировки фибробластов пациента в миофибробласты, так и на активацию дифференцировки аллогенных фибробластов *in vitro* с последующим введением полученных миофибробластов в рану (Ko et al., 2019).

До сих пор не существует клинически одобренных методов предотвращения формирования рубцов (терапии рубцов), специально разработанных для ограничения или предотвращения фиброза кожи (Tai et al., 2021). Предлагаемые стратегии лечения включают в себя резекцию рубца или уменьшение его размера, использование методов тканевой инженерии, использование антител и лекарственную терапию, направленную, в частности, на блокирование дифференцировки фибробластов. В связи с этим при поиске способов предотвращения и лечения фиброза и, в частности, образования рубцов, следует обратить внимание на способность ГК снижать уровень синтеза маркера миофибробластов α -SMA.

2.7. Методология и методы диссертационного исследования

Приведённые в данной диссертационной работе исследования выполнены на модели *in vitro* (метод культуры клеток) с использованием дермальных фибробластов человека. В работе применены методы клеточной биологии, биохимии и молекулярной биологии, а именно культивирование клеток, МТТ-тест, ПЦР в реальном времени, флуоресцентная микроскопия, иммуноцитохимия и цитохимия, трансмиссионная электронная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, вестерн-блоттинг, колориметрический полуколичественный анализ общей продукции коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса. 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. Полученные изображения анализировали с помощью программы Fiji.

2.8. 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.

2.9. 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.

2.10. Степень достоверности результатов

Результаты диссертационной работы обладают высокой степенью достоверности. Результаты 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.

2.11. Апробация результатов

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

2.12. Публикации по теме работы

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. Список публикаций представлен в разделе 9.

3. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

3.1. Дифференцировка фибробластов в миофибробласты

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

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.

3.1.1. Характеристика фибробластов и миофибробластов

Фибробласты – клетки соединительной ткани, синтезирующие и секретирующие компоненты внеклеточного матрикса, такие как коллаген, фибронектин, эластин, гиалуроновая кислота и другие гликозаминогликаны, матриксные металлопротеиназы (MMPs), тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMPs) и др. (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014; Matsuzaki et al., 2015). Фибробласты участвуют в построении и ремоделировании внеклеточного матрикса, заживлении ран, воспалении и ангиогенезе (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014). При ранении фибробласты перемещаются в повреждённый участок, где пролиферируют и дифференцируются в миофибробласты (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014; Matsuzaki et al., 2015).

Миофибробласты совмещают в себе признаки фибробластов, например, хорошо выраженный гранулярный ЭПР и аппарат Гольджи, и признаки гладкомышечных клеток, а именно развитый сократительный аппарат – стресс-фибриллы, содержащие гладкомышечный актин (α -SMA). В миофибробластах, по сравнению с фибробластами, повышен синтез коллагена I, фибронектина и трансформирующего фактора роста β (TGF- β), увеличена толщина стресс-фибрилл и размер фокальных контактов, которые *in vitro* называют «суперзрелые фокальные контакты», а *in vivo* – «фибронексусы», повышена контрактильная способность, снижена миграционная активность (Hinz et al., 2003; Desai et al., 2014; Matsuzaki et al., 2015; Hinz, 2016). Миофибробласты участвуют в заживлении ран, восстанавливая внеклеточный матрикс в качестве каркаса для регенерации ткани, и стягивают края раны за счёт своей контрактильной активности (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014).

Для индукции дифференцировки фибробластов в миофибробласты *in vitro* часто используют многофункциональный цитокин TGF- β , который считается основным индуктором дифференцировки фибробластов в миофибробласты (Dugina et al., 2001; Baek et al., 2012; Desai et al., 2014; Matsuzaki et al., 2015; Hinz, 2016).

3.1.2. Фиброз

При нормальном заживлении ран и восстановлении целостности тканей миофибробласты погибают путём апоптоза (Desai et al., 2014; Matsuzaki et al., 2015). Если процессы заживления раны нарушаются, миофибробласты остаются в раневой зоне, где затем развивается фиброз, характеризующийся избыточным отложением внеклеточного матрикса и нерегулируемой контрактильной активностью миофибробластов (Desai et al., 2014; Heindryckx et al., 2016). Фиброз также может развиваться при хроническом воспалении, вызванном ядовитыми веществами, инфекциями и механическими повреждениями, или как результат аутоиммунных реакций (склеродермии, язвенного колита, болезни Крона и ревматоидного артрита) (Heindryckx et al., 2016). Поскольку объём и упругость внеклеточного матрикса играют решающую роль в структурной и функциональной целостности тканей, избыточное количество внеклеточного матрикса при фиброзе приводит к развитию и усугублению дисфункции тканей. Например, идиопатический лёгочный фиброз характеризуется накоплением миофибробластов и ремоделированием внеклеточного матрикса, что приводит к нарушению строения лёгких и прогрессирующему фиброзу (Zhong et al., 2011). Фиброзу подвержены почти все ткани организма, в том числе печень, почки и сердце (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014; Heindryckx et al., 2016). Присутствие миофибробластов отмечено в активно сокращающейся грануляционной ткани и гипертрофических рубцах, а также в сократительных тканях ладонной фасции при болезни Дюпюитрена (Matsuzaki et al., 2015). Фиброз является одной из важных причин заболеваемости и смертности во всём мире, однако, несмотря на растущее число углублённых исследований фиброза и активную разработку препаратов, направленных

на различные мишени, механизмы возникновения фиброза до конца не объяснены, а многие разработанные препараты обладают побочными эффектами, вынуждающими прекратить их приём пациентом (Zhao et al., 2022).

3.1.3. Снижение регенеративного потенциала

Не менее опасной, чем избыточная активность миофибробластов, является их недостаточная активность. Недостаточная активность миофибробластов и (или) их недостаточное количество, а также чрезмерная активность матриксных металлопротеаз приводят к снижению регенеративного потенциала тканей. Это ведёт к неполному заживлению ран и развитию хронических ран, сопровождающих пациентов с диабетом, ожирением, сердечно-сосудистыми заболеваниями, аутоиммунными заболеваниями, тяжёлыми травмами и ожогами, а также пожилых людей (Hinz, 2016; Ko et al., 2019; Las Heras et al., 2020; Zou et al., 2021). Хронические раны могут снижать качество жизни так же сильно, как болезни сердца и почек, в связи с этим к настоящему времени разработано и продолжает разрабатываться множество вариантов терапии хронических ран (Las Heras et al., 2020). Основные задачи терапии хронических ран направлены на то, чтобы подавить инфекционное заражение раны и воспаление; стимулировать ангиогенез; стимулировать регенерацию, активируя продукцию специфических факторов (таких как TGF- β и фактор роста эндотелия сосудов), эпителизацию раны, а также пролиферацию, миграцию и дифференцировку фибробластов, в частности для увеличения продукции внеклеточного матрикса (Ko et al., 2019; Las Heras et al., 2020). До настоящего времени проблема терапии хронических ран остаётся неразрешённой, так как у каждого метода есть недостатки и ограничения. В связи с этим изучение механизмов дифференцировки фибробластов в миофибробласты является важным звеном в поиске способов предотвращения и лечения как фиброза, так и снижения регенеративного потенциала. Исследования показали, что в дифференцировке фибробластов в миофибробласты важную роль играет сигнальный каскад, носящий название «ответ на неправильно свёрнутые белки»,

или UPR (Baek et al., 2012; Matsuzaki et al., 2015; Heindryckx et al., 2016; Chen et al., 2019a; Kim et al., 2022).

3.1.4. Стресс ЭПР и UPR

Одной из основных функций ЭПР является котрансляционный перенос секреторных, лизосомных и трансмембранных белков, их модификация и сворачивание (Osowski and Urano, 2011). В этих процессах участвует множество разных ферментов и белков-шаперонов ЭПР (Sicari et al., 2020). Для нормального функционирования белков необходим их безошибочный синтез и сворачивание, поэтому в ЭПР существует контроль качества свёрнутых белков. Неправильно свёрнутые белки узнаются шаперонами (например, BiP (белок, связывающий иммуноглобулин), ERdj (семейство локализованных в ЭПР DnaJ-подобных белков)) и лектинами (например, OS-9 (белок, высоко экспрессирующийся в остеосаркомах-9) и ХТР3-В (ХТР3-*транс*-активированный ген-В)), ретротранслоцируются из ЭПР в цитозоль, полиубиквитинируются и деградируют в протеосомах (Hwang and Qi, 2018; Fregno and Molinari, 2019; Sicari et al., 2020). Этот процесс называется ЭПР-ассоциированной деградацией (ERAD) (Sicari et al., 2020).

Для нормального функционирования ЭПР необходим баланс между синтезируемыми в ЭПР ещё не свёрнутыми белками и активностью шаперонов ЭПР (Osowski and Urano, 2011). Различные физиологические состояния и патологические факторы могут нарушить этот баланс, что приводит к накоплению в ЭПР не свёрнутых и неправильно свёрнутых белков. Это состояние носит название «стресс ЭПР» (Chadwick and Lajoie, 2019). Стресс ЭПР может индуцироваться при увеличении количества не свёрнутых белков в ЭПР, например, из-за повышения потребности в белках для секреции в секреторных клетках, или при нарушении процесса сворачивания белков, например, из-за мутаций или воздействия химических агентов (дителиотреитола (ДТТ), туникамицина, тапсигаргина, брефельдина А и др.) (Liu et al., 1992; Yoshida et al., 2006; Li et al., 2011a; Corazzari et al., 2017; Almanza et al., 2019). Нарушение кальциевого

гомеостаза, окислительно-восстановительного статуса ЭПР, гипоксия, глюкозное голодание, перегруженность ЭПР холестерином, депривация питательных веществ и повышение температуры до 40 градусов также могут приводить к нарушению сворачивания белков и стрессу ЭПР (Li et al., 2011a; Corazzari et al., 2017; Almanza et al., 2019).

Для восстановления нормального функционирования ЭПР и, в частности, его способности обеспечивать сворачивание белков, в ответ на стресс ЭПР в клетках активируется сигнальный каскад, известный как ответ на неправильно свёрнутые белки, или UPR (Hetz, 2012; Sicari et al., 2020). UPR – это адаптивный ответ, изначально нацеленный на нормализацию гомеостаза клетки и её выживание (Corazzari et al., 2017; Almanza et al., 2019). Активация UPR оказывает влияние почти на каждый аспект секреторного пути в клетке, модифицируя интенсивность синтеза белков и их транслокацию в ЭПР, сворачивание белков, созревание и контроль качества свёрнутых белков, перенос белков по секреторному пути и элиминацию неправильно свёрнутых белков с помощью аутофагии и ERAD (Hetz, 2012).

UPR может запускаться тремя сенсорными трансмембранными белками ЭПР: IRE1 (требующий инозитол белок 1), PERK (киназа ЭПР, подобная белковой киназе RNA) и ATF6 (активирующий фактор транскрипции 6) (Sicari et al., 2020). Домены этих белков, находящиеся в люмене ЭПР (люминальные домены), в отсутствие стресса ЭПР связаны с шапероном ЭПР BiP, или GRP78 (белок 78 кДа, регулируемый глюкозой). Такое связывание не даёт активироваться этим сенсорным белкам. При индукции стресса ЭПР BiP отсоединяется от сенсоров, что приводит к их активации (Corazzari et al., 2017). Каждый сенсор стресса ЭПР (IRE1, PERK и ATF6) при активации запускает свой сигнальный каскад (путь). Таким образом, IRE1, PERK и ATF6 «отслеживают», справляется ли свёртывающий аппарат ЭПР с имеющимся объёмом не свёрнутых или неправильно свёрнутых белков (Sicari et al., 2020). Следует отметить, что в зависимости от индуктора стресса ЭПР и клеточного типа могут активироваться не все пути UPR, а два или один из возможных (Oslowski and Urano, 2011).

Путь, активируемый IRE1

Трансмембранная киназа IRE1 после освобождения от связи с BiP олигомеризуется и аутофосфорилируется, что ведёт к её активации (Almanza et al., 2019). Активированная IRE1 с помощью своего эндорибонуклеазного домена осуществляет сплайсинг мРНК, кодирующей транскрипционный фактор XBP1 (X-box-связывающий белок 1). Этот домен вырезает 26-нуклеотидный интрон и смещает рамку считывания, в результате чего синтезируется активный транскрипционный фактор sXBP1 («s» означает «сплайсированный») (Calfon et al., 2002; Hetz, 2012). sXBP1 повышает экспрессию генов белков, вовлечённых в транслокацию синтезируемых белков в ЭПР, их сворачивание (например, дисульфид-изомераза PDI) и секрецию, а также деградацию неправильно свёрнутых белков (например, EDEM (усиливающий деградацию α -маннидозоподобный белок ЭПР), участвующий в ERAD) и продукцию липидных компонентов ЭПР (например, холин цитидилтрансфераза) (Lee et al., 2003; Osowski and Urano, 2011; Hetz, 2012; Lam and Bhattacharya, 2018).

Путь, активируемый PERK

Трансмембранная киназа PERK после освобождения от связи с BiP олигомеризуется, аутофосфорилируется и фосфорилирует Ser51 на α -субъединице инициаторного фактора трансляции eIF2 (Teske et al., 2011; Almanza et al., 2019). Фосфорилированный eIF2 α препятствует инициации трансляции, что ведёт к подавлению трансляции большинства мРНК (Teske et al., 2011). В результате в ЭПР перестают поступать синтезируемые белки, что снижает нагрузку на ЭПР, связанную с укладкой белков (Sicari et al., 2020). При этом мРНК транскрипционного фактора ATF4 (активирующий фактор транскрипции 4), наоборот, транслируются в присутствии фосфорилированного eIF2 α (Teske et al., 2011; Hetz, 2012). ATF4 активирует транскрипцию генов-мишеней UPR, кодирующих факторы, вовлечённые в биосинтез аминокислот, антиоксидантный ответ, аутофагию и апоптоз (Teske et al., 2011; Hetz, 2012). Подавление трансляции с помощью eIF2 α обратимо: ATF4 повышает уровень активности регуляторной

субъединицы белковой фосфатазы PP1 – GADD34 (белок, индуцируемый остановкой роста и повреждением ДНК), таким образом участвуя в петле обратной связи, направленной на дефосфорилирование eIF2 α и восстановление нормального уровня синтеза белка (Hetz, 2012).

Путь, активируемый ATF6

Трансмембранный белок ATF6 после освобождения от связи с BiP перемещается в составе COPII-окаймлённых везикул от ЭПР к аппарату Гольджи, где он разрезается протеазами S1P и S2P (Hetz, 2012; Gardner et al., 2013). В результате высвобождается цитоплазматический фрагмент ATF6 – ATF6 p50, который перемещается в ядро и работает как транскрипционный фактор вместе с sXBP1 (Hetz, 2012). ATF6 p50 и sXBP1 активируют транскрипцию генов, кодирующих шапероны и ферменты ЭПР, которые стимулируют транслокацию белков в ЭПР, их сворачивание (например, шапероны GRP78, GRP94, кальнексин), процессинг и секрецию, а также деградацию неправильно свёрнутых белков (Yoshida et al., 1998; Ye et al., 2000; Osowski and Urano, 2011; Hetz, 2012). Кроме того, ATF6 p50 и sXBP1 стимулируют биогенез ЭПР и аппарата Гольджи в условиях стресса ЭПР (Hetz, 2012).

Активация гибели при хроническом стрессе ЭПР

UPR – это адаптивный ответ, изначально нацеленный на выживание клеток, однако если восстановить нормальное функционирование ЭПР не удаётся, то активируются сигнальные пути, запускающие гибель клеток (Osowski and Urano, 2011; Corazzari et al., 2017; Almanza et al., 2019; Sicari et al., 2020). При высоком уровне хронического стресса ЭПР, IRE1 запускает сигнальный путь TNF (фактор некроза опухоли), при котором рекрутируется медиатор этого сигнального пути – TRAF2 (ассоциированный с рецептором TNF фактор 2) и активируется киназа ASK1 (киназа 1 сигналинга апоптоза). ASK1 активирует киназу JNK (с-Jun N-терминальная белковая киназа), которая участвует в запуске апоптоза, регулируя белки семейства BCL2 (В-клеточная лимфома 2) (Osowski and Urano, 2011; Almanza et al., 2019). Кроме того, ATF4, участвующий в сигнальном пути

PERK/eIF2 α , может активировать экспрессию проапоптотического фактора CHOP (ССААТ/белок, гомологичный энхансер-связывающему белку). Этот фактор регулирует белки семейства BCL-2, DR5 (рецептор смерти 5) и GADD34 (регуляторная субъединица белковой фосфатазы PP1) и стимулирует стресс-опосредованную индукцию апоптоза (Hetz, 2012).

Таким образом, хронический стресс ЭПР и продолжительный UPR могут приводить к нарушению функционирования клетки и её гибели (Osowski and Urano, 2011; Oakes and Papa, 2015). Это, в свою очередь, вовлечено в развитие хронических заболеваний у человека, таких как нейродегенеративные заболевания, диабет, фиброз лёгких и воспалительные процессы (Oakes and Papa, 2015).

Гибель или выживание клетки не являются единственными последствиями стресса ЭПР, так как помимо контроля сворачивания белков UPR играет ключевую роль в различных физиологических процессах, таких как врождённый иммунитет, метаболизм глюкозы и липидов, а также дифференцировка клеток (Hetz, 2012). Физиологический стресс ЭПР участвует в дифференцировке клеток эпителиального, мышечного, нейрального и соединительнотканного происхождения, в частности в дифференцировке фибробластов в миофибробласты (Celli et al., 2011; Matsuzaki et al., 2015; Nakanishi et al., 2015; Muraio and Nishitoh, 2017).

3.1.5. Роль UPR в дифференцировке фибробластов в миофибробласты

Исследования *in vitro* показали, что стресс ЭПР (UPR) участвует в дифференцировке фибробластов, выделенных из разных тканей, в миофибробласты (Baek et al., 2012; Matsuzaki et al., 2015; Heindryckx et al., 2016; Chen et al., 2019a; Kim et al., 2022), а ингибирование UPR приводит к подавлению такой дифференцировки (Baek et al., 2012; Jiang et al., 2018; Qin et al., 2021).

Так, например, при индукции дифференцировки лёгочных фибробластов человека и мыши в миофибробласты с помощью TGF- β значительно повышается уровень синтеза GRP78, sXBP1 и ATF6 (Baek et al., 2012). При этом уровень синтеза CHOP и фосфорилированного eIF2 α не изменяется, что, возможно, связано

с антиапоптотическим эффектом TGF- β . Напротив, ингибирование стресса ЭПР с помощью химического шаперона, 4-фенилмасляной кислоты (4-PBA), подавляет не только развитие UPR, но и экспрессию генов, кодирующих α -SMA и коллаген I (основных маркеров дифференцировки миофибробластов). Кроме того, индукция синтеза α -SMA и коллагена I с помощью TGF- β подавляется при нокдауне *GRP78*, что свидетельствует о необходимости участия компонентов UPR в дифференцировке (Baek et al., 2012). 4-PBA также оказывает антифибротическое воздействие при TGF- β -индуцированной дифференцировке первичных синовиальных фибробластов крыс в миофибробласты (Jiang et al., 2018). Стресс ЭПР активируется и при индукции дифференцировки фибробластов в миофибробласты с помощью эндотелина-1 и тромбина (Chen et al., 2019a).

Интересно, что 1%-ный экстракт сигаретного дыма вызывает дифференцировку лёгочных эмбриональных фибробластов человека (MRC-5) в миофибробласты тоже путём индукции UPR (Song et al., 2019). При действии данного фактора в фибробластах повышается синтез белков α -SMA, *GRP78*, *IRE1*, *XBP1* и *ATF6*. Обработка 4-PBA или нокдаун *GRP78* до воздействия снижает индуцированную экстрактом сигаретного дыма дифференцировку фибробластов в миофибробласты. Однако остаётся неизвестным, является ли влияние экстракта сигаретного дыма на дифференцировку фибробластов результатом воздействия одного или нескольких компонентов экстракта или обусловлено совместным действием всех его компонентов (Song et al., 2019).

Ингибирование активности отдельных путей UPR показало их важность в активации дифференцировки фибробластов в миофибробласты, однако пока ещё неясно, насколько равнозначно влияние каждого из них (Heindryckx et al., 2016; Chen et al., 2019a; Stauffer et al., 2020).

3.1.5.1. Роль сигнального пути IRE1

Ингибирование *IRE1* с помощью селективного ингибитора 4 μ 8C (производное салицилового альдегида, подавляющее РНКазную активность *IRE1*) блокирует индуцированную TGF- β дифференцировку эмбриональных лёгочных

фибробластов человека в миофибробласты, снижая экспрессию и синтез α -SMA и коллагена I (Heindryckx et al., 2016). Снижение экспрессии гена, кодирующего α -SMA, наблюдается в эмбриональных лёгочных фибробластах человека при подавлении РНКазной активности IRE1 и в эмбриональных фибробластах мыши с нокаутом *IRE1*. Кроме того, IRE1 разрезает miRNA-150, что снимает ингибирующий эффект этой микроРНК на экспрессию α -SMA, который miRNA-150 осуществляет через подавление экспрессии транскрипционного фактора c-Myc. По этому механизму осуществляется снижение индуцированной TGF- β экспрессии α -SMA при подавлении РНКазной активности IRE1. При этом sXBP1 стимулирует синтез фосфатидилхолина – основного фосфолипида мембраны ЭПР, что вносит вклад в увеличение площади ЭПР. Это, в свою очередь, необходимо для более эффективного синтеза белков в ходе дифференцировки фибробластов в миофибробласты (Sriburi et al., 2004; Heindryckx et al., 2016). Соответственно, при нокадауне *XBP1* увеличение площади ЭПР и секреция коллагена, индуцированные с помощью TGF- β , подавляются (Heindryckx et al., 2016).

3.1.5.2. Роль сигнального пути PERK

Нокдаун *PERK* подавляет дифференцировку эмбриональных лёгочных фибробластов человека линии WI-38 в миофибробласты (Chen et al., 2019a). При индукции дифференцировки с помощью эндотелина-1 или тромбина, но при отсутствии PERK, не происходит повышения синтеза α -SMA, коллагена I и коллагена IV. При этом ингибитор киназы JNK также подавляет индуцированную эндотелином-1 или тромбином дифференцировку этих фибробластов в миофибробласты, в частности, в клетках не повышается синтез α -SMA. Это может свидетельствовать о том, что JNK активирует PERK, а PERK, в свою очередь, необходим для активации синтеза α -SMA. Интересно, что триметиламин N-оксид, синтезируемый в организме человека из триметиламина, который, в свою очередь, производится микрофлорой кишечника, стимулирует дифференцировку фибробластов кожи человека в миофибробласты через активацию PERK (Kim et al., 2022). Причём PERK является рецептором триметиламин N-оксида.

В фибробластах, культивированных в присутствии триметиламин N-оксида, наблюдалось повышение уровня экспрессии генов, кодирующих коллаген I и α -SMA, а также повышение уровня секреции проколлагена I и фибронектина.

3.1.5.3. Роль сигнального пути ATF6

Исследования показали, что ATF6 препятствует дифференцировке фибробластов желудочков сердца в миофибробласты. В частности, подавление активности ATF6 с помощью нокаута или нокдауна приводит к усилению профиброзного эффекта TGF- β (Stauffer et al., 2020). Напротив, дополнительная фармакологическая активация ATF6 с помощью низкомолекулярного активатора *N*-(2-гидрокси-5-метилфенил)-3-фенилпропанамида (compound 147) снижает экспрессию α -SMA и подавляет профиброзное действие TGF- β . Предполагается, что ATF6 подавляет дифференцировку фибробластов в миофибробласты за счёт ингибирования TGF- β -опосредованного сигналинга через посредник Smad и снижения экспрессии генов, кодирующих TGF- β и его рецепторы. В частности, при активации ATF6 с помощью compound 147 активность некоторых профиброзных генов, например генов матриксных металлопротеаз и рецепторов к TGF- β , снижается, а при нокдауне *ATF6* – повышается (Stauffer et al., 2020).

3.1.5.4. Влияние экзогенных индукторов стресса ЭПР на дифференцировку фибробластов в миофибробласты

Стресс ЭПР может быть индуцирован разными химическими агентами. Так, например, туникамицин, являющийся антибиотиком, блокирует N-гликозилирование белков в ЭПР, что приводит к нарушению начальной стадии биосинтеза гликопротеинов, накоплению не свёрнутых гликопротеинов в ЭПР и стрессу ЭПР (Osłowski and Urano, 2011). Ещё один индуктор стресса ЭПР – тапсигаргин (сесквитерпеновый лактон) – блокирует работу кальциевых АТФаз (SERCA), что приводит к потере активности кальций-зависимых шаперонов и накоплению не свёрнутых белков. Оказалось, что и туникамицин, и тапсигаргин способны индуцировать дифференцировку фибробластов в миофибробласты. Так, например, при действии туникамицина или тапсигаргина на первичные лёгочные

фибробласты человека наблюдается повышение уровня синтеза α -SMA и коллагена I, а при нокдауне *GRP78* индукция синтеза α -SMA и коллагена I подавляется (Baek et al., 2012). Стресс ЭПР, индуцированный тапсигаргином, также повышает экспрессию генов, кодирующих коллаген I и α -SMA, в синовиальных фибробластах крыс (Jiang et al., 2018). Постоянная активация стресса ЭПР с помощью туникамицина в первичных фибробластах кожи мыши индуцирует дифференцировку этих клеток в миофибробласты. В клетках повышается экспрессия α -SMA и контрактильная активность, они приобретают более распластанную форму (Matsuzaki et al., 2015). Туникамицин и тапсигаргин также повышают синтез α -SMA и коллагена IV и стимулируют дифференцировку эмбриональных лёгочных фибробластов человека линии WI-38 в миофибробласты (Chen et al., 2019a). При этом нокдаун гена *PERK* или ингибирование PERK с помощью ингибитора GSK2606414 подавляет индуцированный тапсигаргином синтез α -SMA и коллагена IV.

Таким образом, сигнальные пути активации UPR могут оказывать разнонаправленное действие на дифференцировку фибробластов в миофибробласты: если необходимо стимулировать дифференцировку, следует активировать IRE1- и PERK-зависимые механизмы индукции UPR; если же необходимо подавить признаки дифференцировки, то следует воздействовать на сигнальный путь ATF6.

Воздействие на компоненты UPR и контроль секреторно-синтетических процессов в фибробластах являются одними из потенциальных способов коррекции фиброза и неполного заживления ран. В связи с этим перспективным является поиск соединений, обладающих такими свойствами. Такими соединениями могут стать фитогормоны, которые, как будет показано далее, обладают широким спектром воздействий на клетки млекопитающих, в том числе человека.

3.2. Фитогормоны в клетках растений

Фитогормоны (или растительные гормоны) – сигнальные молекулы, производимые растениями. Они контролируют практически каждый аспект в жизни растений: их рост, развитие и устойчивость к биотическому и абиотическому стрессу (Wang and Irving, 2011; Atamian and Harmer, 2016; Bittner et al., 2022). Биосинтез и сигнальные пути фитогормонов регулируются циркадными часами, генерирующими суточные ритмы в активности этих веществ (Atamian and Harmer, 2016). У каждого фитогормона есть специфические функции, хотя то или иное биологическое событие в жизни растения обычно обусловлено комбинированным взаимодействием нескольких различных гормонов через активацию каскадов фосфорилирования или общего вторичного мессенджера (Wang and Irving, 2011; El-Esawi, 2017; Bittner et al., 2022). Следует отметить, что большинство фитогормонов синтезируется в широком спектре тканей и органов растений, и функции каждого гормона могут различаться в зависимости от его местонахождения (Seo and Marion-Poll, 2019). Фитогормоны могут перемещаться по растению, и для их восприятия в клетках присутствуют специфические рецепторы (Wang and Irving, 2011; Seo and Marion-Poll, 2019).

Фитогормон **абсцизовая кислота (АБК)** (рис. 1) относится к классу терпеноидов (Li et al., 2017). АБК называют «гормоном стресса», так как это соединение регулирует адаптацию растения к абиотическому стрессу, например, вызывая закрытие устьиц и, таким образом, препятствуя потере воды с испарением (Wang and Irving, 2011). Однако АБК выполняет важные функции и в нормальных физиологических условиях, в частности подавляя развитие и прорастание семян (Lin and Tan, 2011; Wang and Irving, 2011; Seo and Marion-Poll, 2019). Биосинтез АБК происходит путём специфической деградации каротиноидов. Он начинается в пластидах, а заканчивается в цитоплазме (Boursiac et al., 2013; Chen et al., 2019b; Kumar et al., 2022). Установлено, что рецепторами АБК являются белки pyrabactin resistance (PYR)/PYR1-like (PYL)/regulatory components of ABA receptors (RCAR) (Wang and Irving, 2011; Li et al., 2017). Наличие мембранных рецепторов к АБК остаётся предметом для дискуссий, но перенос АБК в клетки осуществляется

при участии специфичных мембранных транспортёров (Chen et al., 2019b). В сигнальный путь АБК вовлечены фосфопротеинфосфатаза 2С (PP2C) (негативный регулятор), протеинкиназа SnRK (SNF1-related protein kinase 2) (позитивный регулятор), фосфатидная кислота, инозитол-3-фосфат, Ca^{2+} , NO, сADPR (циклическая АДФ-рибоза), MAPK-каскады (каскады митоген-активируемых киназ) и изменение pH (Wang and Irving, 2011; Danquah et al., 2013; Li et al., 2017).

Фитогормон **гиббереллиновая кислота (ГК, или ГК₃)** (рис. 1) относится к семейству гиббереллинов – тетрациклических дитерпеноидных кислот (Meleigy and Khalaf, 2009). Гиббереллины играют важную роль в стимуляции роста и развития растения, от прорастания семян и вегетативного роста до цветения и развития цветка и плода, а также вовлечены в реакции, запускаемые в ответ на некоторые абиотические и биотические стрессовые факторы (Lin and Tan, 2011; Colebrook et al., 2014; Shah et al., 2023). Недостаток ГК приводит к формированию карликовых растений и позднему цветению, а введение ГК возвращает нормальный фенотип (Davière and Achard, 2013). Гиббереллины синтезируются из геранилгеранил дифосфата в ходе нескольких промежуточных стадий, катализируемых ферментами в пластидах, ЭПР и цитозоле (Wang and Irving, 2011; Gupta and Chakrabarty, 2013; Shah et al., 2023). Рецептором ГК является растворимый белок GID1 (GA-INSENSITIVE DWARF1), локализующийся в цитоплазме и ядре (Wang and Irving, 2011; Shah et al., 2023). Транспортёры для переноса ГК через плазматическую мембрану клеток пока не найдены (Hedden, 2020). В сигнальный путь ГК вовлечены транскрипционные репрессоры DELLA (негативные регуляторы), F-box белки SLEEPY1 (SLY1)/GID2 (позитивные регуляторы) и фитохром-связывающие факторы PIFs (Wang and Irving, 2011; Shah et al., 2023).

Подробно функции, синтез и сигнальные пути АБК и ГК рассмотрены в обзоре Вильдановой и Смирновой (2016).

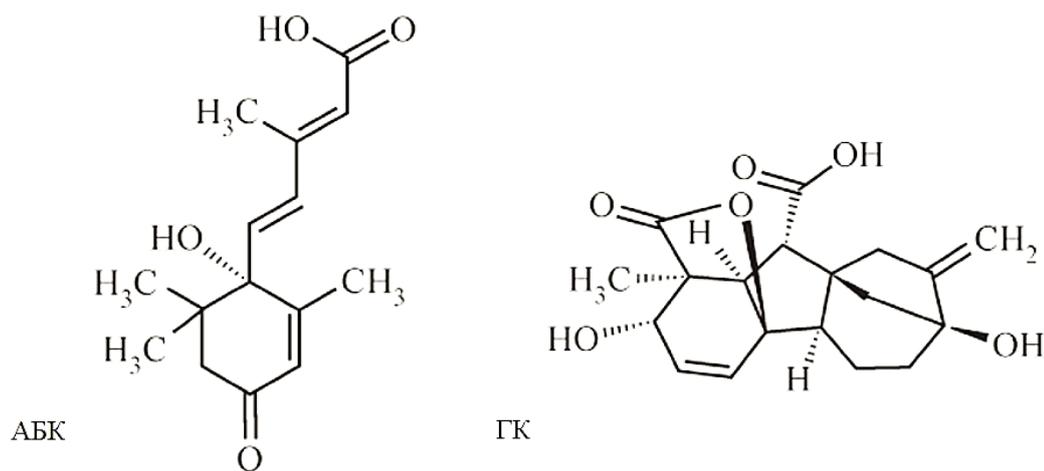


Рис. 1. Химическое строение фитогормонов АБК и ГК. По Шпакову, 2009.

3.3. Фитогормоны и клетки животных

3.3.1. Абсцизовая кислота

Первые данные о присутствии АБК в клетках животных были опубликованы ещё в 1986 году. АБК и ее конъюгаты (эферы и глюкозиды) были обнаружены методом радиоиммунного анализа в мозге свиней и крыс; кроме того, АБК была идентифицирована в других тканях свиней (сердце, печень, лёгкие, почки), но в гораздо меньшем количестве (Le Page-Degivry et al., 1986). Исследователи показали, что наличие АБК в мозге крыс не коррелирует с содержанием данного фитогормона в рационе животных: напротив, у крыс, содержащихся на диете, бедной АБК, содержание АБК в мозге было выше, чем у контрольных крыс (Le Page-Degivry et al., 1986). Тем не менее долгое время эти результаты оставались незамеченными (Lievens et al., 2017).

3.3.1.1. Аутокринная секреция АБК

На сегодняшний день эндогенная АБК обнаружена у простейшего *Toxoplasma gondii*, низших многоклеточных (губки, гидры), медовой пчелы *Apis mellifera* и у млекопитающих (мыши, крысы и человека) (Zocchi et al., 2001; Puce et al., 2004; Nagamune et al., 2008; Li et al., 2011b; Olds et al., 2018). Показано, что АБК может синтезироваться и выделяться различными клетками млекопитающих как

в физиологических условиях, так и при патологии (Li et al., 2011b). На сегодняшний день эндогенная продукция АБК обнаружена в мезенхимных стромальных клетках, остеобластах, эндотелиальных клетках костного мозга, мегакариоцитах, моноцитах и макрофагах, микроглии, гранулоцитах, кератиноцитах и фибробластах, а также в β -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы (Bruzzone et al., 2007; Bruzzone et al., 2008; Scarfi et al., 2008; Bodrato et al., 2009; Magnone et al., 2009; Scarfi et al., 2009; Bruzzone et al., 2012a; Bruzzone et al., 2012b; Bruzzone et al., 2012c; Magnone et al., 2012; Lievens et al., 2017; Malara et al., 2017; Jung et al., 2021).

АБК присутствует в не стимулированных гранулоцитах человека как в свободном, так и в связанном виде. Конъюгированная форма АБК, возможно, является внутриклеточной формой хранения данного гормона (Bruzzone et al., 2007). Химическая стимуляция гранулоцитов ацетатом форболмиристора или повышение температуры до 39°C приводили к возрастанию концентрации внутриклеточной свободной АБК в 2 и 3 раза, соответственно (Bruzzone et al., 2007). Воздействие высокой температуры не вызывало выхода АБК, однако стимуляция частицами зимозана или латексными шариками снижала внутриклеточную концентрацию гормона и стимулировала выход АБК во внеклеточную среду. Авторы заключили, что АБК в гранулоцитах человека выступает в роли эндогенного провоспалительного цитокина, стимулирующего основные функции этих клеток: фагоцитоз, продукцию активных форм кислорода и NO, хемотаксис и хемокинез (Bruzzone et al., 2007).

Несколькими годами позже было показано, что АБК является ключевым медиатором воспаления, индуцированного ультрафиолетовым облучением (УФ). Воздействие УФ вызывало увеличение внутриклеточной концентрации АБК и её высвобождение из гранулоцитов, стимулируя основные функции этих клеток. В облучённых кератиноцитах также повышалась внутриклеточная концентрация АБК и наблюдалось её высвобождение из клеток (Bruzzone et al., 2012b). При этом АБК стимулировала продукцию в клетках NO, простагландина E₂, TNF- α и активных форм кислорода (АФК). Таким образом, было показано, что аутокринная АБК стимулирует клеточные функции, вовлечённые в воспалительные процессы

в коже. При этом, как полагают исследователи, АБК, выделяемая кератиноцитами, возможно, является хемоаттрактантом для гранулоцитов при их миграции к месту УФ облучения (Bruzzone et al., 2012b).

Согласно данным этой же группы исследователей, фибробласты также относятся к АБК-синтезирующим клеткам (Bruzzone et al., 2012a). Эксперименты *in vitro* показали, что облучение УФ повышало уровень АБК в культуре фибробластов от больных системным склерозом почти в 3 раза, в то время как в культуре нормальных фибробластов повышение уровня выработки АБК было незначительным (Bruzzone et al., 2012a). Эти данные представляют большой интерес, так как показывают отличия в способности синтезировать АБК у нормальных и патологически измененных клеток. При этом патологически измененные фибробласты более активно синтезируют АБК в ответ на УФ облучение.

Ещё одним аргументом в пользу провоспалительного характера действия АБК стали исследования её участия в активации клеток макрофагального ряда (Bodrato et al., 2009; Magnone et al., 2009; Magnone et al., 2012). Было показано, что клетки мышинной микроглии линии N9 синтезируют АБК, которая аутокринно индуцирует их активацию (Bodrato et al., 2009). Усиление интенсивности синтеза и выведения АБК во внеклеточную среду наблюдалось при стимуляции бактериальным липополисахаридом, ацетатом форболмиристата, β -амилоидом и хемоаттрактантным пептидом f-MLP. Экзогенная АБК стимулировала продукцию медиаторов воспаления NO и TNF- α , а также миграцию микроглии (Bodrato et al., 2009). В свою очередь, другие авторы обнаружили синтез и аутокринную секрецию АБК в моноцитах человека и макрофагах крыс и мышей (Magnone et al., 2009, 2012). Синтезированная моноцитами АБК стимулировала миграцию моноцитов и высвобождение белка – хемоаттрактанта моноцитов MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), а также миграцию и пролиферацию сосудистых гладкомышечных клеток, таким образом осуществляя как аутокринное, так и паракринное провоспалительное действие. При этом стимуляция высвобождения АБК наблюдалась при повышении температуры до 39°C, добавлении в среду

MCP-1, а также при инкубации с активированными тромбоцитами, наличие которых характерно для повреждённого сосудистого эндотелия (Magnone et al., 2009). Более того, на культивируемых клетках макрофагов мышей RAW264.7 и на первичной культуре альвеолярных макрофагов крыс было показано, что значительное повышение выхода АБК индуцируют частицы кварца. Вызванная ими секреция АБК стимулировала высвобождение медиаторов воспаления простагландина E_2 и TNF- α , которые также выделяются альвеолярными макрофагами при силикозе – заболевании лёгких, вызываемым хроническим вдыханием частиц кварца (Magnone et al., 2012).

Таким образом, при активации некоторыми провоспалительными стимулами клетки врождённого иммунитета (гранулоциты, моноциты, микроглия), а также кератиноциты, синтезируют и секретируют АБК, которая стимулирует функциональные активности, вовлечённые в воспаление, в том числе фагоцитоз (у клеток врождённого иммунитета), продукция АФК и NO, высвобождение простагландина E_2 и TNF- α и клеточная миграция (у клеток врождённого иммунитета) (Magnone et al., 2012).

Список клеток, которые способны к синтезу АБК, постоянно расширяется. Так, мезенхимные стромальные клетки (МСК) костного мозга человека также синтезируют АБК и выделяют её во внеклеточную среду. При этом добавление ростового фактора BMP-7 (костный морфогенетический белок) в среду культивирования стимулировало синтез АБК, а такие стресс-сигналы, как TNF- α , RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) и IL-8, выделяемые мононуклеарами периферической крови, стимулировали высвобождение АБК из МСК (Scarfi et al., 2008). Аутокринная АБК, в свою очередь, индуцировала целый спектр функциональных активностей МСК, включая выделение цитокинов, стимулирующих гемопоэз, продукцию иммуномодулирующих цитокинов и хемокинов, снижающих активацию лимфоцитов и их негативное влияние на гемопоэз, и стимуляцию мобилизации МСК из костного мозга. Более того, экзогенная АБК (в том числе выделяемая МСК при сокультивировании) стимулировала пролиферацию и распространение

некоммитированных кроветворных предшественников (Scarfi et al., 2009). Эти данные позволяют предположить, что АБК может являться не только аутокринным стимулятором мобилизации и активации МСК, но и участвовать в качестве гормона стресса в паракринном сигналинге между МСК, воспалительными/иммунными клетками и кроветворными предшественниками, располагающимися в костном мозге (Scarfi et al., 2008, 2009). Необходимо отметить, что недавно аутокринная секреция АБК была обнаружена в мегакариоцитах, также присутствующих в костном мозге и тесно связанных с вышеупомянутыми клетками (Malara et al., 2017).

Сведения о наличии аутокринной секреции АБК не ограничиваются клетками врождённого иммунитета, их предшественниками и кератиноцитами. АБК синтезируется в β -клетках островков Лангерганса человека и крыс, и является эндогенным стимулятором секреции инсулина в ответ на повышение уровня глюкозы (Bruzzone et al., 2008). Инкубация культивируемых клеток человека и крысы в среде с повышенным содержанием глюкозы приводила к повышению внутриклеточной концентрации АБК в 2 раза, а также к значительному повышению АБК в среде культивирования (в 25 раз в эксперименте с клетками человека). В свою очередь, введение АБК в среду культивирования усиливало стимулированную глюкозой секрецию инсулина клетками островков и запускало глюкозо-независимую секрецию инсулина этими клетками (Bruzzone et al., 2008).

Таким образом, АБК не только является эндогенным провоспалительным цитокином у млекопитающих, но и участвует в физиологическом процессе секреции инсулина, то есть оказывает влияние на секреторно-синтетическую систему определённых клеток.

3.3.1.2. Действие АБК на клетки животных

Большой научный интерес также представляет изучение влияния АБК на клетки как в норме, так и при патологии. Как показал анализ литературы, это влияние носит широкий характер.

3.3.1.2.1. АБК и опухолевые клетки

Было показано, что АБК подавляет рост и стимулирует дифференцировку опухолевых клеток (Li et al., 2011b). Противоопухолевая активность АБК продемонстрирована на клетках плоскоклеточного рака языка человека Тса8113 (подавление роста, индукция апоптоза, в том числе на иммунодефицитных мышах (nude mice)), клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека SMMC-7721 (подавление пролиферации, индукция дифференцировки), клетках аденокарциномы лёгких человека spc-A1 (индукция аутофагии) (Ma et al., 2006; Zhao et al., 2007; Lu et al., 2008; Zhao et al., 2008) и клетках глиобластомы человека U87-MG и A172 (индукция апоптоза и дифференцировки) (Zhou et al., 2016). Исследователи обнаружили строгую обратную зависимость между концентрацией АБК и экспрессией маркера пролиферации Ki67 (Zhou et al., 2016). Следует отметить, что АБК активировала аутофагическую гибель в клетках глиобластомы *in vitro* и *in vivo*, причём *in vitro* было показано, что АБК запускает аутофагическую гибель через MAPK/JNK сигнальный каскад (Zhou et al., 2021).

Кроме того, АБК оказалось способной стимулировать переход клеток рака предстательной железы в стадию покоя *in vitro*, подавляя пролиферацию и стимулируя переход клеток в G₀ и задержку на этой стадии клеточного цикла (Jung et al., 2021). По-видимому, такой эффект АБК обусловлен активацией сигнального пути с участием PPAR γ (рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом γ). Сходные результаты были получены при сокультивировании раковых клеток предстательной железы с остеобластами линии MC3T3-E1 для имитации микроокружения костного мозга при метастазировании и *in vivo* при введении этих опухолевых клеток внутрибрюшинно мышам.

Хотелось бы отметить, что при анализе количества АБК в операционном материале, полученном от пациентов с глиомой, было обнаружено, что уровень АБК в глиомах с низкой степенью злокачественности в 2 раза выше, чем в глиомах с высокой степенью злокачественности (Zhou et al., 2016). Авторы статьи полагают, что источником АБК в глиомах могут быть гранулоциты, моноциты или микроглия. Разницу в уровне АБК в тканях опухоли разной степени

злокачественности исследователи объясняют хроническим воспалением и, следовательно, активацией клеток иммунной системы, и возрастанием синтеза и секреции АБК в опухолях с низкой степенью злокачественности и истощением клеточных ресурсов и снижением уровня АБК в опухолях с высокой степенью злокачественности (Zhou et al., 2016).

3.3.1.2.2. АБК как потенциальный агент для предотвращения и лечения заболеваний

Функционирование АБК как эндогенного провоспалительного аутокринного цитокина открывает возможность для нового подхода по разработке противовоспалительных препаратов (Li et al., 2011b). Проведённые на сегодняшний день клинические исследования и эксперименты *in vivo* продемонстрировали эффективность использования АБК при сахарном диабете второго типа, воспалительном заболевании кишечника, атеросклерозе, системном склерозе, гепатите С, гриппе, малярии и других заболеваниях (Lievens et al., 2017).

АБК и нарушения метаболизма глюкозы

Исследования показали, что АБК как эндогенный гормон вовлечена в регуляцию гомеостаза глюкозы у млекопитающих, стимулируя секрецию инсулина и поглощение глюкозы (Bruzzone et al., 2015). Показано, что АБК стимулирует поглощение глюкозы клетками линий адипоцитов мышей и миобластов крысы, а также индуцирует активность бурого жира в адипоцитах *in vitro* и *in vivo*, стимулируя поглощение глюкозы бурой жировой тканью и побурение белой жировой ткани (Bruzzone et al., 2012c; Sturla et al., 2017; Magnone et al., 2020). Кроме того, при пероральном получении АБК у мышей и здоровых добровольцев наблюдалось снижение веса (Magnone et al., 2020). Интересно, что введение глюкозы перорально здоровым людям (в эксперименте участвовали несколько добровольцев) - т.е. создание гипергликемии - повышало концентрацию АБК в плазме крови от 2 до 9 раз (Bruzzone et al., 2012c).

Известно, что АБК секретируется β -клетками островков Лангерганса в ответ на стимуляцию не только глюкозой, но и GLP-1 (glucagon-like peptide 1) –

гастроинтестинальным гормоном, секретлируемым энтероэндокринными L-клетками (Bruzzone et al., 2015). Гормон GLP-1 стимулирует секрецию инсулина и блокирует секрецию глюкагона, участвуя в регуляции уровня глюкозы в крови. На L-клетках линии hNCI-H716 было показано, что АБК может стимулировать секрецию GLP-1. Введение АБК перорально крысам повышало уровень GLP-1 в плазме крови. Авторами исследования было сделано предположение о существовании прямой зависимости между АБК и GLP-1 в регуляции гомеостаза глюкозы (Bruzzone et al., 2015). На сегодняшний день при лечении диабета второго типа применяют препараты, блокирующие быстрое расщепление GLP-1, либо используют миметики этого пептида. Одним из альтернативных подходов к лечению этого заболевания является стимуляция секреции GLP-1 из энтероэндокринных L-клеток. Полученные данные дают основание полагать, что АБК и/или её аналоги можно рассматривать, как потенциальные противодиабетические препараты (Bruzzone et al., 2015).

Ещё одним аргументом в пользу эффективности АБК при лечении диабета является то, что её эффект сходен с тиазолидиндионами (эти вещества даже имеют структурное сходство с АБК) - классом противодиабетических препаратов, увеличивающих чувствительность к инсулину, но обладающих рядом серьёзных побочных эффектов, которые ограничивают их применение (Zocchi et al., 2017). При пероральном введении АБК в течение 5 недель мышам с дефицитом рецептора лептина, у животных значительно повышалась переносимость глюкозы, снижалась концентрация глюкозы в плазме крови, уменьшалось воспаление в жировой ткани: снижался уровень мРНК TNF- α и количество макрофагов, снижался средний размер адипоцитов, повышалась дифференцировка адипоцитов и адипогенез (Guri et al., 2007; Li et al., 2011b; Bruzzone et al., 2015). При этом побочных эффектов, характерных для тиазолидиндионов, обнаружено не было (Guri et al., 2007; Li et al., 2011b).

АБК, как и другие фитогормоны, содержится в продуктах растительного происхождения (Zocchi et al., 2017; Leber et al., 2020; Schiano et al., 2022). Поэтому несколькими группами авторов был проведён анализ влияния АБК, получаемой

с пищей, на здоровый организм млекопитающих. В исследовании одной группы авторов фруктовые экстракты, содержащие этот фитогормон, использовали для кормления крыс и питания людей (Magnone et al., 2015). После проведения тестов на «glucose tolerance» была отмечена более быстрая нормализация уровня глюкозы в крови, но при этом наблюдалось снижение уровня инсулина (инсулинемия), что противоречит результатам, полученным на клетках островков Лангерганса *in vitro* (Magnone et al., 2015). Исследователи называют две возможные причины таких противоречий в полученных данных: (1) стимуляция транспорта глюкозы в клетках, экспрессирующих транспортёр глюкозы GLUT-4 (glucose transporter type 4), с помощью АБК, может опережать по времени и/или превышать по степени стимуляцию высвобождения инсулина; (2) клетки, экспрессирующие GLUT-4, могут быть более чувствительны к действию АБК, чем β -клетки островков *in vivo* (Zocchi et al., 2017).

В эксперименте, проведённом другой группой авторов, было показано, что богатый АБК экстракт инжира ускорял нормализацию уровня глюкозы в крови и повышал чувствительность к инсулину в мышечных моделях диабета, вызванного ожирением или обусловленного генетически (Leber et al., 2020). Кроме того, этот экстракт снижал уровень системного воспаления, сопровождающего диабет. При этом АБК не повышала уровень инсулина в крови, что согласуется с данными предыдущей группы исследователей, однако стимулировала активность ферментов мышц, участвующих в метаболизме глюкозы, в частности гликогенсинтазы, гексокиназы 2 и GLUT-4. По-видимому, АБК снижает уровень глюкозы в крови в моделях диабета именно за счёт повышения метаболической активности мышц, но не уровня инсулина в крови. Показано, что АБК стимулирует инсулин-независимую утилизацию глюкозы мышцами через АМПК-опосредованный механизм, активируя киназу АМПК (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase), которая стимулирует поглощение глюкозы (Magnone et al., 2020). Полученные данные свидетельствуют об эффективности АБК в предотвращении и лечении диабета 2-го типа и метаболического синдрома (Derosa et al., 2020; Leber et al., 2020). Способность АБК снижать уровень глюкозы в крови без стимуляции

секреции инсулина делает этот фитогормон ещё более привлекательным для лечения диабета 2-го типа, так как лекарственные препараты, снижающие уровень глюкозы в крови за счёт стимуляции секреции инсулина, приводят в итоге к истощению и гибели β -клеток (Schiano et al., 2022).

Трёхмесячное рандомизированное контролируемое исследование, проведённое третьей группой авторов, подтвердило способность фруктов, богатых АБК, снижать уровень глюкозы в крови больных диабетом 2-го типа (Schiano et al., 2022). Шестьдесят один пациент в течение трёх месяцев получал таблетки из порошка, полученного из незрелых нектаринов. В результате у пациентов наблюдалось значительное снижение гликемии. Кроме того, в крови повышался уровень липопротеинов высокой плотности, возможно, из-за высокой концентрации полифенольных соединений в незрелых нектаринах, так как полифенолы стимулируют метаболизм холестерина.

Следует отметить, что АБК является многообещающим препаратом для лечения диабета не только 2-го, но и 1-го типа (Magnone et al., 2022). В мышинной модели диабета 1-го типа АБК на фоне введения низкой дозы инсулина повышала чувствительность к инсулину и утилизацию глюкозы по сравнению с действием инсулина в отсутствие АБК. Это свидетельствует о возможности снижения количества доз инсулина, необходимого для пациентов с диабетом 1-го типа, а также снижении риска гипогликемии.

Паракринная продукция АБК активированными гранулоцитами и моноцитами даёт основание полагать, что АБК может участвовать в регуляции метаболизма инсулина в условиях воспаления (Bruzzone et al., 2008). В связи с имеющимися данными, группой исследователей была разработана следующая гипотетическая схема участия АБК в регуляции метаболизма глюкозы в норме и при воспалении. У млекопитающих острый физический стресс может индуцировать гипергликемию (Zocchi et al., 2017). Гликемия, вызванная либо стрессом, либо поглощением глюкозы, может запускать секрецию АБК из β -клеток островков, что повышает секрецию инсулина и поглощение глюкозы жировой тканью и мышцами (рис. 2А) (Bruzzone et al., 2012c). Так как АБК также

секретируется активированными клетками воспаления и жировой тканью, паракринная и эндокринная АБК может стимулировать секрецию инсулина в условиях воспаления и/или ожирения. При остром воспалении АБК, секретлируемая клетками воспаления, может стимулировать секрецию инсулина, частично препятствуя цитокин-индуцированной невосприимчивости к инсулину (Bruzzone et al., 2012c). Однако в условиях хронического воспаления длительная секреция АБК может стать пагубной (рис. 2В), так как будет поддерживать воспаление, активируя клетки врождённого иммунитета, что может привести к развитию невосприимчивости к инсулину и сахарному диабету второго типа (Bruzzone et al., 2012c). Кроме того, длительная стимуляция β -клеток секретцией АБК из клеток воспаления и/или избыточной жировой ткани может привести к повышенной глюкозо-независимой секреции инсулина, в конце концов, ведущей к истощению β -клеток (Bruzzone et al., 2012c). Это может быть особенно актуально при низкоуровневом хроническом воспалении, ассоциированном с ожирением, которое имеет место при метаболическом синдроме – состоянии воспаления, поддерживаемом висцеральной жировой тканью, гипертонией, дислипидемией и/или невосприимчивостью к инсулину, что является основным фактором риска для развития сахарного диабета второго типа и сердечно-сосудистых заболеваний (Bruzzone et al., 2012c).

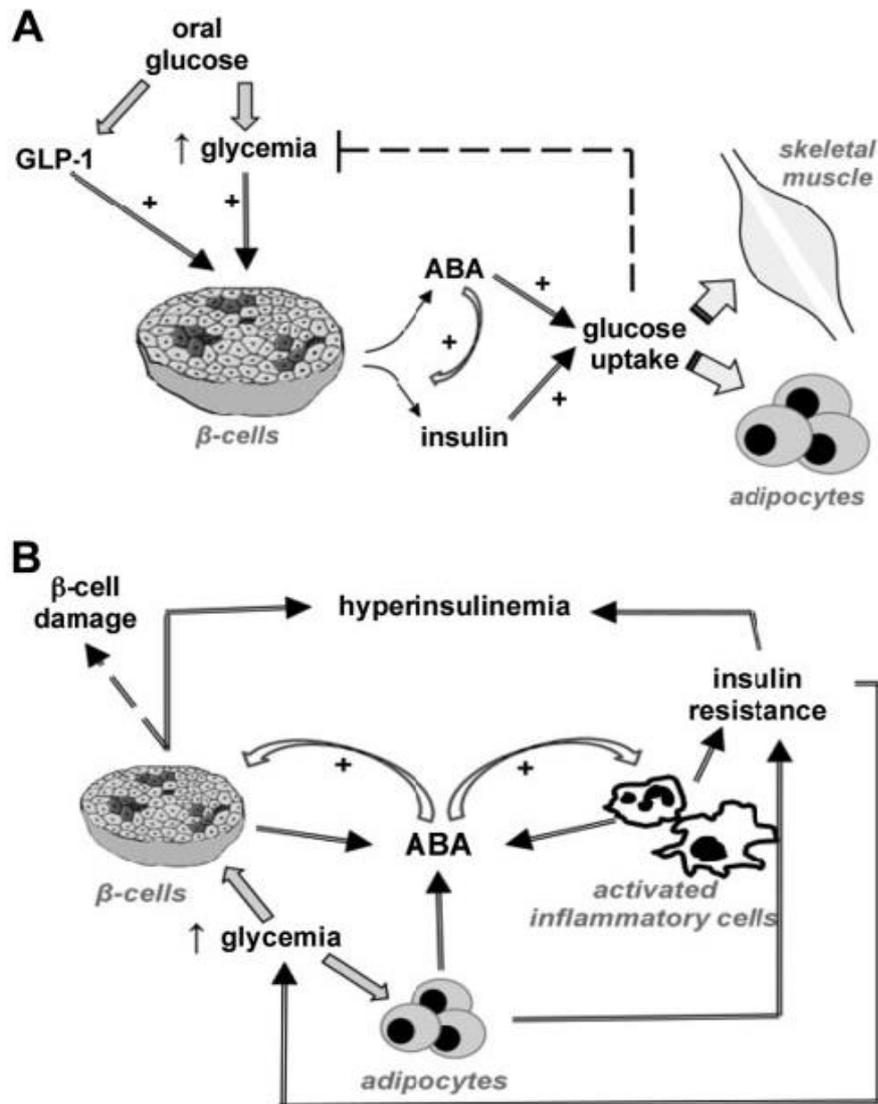


Рис. 2. Схема предполагаемой роли АБК в регуляции уровня глюкозы и при метаболическом синдроме (по Bruzzone et al., 2012c).

АБК и фиброз

Ещё одно хроническое воспалительное заболевание - системный склероз, приводящий к фиброзу кожи и внутренних органов (Bruzzone et al., 2012a). При этом заболевании происходит активация фибробластов, которые начинают бесконтрольно и избыточно откладывать внеклеточный матрикс, в основном коллаген I. Для таких фибробластов при культивировании *in vitro* характерна повышенная миграция, пониженная пролиферация и повышенное (почти в 10 раз) отложение коллагена по сравнению с нормальными фибробластами. Однако при воздействии АБК наблюдалась сравнительная нормализация функций

фибробластов, полученных от больных системным склерозом: снижалась их миграция и повышалась пролиферативная активность (Bruzzone et al., 2012a). Также значительно снижалось отложение коллагена на фоне возросшей активности матриксной металлопротеиназы-1 (ММР-1) и сниженного уровня экспрессии тканевого ингибитора металлопротеиназы TIMP-1, который гиперэкспрессируется в фибробластах больных системным склерозом, являясь одной из причин избыточного отложения коллагена. При этом АБК не оказывала влияния на такие же параметры у нормальных фибробластов – их миграционная и пролиферативная активность, а также отложение коллагена не менялось (Bruzzone et al., 2012a). Интересно, что для нормальных фибробластов АБК являлась хемоаттрактантом, стимулировавшим их миграцию по градиенту концентрации. Напротив, АБК-опосредованный хемотаксис не наблюдался у фибробластов, выделенных из тканей больных системным склерозом. При этом уровень АБК в плазме крови больных системным склерозом был значительно ниже, чем у здоровых людей. Авторы исследования полагают, что это может быть связано с гибелью β -клеток в поджелудочной железе больных (Bruzzone et al., 2012a). Все эти данные дают основание полагать, что АБК может быть использована в клинике для уменьшения фиброзных повреждений у больных системным склерозом.

Антифиброзное действие АБК было также продемонстрировано на модели фиброза печени у мышей (Chen et al., 2021). При введении АБК на 4-й неделе развития заболевания и анализе на 8-й неделе наблюдалось антиапоптотическое, противовоспалительное и антиоксидантное действие, а также снижался синтез коллагена I и α -SMA.

АБК и воспалительные заболевания

Противовоспалительное действие АБК было продемонстрировано на модели воспалительного заболевания кишечника (Guri et al., 2010). Так, например, АБК значительно снижала прогрессирование заболевания, колит, а также инфильтрацию ободочной кишки лейкоцитами. Авторы исследования полагают,

что противовоспалительный эффект АБК обусловлен регуляцией распределения Т-клеток и экспрессии молекул адгезии (Guri et al., 2010).

В связи с тем, что АБК является медиатором воспаления, данный фитогормон может быть потенциальной мишенью в терапии такого заболевания, как атеросклероз. Было показано, что инкубация моноцитов с экзогенной АБК приводила к увеличению экспрессии циклооксигеназы-2, продукции простагландина E₂ и стимуляции выхода MCP-1 и металлопротеазы-9 (Magnone et al., 2009). Тот факт, что все эти события вовлечены в процесс атерогенеза, а также присутствие АБК в артериальных бляшках в концентрации, в 10 раз превышающей норму, привели учёных к заключению, что АБК может рассматриваться как новая сигнальная молекула, участвующая в развитии атеросклероза, а значит, возможная новая мишень в лечении этого заболевания (Magnone et al., 2009). Однако на мышях с мутацией по аполипопротеину E (ApoE^{-/-}) другой группой учёных было показано, что АБК препятствует или снижает индуцированную атеросклерозом гипертонию, а также ингибирует воспаление, подавляя рекрутирование клеток иммунной системы в стенку корня аорты. У мышей, получавших АБК, площадь очага поражения была значительно меньше, чем у контрольных мышей (Guri et al., 2010).

Установлено, что АБК может преодолевать гемато-энцефалический барьер, поэтому, по мнению исследователей, это соединение может быть использовано при лечении воспалительных процессов нервной системы (Sánchez-Sarasúa et al., 2016). Согласно проведенным исследованиям, АБК является провоспалительным фактором, вызывающим аутокринную активацию микроглии (Bodrato et al., 2009). Однако при моделировании нейровоспаления на крысах, содержащихся на диете с высоким содержанием жиров, оказалось, что АБК снижает активацию микроглии и уровень TNF-α в гипоталамусе у таких крыс, а также нейтрализует вызванные диетой когнитивные расстройства (Sánchez-Sarasúa et al., 2016). Более того, АБК оказывает противовоспалительное действие, восстанавливает нейрогенез и чувствительность к инсулину в гиппокампе таких крыс (Ribes-Navarro et al., 2019).

АБК и патологии нервной системы

Исследования показали, что у млекопитающих АБК подавляет нарушение когнитивных функций, вызванных различными заболеваниями, если воздействовать этим фитогормоном, начиная с первых дней моделирования заболевания. В частности, АБК подавляла отложение амилоида β и воспаление нервной ткани при моделировании болезни Альцгеймера, улучшая память у мышей (Jeon et al., 2020). АБК также препятствовала развитию нарушений памяти и пространственного обучения при моделировании болезни Альцгеймера и диабета у крыс (Khorasani et al., 2019; Kooshki et al., 2021). Помимо этого, АБК подавляла когнитивные и двигательные нарушения в модели эссенциального тремора у крыс (медленно прогрессирующее неврологическое заболевание, сопровождающееся непроизвольным дрожанием конечностей тела) (Shabani and Naderi, 2022).

Стоит отметить, что АБК улучшает пространственную память и обучение у крыс и мышей не только при нарушениях в центральной нервной системе, но и у здоровых животных (Qi et al., 2015; Naderi et al., 2017; Liu et al., 2018). По-видимому, такой эффект обусловлен тем, что АБК стимулирует формирование и созревание дендритных шипиков у пирамидальных нейронов гиппокампа, регулируя таким образом синаптогенез через сигнальный путь, опосредуемый киназой NDR1/2 (nuclear dbf2-related) (Liu et al., 2018). Также в про-когнитивном действии АБК предполагается участие сигнального пути PI3K/PKC (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase C) (Naderi et al., 2017). Кроме того, АБК оказывала успокаивающее действие при проведении теста на тревожность у крыс, предположительно, тоже при участии сигнального пути PI3K/PKC.

Помимо про-когнитивного и противовоспалительного действия АБК на нервную систему, обнаружено обезболивающее действие АБК при моделировании невропатической боли у крыс (Pizzio, 2022).

АБК и тромбоцитопоз

АБК обладает не только противовоспалительным действием. Как показало исследование Malara и соавторов, данный фитогормон является фактором

выживания мегакариоцитов, действующим независимо от тромбопоэтина - основного фактора тромбопоэза в костном мозге, играющего центральную роль в выживании и пролиферации кроветворных стволовых клеток (Malara et al., 2017). В условиях стресса, индуцированного изъятием из среды культивирования рекомбинантного тромбопоэтина (rТро) и сыворотки, АБК стимулировала выживание мегакариоцитов, а также повышала продукцию тромбоцитов. Таким образом, АБК действовала как агонист тромбопоэтина (Malara et al., 2017). Возможно, это обусловлено способностью АБК активировать в мегакариоцитах те же биохимические пути, которые в норме регулируются тромбопоэтином. При этом, по данным авторов, в стандартных условиях культивирования, при ежедневном добавлении в течение 14 дней, АБК не оказывала влияния на дифференцировку из кроветворных предшественников мегакариоцитов мыши и человека, на созревание мегакариоцитов, а также на формирование тромбоцитов. Однако недавно другая группа исследователей показала, что АБК стимулирует дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (иПСК) в мегакариоциты и образование тромбоцитов в присутствии тромбопоэтина при ежедневном добавлении АБК в течение 14 дней (Huang et al., 2021). Противоречие в данных о влиянии АБК на тромбоцитопоэз может быть связано с различиями в источнике предшественников мегакариоцитов: в исследовании Malara и соавторов таким источником являются не иПСК, а кроветворные стволовые клетки (Malara et al., 2017). Тем не менее, полученные данные обеих групп исследователей могут быть использованы для борьбы с тромбоцитопенией, которая характеризуется гибелью мегакариоцитов и может быть вызвана химиотерапевтическими агентами, аутоантителами и вирусами (Malara et al., 2017).

3.3.1.3. Сигнальный путь АБК

Сигнальный путь, опосредующий действие АБК на клетки животных, имеет большое сходство с сигнальным путём, известным для растений. Он включает в себя связывание АБК на плазматической мембране, активацию АДФ-рибозил

циклазы (ADPRC), гиперпродукцию универсального кальциевого мобилизатора циклической АДФ-рибозы (сADPR) и возрастание внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$). Поэтому АБК можно считать универсальной сигнальной молекулой (Li et al., 2011b). Однако рецепторы для АБК у клеток животных и растений отличаются (Li et al., 2011b). Самый хорошо изученный рецептор для АБК у животных – это мембранный белок LANCL2 (lanthionine synthetase C-like protein 2), расположенный на внутренней стороне плазматической мембраны и связанный с ней миристоилированием (Sturla et al., 2011; Vigliarolo et al., 2015; Lievens et al., 2017; Leber et al., 2020). LANCL2 имеет высоко аффинный сайт связывания с АБК (Cichero et al., 2018). Связывание и функционирование АБК напрямую зависит от LANCL2 и/или ядерного рецептора PPAR γ (Li et al., 2011b; Khorasani et al., 2019; Kooshki et al., 2021). Демиристоилирование LANCL2 химически или генетически запускает его ядерную транслокацию (Fresia et al., 2016).

Согласно последним данным, противовоспалительное действие АБК осуществляется через ось LANCL2-PPAR γ , а провоспалительное - через пертуссин токсин (PTX) - чувствительный G-белок-рецепторный комплекс GPCR (G-protein coupled receptor) (Lievens et al., 2017), хотя при моделировании болезни Альцгеймера АБК осуществляла своё противовоспалительное действие через сигнальный каскад LANCL2, но не PPAR γ (Jeon et al., 2020). Авторы исследования полагают, что LANCL2 может быть мишенью для лекарств, особенно для лечения воспалительного заболевания кишечника. Интересно, что АБК усугубляла воспаление в моделях воспалительного заболевания кишечника, если PPAR γ отсутствовал. Это ещё раз подтверждает, что АБК играет двойную роль и её действие может быть как провоспалительным, так и противовоспалительным (Lievens et al., 2017).

Является ли LANCL2 основным рецептором для АБК у человека, пока до конца неясно (Lievens et al., 2017). Так белки-шапероны семейства белков теплового шока 70, в том числе GRP78 и HSP70-2, тоже являются АБК-связывающими белками (Kharenko et al., 2013; Malara et al., 2017; Huang et al., 2021). Шаперон GRP78 считается ключевым маркёром и участником UPR, запускаемого

при стрессе ЭПР (Malara et al., 2017). Предполагается, что эффект АБК на мегакариоциты обусловлен её связыванием как с LANCL2, так и с HSP70 (GRP78) (Lievens et al., 2017, Huang et al., 2021). Кроме того, недавно было обнаружено, что гомолог LANCL2 – LANCL1 – также является рецептором АБК в клетках животных и стимулирует утилизацию глюкозы в миообластах крысы линии L6 через AMPK-опосредованный сигнальный путь (Spinelli et al., 2021; Magnone et al., 2022). При нокауте LANCL2 в мышечных клетках мышей спонтанно повышалась экспрессия LANCL1 и в ответ на введение АБК активировался AMPK-опосредованный механизм утилизации глюкозы (Spinelli et al., 2021). При этом система АБК - LANCL1/2 регулирует в миоцитах не только поглощение и окисление глюкозы, но и ключевые функции митохондрий – биогенез, митохондриальное дыхание и градиент протонов, транскрипцию разобщающих белков (uncoupling proteins) и сарколипина (Spinelli et al., 2023). АБК - LANCL1/2 через AMPK-опосредованный сигнальный путь также контролирует термогенез бурых и “бежевых” адипоцитов человека, стимулируя в них энергетический метаболизм (поглощение и окисление глюкозы), функционирование митохондрий (биогенез митохондрий, митохондриальное дыхание и градиент протонов) и термогенез (экспрессию рецепторов гормонов, активирующих побурение белого жира, и генов, активирующих побурение).

Исследования показали, что АБК участвует в ингибировании рецептора горького вкуса, который влияет на микробиом кишечника и реакцию на глюкозу (Pydi et al., 2015; Lievens et al., 2017). Эти данные могли бы послужить объяснением многих физиологических эффектов АБК, особенно её защитных свойствах при колите и диабете. Синтезируемая микроорганизмами АБК может быть важным сигналом между микробиомом кишечника и хозяином, так как микробиом кишечника продуцирует многие комплексные метаболиты (Lievens et al., 2017). Влияние АБК, синтезируемой микроорганизмами, на организм хозяина хорошо известно для растений (Chanclud and Lacombe, 2017). Существует ли подобное явление у животных – вопрос интересный и важный, но пока неизученный (Chanclud and Lacombe, 2017). Показано, что некоторые бактерии, найденные

в кишечнике у животных (например, *Escherichia coli*), при культивировании *in vitro* могут на низком уровне продуцировать АБК, однако пока нет сведений о том, присутствует ли АБК во внутреннем кишечном метаболоме и коррелирует ли её присутствие с различными физиологическими состояниями хозяина (Lievens et al., 2017).

В связи с тем, что рецептор LANCL2 расположен на внутренней стороне плазматической мембраны, возникает вопрос, каким образом АБК проникает в клетку, чтобы взаимодействовать со своим рецептором. Исследования показали, что транспорт АБК в клетки человека осуществляется через анионные переносчики AE (Vigliarolo et al., 2015; Vigliarolo et al., 2016). Известные на сегодняшний день АБК-опосредованные сигнальные пути представлены на рисунке 3. Следует отметить, что до сих пор неизвестно, в каких компартментах клеток животных синтезируется АБК (у растений, как известно, синтез начинается в пластидах). Созданный недавно флуоресцентный аналог АБК – АБК, конъюгированный с флуорофором нитробензоксадиазолом через этаноламиновый линкер (Gonzalez et al., 2020) – может помочь в решении этого вопроса.

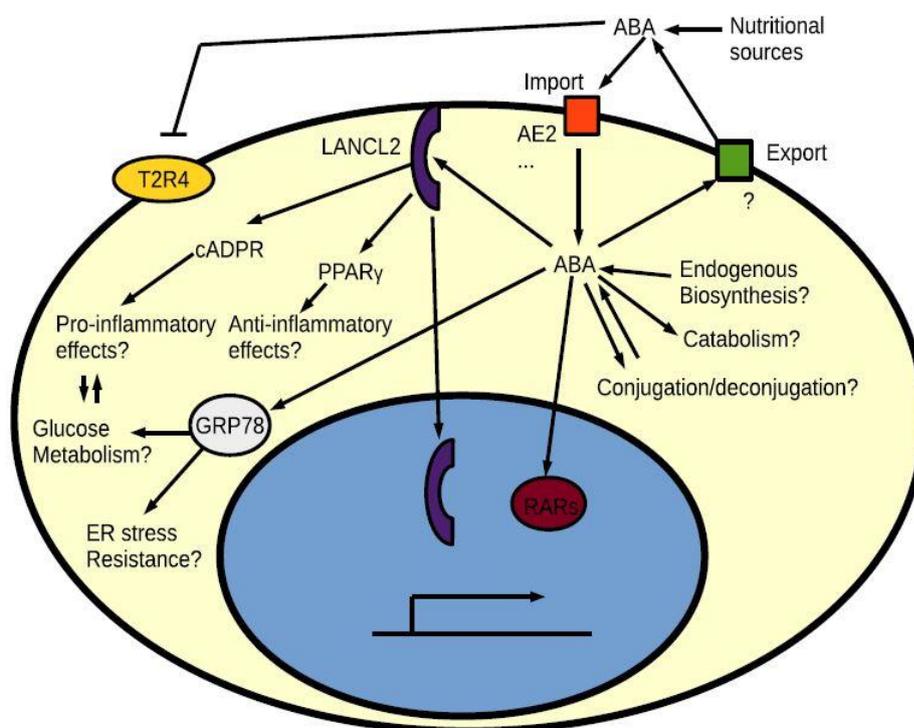


Рис. 3. Предполагаемые сигнальные пути АБК в клетках животных (по Lievens et al., 2017).

3.3.2. Гиббереллиновая кислота

Анализ литературы показал, что данных о том, оказывает ли влияние ГК на клетки животных, очень мало, и они носят противоречивый характер. Существует две противоположные точки зрения. Согласно первой, ГК оказывает генотоксический и цитотоксический эффект на клетки животных, а также обладает провоспалительным действием. Согласно второй точке зрения, ГК относится к противовоспалительным агентам. Причиной таких противоречий может быть как выбор модели исследования, так и условия эксперимента. Кроме того, возможно двойное действие ГК, как это наблюдается в случае АБК. Воздействие ГК на клетки животных изучено недостаточно и требует более пристального внимания.

3.3.2.1. ГК как токсин и канцероген

Генотоксическое и цитотоксическое действие ГК описано, в основном, в экспериментах *in vivo*. В качестве объектов исследования чаще всего использовались крысы и мыши, однако некоторые эксперименты проводились на кроликах, жабах, а также цыплятах (el-Mofty and Sakr, 1988; Abdelhamid et al., 1994; Abdou et al., 2016). Оказалось, что ГК оказывает негативное воздействие на многие органы млекопитающих: было отмечено нефротоксическое, нейротоксическое и гепатотоксическое действие (Amer and Hussien, 2010; Soliman et al., 2010; Troudi et al., 2010; Hussein et al., 2011; Abou-zeid and Abd-Ellah, 2015; Tawfik, 2015; Abdou et al., 2016; Alsemeh et al., 2019; Soliman et al., 2021a; Ali et al., 2022; Khadrawy et al., 2023). Патологические изменения наблюдались в поджелудочной и щитовидной железах, также была обнаружена деминерализация костей (Troudi et al., 2011a, b; Abd-El- Aty and Masoud, 2016). При воздействии ГК на беременных самок крыс гепатотоксический, нефротоксический и нейротоксический эффекты ГК проявлялись и у их потомства (Ali et al, 2018; Alsemeh et al., 2019; Abu Amra et al., 2020). У крыс, получавших ГК с момента прекращения грудного вскармливания до полового созревания, наблюдалось нарушение развития фолликулов яичника (Guo et al., 2019). Кроме того, были описаны дегенеративные изменения в репродуктивной системе самцов,

приводившие к снижению качества спермы (Hosseinchí et al., 2013; Abdou et al., 2016; Khalaf et al., 2019; Soliman et al., 2021b). Токсическое действие ГК часто сопровождалось индукцией окислительного стресса, который характеризовался стимуляцией перекисного окисления липидов. В частности, в тканях повышалось содержание малонового диальдегида и снижалась антиоксидантная защита (Celik et al., 2007; Muthuraman and Srikumar, 2009; Amer and Hussien, 2010; Hussein et al., 2011; El-Sayyad et al., 2015; Abd-El- Aty and Masoud, 2016; Alsemeh et al., 2019; Khalaf et al., 2019; Soliman et al., 2021b; Khadrawy et al., 2023). Кроме того, наблюдались многочисленные повреждения ДНК и хромосомные aberrации, в том числе в лимфоцитах человека *in vitro* (El-Sayyad et al., 2015; Abdou et al., 2016). Также было показано, что ГК может индуцировать или усугублять воспалительные или аллергические заболевания, в частности, увеличивая количество тучных клеток и стимулируя их активацию (Erin et al., 2008; Hussein et al., 2011).

Кроме того, была обнаружена канцерогенная активность ГК, что проявлялось в образовании гепатоцеллюлярных карцином с развитием вторичных метастаз в почках и яичниках у египетских жаб *Bufo regularis*; сальных аденом кожи подмышечной области, аденокарцином молочной железы со вторичными метастазами в лёгкие, а также аденокарцином лёгких у швейцарских мышей альбиносов (el-Mofty et al., 1994).

3.3.2.2. Другие эффекты ГК и её производных

Нашей научной группой было показано, что ГК запускает стресс ЭПР (UPR) и активирует дифференцировку в клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 (Vildanova et al., 2021). При действии ГК наблюдалось повышение уровня экспрессии маркеров UPR *GRP78*, *ATF4*, *sXBP1* и *CHOP*. Кроме того, повышался уровень синтеза маркеров дифференцировки кератиноцитов – инволюкрина и филаггрина, а также маркера аутофагии белка LC3B-II (light chain 3B). По-видимому, ГК стимулирует дифференцировку клеток эпидермоидной карциномы через активацию аутофагии. Следует отметить, что ГК также активировала UPR и повышала уровень синтеза маркеров дифференцировки

в иммортализованных кератиноцитах человека линии HaCaT, однако влияние ГК на дифференцировку иммортализованных кератиноцитов было менее выражено, чем на опухолевые клетки, что может быть связано с изначальным более низким дифференцировочным статусом последних (Vildanova et al., 2021).

Высокая противоопухолевая и антиангиогенная активность как *in vitro*, так и *in vivo* была показана для синтетических производных ГК (Chen et al., 2009; Zhang et al., 2012; Cheng et al., 2020; Luo et al., 2022). Кроме того, было обнаружено антиоксидантное действие производных природного происхождения ГК₄ и ГК₇ по отношению к пероксильным радикалам (ROO●) (Nani et al., 2022).

К числу других эффектов ГК можно отнести стимуляцию продукции яиц самками перепелов, а также влияние на репродуктивные характеристики этих птиц (El-Sebai et al., 2003).

Интересные результаты были получены на МСК, выделенных из жирового тела Биша человека, расположенного в области щеки (Kasamatsu et al., 2012). При воздействии ГК в этих клетках повышалась экспрессия α -амилазы. При этом, как отмечают авторы исследования, ГК не оказывала воздействия ни на морфологию, ни на жизнеспособность МСК (Kasamatsu et al., 2012).

Большой интерес представляет исследование Reihill и соавторов, посвящённое противовоспалительному эффекту ГК на клетки человека (Reihill et al., 2016). В этом исследовании первичная культура назальных клеток и иммортализованная линия 16HBE14o (эпителиальные клетки бронхов) инкубировались с ГК, а затем с липополисахаридами бактерий. Оказалось, что предварительная инкубация с ГК снижала воспалительный иммунный ответ этих клеток (Reihill et al., 2016). Противовоспалительное действие ГК было обусловлено связыванием с белком A20 (TNFAIP3 (TNF- α -induced protein 3)), являющимся важным белком иммунного ответа у млекопитающих, а также регулятором ответов на стресс у растений (Reihill et al., 2016). В клетках животных его активность необходима для своевременного завершения воспалительного ответа, опосредованного NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells), за счёт снижения экспрессии последнего и редукции деградации I κ B α

(NF-κB inhibitor). Оказалось, что этот механизм задействован и при воздействии ГК. При этом никакого цитотоксического эффекта на клетки или повышения их пролиферации обнаружено не было (Reihill et al., 2016). Данное открытие может быть перспективным при разработке противовоспалительных лекарственных средств, однако в силу ограничений, обусловленных модельными объектами, необходимо проведение исследований противовоспалительных эффектов ГК на первичных культурах, полученных от пациентов с хроническими заболеваниями дыхательных путей. Стоит отметить, что несколько препаратов на основе гиббереллинов запатентованы как средство лечения диабета, псориаза и простатита, однако в клинике в качестве противовоспалительных препаратов гиббереллины пока не применяются (Reihill et al., 2016).

3.4. Заключение

Нарушение регуляции секреторно-синтетической активности, вызванное изменением дифференцировочного статуса фибробластов и миофибробластов или изменением их количества, может приводить к опасным для здоровья и жизни патологиям, в частности, развитию фиброза и снижению регенеративного потенциала. Для дифференцировки фибробластов в миофибробласты необходима активация UPR, поэтому разработка новых подходов, способных нормализовать секреторную активность клеток и оказывать влияние на уровень их дифференцировки за счёт воздействия на молекулярные компоненты UPR, может оказаться перспективным направлением для решения проблем, связанных с терапией фиброза и хронических ран. Исследования показали, что фитогормоны АБК и ГК способны влиять на секреторно-синтетическую активность клеток разного тканевого происхождения, а ГК также способна активировать UPR и дифференцировку. Это даёт основание полагать, что АБК и/или ГК могут стать агентами коррекции секреторно-синтетической активности и дифференцировочного статуса фибробластов. В связи с этим целью настоящей работы является исследование влияния растительных гормонов АБК и ГК

на секреторно-синтетическую активность и признаки дифференцировки культивируемых дермальных фибробластов человека в миофибробласты.

4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

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.

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.

Турищева Е. П., Ашников 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.

4.1. Культивирование дермальных фибробластов человека

В работе были использованы дермальные фибробласты человека, предоставленные В.Ю. Сысоевой (факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова) и Е.Р. Андреевой (ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН), и дермальные фибробласты человека линии HdFb (d75), полученные из Уникальной научной установки «Коллекция клеточных культур» Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Клетки культивировали в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки телёнка (FBS; «HyClone», США), 2 mM L-глутамина («ПанЭко») и коммерческой смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (5 мл смеси на 450 мл среды) («ПанЭко») в стандартных условиях (37 °C, 5% CO₂). Клетки пассировали смесью растворов трипсина («ПанЭко») и Версена («ПанЭко») в соотношении 3/7. При проведении экспериментов клетки 5–8 пассажей высаживали в чашки Петри (d = 60 мм; «SPL Lifesciences», Корея) и 24-луночные планшеты («Corning», США) в концентрации 50 000 клеток/мл или в чашки Петри (d = 35 мм; «SPL Lifesciences», Корея) с покровными стёклами в концентрации 40 000 клеток/мл и культивировали в течение 24 часов. Затем в культуральную среду добавляли стоковые спиртовые растворы АБК (189 mM) и ГК (500 mM) («Merck», США) до конечной концентрации 1, 2 или 4 mM или заменяли культуральную среду на свежую среду, содержащую 2 mM ДТТ («PanReasAppliChem», Германия). Время культивирования с фитогормонами составляло 24, 48, 72, 96 часов или 7 суток. Время культивирования с ДТТ

составляло 24 часа. Клетки достигали конфлюэнтного монослоя через 5–6 суток после посадки. Для контрольных точек вместо фитогормонов в культуральную среду добавляли соответствующий объём 96%-ного этилового спирта, а в качестве контроля для ДТТ использовали свежую среду без ДТТ.

4.2. Оценка метаболической активности клеток

Фибробласты высаживали в 24-луночные планшеты и после добавления фитогормонов культивировали в течение 24, 48, 72 или 96 часов. Затем в каждую лунку добавляли стоковый раствор МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид, 98%) («ПанЭко»), разведённый культуральной средой, до конечной концентрации 0,25 мг/мл и культивировали 1 час при 37°C. После этого из каждой лунки отбирали среду и добавляли по 240 мкл ДМСО («ПанЭко») на 15 минут для растворения гранул образовавшегося формазана. Оптическую плотность полученного раствора определяли на спектрофотометре Униплан («Пикон», Россия) при длине волны 530 нм.

4.3. Количественная ПЦР в реальном времени

ПЦР (полимеразная цепная реакция) проводили по описанной ранее схеме (Vildanova et al., 2021), используя праймеры («Синтол», Россия) к генам *GRP78*, *ATF4*, *CHOP*, *HPRT* (гипоксантин фосфорибозилтрансфераза), *GAPDH* (глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа) и *YWHAZ* (белок zeta (ζ) активации тирозин 3-монооксигеназы/триптофан 5-монооксигеназы), а также к сплайсированной форме мРНК *XBP1* (*sXBP1*). Последовательности используемых праймеров указаны в таблице. *HPRT*, *GAPDH* и *YWHAZ* использовали в качестве референсных генов. Выделение РНК проводили с помощью набора RNeasy Mini Kit («Qiagen», США), для проведения обратной транскрипции использовали набор RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific», США), ПЦР проводили с помощью набора «ПЦР-Комплект (R-402)» («Синтол»). ПЦР для каждого образца проводили в трёх технических повторах. Результаты ПЦР анализировали по методике Vandesompele et al. (Vandesompele et al., 2002).

Таблица. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Последовательность праймеров (5'→3')	
	прямой	обратный
<i>GRP78</i>	TCTGCTTGATGTGTGTCCTCTT	GTCGTTACACCTTCGTAGACCT
<i>ATF4</i>	TGGCTGGCTGTGGATGG	TCCCGGAGAAGGCATCCT
<i>CHOP</i>	AGTCTAAGGCACTGAGCGTATC	TCTGTTTCCGTTTCCTGGTT
<i>sXBP1</i>	GCTGAGTCCGCAGCAGGT	CAGGGTCCAACCTGAACAGAAT
<i>HPRT</i>	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
<i>GAPDH</i>	TGCACCACAACCTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
<i>YWHAZ</i>	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	CCGCCAGGACAAACCAGTAT

4.4. 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», Германия) и программным обеспечением Zeiss ZEN 3.3 (blue edition) («Microscope Software», Германия).

Для **прижизненного выявления** ЭПР использовали краситель ER-Tracker Red (BODIPY™ TR Glibenclamide, «Thermo Fisher Scientific»). Концентрация стокового раствора, разведённого в ДМСО, составляла 1 мМ. Краситель добавляли в среду культивирования в чашки Петри, в которых находились стёкла с клетками, на 30 минут при 37°C из расчёта 1 мкл на 1 мл среды. Препараты, окрашенные ER-Tracker Red, отмывали средой 5 минут при 37°C и помещали в камеру для прижизненных наблюдений.

Для **иммуноцитохимического выявления** белков покровные стёкла с клетками фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида («MP Biochemical», Франция), разведённым в PBS (pH 7.4, «ПанЭко») в течение 20 минут, затем отмывали фиксатор с помощью PBS 3 раза по 5 минут и пермеабелизировали клеточные мембраны с помощью 0,5%-ного раствора

детергента Triton X-100 («Serva», Германия) в течение 10 минут. Далее образцы отмывали от детергента с помощью PBS 3 раза по 5 минут и инкубировали с разведёнными в PBS первичными мышинными моноклональными антителами к белку аппарата Гольджи GM130 (белок матрикса Гольджи 130) (разведение 1:300), белку аппарата Гольджи 58K (разведение 1:50), маркеру миофибробластов α -SMA (разведение 1:100), маркеру фокальных контактов винкулину (разведение 1:100) (все - «Merck») и к С-концевому пептиду проколлагена I («Takara Bio Inc.», Япония) (разведение 1:100); кроличьими моноклональными антителами к фибронектину («Abcam», Великобритания) (разведение 1:250) или с кроличьими поликлональными антителами к тубулину (разведение 1:100), предоставленными профессором Э. Байером (Университет штата Орегон, США), в течение 30 минут во влажной камере при температуре 37 °С. Далее образцы отмывали от первичных антител PBS 3 раза по 5 минут и инкубировали в аналогичных условиях с вторичными моноклональными антителами козы к IgG мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 488 («Thermo Fisher Scientific») (разведение 1:400), или моноклональными антителами осла к IgG кролика, конъюгированными с Alexa Fluor 568 («Thermo Fisher Scientific») (разведение 1:400). Затем препараты отмывали от вторичных антител PBS 3 раза по 5 минут, визуализировали ядра с помощью DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола) («Merck») (конечная концентрация 0,1 мкг/мл) и заключали в Mowiol («Hoechst», Германия).

Для цитохимического выявления полимеризованного F-актина использовали меченый TRITC фаллоидин («Merck»). Концентрация стокового раствора, разведённого на метаноле, составляла 1 мг/мл, концентрация рабочего раствора, разведённого на PBS, - 0,005 мг/мл. После фиксации 4%-ным раствором параформальдегида клетки инкубировали с красителем во влажной камере в течение 45 минут при 37°С. Затем препараты трижды промывали PBS по 5 минут, визуализировали ядра с помощью DAPI и заключали в Mowiol.

4.5. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)

Клетки промывали средой без сыворотки и фиксировали на стёклах 2,5%-ным глутаровым альдегидом («Ted Pella Inc.», США) с добавлением 2% формалина на 0,1 М PBS в течение 1 часа. Затем клетки промывали PBS в течение 15 минут и проводили дофиксацию в 1%-ном OsO₄ («Serva») 1 час в темноте. Обезвоживание и заключение в Эпон 812 («Fluka Chemicals/Merck», США) проводили по стандартной методике: стёкла с клетками последовательно помещали в 50%-ный этиловый спирт (+4°C в темноте) до прекращения потемнения последнего, в 60%-ный спирт 2 раза по 20 мин (при +4°C), в 70%-ный спирт с 1,5% уранилацетатом на ночь (+4°C), в 80%-ный спирт на 15 мин (+4°C), в 96%-ный спирт на 15 мин (при комнатной температуре), в 96%-ный спирт 3 раза по 30 мин, в ацетон («Реахим», Россия) 3 раза по 30 мин, в смесь ацетон–эпон 3:1 на полтора часа, смесь ацетон–эпон 1:1 на полтора часа, ацетон–эпон 1:3 на ночь и в эпон на полтора часа. Полимеризацию проводили в течение 24 часов при 37°C и 48 часов при 60°C. Ультратонкие срезы (толщиной 60 нм) залитых в Эпон образцов контрастировали 1,5%-ным раствором уранилацетата в течение 15 минут и цитратом свинца по Рейнольдсу 15 минут. Срезы исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1011 («JEOL», Япония) (ускоряющее напряжение 80-100 кВ) с цифровой фотокамерой GATAN ES500W, работающей под управлением программы Digital Micrograph фирмы GATAN.

4.6. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Покровные стёкла с клетками промывали PBS 5 минут и затем фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида в течение 1 часа. Затем клетки на стёклах отмывали от фиксатора с помощью PBS 3 раза по 5 минут и обезвоживали в холодном (+4°C) этаноле возрастающей концентрации (от 40%-ного до 96%-ного с шагом в 10%, 2 смены каждой концентрации по 10 минут). Далее образцы проводили по смесям ацетона с этанолом с последовательно возрастающей концентрацией ацетона (1:3, 1:1, 3:1; 3 смены каждой смеси по 5 минут). Затем образцы помещали в чистый ацетон на 1 час и высушивали в критической точке.

Высушенные образцы покрывали 1–2 нм Au-Pd плёнкой. Образцы анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (ускоряющее напряжение 20 кВ; SEI mode, «JEOL», Япония).

4.7. Проточная цитофлуориметрия

Для анализа клеточного цикла клетки снимали с поверхности чашек Петри смесью растворов трипсина и Версена, отмывали от среды культивирования фосфатно-солевым буферным раствором PBS, дважды центрифугируя клеточную суспензию в течение 3 минут при 3 000 об./мин, и фиксировали ледяным 70%-ным этанолом в течение ночи при +4°C. Затем образцы отмывали от фиксатора PBS, дважды центрифугируя клеточную суспензию в течение 5 минут при 3 000 об./мин, и окрашивали раствором йодида пропидия (PI; «Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe», Германия) на PBS (в конечной концентрации PI 30 мкг/мл), содержащим РНКазу А (в конечной концентрации 10 мкг/мл) в течение ночи в темноте при комнатной температуре. Далее образцы отмывали от красителя PBS, дважды центрифугируя клеточную суспензию в течение 5 минут при 3 000 об./мин, и анализировали на проточном сортере FACSAria («Beckton Dickinson», США).

4.8. Иммуноферментный анализ (ИФА)

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

4.9. Вестерн-блоттинг

Клетки лизировали в однократном лизирующем буфере, содержащем 150 мМ NaCl («ПанЭко»), 0,1% Triton X-100, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% додецилсульфат натрия, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и коктейль ингибиторов протеаз (все составляющие – «Merck»). Затем в лизат добавляли буфер Лэммли («Bio-Rad»,

США), содержащий β -меркаптоэтанол («Merck»), инкубировали лизат при 65°C в течение 5 минут и дополнительно денатурировали в течение 2 минут при –20°C. Белки разделяли с помощью вертикального электрофореза, используя 8%-ные или 10%-ные полиакриламидные гели. Полусухой перенос белков на ПВДФ-мембрану (поливинилидендифторид-мембрану) («Bio-Rad») осуществляли с помощью Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini LF PVDF TransferKit («Bio-Rad Laboratories», США). Затем ПВДФ-мембрану инкубировали в 5%-ном обезжиренном молоке, разведённом Tris-буфером (TBS) («Bio-Rad»), содержащим 0,1% Tween («Bio-Rad»), в течение 30 минут при комнатной температуре. Далее мембрану инкубировали с первичными мышинными антителами к GAPDH (разведение 1:1000) («Хайтест», Россия) и проколлагену I (разведение 1:1000) («Abcam»), кроличьими антителами к фибронектину (разведение 1:1000) и α -SMA (разведение 1:1000) (все - «Abcam») в течение ночи при +4°C и затем со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена («Bio-Rad») (разведение 1:2000), 1 час при комнатной температуре. Для выявления белков использовали Novex™ ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit («Thermo Fisher Scientific») и систему визуализации ChemiDoc™ («Bio-Rad»). Оптическую плотность белковых полос определяли с помощью ImageLab Software («Bio-Rad»). Полученные значения для целевых белков нормировали на GAPDH.

4.10. Колориметрический полуколичественный анализ общей продукции коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса

Дермальные фибробласты высаживали в 24-луночные планшеты («Corning») и после добавления фитогормонов культивировали в течение 7 суток. Следует отметить, что схемы экспериментов с длительным (8 суток и более) культивированием клеток, продуцирующих внеклеточный матрикс, являются общепринятыми (Матвеева и др., 2019; Basalova et al., 2020; Zhivodernikov et al., 2020; Grigorieva et al., 2021; Yang et al., 2022). Далее клетки промывали тёплым PBS, фиксировали насыщенным раствором пикриновой кислоты («Merck») в течение 30 минут, промывали дистиллированной водой и окрашивали 0,1%-ным Sirius Red F3BA («Merck») или 0,1%-ным Fast Green FCF («Merck») в течение 30 минут

при комнатной температуре на ротационном шейкере для выявления коллагеновых и неколлагеновых белков соответственно. Для приготовления 0,1%-ных растворов красителей сухие Sirius Red и Fast Green растворяли в насыщенной пикриновой кислоте. 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%-ным Crystal Violet («Merck»), разведённом на абсолютном метаноле, в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем краситель отмывали дистиллированной водой, и клетки фотографировали на микроскопе Eclipse Ti-U (объектив Nikon Plan Fluor 10×/0.30). Далее связавшийся краситель растворяли в 96%-ном этаноле, и оптическую плотность полученного элюата анализировали с помощью микропланшетного ридера Microplate Reader PR2100 при 550 нм.

4.11. Обработка изображений и статистический анализ

Полученные изображения анализировали с помощью программы Fiji (National Institutes of Health, США). Площадь расплывания клеток оценивали путём измерения площади клетки, ограниченной клеточным контуром.

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 $p < 0,05$.

5. РЕЗУЛЬТАТЫ

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

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.

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.

Турищева Е. П., Ашников 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.

Были также использованы тезисы докладов (см. раздел 9.2).

5.1. Оценка метаболической активности культивируемых дермальных фибробластов

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 (рис. 4). Диапазон концентраций и времени воздействия был выбран на основании предыдущих исследований, показавших, что в миллимолярных концентрациях и временном диапазоне до 7 дней ГК не оказывает токсического действия на мезенхимные стромальные клетки и нормальные и опухолевые клетки эпидермоидного происхождения, но при этом влияет на их биосинтетическую активность и дифференцировочный статус (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: небольшие достоверные изменения метаболической активности клеток (2-6,3%) были в пределах ошибки метода (рис. 4).

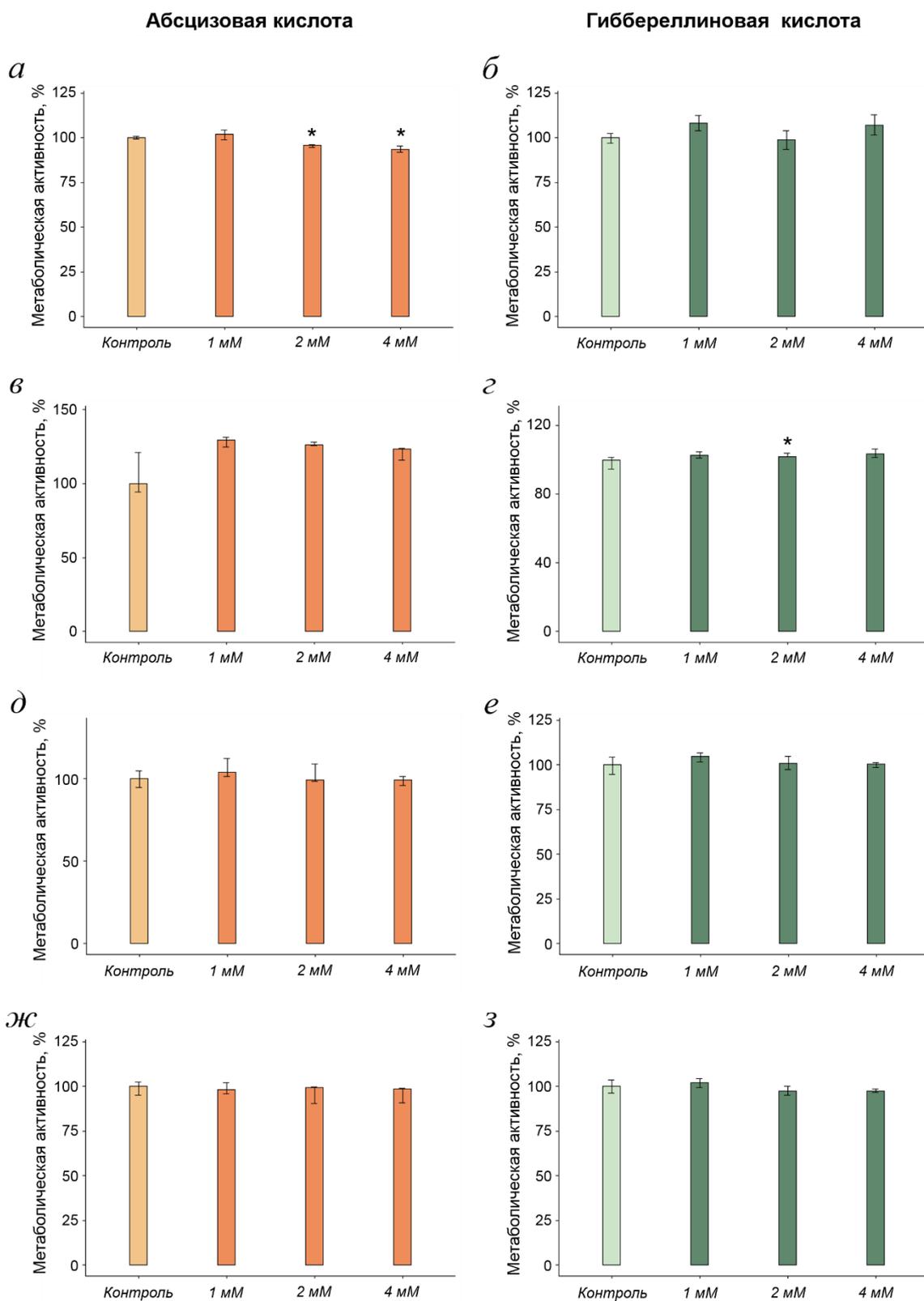


Рис. 4. Метаболическая активность дермальных фибробластов при действии АБК (а, в, д, ж) и ГК (б, г, е, з) в течение 24 часов (а и б), 48 часов (в и г), 72 часов (д и е) и 96 часов (ж и з). Показаны медианы и интерквартильные размахи; * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни относительно контроля; 3 независимых эксперимента.

5.2. Анализ уровня экспрессии генов, кодирующих маркеры UPR, при действии АБК и ГК

Ранее было показано, что культивирование с 2 мМ ГК в течение 24 часов вызывало активацию UPR в культивируемых клетках эпидермоидного происхождения (Vildanova et al., 2021). Мы проверили, будет ли наблюдаться сходный эффект у культивируемых дермальных фибробластов человека. С помощью ПЦР мы провели оценку уровня экспрессии маркеров UPR – *GRP78* (белок 78 кДа, регулируемый глюкозой), *ATF4* (активирующий фактор транскрипции 4), *sXBP1* (сплайсированный X-бох-связывающий белок 1) и *CHOP* (ССААТ/белок, гомологичный энхансер-связывающему белку) после 24-часового воздействия на дермальные фибробласты 2 мМ АБК и ГК (рис. 5). Мы обнаружили, что при действии АБК повышалась экспрессия генов *GRP78* и *ATF4* в 2,7 и 1,7 раза соответственно (рис. 5, а и в). При этом АБК не оказывала значимого влияния на количество *sXBP1* и уровень экспрессии *CHOP* (рис. 5, д и ж). Напротив, ГК оказывала влияние на уровень экспрессии только *CHOP*, повышая его в 2,9 раза (рис. 5, б, г, е, з).

Таким образом, АБК и ГК в концентрации 2 мМ и при воздействии в течение 24 часов активировали экспрессию генов, кодирующих маркеры UPR в дермальных фибробластах, однако паттерны активации изученных генов у АБК и ГК различались.

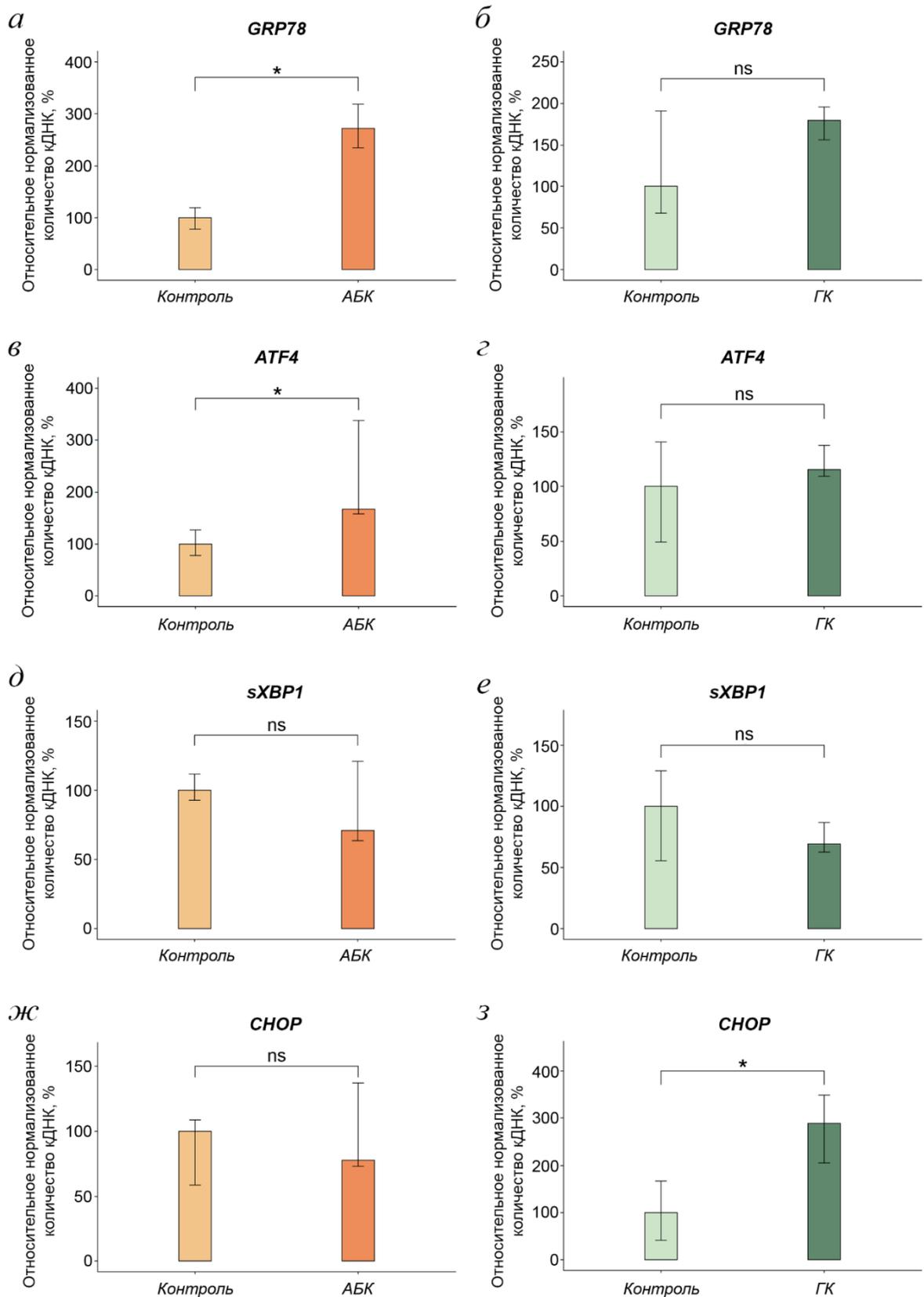


Рис. 5. Уровень экспрессии генов, кодирующих маркеры UPR *GRP78* (а и б), *ATF4* (в и г), *sXBP1* (д и е) и *CHOP* (ж и з) после 24-часового воздействия АБК и ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; ns – not significant (не значимо); * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 7 независимых экспериментов.

5.3. Структурное состояние ЭПР при действии АБК и ГК

Как известно, UPR может сопровождаться морфологическими изменениями ЭПР, такими как набухание цистерн, фрагментация цистерн, изменение распределения цистерн в цитоплазме (Diakogiannaki et al., 2008; Asselah et al., 2010; Osowski and Urano, 2011; Tersey et al., 2012; Ha et al., 2020). 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 с помощью ЭПР-трекера показало, что АБК и ГК не вызывали заметных изменений распределения и морфологии ЭПР в дермальных фибробластах. В контрольных клетках и при воздействии АБК и ГК ЭПР выявлялся как сеть из тонких цистерн разной длины и толщины, распространяющаяся от ядра к клеточной периферии (рис. 6, а-в). Некоторые цистерны имели утолщения, напоминающие бусы на нитке. При исследовании состояния ЭПР с помощью ТЭМ было обнаружено, что, по сравнению с контролем, АБК не вызывала заметных изменений состояния цистерн ЭПР (рис. 6, з, д). В то же время, в цитоплазме многих клеток мы обнаружили скопления везикулярных структур, гетерогенных по форме, размеру и содержимому (рис. 6, д). Как показал детальный ультраструктурный анализ, внутри таких везикул были видны скрученные в виде концентрических колец мембранные структуры, причём количество таких мембранных кластеров могло быть от 1 до 3 (рис. 7). В англоязычной литературе такие везикулярные структуры часто называются «whorls» (Snapp et al., 2003; Lingwood et al., 2009; Schuck et al., 2014; Chino and Mizushima, 2020; Guo et al., 2022). В контрольных образцах «whorls» тоже присутствовали, но в единичном количестве (рис. 6, з). Следует отметить, что метод ТЭМ не позволяет сделать однозначное заключение о том, происходило ли накопление «whorls» во всех клетках, или только в некоторых клетках из всей популяции. При действии ГК мы наблюдали хорошо выраженное расширение и набухание цистерн ЭПР, при этом в цитоплазме клеток, так же как и в контроле, присутствовали единичные структуры, похожие на «whorls» (рис. 6, е). Точно

также мы не можем сделать однозначного заключения о том, насколько расширение цистерн ЭПР при действии ГК было характерно для всех клеток в популяции.

Таким образом, UPR, вызываемый АБК и ГК, не сопровождается изменениями морфологии ЭПР, регистрируемыми на светооптическом уровне. В то же время, анализ ультраструктуры клеток позволяет визуализировать отличия в реакции на АБК и ГК: в некоторых клетках АБК стимулирует образование «whorls», а ГК вызывает расширение цистерн ЭПР.

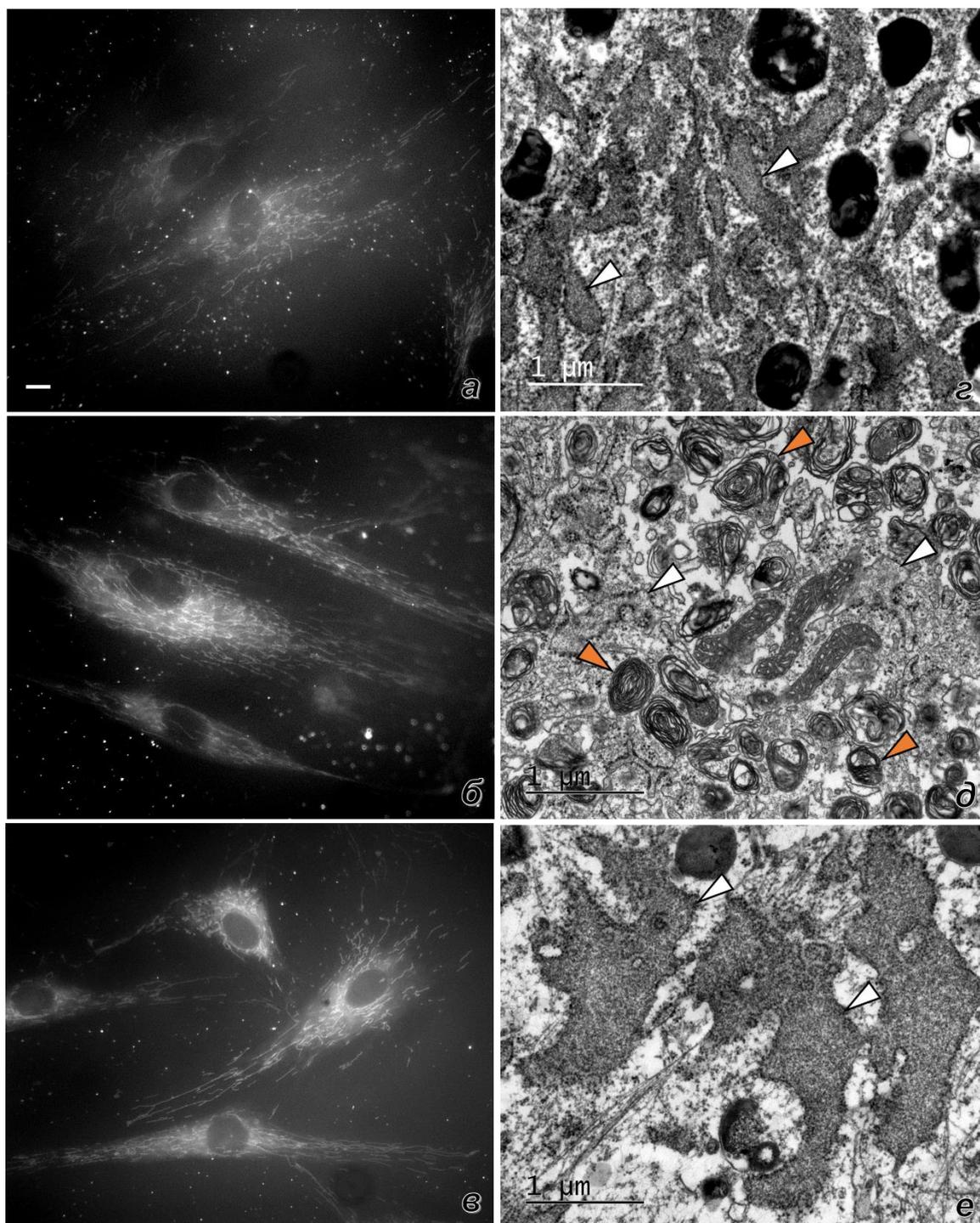


Рис. 6. ЭПР в дермальных фибробластах. *a-c* – Прижизненное выявление с помощью ЭПР-трекера (ER-Tracker Red); *d-e* – ультраструктура гранулярного ЭПР. *a, d* – Контроль; *b, d* – АБК; *c, e* – ГК. Белые стрелки указывают на цистерны ЭПР; оранжевые стрелки указывают на «whorls». Масштабный отрезок: 10 (*a-c*) или 1 (*d-e*) мкм.

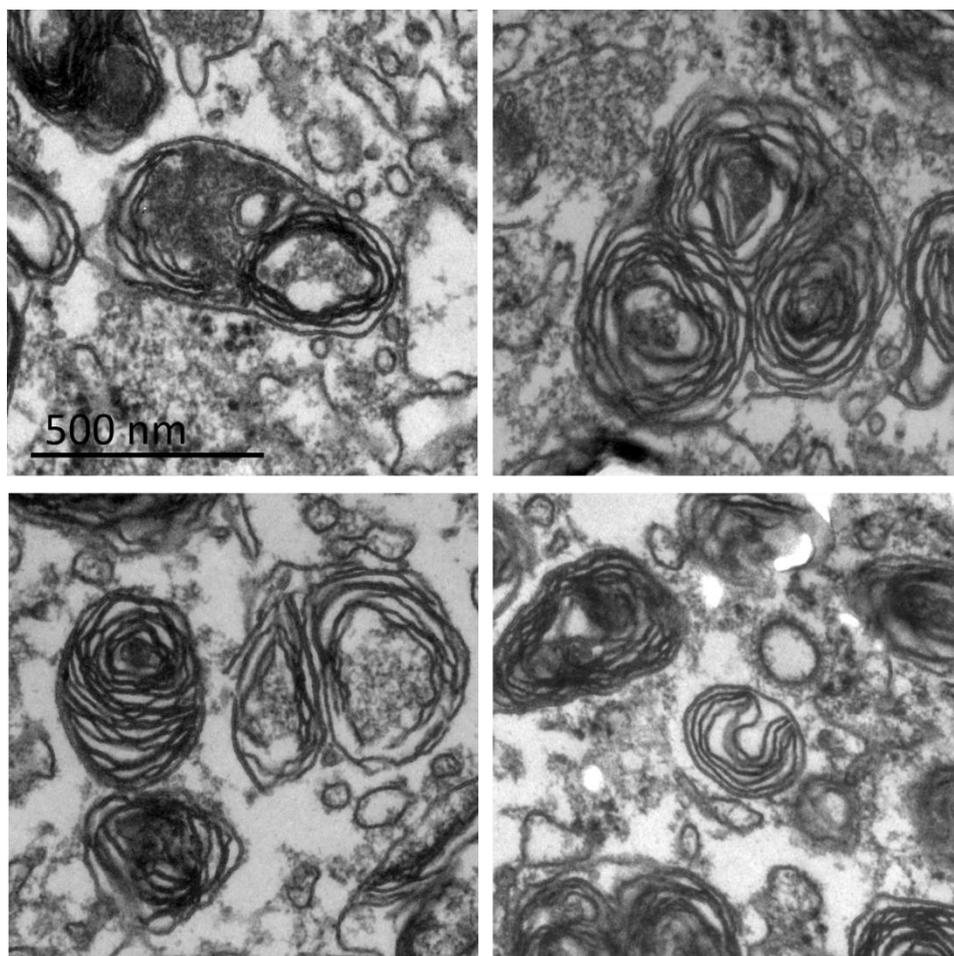


Рис. 7. Везикулы с неоднородным и слоистым содержимым люмена (whorls), присутствующие в цитоплазме фибробластов при действии АБК. Масштабный отрезок: 500 нм.

5.4. Структурное состояние ЭПР при действии ДТТ

Для того, чтобы выяснить, отличается ли реакция ЭПР в дермальных фибробластах при индукции UPR с помощью АБК и ГК и с помощью канонических индукторов стресса ЭПР, мы проанализировали состояние ЭПР после воздействия ДТТ (Oslowski and Urano, 2011; 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).

Оказалось, при действии ДТТ сеть ЭПР фрагментировалась и распадалась на многочисленные более мелкие цистерны (рис. 8, а, б). В клетках, в которых ЭПР сохранял вид сети, повышался уровень фонового окрашивания, сеть становилась тоньше, часто принимая вид «перепутанных» нитей (рис. 8, б). При этом

на ультраструктурном уровне изменений в состоянии ЭПР при действии ДТТ не наблюдалось (рис. 8, в, г).

Таким образом, при действии разных индукторов стресса ЭПР и UPR (АБК, ГК и ДТТ) наблюдаются различные морфологические состояния ЭПР. Отсутствие расширения цистерн при UPR, вызываемом АБК, не является исключением, так как при действии ДТТ расширения цистерн ЭПР также не наблюдается.

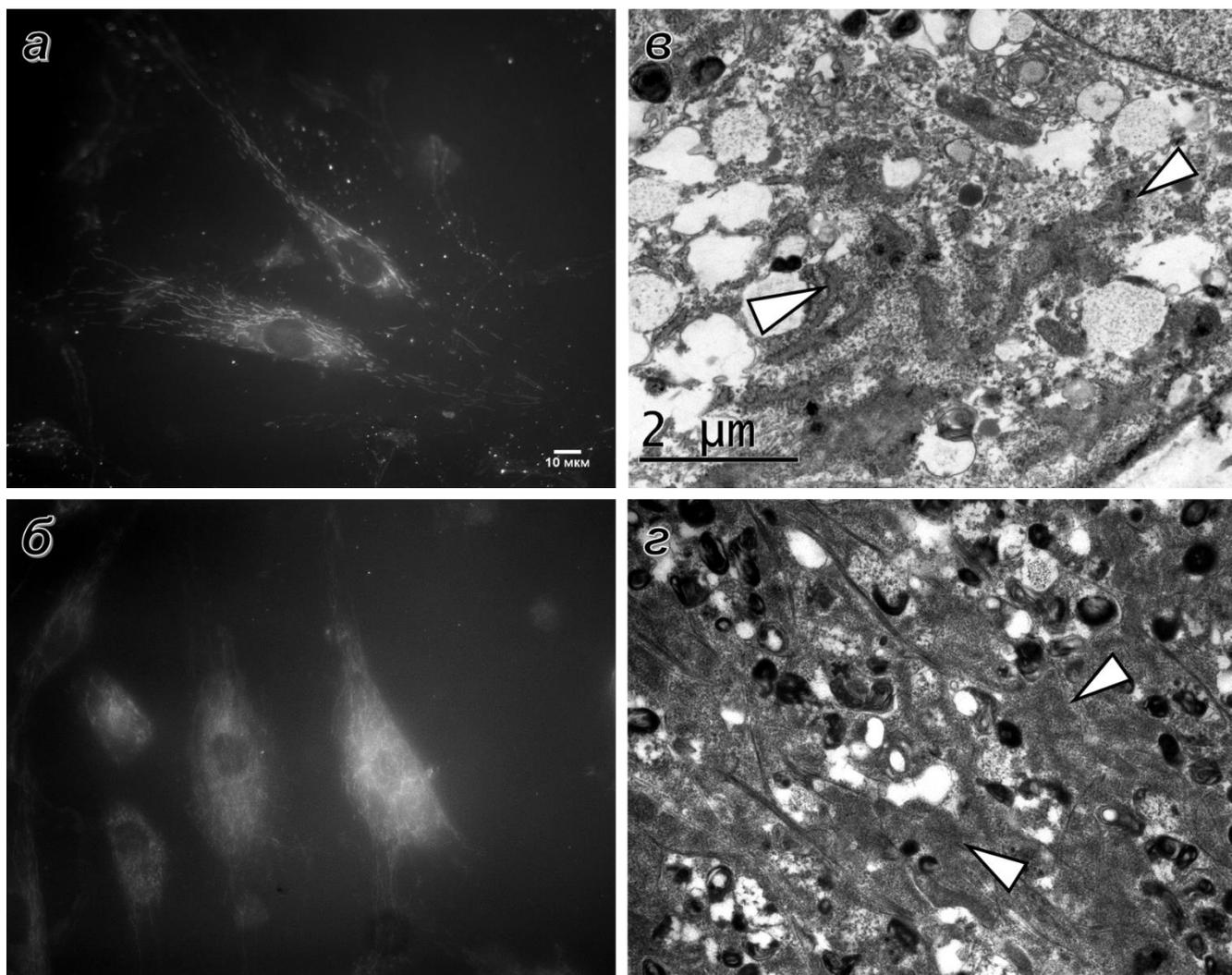


Рис. 8. ЭПР в дермальных фибробластах после действия ДТТ. *а, б* – Прижизненное выявление с помощью ЭПР-трекера (ER-Tracker Red); *в, г* – ультраструктура гранулярного ЭПР. *а, в* – Контроль; *б, г* – ДТТ. *Белые стрелки* указывают на цистерны ЭПР. *Масштабный отрезок:* 10 (*а, б*) или 2 (*в, г*) мкм.

5.5. Структурное состояние аппарата Гольджи при действии АБК и ГК

Изменение состояния ЭПР при действии АБК и ГК может влиять на состояние другого компонента биосинтетической системы – аппарата Гольджи. В связи с этим мы оценили морфологию этой органеллы с помощью иммуноцитохимического выявления и ТЭМ.

Иммуноцитохимическое окрашивание аппарата Гольджи с помощью антител к белку GM130 показало, что в популяции дермальных фибробластов вид и расположение аппарата Гольджи относительно ядра было различным. Аппарат Гольджи располагался с одной стороны ядра или с двух противоположных его сторон в виде шапочек, или же был распределён вокруг ядра. При этом аппарат Гольджи мог быть в компактном или деконденсированном состоянии. 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. 9, а-в). Подсчёт клеток с этими вариантами расположения аппарата Гольджи в популяции дермальных фибробластов показал, что в контроле 69,5% клеток имели полярный тип расположения, 6,5% - биполярный и 24% - неполярный. При этом культивирование дермальных фибробластов с фитогормонами приводило к изменению соотношения вариантов расположения аппарата Гольджи в клеточной популяции (рис. 9, г). После воздействия АБК клеток с полярным типом расположения аппарата Гольджи становилось меньше на 13,5%, а клеток с неполярным типом - больше на 11%. После воздействия ГК клеток с полярным вариантом расположения аппарата Гольджи становилось меньше на 8,1%, а клеток с неполярным типом – больше на 8%. Доля клеток с биполярным расположением аппарата Гольджи после воздействия АБК и ГК статистически достоверно не изменялась. При этом на ультраструктурном уровне значительных изменений морфологии аппарата Гольджи после действия растительных гормонов обнаружено не было. Аппарат Гольджи на срезах в контрольных клетках и

после действия АБК и ГК был представлен стопками, расположенными линейно или полукругом (рис. 9, д-ж).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что культивирование дермальных фибробластов с АБК и ГК приводило к изменениям соотношения клеток с разным расположением аппарата Гольджи: доля клеток с полярным расположением аппарата Гольджи уменьшалась, а доля клеток с неполярным расположением аппарата Гольджи возрастала.

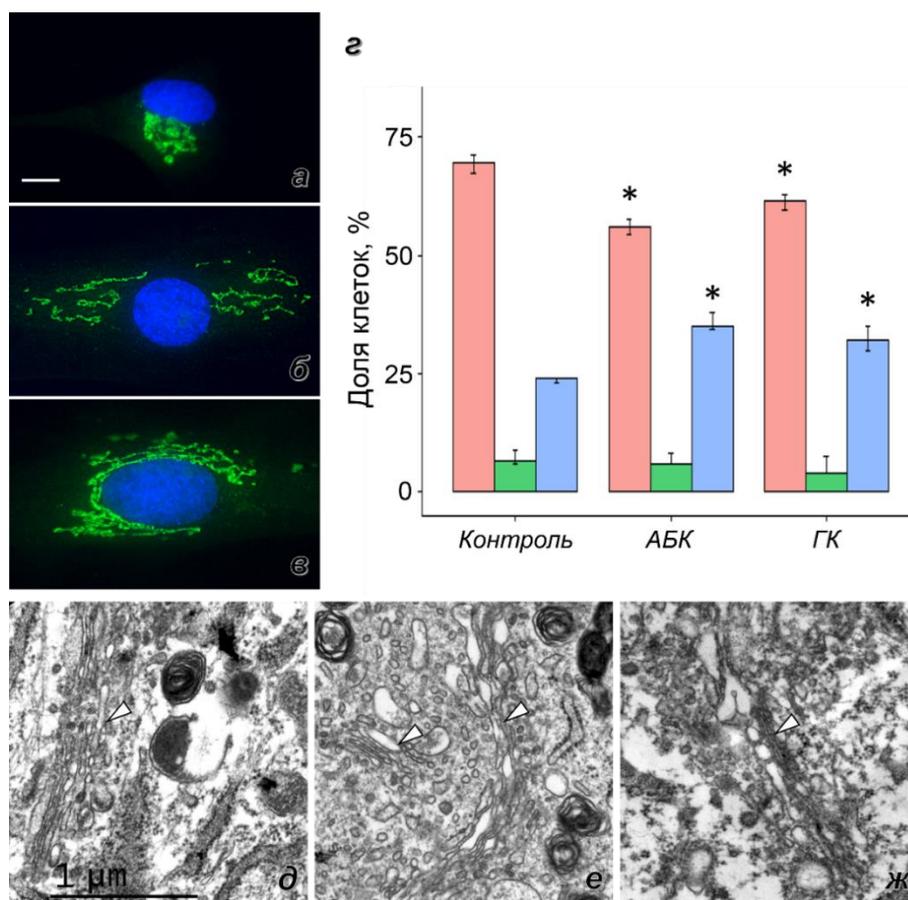


Рис. 9. Аппарат Гольджи в дермальных фибробластах. *a-в* - Иммуноцитохимическое выявление аппарата Гольджи (зелёный; ядра окрашены в синий цвет DAPI) с помощью антител к белку GM130 и типы его расположения: полярное (*a*), биполярное (*б*), неполярное (*в*). *г* - Распределение клеток с разными вариантами расположения аппарата Гольджи в клеточной популяции: полярное (розовые столбцы), биполярное (зелёные столбцы), неполярное (голубые столбцы) в контроле и при действии АБК или ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; * $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни; 3 независимых эксперимента. *д-ж* - Ультраструктура аппарата Гольджи в контроле (*д*) и после действия АБК (*е*) и ГК (*ж*); стрелки указывают на аппарат Гольджи. Масштабный отрезок – 10 (*a-в*) или 1 (*д-ж*) мкм.

5.6. Распределение дермальных фибробластов по фазам клеточного цикла

Вклад в разнообразие формы и расположения аппарата Гольджи может вносить его динамика в клеточном цикле – в поздней фазе G_2 и ранней профазе лентовидная структура аппарата Гольджи нарушается, и он распадается на отдельные стопки (Huang and Wang, 2017; Wei and Seemann, 2017). Задержка в той или иной фазе клеточного цикла может приводить к изменению соотношения клеток с разным расположением аппарата Гольджи в клеточной популяции. Для того чтобы проверить, есть ли связь между изменением соотношения клеток с разным расположением аппарата Гольджи в присутствии АБК и ГК и изменением параметров клеточного цикла, мы провели исследование распределения популяции клеток по фазам клеточного цикла после культивирования с фитогормонами в течение 24 часов методом проточной цитофлуориметрии.

Полученные данные представлены на рисунке 10. В контрольных образцах доля клеток, находящихся в фазах G_0/G_1 , составляла 70,2%, в фазе S – 6,8%, в фазах G_2/M – 17,4% (рис. 10, а). После воздействия АБК и ГК распределение клеточной популяции по фазам клеточного цикла практически не изменялось. После культивирования с АБК в фазах G_0/G_1 находилось 67,9% клеток, в S-фазе – 8%, в G_2/M – 18% (рис. 10, б). После культивирования с ГК в фазах G_0/G_1 находилось 66,6% клеток, в S-фазе – 9,6%, в G_2/M – 17,7% (рис. 10, в). То есть накопления клеток в фазах G_0/G_1 и в G_2/M после воздействия АБК и ГК не происходило. Это указывает на то, что перераспределение аппарата Гольджи относительно ядра после воздействия растительных гормонов не связано с задержкой в той или иной фазе клеточного цикла, а может быть вызвано непосредственно влиянием АБК и ГК на состояние аппарата Гольджи.

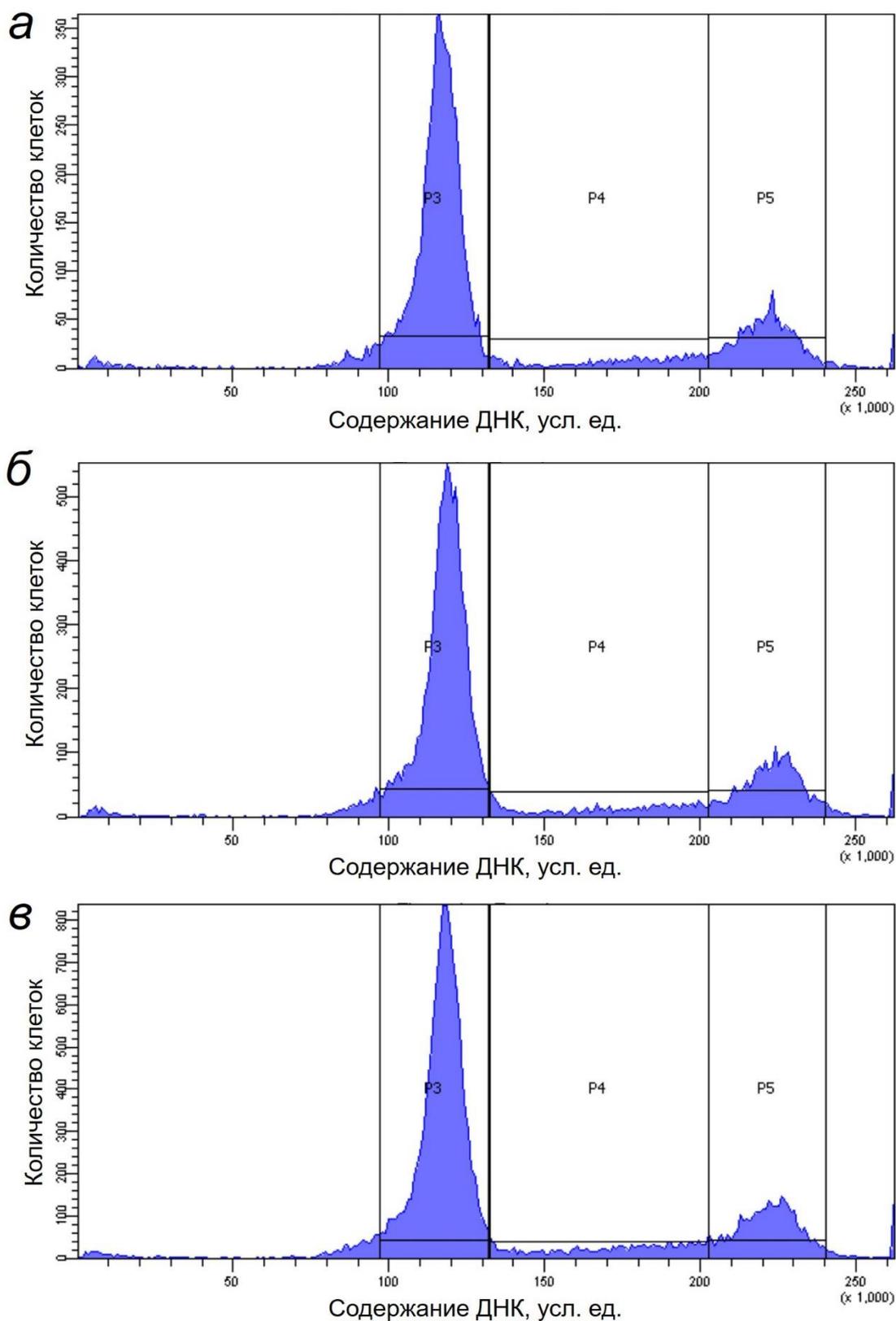


Рис. 10. Гистограмма содержания ДНК в популяции дермальных фибробластов в контроле (а) и после воздействия растительных гормонов АБК (б) и ГК (в). P3, P4, P5 - Клетки в фазах клеточного цикла G₀/G₁, S, G₂/M соответственно. Проточная цитофлуориметрия.

5.7. Организация сети микротрубочек и актиновых филаментов при действии АБК и ГК

Хорошо известно, что структурное состояние аппарата Гольджи зависит от системы микротрубочек и актиновых филаментов (Gosavi and Gleeson, 2017; Ignashkova et al., 2017; Ravichandran et al., 2020), поэтому мы проанализировали, есть ли изменения в организации этих элементов цитоскелета, и насколько они коррелируют с изменениями распределения аппарата Гольджи относительно ядра.

Визуализацию актиновых филаментов проводили с помощью TRITC-фаллоидина. В контрольных клетках выявлялись пучки актиновых филаментов разной толщины, а также актин, входящий в состав кортикальной сети (рис. 11, *а*). При действии АБК (рис. 11, *б*) и ГК (рис. 11, *в*) изменений в состоянии актинового цитоскелета не наблюдалось.

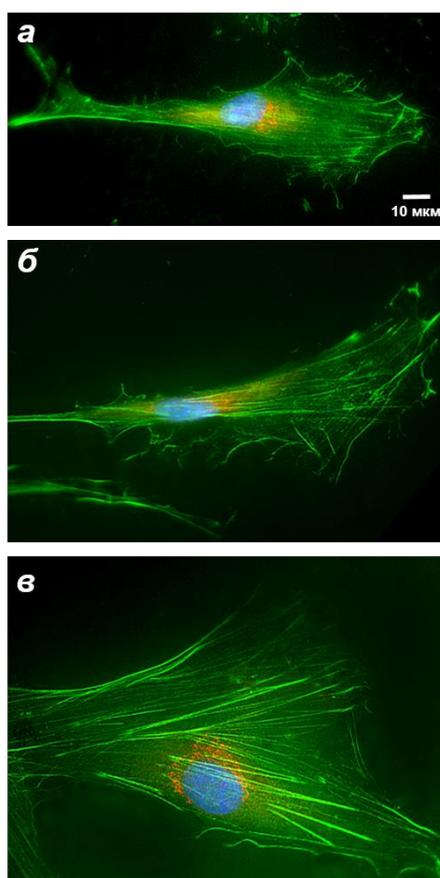


Рис. 11. Актиновые филаменты в дермальных фибробластах в контроле (*а*) и при действии АБК (*б*) и ГК (*в*). Цитохимическое выявление актиновых филаментов с помощью фаллоидина, конъюгированного с TRITC (зелёный). Иммуноцитохимическое выявление аппарата Гольджи с помощью антител к белку 58К (красный). Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок: 10 мкм.

Иммуноцитохимическое выявление микротрубочек с помощью антител к тубулину показало, что для фибробластов характерна плотная сеть микротрубочек, заполняющая всю цитоплазму (рис. 12, *а*), при этом часто были видны как centrosомные фокусы схождения микротрубочек, так и микротрубочки, ассоциированные с самим аппаратом Гольджи. Значительных изменений состояния микротрубочек при действии АБК и ГК отмечено не было (рис. 12, *б*, *в*).

Таким образом, 24-часовое воздействие АБК и ГК не вызывало изменений в состоянии микротрубочек и актинового цитоскелета. Следовательно, определённые изменения расположения аппарата Гольджи относительно ядра, которые мы наблюдали после действия АБК и ГК в течение 24 часов, не опосредованы реорганизацией системы микротрубочек и/или актиновых филаментов.

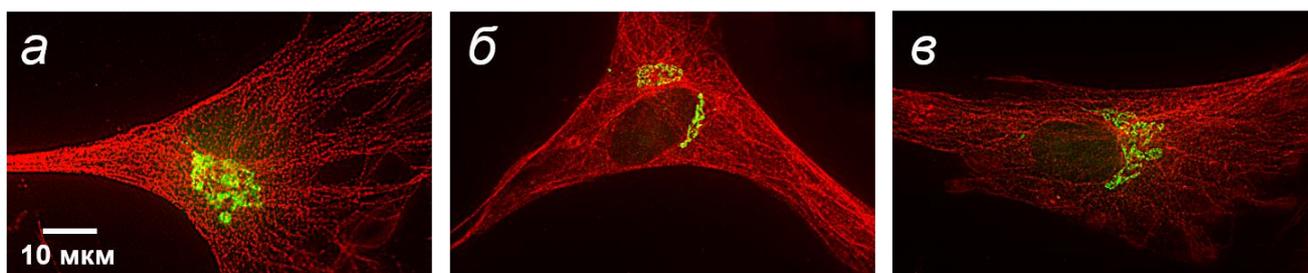


Рис. 12. Микротрубочки в дермальных фибробластах в контроле (*а*) и после 24-часового воздействия АБК (*б*) и ГК (*в*). Иммуноцитохимическое выявление микротрубочек (*красные*) с помощью антител к тубулину и аппарата Гольджи (*зелёный*) с помощью антител к белку GM130. Масштабный отрезок: 10 мкм.

5.8. Структурное состояние актинового цитоскелета при действии ДТТ

При индукции UPR с помощью АБК и ГК изменений формы фибробластов не наблюдалось (рис. 13, *а*, *б*, *в*), однако при анализе фибробластов, которые культивировали с 2 мМ ДТТ в течение 24 часов, мы обнаружили, что клетки меняли свою форму и становились более поджатыми и отростчатыми (рис. 13, *г*). Так как изменение формы клеток может быть связано с реорганизацией актиновых филаментов, мы проанализировали актиновый цитоскелет после действия ДТТ.

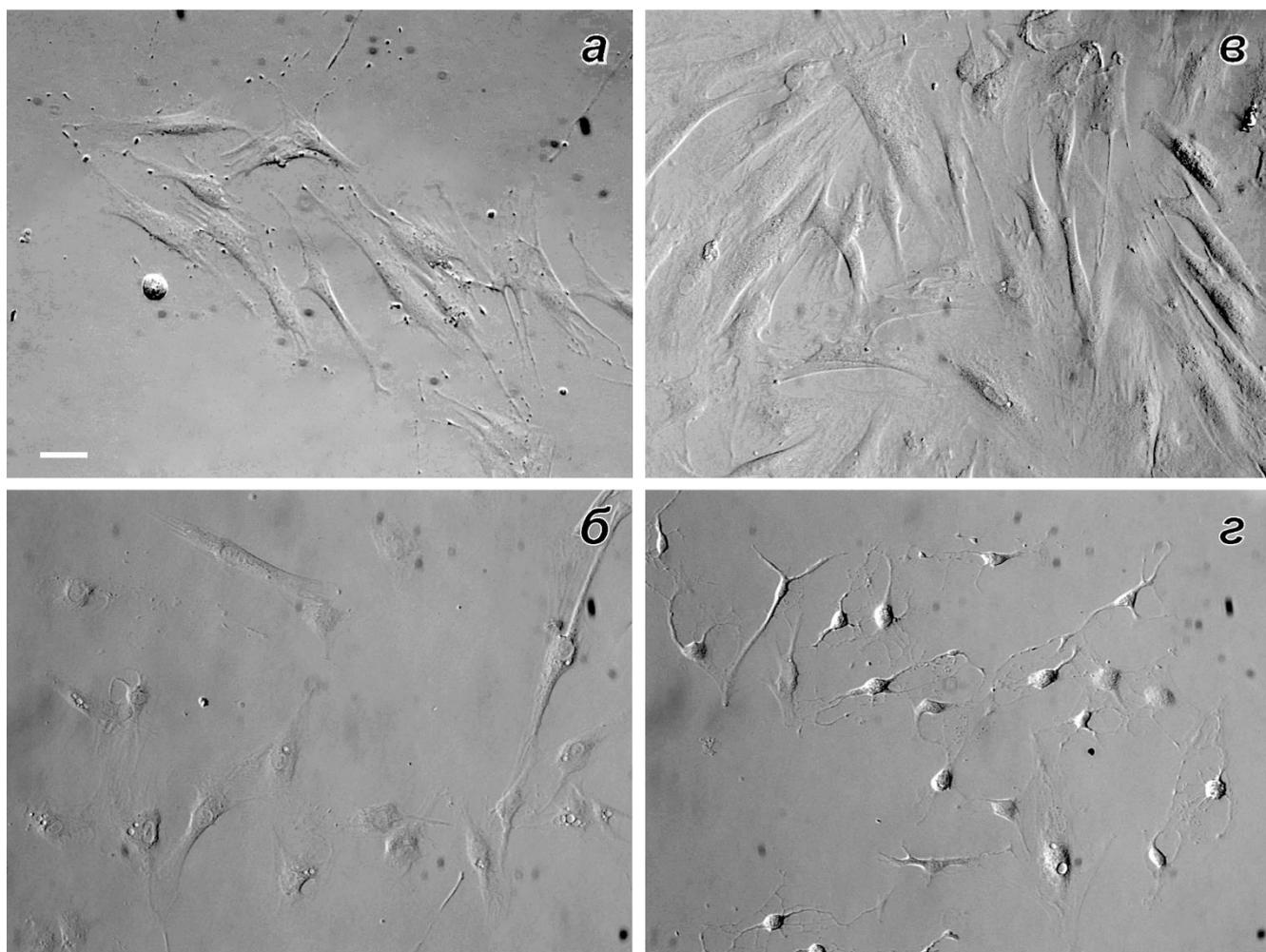


Рис. 13. Форма дермальных фибробластов в контроле (*a*) и после 24-часового воздействия АБК (*б*), ГК (*в*) и ДТТ (*г*). Фазовый контраст. Масштабный отрезок: 20 мкм.

В нормальных условиях культивирования в дермальных фибробластах выявлялись пучки актиновых филаментов разной толщины, а также актин, входящий в состав кортикальной сети (рис. 14, *a*, *б*). При действии ДТТ происходила дезорганизация системы актиновых филаментов (рис. 14, *в*, *г*): пучки актина, характерные для контрольных клеток, становились менее выраженными или отсутствовали. Кроме того, выявление актиновых филаментов в кортикальной цитоплазме подтвердило то, что клетки меняли свою форму и характер распластывания на субстрате и становились отростчатыми.

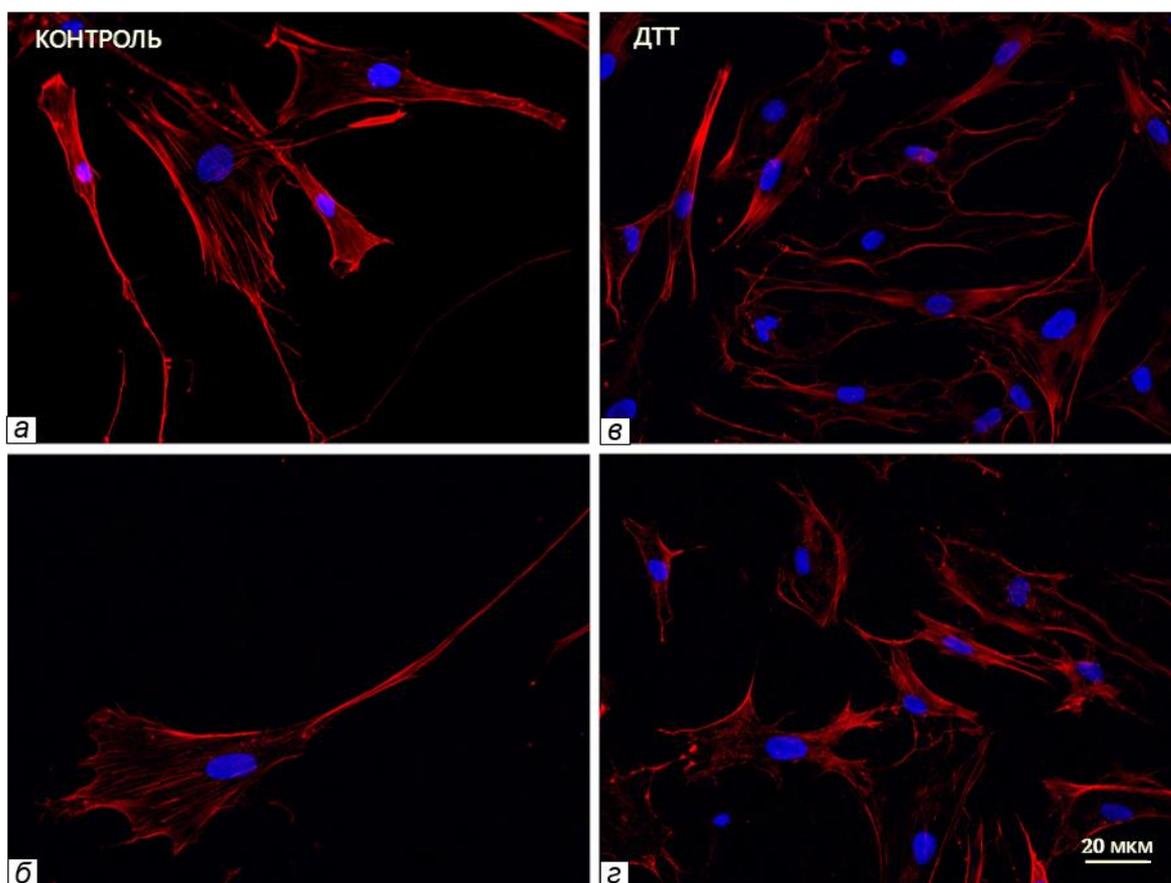


Рис. 14. Влияние ДТТ на состояние актиновых филаментов дермальных фибробластов. Цитохимическое выявление актиновых филаментов с помощью TRITC-фаллоидина (красный; ядра окрашены в синий цвет DAPI). *а, б* – Контроль; *в, г* – 24 часа воздействия ДТТ. Масштабный отрезок: 20 мкм.

5.9. Характеристика фокальных контактов при действии ДТТ

Поскольку в дермальных фибробластах при действии ДТТ мы наблюдали дезорганизацию пучков актиновых филаментов, а стресс-фибриллы у фибробластов связаны с фокальными контактами (Шутова, Александрова, 2010; Tojkander et al., 2012), мы проанализировали распределение фокальных контактов в клетках с помощью иммуноцитохимического выявления винкулина.

В нормальных условиях культивирования фокальные контакты были распределены по вентральной поверхности клеток и выявлялись в клеточных отростках (рис. 15, *а, б*). ДТТ вызывал перераспределение фокальных контактов (рис. 15, *в, г*): в распластанных и отростчатых клетках фокальные контакты присутствовали преимущественно в клеточных отростках, а в сильно поджатых

клетках – наоборот, в центральной части клеток. Кроме того, при воздействии ДТТ количество фокальных контактов на клетку уменьшалось в 4 раза (рис. 15, д).

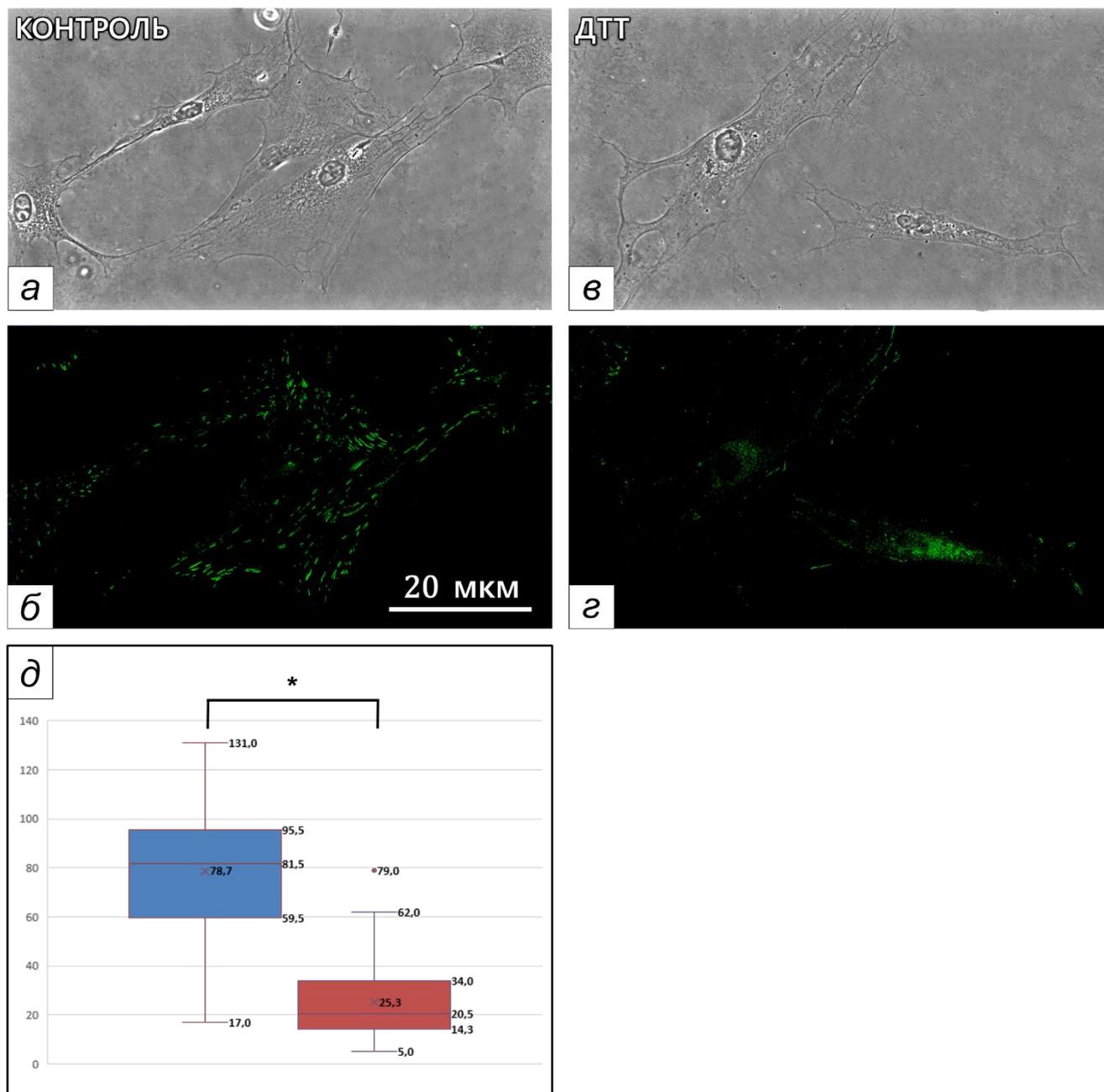


Рис. 15. Влияние ДТТ на распределение и количество фокальных контактов в дермальных фибробластах. *а, в* – Фазовый контраст; *б, з* – иммуноцитохимическое выявление винкулина (зелёный). *а, б* – Контроль; *в, з* – 24 часа воздействия ДТТ. Масштабный отрезок: (*а-з*) – 20 мкм. *д* - Подсчёт количества фокальных контактов на клетку в нормальных условиях культивирования (*синий*) и при действии ДТТ (*красный*). Объём контрольной выборки $n=44$, объём экспериментальной выборки $n=32$. * $p<0,05$ по критерию Манна-Уитни.

5.10. Оценка площади клеток при действии ДТТ

Хорошо выявляемые при окрашивании TRITC-фаллоидином границы клеток позволили оценить изменение площади дермальных фибробластов после воздействия ДТТ. Было проанализировано 56 клеток в нормальных условиях культивирования и 82 клетки после воздействия ДТТ. Оказалось, что ДТТ вызывал уменьшение площади распластывания дермальных фибробластов в 1,3 раза (рис. 16).

Таким образом, при индукции стресса ЭПР и UPR с помощью ДТТ происходит нарушение организации системы актиновых филаментов, уменьшается число фокальных контактов, и это ведёт к уменьшению площади распластывания фибробластов.

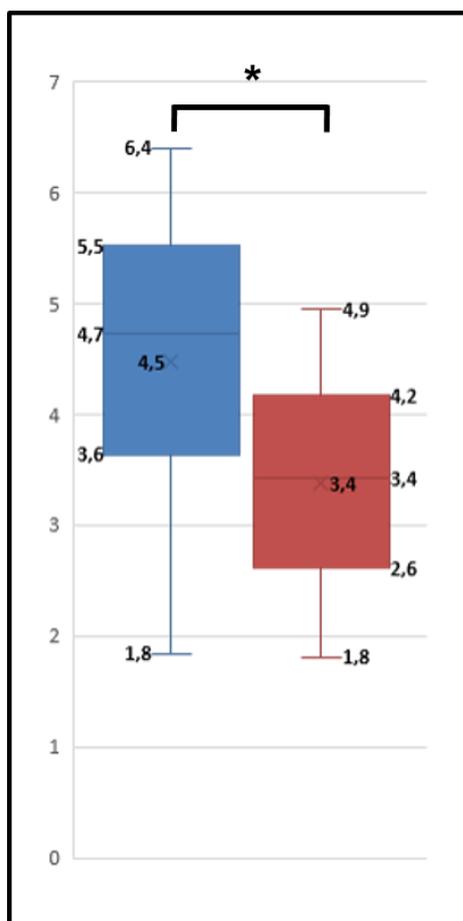


Рис. 16. Измерение площади дермальных фибробластов в нормальных условиях культивирования (синий) и при действии ДТТ (красный). Площадь выражена в условных единицах, где $1 \approx 100 \text{ мкм}^2$. Объем контрольной выборки $n=56$, объем экспериментальной выборки $n=82$. * $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни.

5.11. Анализ клеточной поверхности при действии ДТТ с помощью СЭМ

Так как уменьшение площади клеток может сопровождаться изменением рельефа поверхности, мы проанализировали поверхность дермальных фибробластов с помощью СЭМ. В нормальных условиях культивирования (рис. 17, *a-в*) дермальные фибробласты были хорошо распластанными и со сглаженным микрорельефом поверхности, с клеточными отростками разной длины. После воздействия ДТТ наблюдалось изменение формы и рельефа поверхности фибробластов (рис. 17, *г-е*): клетки становились более выпуклыми и «поджатыми» (рис. 17, *г, д*), их отростки – более толстыми и рельефными (рис. 17, *е*), на дорзальной поверхности клеток появлялись бугристые и складчатые образования.

Таким образом, ДТТ вызывал изменение поверхности дермальных фибробластов.

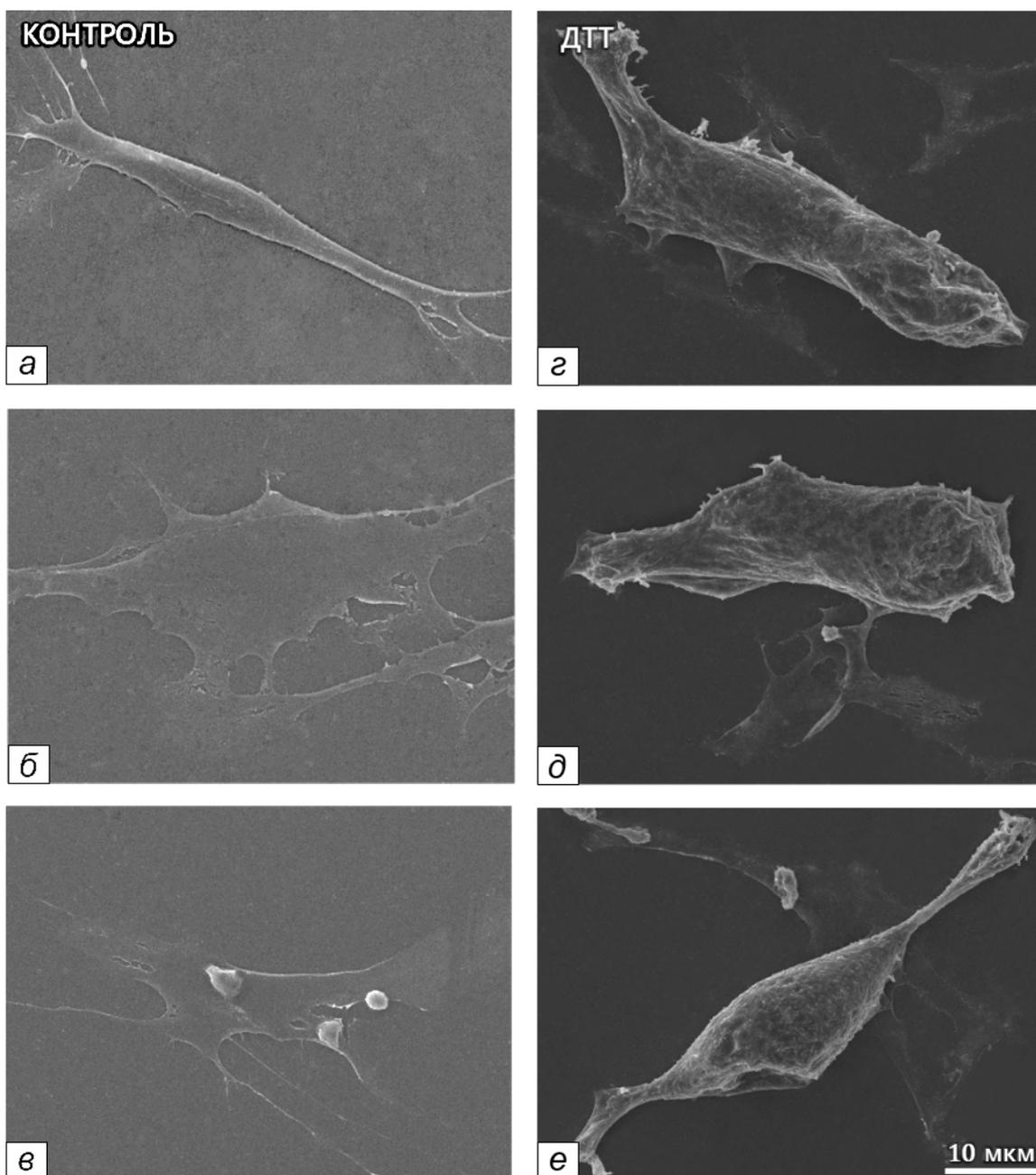


Рис. 17. Влияние ДТТ на микрорельеф клеточной поверхности дермальных фибробластов, СЭМ. *a-в* – Контроль; *г-е* – 24 часа воздействия ДТТ. Масштабный отрезок: 10 мкм.

Таким образом, индуктор стресса ЭПР ДТТ вызывает реорганизацию актинового цитоскелета в дермальных фибробластах, что сопровождается сжатием клеток, изменением их формы и поверхности и уменьшением числа фокальных контактов. При этом АК и ГК вызывают стресс ЭПР без изменений актинового цитоскелета, характерных для ДТТ. Следовательно, разные варианты индукции

стресса ЭПР и UPR могут сопровождаться (или не сопровождаться) разными морфологическими изменениями не только мембранных органелл, но и цитоскелета. Это говорит о том, что стресс ЭПР и UPR не могут быть охарактеризованы строго определёнными морфологическими критериями.

5.12. Анализ распределения проколлагена I и фибронектина при действии АБК и ГК

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 (Bonnans et al., 2014; 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.

Окрашивание клеток с помощью антител к проколлагену I позволило выявить все компоненты биосинтетической системы фибробластов, задействованные в синтезе, модификациях и транспортировке проколлагена I: обширную сеть, представляющую собой цистерны ЭПР, более яркие фибриллярно-гранулярные скопления в околоядерной области, по морфологии и расположению соответствующие аппарату Гольджи, а также секреторные везикулы, доставляющие проколлаген I от аппарата Гольджи к плазматической мембране. Во внеклеточном пространстве проколлаген I не выявлялся. При воздействии АБК и ГК в течение 24 часов заметных изменений в характере окрашивания дермальных фибробластов отмечено не было (рис. 18).

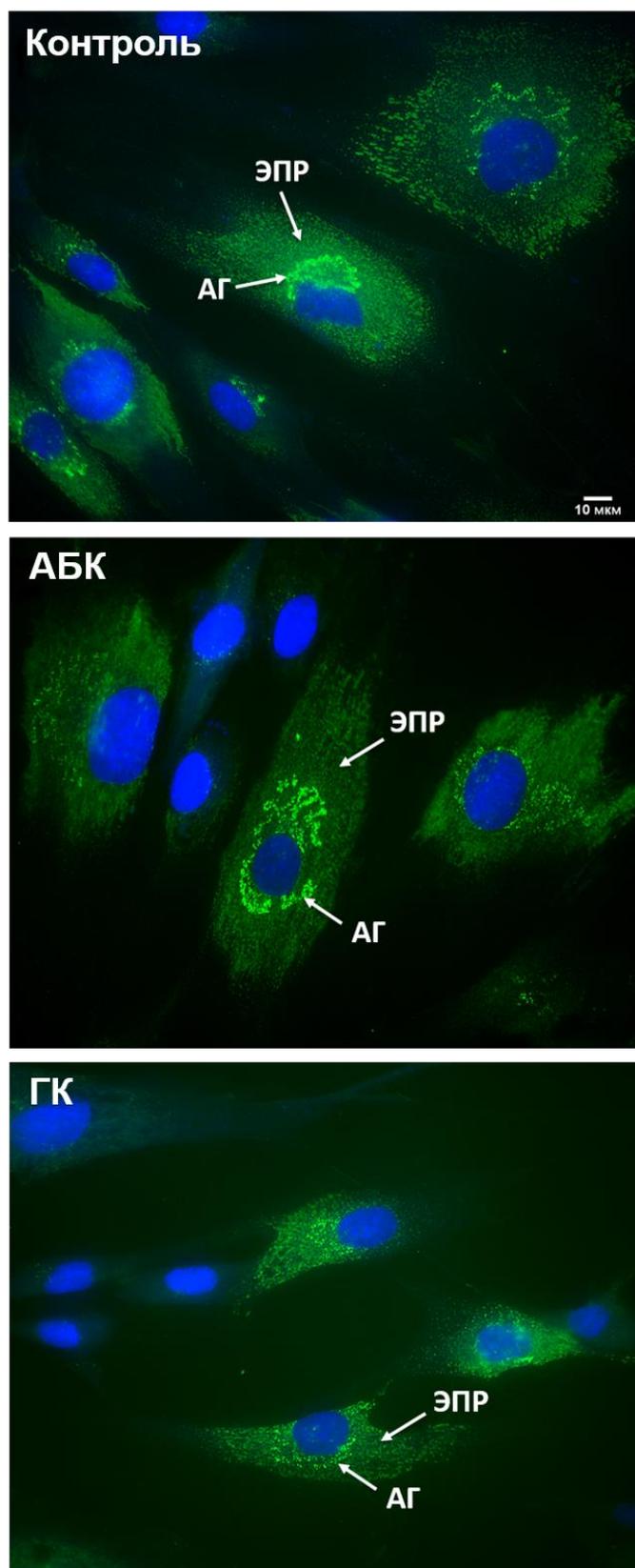


Рис. 18. Проколлаген I в дермальных фибробластах. ЭПР – эндоплазматический ретикулум; АГ – аппарат Гольджи. Иммуноцитохимическое выявление проколлагена I (зелёный) с помощью антител к С-терминальному пропептиду проколлагена I. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок: 10 мкм.

Окрашивание фибробластов с помощью антител к фибронектину показано на рисунке 19. В клетках выявлялась сеть, представляющая собой цистерны ЭПР, в которых происходит синтез фибронектина, а также переплетённые нити на поверхности фибробластов и между фибробластами - секретированный фибронектин в составе внеклеточного матрикса. При воздействии АБК и ГК заметных изменений в характере окрашивания замечено не было.

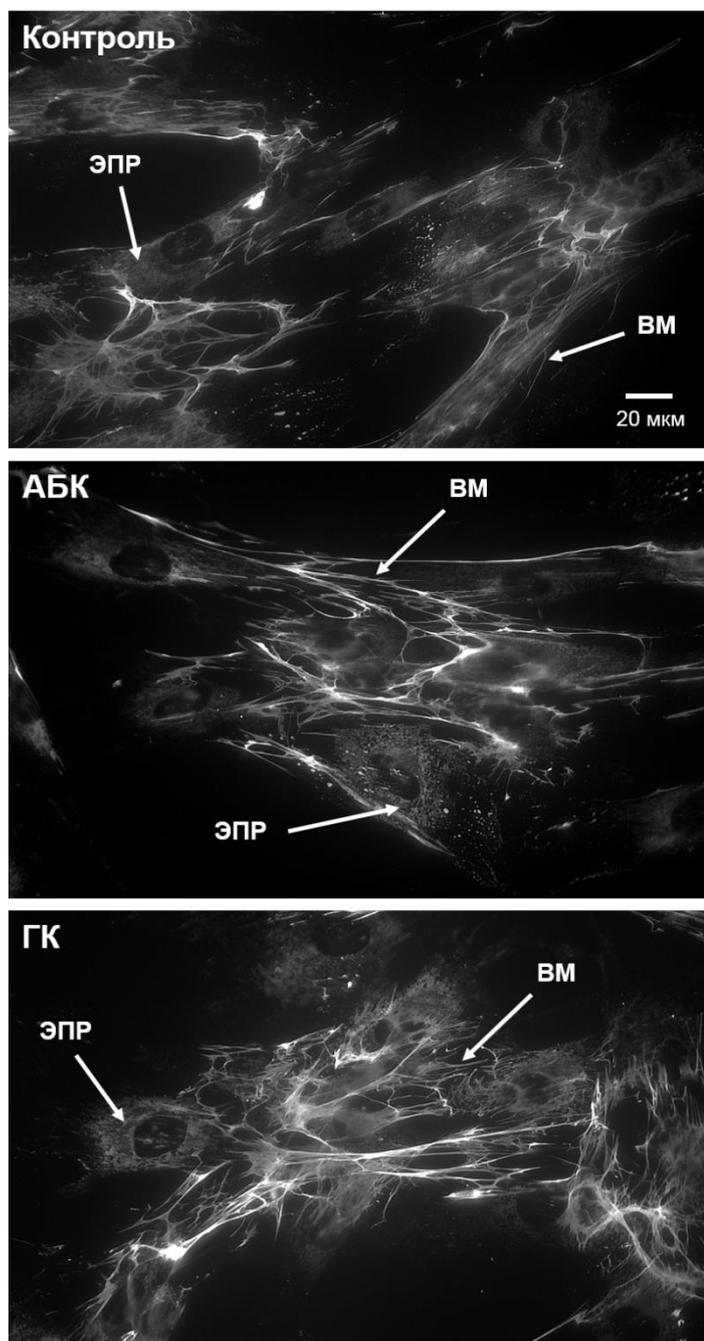


Рис. 19. Фибронектин в дермальных фибробластах. ЭПР – эндоплазматический ретикулум; ВМ – нити фибронектина во внеклеточном матриксе. Иммуноцитохимическое выявление фибронектина. *Масштабный отрезок: 20 мкм.*

Таким образом, АБК и ГК не вызывают изменения распределения проколлагена I и фибронектина, выявляемых с помощью иммуноцитохимического окрашивания.

5.13. Оценка уровня секреции проколлагена I и фибронектина при действии АБК и ГК

Мы предположили, что изменение секреторной активности клеток может происходить позже, чем активация UPR, поэтому проанализировали уровень секреции проколлагена I и фибронектина с помощью ИФА через 24 и 48 часов культивирования фибробластов с АБК и ГК (рис. 20). Как показано на рисунке 20 (а–г), АБК и ГК не вызывали изменений в уровне секреции проколлагена I и фибронектина через 24 часа воздействия. Однако культивирование с АБК в течение 48 часов приводило к повышению уровня секреции проколлагена I на 6,1% (рис. 20, д) и не влияло на уровень секреции фибронектина (рис. 20, ж). Культивирование с ГК в течение 48 часов приводило к повышению уровня секреции фибронектина на 7,2% (рис. 20, з) и не влияло на уровень секреции проколлагена I (рис. 20, е). Таким образом, АБК и ГК оказывали влияние на секреторную активность дермальных фибробластов, причём АБК стимулировала секрецию проколлагена I, а ГК стимулировала секрецию фибронектина.

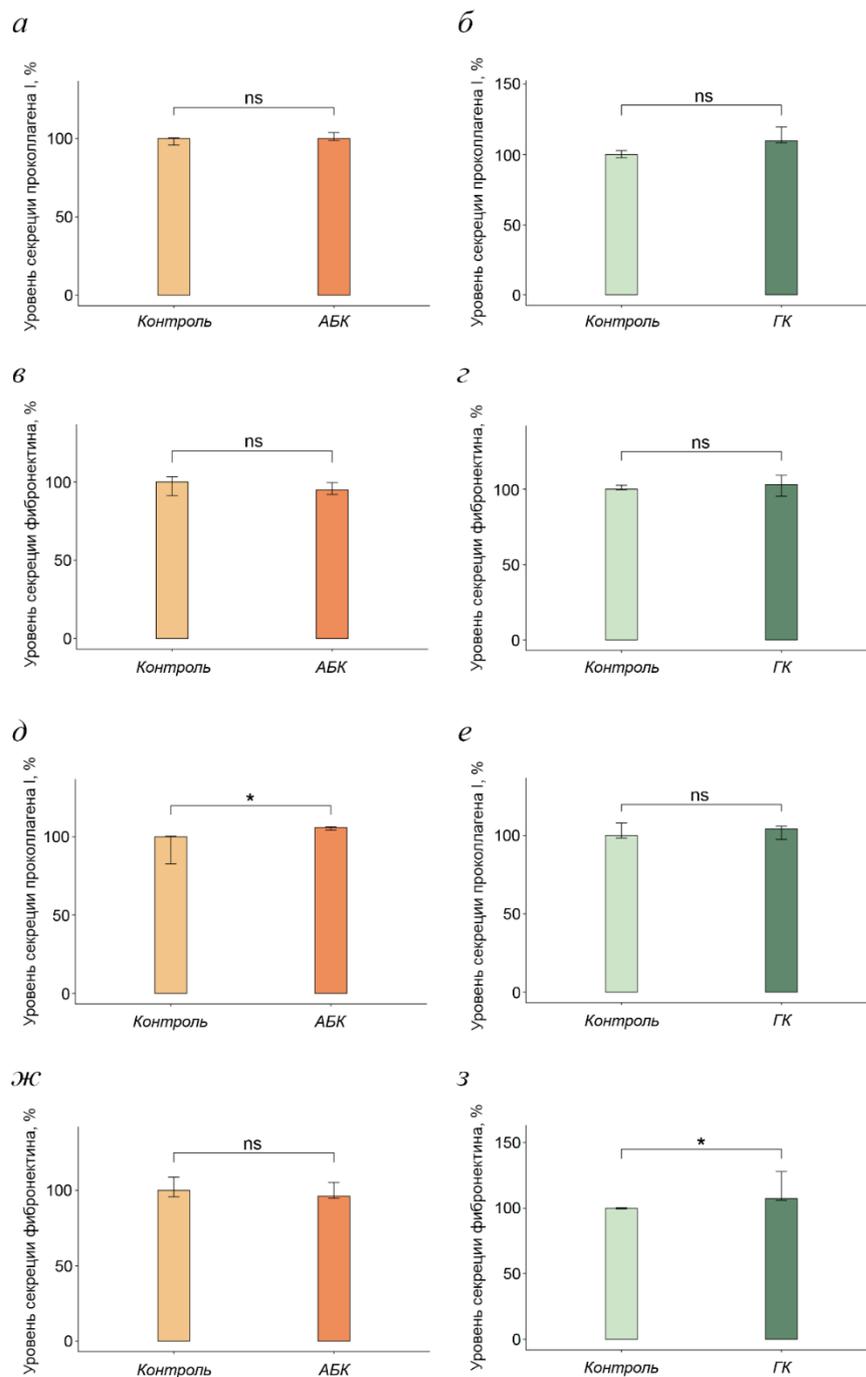


Рис. 20. Влияние АБК и ГК на уровень секреции проколлагена I и фибронектина в дермальных фибробластах. *а* – Уровень секреции проколлагена I после 24 ч воздействия АБК; *б* – уровень секреции проколлагена I после 24 ч воздействия ГК; *в* – уровень секреции фибронектина после 24 ч воздействия АБК; *г* – уровень секреции фибронектина после 24 ч воздействия ГК; *д* – уровень секреции проколлагена I после 48 ч воздействия АБК; *е* – уровень секреции проколлагена I после 48 ч воздействия ГК; *ж* – уровень секреции фибронектина после 48 ч воздействия АБК; *з* – уровень секреции фибронектина после 48 ч воздействия ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; ns – not significant (не значимо); * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 5 независимых экспериментов.

5.14. Оценка уровня синтеза проколлагена I и фибронектина при действии АБК и ГК

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 часов инкубации фибробластов с АБК и ГК (рис. 21). Оказалось, что АБК увеличивала уровень синтеза проколлагена I и фибронектина в 29,4 раза (рис. 21, *a*) и в 1,6 раза (рис. 21, *в*) соответственно. При этом ГК снижала уровень синтеза проколлагена I в 1,6 раза (рис. 21, *б*), а также снижала уровень синтеза фибронектина (рис. 21, *г*), но статистически недостоверно. Таким образом, в дермальных фибробластах АБК вызывала повышение уровня синтеза белков внеклеточного матрикса – проколлагена I и фибронектина, а ГК достоверно индуцировала снижение уровня синтеза только проколлагена I.

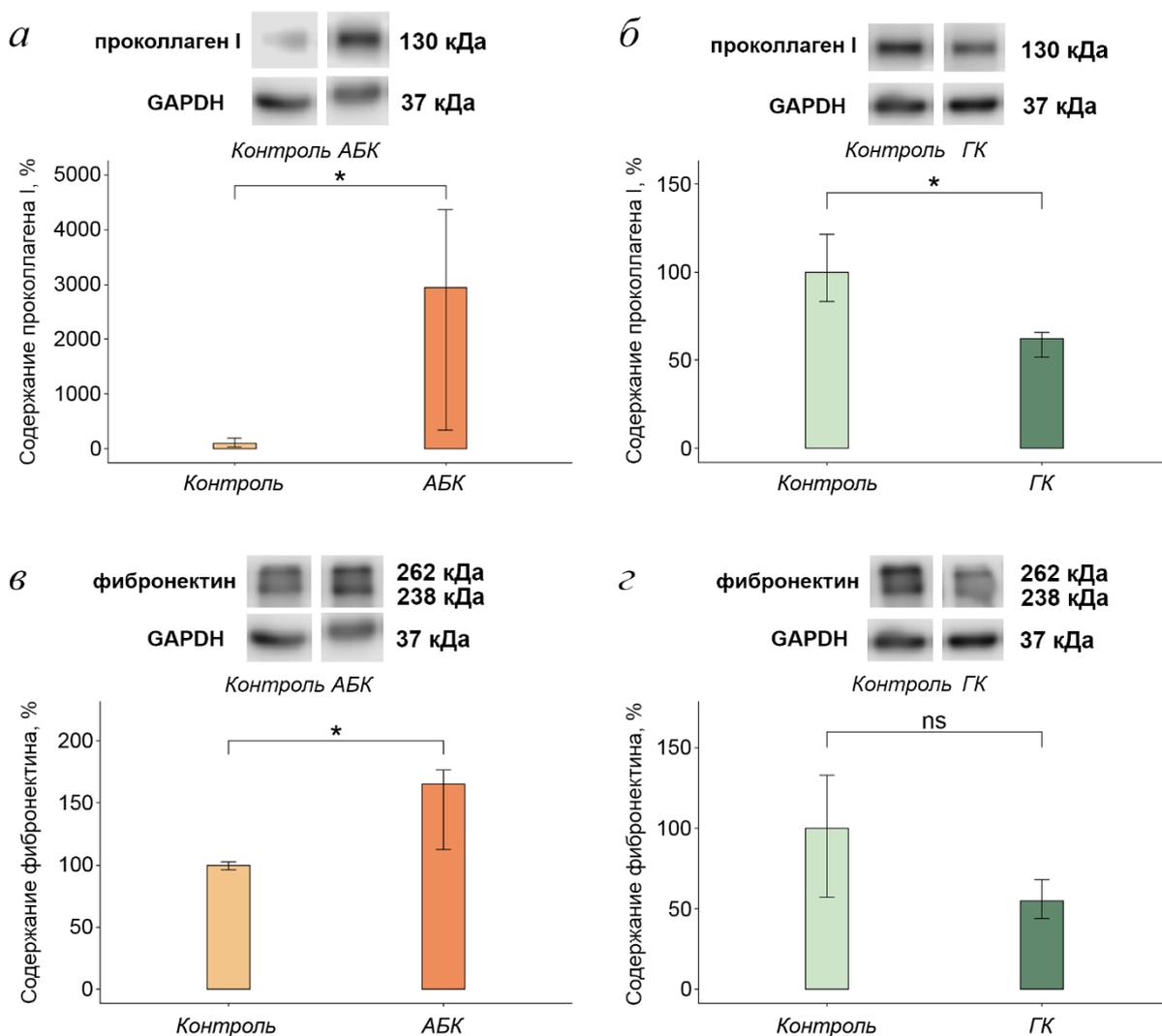


Рис. 21. Влияние 48-часовой инкубации с АБК и ГК на уровень синтеза проколлагена I и фибронектина в дермальных фибробластах. *а* – Содержание проколлагена I после воздействия АБК; *б* – содержание проколлагена I после воздействия ГК; *в* – содержание фибронектина после воздействия АБК; *г* - содержание фибронектина после воздействия ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; ns – not significant (не значимо); * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 5 независимых экспериментов.

5.15. Оценка общей продукции коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса при действии АБК и ГК с помощью колориметрического анализа

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. 22). Срок культивирования с фитогормонами в данном эксперименте составлял 7 суток, что позволило выявить накопление анализируемых белков как вблизи поверхности фибробластов, так и внутри клеток. Коллагеновые и неколлагеновые белки матрикса выявлялись с помощью гистологических красителей Sirius Red и Fast Green соответственно. Красители, связавшиеся с коллагеновыми и неколлагеновыми белками внеклеточного матрикса, элюировали и затем анализировали оптическую плотность образцов. Для нормирования полученных значений на количество клеток использовали окрашивание гистологическим 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. 22, а и б). После культивирования фибробластов с ГК содержание коллагеновых белков внеклеточного матрикса, наоборот, снижалось на 21,0% (рис. 22, в). Содержание неколлагеновых белков также снижалось, но изменение было статистически недостоверным (рис. 22, г). Полученные данные свидетельствуют о том, что общая продукция коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами при действии АБК повышалась, а при действии ГК – снижалась, но статистически достоверные данные были получены только для коллагеновых белков.

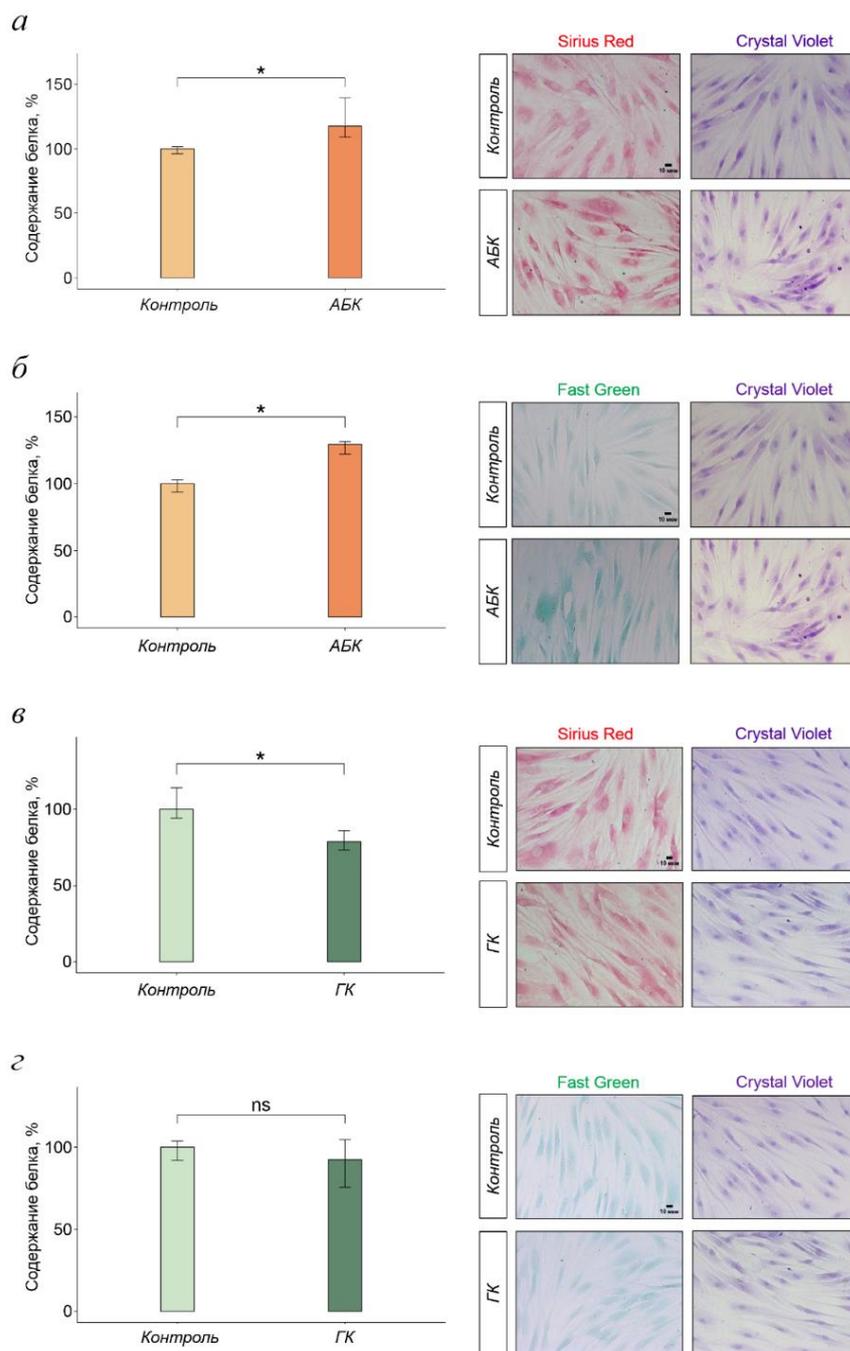


Рис. 22. Влияние 7-суточного культивирования с АБК и ГК на общую продукцию коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами. Представлены репрезентативные изображения окрашивания клеток Sirius Red (выявление коллагеновых белков матрикса), Fast Green (выявление неколлагеновых белков матрикса) и Crystal Violet (оценка количества клеток). *а* - Содержание коллагеновых белков после воздействия АБК; *б* - содержание неколлагеновых белков после воздействия АБК; *в* – содержание коллагеновых белков после воздействия ГК; *г* – содержание неколлагеновых белков после воздействия ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; ns – not significant (не значимо); * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 5 независимых экспериментов. Масштабный отрезок: 10 мкм.

5.16. Оценка уровня синтеза α -SMA и доли миофибробластов в популяции фибробластов при действии АБК и ГК

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 (Matsuzaki et al., 2015; Heindryckx et al., 2016; Chen et al., 2019a), поэтому была проведена оценка уровня синтеза α -SMA после 48-часового воздействия АБК и ГК с помощью вестерн-блоттинга (рис. 23, а, б). Как видно из рисунка 23, при действии АБК уровень синтеза α -SMA повышался на 38,5% (рис. 23, а), а при действии ГК – снижался на 5,4% (рис. 23, б).

В миофибробластах α -SMA встроен в их 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 иммуноцитохимического выявления α -SMA (рис. 23, в, г). Подсчёт миофибробластов (клеток, содержащих α -SMA-положительные фибриллы) показал, что при действии АБК доля миофибробластов возрастала в 1,5 раза (рис. 23, в), а при действии ГК – снижалась на 41,5% (рис. 23, г).

Таким образом, АБК стимулировала увеличение уровня синтеза α -SMA и количества миофибробластов в популяции дермальных фибробластов, а при действии ГК уровень синтеза α -SMA и количество миофибробластов уменьшалось.

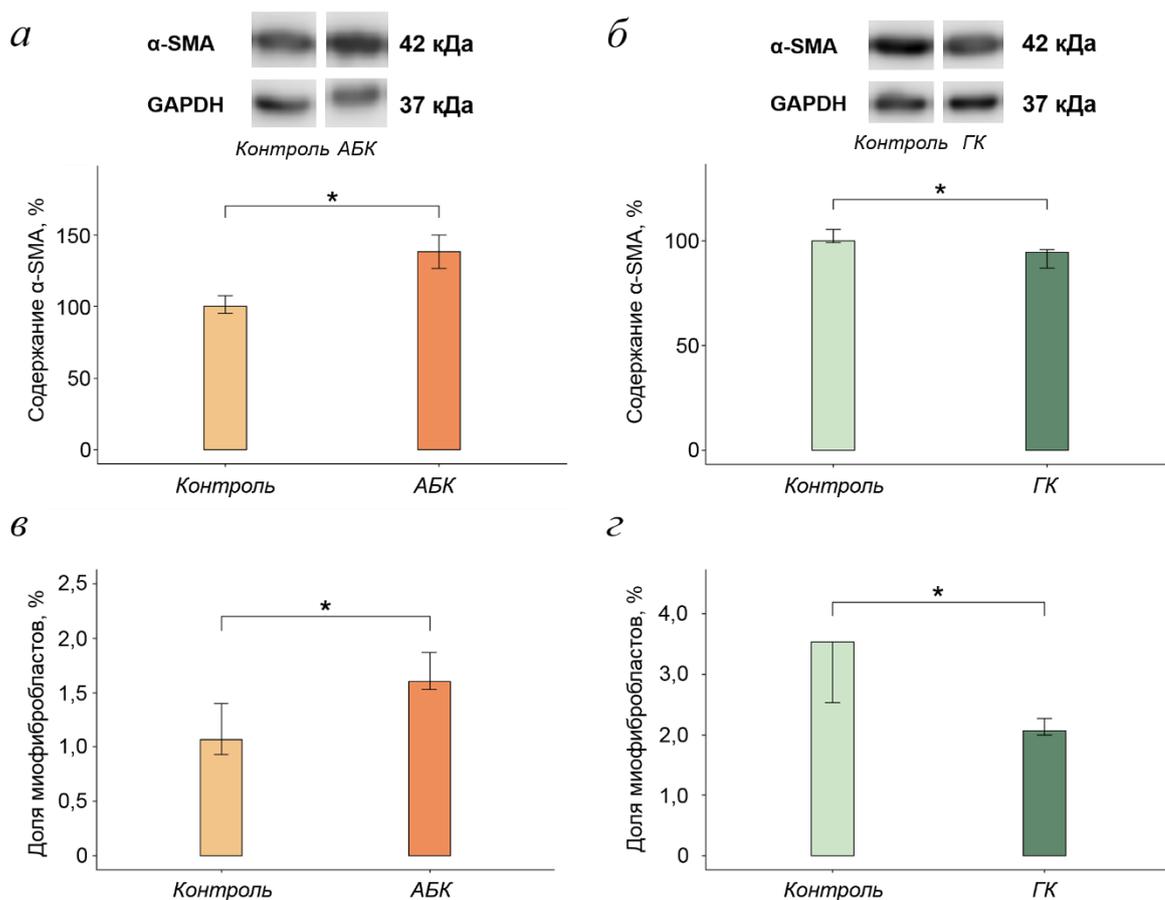


Рис. 23. Влияние 48-часовой инкубации с АБК и ГК на уровень синтеза α -SMA и долю миофибробластов в популяции дермальных фибробластов. *а* – Содержание α -SMA после воздействия АБК; *б* – содержание α -SMA после воздействия ГК; *в* - доля миофибробластов после воздействия АБК; *з* – доля миофибробластов после воздействия ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 5 независимых экспериментов.

Заключение: АБК и ГК не оказывают токсического влияния на дермальные фибробласты при длительном культивировании и однократном введении в среду культивирования. В концентрации 2 мМ и при воздействии в течение 24 часов АБК и ГК активируют в этих клетках экспрессию генов, кодирующих маркеры UPR (GRP78, ATF4 и CHOP), однако паттерны активации изученных генов у АБК и ГК различаются: при действии АБК повышается экспрессия *GRP78* и *ATF4*, а при действии ГК повышается экспрессия *CHOP*. В отличие от UPR, вызываемого индуктором стресса ЭПР ДТТ, UPR, вызываемый АБК и ГК, не сопровождается значительными морфологическими изменениями биосинтетической системы клеток, регистрируемыми на светооптическом уровне. Однако было замечено, что

культивирование дермальных фибробластов с АБК и ГК приводит к изменениям соотношения клеток с разным расположением аппарата Гольджи, что не связано с задержкой в той или иной фазе клеточного цикла. Обнаруженные нами при действии АБК и ГК морфологические изменения биосинтетической системы, регистрируемые на ультраструктурном уровне, пока нельзя интерпретировать как общие для всех клеток в популяции. Следует отметить, что при действии в течение 24 часов индуктор стресса ЭПР и UPR ДТТ вызывает реорганизацию актинового цитоскелета в фибробластах, что сопровождается сжатием клеток, изменением их формы и поверхности и не наблюдается при индукции UPR растительными гормонами. Следовательно, разные варианты индукции стресса ЭПР и UPR могут сопровождаться (или не сопровождаться) разными морфологическими изменениями не только мембранных органелл, но и цитоскелета.

В то же время, мы обнаружили влияние АБК и ГК на функциональную активность биосинтетической системы дермальных фибробластов. Несмотря на то, что с помощью иммуноцитохимического окрашивания мы не увидели изменений в распределении проколлагена I и фибронектина при действии АБК и ГК, с помощью ИФА мы обнаружили влияние АБК и ГК на секреторную активность дермальных фибробластов: АБК стимулировала секрецию проколлагена I и не влияла на секрецию фибронектина, а ГК стимулировала секрецию фибронектина и не влияла на секрецию проколлагена I. С помощью вестерн-блоттинга мы также обнаружили, что АБК вызывала повышение уровня синтеза белков внеклеточного матрикса – проколлагена I и фибронектина, а ГК достоверно индуцировала снижение уровня синтеза только проколлагена I. При исследовании общей продукции коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами мы установили, что при действии АБК повышалась общая продукция коллагеновых и неколлагеновых белков, а при действии ГК снижалась общая продукция коллагеновых белков. И, наконец, мы обнаружили, что АБК стимулировала увеличение уровня синтеза маркера миофибробластов α -SMA и количества миофибробластов в популяции дермальных фибробластов, а

при действии ГК уровень синтеза α -SMA и количество миофибробластов уменьшались.

Полученные данные свидетельствуют о том, что АБК стимулирует дифференцировку дермальных фибробластов в миофибробласты, повышая их секреторно-синтетическую активность и увеличивая долю миофибробластов в клеточной популяции. В свою очередь, ГК, напротив, подавляет секреторно-синтетическую активность дермальных фибробластов и снижает долю миофибробластов в клеточной популяции. Кроме того, оба фитогормона вызывают активацию UPR в дермальных фибробластах, имеющего, однако, разное происхождение и разный сигналинг, а также оказывающего противоположное влияние на дифференцировочный статус фибробластов.

6. ОБСУЖДЕНИЕ

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

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.

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.

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.

Турищева Е. П., Ашниева 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.

Растительные гормоны – это сигнальные молекулы различной химической природы, регулирующие рост и дифференцировку растений. Человек постоянно контактирует с растительными гормонами: они попадают в его организм в составе растительных продуктов и используются в сельском хозяйстве. Исследования показали, что фитогормоны могут оказывать разностороннее влияние на жизнеспособность и метаболизм клеток человека, в частности, фитогормоны АБК и ГК способны влиять на секреторно-синтетическую активность культивируемых клеток человека разного тканевого происхождения (мезенхимных стромальных клеток, β -клеток островков Лангерганса, энтероэндокринных клеток), а ГК также способна активировать UPR и дифференцировку в нормальных и опухолевых клетках эпидермоидного происхождения (Bruzzzone et al., 2008; Kasamatsu et al., 2012; Bruzzzone et al., 2015; Vildanova et al., 2021). Мы предположили, что АБК и ГК могут являться модуляторами секреторно-синтетической активности и дифференцировочного статуса фибробластов – клеток с высокой секреторной активностью, продуцирующих компоненты внеклеточного матрикса и при ранении дифференцирующиеся в миофибробласты с ещё более высокой секреторно-синтетической активностью. Избыточная дифференцировка фибробластов в миофибробласты вызывает фиброз, а пониженная активность миофибробластов и/или их недостаточное количество приводят к развитию незаживающих ран, при этом проблема терапии фиброза и хронических ран остаётся неразрешённой. В связи с этим целью настоящей работы являлось

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

6.1. АБК и ГК вызывают активацию UPR

Проведённые нами исследования показали, что фитогормоны АБК и ГК вызывают активацию UPR в дермальных фибробластах человека. UPR – это адаптивный ответ клетки на нарушение гомеостаза ЭПР, вызванное накоплением в ЭПР не свёрнутых и/или неправильно свёрнутых белков (Sicari et al., 2020; Турищева и др., 2022). Такое нарушение гомеостаза носит название «стресс ЭПР». Ранее было показано, что ГК вызывает активацию сигнальных путей UPR в культивируемых нормальных и опухолевых клетках эпидермоидного происхождения, повышая экспрессию генов, кодирующих основные маркеры стресса ЭПР и UPR (Vildanova et al., 2021) – шаперона люмена ЭПР *GRP78* и транскрипционных факторов *ATF4*, *sXBP1* и *CHOP*, повышающих экспрессию других генов, кодирующих белки ответа на стресс ЭПР (Турищева и др., 2022). Все транскрипционные факторы, активирующиеся в ходе стресса ЭПР и UPR, за исключением *CHOP*, повышают экспрессию генов ответа на стресс ЭПР, направленных на восстановление гомеостаза ЭПР и его свёртывающей способности. *CHOP* стимулирует стресс-опосредованную индукцию апоптоза.

Мы провели оценку уровня экспрессии *GRP78*, *ATF4*, *sXBP1* и *CHOP* при воздействии АБК и ГК на культивируемые дермальные фибробласты человека. Оказалось, что АБК повышает уровень экспрессии *GRP78* и *ATF4*, что свидетельствует об активации стресса ЭПР (UPR) в этих клетках. Насколько нам известно, это первые данные о способности АБК активировать стресс ЭПР (UPR) в культивируемых клетках человека. При этом АБК не повышала уровень экспрессии *sXBP1*. Это может быть связано с тем, что АБК не активирует или блокирует сигналинг по пути UPR, обозначаемому как IRE1–XBP1, а также с возможной активацией этого пути на более ранних сроках воздействия, а затем снижением его активности. Отсутствие повышения экспрессии гена *CHOP*

свидетельствует о том, что АБК не индуцирует стресс-опосредованный апоптоз, контролируемый *CHOP*, по крайней мере через 24 часа воздействия.

ГК тоже вызывала активацию UPR, о чём свидетельствует повышение уровня экспрессии *CHOP*. Однако значительного изменения уровня экспрессии генов, кодирующих другие маркеры стресса ЭПР, при её воздействии не наблюдалось, что может быть связано с активацией сигнальных путей UPR на более ранних сроках воздействия ГК и последующим снижением их активности. *CHOP* считается проапоптотическим фактором, однако с помощью МТТ-теста мы показали, что однократное введение в среду культивирования 2 мМ ГК не вызывает значительного снижения метаболической активности, отражающей жизнеспособность клеток, а, следовательно, и гибели, дермальных фибробластов при 24-часовом воздействии и на более поздних сроках, вплоть до 96 часов. По-видимому, фибробласты «справляются» со стрессом ЭПР, индуцированным ГК, без активации гибели клеток. Следует отметить, что в культивируемых нормальных и опухолевых клетках эпидермоидного происхождения ГК вызывала повышение экспрессии генов, кодирующих все исследованные маркеры стресса ЭПР и UPR – *GRP78*, *ATF4*, *sXBP1* и *CHOP* (Vildanova et al., 2021), следовательно, влияние АБК и ГК на клетки эпидермоидного и соединительнотканного происхождения различается.

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. Известно, что при активации сигнального пути, запускаемого АБК в клетках растений и животных, происходит усиленная продукция *sADPR* (Вильданова и Смирнова, 2016). *sADPR*, в свою очередь, стимулирует выход ионов кальция из ЭПР в цитозоль. Возможно, уменьшение количества кальция в люмене ЭПР, вызываемое АБК, достаточно для нарушения работы кальций-зависимых шаперонов ЭПР и активации стресса ЭПР.

6.2. Морфология органелл фибробластов, сопровождающая активацию UPR

В настоящее время накоплено много данных, касающихся молекулярных механизмов активации стресса ЭПР, сигнальных каскадов, ведущих к выживанию или гибели клеток, а также способов индукции стресса ЭПР (Osowski, Urano, 2011; Corazzari et al., 2017; Almanza et al., 2019; Chadwick and Lajoie, 2019; Турищева и др., 2022; Guo et al., 2022). Напротив, надёжные морфологические маркеры стресса ЭПР (UPR) до сих пор отсутствуют (Guo et al., 2022), и исследователи уделяют морфологическим изменениям клеток при стрессе ЭПР гораздо меньше внимания. Тем не менее, известно, что UPR может сопровождаться морфологическими изменениями ЭПР (Osowski and Urano, 2011). Так в лёгочных фибробластах человека линии MRC-5 при индукции стресса ЭПР тапсигаргином наблюдалось расширение цистерн ЭПР и их фрагментация (Ha et al., 2020). Расширение и фрагментация ЭПР на фоне стресса ЭПР также наблюдались в β -клетках островков Лангерганса у мышей с диабетом, не страдающих ожирением (Tersey et al., 2012). В β -клетках островков Лангерганса крысы линии BRIN-BD11 при индукции стресса ЭПР с помощью пальмитата также наблюдалось расширение цистерн ЭПР (Diakogiannaki et al., 2008). В гепатоцитах пациентов с хроническим нелеченым гепатитом С стресс ЭПР сопровождался расширением цистерн ЭПР и изменением распределения цистерн в цитоплазме (Asselah et al., 2010). Кроме того, морфологическим признаком UPR могут являться скрученные в виде концентрических колец мембранные структуры, формирующиеся из мембран ЭПР, которые в англоязычной литературе получили название «whorls» (Guo et al., 2022). Мы проверили, вызывают ли АБК и ГК, как индукторы UPR, изменения морфологии ЭПР, а также сравнили эти изменения с реакцией ЭПР на действие одного из распространённых химических индукторов UPR - ДТТ.

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 (Yorimitsu et al., 2006; Osowski and Urano, 2011; Ren et al., 2018). Формирование дисульфидных связей (дисульфидных мостиков) - одна из основных модификаций белков,

синтезированных в ЭПР (Feige and Hendershot, 2011). Помимо обеспечения структурной укладки белков, то есть структурной роли, дисульфидные связи вовлечены в ферментативный катализ, регулирование активности белков, защиту белков от окислительных повреждений, а также облегчают транслокацию белков через мембраны (Weiss et al., 2022). В клетках человека дисульфидные связи присутствуют преимущественно в секретируемых белках и во внеклеточных доменах мембранных белков, поскольку эти белки не могут полагаться на шапероны цитоплазмы для поддержания их в свёрнутом состоянии, а дисульфидные связи повышают общую термодинамическую стабильность белков и делают их менее восприимчивыми к денатурации или деградации и более устойчивыми к перепадам температур (Weiss et al., 2022). По оценкам, в клетках человека 30-40% всех клеточных белков (около 7000) предназначены для секреторного пути, и из них примерно 80% содержат дисульфидные связи. Структурные дисульфидные связи также присутствуют в цитозольных (например, супероксиддисмутаза, SOD1) и митохондриальных белках (например, во многих белках межмембранного пространства). Межмембранное пространство содержит значительно меньше белков, чем секреторный путь. Тем не менее, из 150 белков межмембранного пространства, идентифицированных к настоящему времени с помощью протеомных подходов, около 80% содержат консервативные цистеины, многие из которых содержатся в дисульфидных связях зрелых белков (Weiss et al., 2022). При этом в цитозольных белках дисульфидные связи практически отсутствуют (Chang and Fu, 2023). Таким образом, ДТТ нарушает сворачивание преимущественно секреторных белков, синтезируемых в ЭПР.

Оказалось, что при действии ДТТ в фибробластах на светооптическом уровне наблюдались изменения морфологии ЭПР, характерные для клеток в состоянии стресса ЭПР - фрагментация сети ЭПР на мелкие цистерны. Мы не обнаружили эти изменения на ультраструктурном уровне, так как для выявления таких изменений нужно проводить 3D-реконструкцию клеток, что не входило в наши задачи. Кроме этого, ДТТ вызывал реорганизацию актинового цитоскелета в фибробластах, что сопровождалось сжатием клеток, изменением их формы и поверхности,

уменьшением площади распластывания и числа фокальных контактов. Изменение формы клеток при действии индукторов стресса ЭПР не считается характерным морфологическим признаком стресса ЭПР и UPR, однако есть данные о поджатию нормальных и опухолевых клеток при действии некоторых индукторов стресса ЭПР, имеющих разный механизм активации стресса ЭПР. Так, например, изменение формы и уменьшение площади распластывания было замечено при воздействии туникамицина на нормальные и трансформированные фибробласты (Kohno et al., 1979), тапсигаргина на клетки нейробластомы (Földi et al., 2013) и бортезомиба на клетки эндотелия HUVEC (Belloni et al., 2010) и опухолевые клетки яичника (Brüning et al., 2009). Однако механизмы таких изменений формы до сих пор неизвестны. Показано также, что клетки линии HeLa при действии ДТТ приобретают округлую форму (Xiang et al., 2016), а в клетках почки собаки линии MDCK II нарушается структура адгезивных контактов, что приводит к поджатию клеток (Brückner and Janshoff, 2018).

Следует отметить, что актин и винкулин относятся к цитозольным белкам и, по-видимому, не имеют дисульфидных связей в своей структуре (Ziegler et al., 2006; Jahed et al., 2015). Поэтому реорганизация актинового цитоскелета и уменьшение количества фокальных контактов в фибробластах после действия ДТТ, скорее всего, не связаны с влиянием ДТТ на структуру актина и винкулина. Однако нельзя исключать вероятность того, что ДТТ может оказывать влияние, не связанное с восстановлением дисульфидных связей белков. Например, была обнаружена способность ДТТ связываться с белками в отсутствие цистеиновых остатков (Alliegro, 2000). В этом случае возможно, что ДТТ нарушает функционирование белков, участвующих в сборке актина, в частности шаперонинов (Balchin et al., 2018), или контролирующих состояние актиновой сети, то есть актин-связывающих белков. Так, например, в мышечных фибробластах линии NIH-3T3 ингибитор Arp2/3 (Actin Related Protein 2/3 complex) СК666 вызывал переход сети актина в фибриллы в кортикальной зоне, а ингибитор формина SMIFH2 вызывал исчезновение стресс-фибрилл (Eghiaian et al., 2015). При действии ДТТ на фибробласты в нашем исследовании пучки актина, часть из которых,

по-видимому, представляет собой стресс-фибриллы, отсутствовали или становились менее выраженными. Возможно, ДТТ прямо или косвенно подавлял работу формина, который участвует в формировании стресс-фибрилл.

Кроме того, возможно, ДТТ влияет на дисульфидные связи, не участвующие в укладке белков, а играющие регуляторную роль. Так, например, дисульфидные связи нужны для стабилизации и функционирования комплекса из SUN- (Sad-1 and Unc) и KASH- (Klarsicht, ANC-1, Syne Homology) белков (Jahed et al., 2015). Белки SUN располагаются на внутренней мембране ядра и содержат SUN-домен в перинуклеарном пространстве и нуклеоплазматический домен, связанный с ламинной ядра и теломерами. Белки KASH находятся на внешней мембране ядра и содержат KASH-домен в перинуклеарном пространстве и цитоплазматический домен, связанный с белками цитоскелета, в частности актином. Таким образом, комплекс SUN-KASH связывает ламину ядра с актиновым цитоскелетом и фокальными контактами и обеспечивает передачу сигнала (механотрансдукцию) между цитоскелетом ядра и цитоскелетом цитоплазмы (Jahed et al., 2015). Можно предположить, что ДТТ вызывает нарушение взаимодействия между SUN и KASH и механотрансдукцию, что оказывает влияние на организацию актина и количество фокальных контактов.

Интересно, что ДТТ вызывал активацию эндогенной трансглутаминазы в изолированных артериолах крыс, что приводило к вазоконстрикции (сжатию артериол) за счёт перестройки актинового цитоскелета (Castorena-Gonzalez et al., 2014). По-видимому, эндогенные трансглутаминазы действительно вызывают реорганизацию актина в клетках артериол, однако пока неизвестно, какие посредники участвуют в такой активации и как именно ДТТ активирует трансглутаминазу. Тем не менее, эти данные позволяют предположить, что перестройки актинового цитоскелета в фибробластах при культивировании с ДТТ также вызваны активацией трансглутаминазы под действием ДТТ.

В отличие от ДТТ изменений морфологии ЭПР и организации актиновых филаментов в фибробластах при действии АБК и ГК в течение 24 часов на светооптическом уровне мы не увидели. Также АБК и ГК не вызывали

изменение формы клеток. Однако при анализе состояния аппарата Гольджи с помощью иммуноцитохимии мы обнаружили, что АБК и ГК оказывают влияние на его морфологию, вызывая перераспределение аппарата Гольджи относительно ядра. Это может свидетельствовать о частичной дезинтеграции аппарата Гольджи под воздействием этих фитогормонов. Оценка распределения популяции фибробластов по фазам клеточного цикла и анализ состояния микротрубочек и актинового цитоскелета после культивирования с АБК и ГК показал, что изменение морфологии аппарата Гольджи не связано ни с задержкой в той или иной фазе клеточного цикла, ни с изменением состояния цитоскелета. В этом случае возможными мишенями АБК и ГК могут являться белки, участвующие в поддержании структурной целостности аппарата Гольджи (гольджины), например, GRASP65 (Golgi reassembly and stacking proteins), джиантин (giantin), GM130 и GCC88 (Lowe, 2011; Makhouf et al., 2019; Petrosyan, 2019). Сходная с обнаруженной нами дезинтеграция аппарата Гольджи наблюдалась при воздействии ингибитора трафика белков АМФ-26 - производного октагидронафталина, вызывающее дезинтеграцию аппарата Гольджи путём ингибирования малых ГТФ-аз Arf, что подавляет антероградный транспорт в аппарат Гольджи (Ignashkova et al., 2017). АМФ-26 вызывал перераспределение аппарата Гольджи из плотной шапочки в рыхлую сеть вокруг ядра в опухолевых клетках человека линий А549 (аденокарцинома лёгких), HeLa (карцинома шейки матки) и 786-О (карцинома почек). Нарушение трафика белков между ЭПР и аппаратом Гольджи при воздействии АМФ-26 приводило к развитию стресса ЭПР и активации UPR. Можно предположить, что АБК и ГК подавляют антероградный транспорт в аппарат Гольджи, воздействуя на поддерживающие его механизмы, и тем самым вызывают обнаруженную нами активацию UPR, то есть активация UPR является следствием стресса ЭПР, вызванного воздействием фитогормонов на функционирование аппарата Гольджи фибробластов.

Кроме того, перераспределение аппарата Гольджи может быть следствием стресса ЭПР или стресса самого аппарата Гольджи (то есть нарушения нормального функционирования аппарата Гольджи из-за нарушения его

гомеостаза), вызванного не свёрнутыми и неправильно свёрнутыми белками в ЭПР или аппарате Гольджи (Serebrenik et al., 2018; Petrosyan, 2019). В связи с этим можно предположить, что сходное перераспределение (дезинтеграция) аппарата Гольджи при действии АБК и ГК является следствием стресса ЭПР или Гольджи, активируемого АБК и/или ГК. При этом дальнейшая активация UPR у АБК и ГК различается по сигналингу, что приводит к различному влиянию этих фитогормонов на секреторно-синтетическую активность фибробластов.

Перераспределение аппарата Гольджи может влиять на секреторную активность клеток, причём в зависимости от типа действующего агента, его концентрации и типа клеток может наблюдаться как усиление секреции, так и её подавление (Ignashkova et al., 2017). В наших экспериментах перераспределение аппарата Гольджи, наблюдаемое через 24 часа воздействия АБК и ГК, не сопровождалось изменением морфологии аппарата Гольджи на ультраструктурном уровне и изменением его секреторной активности. Однако секреторная активность менялась через 48 часов воздействия фитогормонов, причём эффект АБК и ГК различался: АБК стимулировала секрецию проколлагена, а ГК – фибронектина, хотя оба фитогормона вызывали сходное воздействие на перераспределение аппарата Гольджи через 24 часа воздействия. Иммуноцитохимическое выявление аппарата Гольджи через 48 и более часов воздействия АБК и ГК позволило бы определить, меняется ли в дальнейшем морфология аппарата Гольджи, сохраняется ли эффект перераспределения аппарата Гольджи при более длительных сроках инкубации с фитогормонами и различается ли он у АБК и ГК.

Необходимо ещё раз отметить, что вызываемое АБК и ГК перераспределение аппарата Гольджи относительно ядра в фибробластах не сопровождалось изменениями его ультраструктурного состояния. В то же время в иммортализованных кератиноцитах линии HaCaT воздействие АБК и ГК приводило к увеличению площади аппарата Гольджи и расширению его цистерн, детектируемому на ультраструктурном уровне (Вильданова и др., 2014).

Следовательно, действие АБК и ГК на аппарат Гольджи в клетках разного происхождения различается.

Хотелось бы отметить, что АБК и ГК вызывали определённые морфологические изменения на ультраструктурном уровне, хотя метод ТЭМ не позволяет оценить распространённость данного эффекта в клеточной популяции. Интерес представляет большое количество везикул со скрученными мембранами внутри («whorls»), обнаруженных в некоторых клетках при действии АБК. Эти везикулы (по крайней мере некоторые из них) могут представлять собой аутофагосомы, идентифицируемые по наличию двойной мембраны. Интересно, что при индукции стресса ЭПР туникамицином и тапсигаргином в клетках нейробластомы человека линии SK-N-SH (Ogata et al., 2006) часто наблюдали аутофагосомы, содержащие мультимембранные структуры (multi-lamellar structures), по морфологии сходные с наблюдаемыми нами в дермальных фибробластах.

Кроме того, сходные мультимембранные структуры были обнаружены и у дрожжей при обработке ДТТ и туникамицином (Bernales et al., 2007; Schuck et al., 2014). При этом было показано, что мембраны, составляющие эти мультимембранные структуры, являются мембранами ЭПР, впоследствии деградирующими в вакуоли (лизосоме дрожжей) путём инвагинации её мембраны (Schuck et al., 2014). Этот процесс был назван авторами ЭПР-фагией (ER-phagy) (Schuck et al., 2014). Однако в этих работах авторы отмечали значительную гипертрофию ЭПР, вызванную стрессом этой органеллы, в то время как в нашем исследовании при воздействии АБК на клетки в течение 24 часов гипертрофии ЭПР отмечено не было.

Считается, что аутофагосомы, образующиеся при ЭПР-фагии, селективно включают мембраны ЭПР, и двойная мембрана самой аутофагосомы отчасти образована мембраной ЭПР (Song et al., 2017). Скрученные мембраны, которые составляют везикулы, обнаруженные в нашем исследовании, сходны между собой, и промежутки между ними практически не отличаются. Кроме того, на этих

мембранах встречаются рибосомы. Можно предположить, что данные везикулы являются примером ЭПР-фагии.

Наконец, «whorls» могут быть одним из вариантов ответа клеток на стресс ЭПР (Xu et al., 2021). Так, например, при воздействии индукторов стресса ЭПР тапсигаргина, ДТТ и циклопиазоновой кислоты, но не туникамицина, на клетки эпителия почки крысы наблюдалось зависимое от дозы образование «whorls» из мембран ЭПР. Причём для образования «whorls» была необходима киназная активность PERK (при нокдауне PERK «whorls» не образовывались), которая запускала образование предшественников «whorls», содержащих резидентные белки ЭПР. Образование «whorls» опосредовалось механизмом COPII, который облегчал почкование мембраны ЭПР с образованием трубчато-везикулярных предшественников. В свою очередь, формирование предшественников инициировалось рекрутированием ГТФ-азы Sar1. Затем предшественники проходили через опосредованное Sec22b слияние с образованием «whorls». На мембранах «whorls» не было рибосом, но были обнаружены транслоконы и PERK, причём PERK сортировался в «whorls» при стрессе ЭПР. Было сделано предположение, что эти структуры вносят вклад в подавление трансляции путём регулирования активности PERK и секвестрирования комплексов транслоконов. Следует отметить, что образование «whorls» было обратимо, причём их исчезновение не было опосредовано макроаутофагией или микроаутофагией (Xu et al., 2021). Дозозависимое образование «whorls» также наблюдалось в клетках почки человека линии HEK293T при действии индукторов стресса ЭПР тапсигаргина, ДТТ, активатора PERK МК-28, пальмитиновой кислоты, ингибитора Na^+/K^+ -АТФазы буфалина и ингибитора p97 СВ-5083 (Guo et al., 2022). Внутри были обнаружены неправильно свёрнутые и агрегированные белки.

Интересно, что в ходе дифференцировки миобластов происходит временное снижение концентрации кальция в ЭПР, что приводит к образованию структур типа «whorls» *in vitro* и *in vivo* (Nakanishi et al., 2015). Эти структуры имеют размер 1-4 мкм и представляют собой цистерны гранулярного ЭПР, свёрнутые в концентрические кольца. Одна структура содержит 4–10 свёрнутых в кольцо

цистерн ЭПР, расположенных почти на одинаковом расстоянии друг от друга. Они появляются в миообластах на третий день дифференцировки, а исчезают уже после слияния миобластов. Сходные структуры, но со свободным пространством в центре (иногда заполненным органеллами), наблюдаются в пролиферирующих миообластах при индукции стресса ЭПР с помощью ингибиторов кальциевых АТФаз – тапсигаргина и циклопиазоновой кислоты. Возможно, появление таких структур стимулируется снижением концентрации кальция в люмене ЭПР, что может послужить объяснением образования «whorls» в фибробластах при действии АБК, так как при действии АБК также происходит снижение концентрации кальция в люмене ЭПР (Вильданова и Смирнова, 2016).

Таким образом, наблюдаемые нами при действии АБК структуры типа «whorls» могут быть связаны с индукцией стресса ЭПР напрямую или опосредованно.

ГК не стимулировала образование «whorls», однако вызывала расширение цистерн ЭПР в дермальных фибробластах, по крайней мере в некоторых клетках. Расширение цистерн ЭПР является одним из морфологических признаков стресса ЭПР. Так, ранее нашей научной группой было показано, что растительный гормон жасмоновая кислота индуцирует стресс ЭПР и вызывает расширение цистерн ЭПР в иммортализованных кератиноцитах человека линии HaCaT (Вильданова и др., 2019).

Расширение цистерн ЭПР также может быть связано с ингибированием секреции продуктов синтеза из клеток. Так, моновалентный ионофор монензин ингибирует секрецию проколлагена и фибронектина в фибробластах кожи человека линии CRL 1220 (Ledger et al., 1980). В клетках, подвергшихся воздействию монензина, наблюдается сильно выраженное расширение цистерн ЭПР. Однако при действии монензина изменяется также ультраструктура аппарата Гольджи: в зоне, где в контрольных клетках располагается аппарат Гольджи, при воздействии монензина выявляются крупные везикулы, а типичные для данной органеллы стопки цистерн не обнаруживаются. При исследовании аппарата Гольджи дермальных фибробластов после воздействия ГК нами не были

обнаружены такие изменения аппарата Гольджи. В связи с этим можно предположить, что наблюдаемое нами расширение ЭПР при действии ГК не связано с ингибированием секреции. Обнаруженное в ходе дальнейшего исследования снижение секреторно-синтетической активности и повышение уровня экспрессии гена маркера стресса ЭПР СНОР в фибробластах при действии ГК свидетельствует о том, что расширение цистерн ЭПР при действии ГК в этих клетках является морфологическим проявлением стресса ЭПР.

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.

6.3. Влияние АБК и ГК на секреторно-синтетическую активность фибробластов

Несмотря на отсутствие значимых морфологических изменений компонентов секреторно-синтетической системы, наши данные свидетельствуют о том, что АБК и ГК оказывают влияние на функциональную активность дермальных фибробластов. 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. Это может быть связано с тем, что дермальные фибробласты отвечают на действие ГК выбросом синтезированного фибронектина, однако синтез новых молекул фибронектина подавляется. Возможно, выход фибронектина в культуральную среду обусловлен тем, что ГК оказывает влияние на секреторный путь фибронектина, который, как известно, отличается от секреторного пути

проколлагена I (Albacete-Albacete et al., 2021). Проколлаген I транспортируется из ЭПР в аппарат Гольджи в составе COPII-везикул, которые формируются при участии белка TANGO1 (transport and Golgi organization protein 1). Далее в аппарате Гольджи проколлаген I сортируется в тубулярные структуры, которые направляются к плазматической мембране. Секреторный путь фибронектина до сих пор полностью не изучен (Albacete-Albacete et al., 2021). Известно, что он не зависит от белков COPII и TANGO1. Предполагается, что в транспорте фибронектина из ЭПР участвуют периостин и трансмембранный P24 транспортный белок 2 (TMED2), а далее фибронектин транспортируется к плазматической мембране при участии мультивезикулярных телец и секретируется во внеклеточную среду в составе внеклеточных везикул (Albacete-Albacete et al., 2021). Возможно, ГК ускоряет транспорт фибронектина из ЭПР или воздействует на формирование внеклеточных везикул и их слияние с плазматической мембраной.

Полученные нами данные указывают на то, что АБК и ГК прямо или косвенно влияют на синтез проколлагена I и фибронектина и, возможно, других коллагеновых и неколлагеновых белков в дермальных фибробластах, причём это влияние носит противоположный характер. Косвенное влияние этих фитогормонов может быть обусловлено регуляцией экспрессии генов дифференцировки фибробластов в миофибробласты, так как для миофибробластов характерна повышенная секреторно-синтетическая активность, в частности повышенный уровень синтеза проколлагена I и фибронектина (Desai et al., 2014).

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.

В литературе есть данные об уменьшении уровня синтеза и отложения коллагена I фибробластами при действии АБК (Bruzzzone et al., 2012a; Chen et al., 2021). Однако в этих работах исследовали влияние АБК в более низких концентрациях и на фибробласты из зон фиброза. Поэтому мы полагаем, что наши данные не противоречат данным литературы, а дополняют их.

Следует отметить, что при индукции UPR в ходе дифференцировки клеток с высокой секреторной активностью (миофибробластов, остеобластов, адипоцитов, В-лимфоцитов) или запуске дифференцировки этих клеток с помощью химических индукторов стресса ЭПР следствием UPR является активация секреторно-синтетической активности клеток (Tellier et al., 2016; Nguyen et al., 2019; Турищева и др., 2022). Стресс ЭПР (UPR), участвующий в физиологических процессах, таких как дифференцировка, врождённый иммунитет, метаболизм глюкозы и липидов, называют «физиологическим» стрессом ЭПР (Hetz, 2012; Турищева и др., 2022). Физиологический тип активации UPR, по-видимому, является адаптивным механизмом, направленным на стимуляцию выживания клеток и эффективное функционирование ЭПР, в частности на адаптацию к большому объёму синтезируемых белков в клетках с высокой синтетической активностью (Турищева и др., 2022).

Запуск стресса ЭПР выше физиологического уровня вызывает сильный UPR, который не позволяет клеткам уйти в дифференцировку, так как ресурсы таких клеток направлены на выживание (Турищева и др., 2022). Такой стресс ЭПР называют «патологическим», он вызывает подавление секреторно-синтетической активности клеток и может даже приводить к их гибели. Патологическая форма UPR возникает в ответ на неблагоприятные условия, такие как гипоксия, гипергликемия, вирусная инфекция или окислительный и механический стресс. Подтверждение предположения о двух формах UPR было получено в работе Longo et al. (Longo et al., 2016), показавших, что стресс ЭПР и UPR «физиологически» активируются в ходе адипогенеза преадипоцитов мыши линии 3T3-L1, а «патологическая» часть стресса ЭПР, вызванная глюкотоксическим воздействием глюкозамина, ингибирует их дифференцировку. Индукция дифференцировки

преадипоцитов в присутствии индуктора стресса ЭПР тапсигаргина вызывала значительно более высокую активацию UPR, чем при физиологически индуцированном адипогенезе. Такая гиперактивация UPR сопровождалась снижением экспрессии генов-маркёров адипоцитов (*C/EBP α* , *PPAR γ 2*, *FABP4/AP2*) и ингибированием адипогенеза. Сходным эффектом обладал и другой индуктор стресса ЭПР – глюкозамин, способный активировать гексозаминовый биосинтетический путь, вовлечённый во многие отрицательные эффекты гипергликемии. Интересно, что добавление химического шаперона 4-РВА в концентрации 50 мкМ в дифференцировочную среду вместе с глюкозамином не ингибировало «физиологическое» повышение экспрессии *GRP78* и *CHOP* при дифференцировке адипоцитов, но снимало ингибирующий эффект глюкозамина на адипогенез (Longo et al., 2016). При этом ранее было показано, что 10–20 мМ 4-РВА ингибирует дифференцировку адипоцитов (Bassery et al., 2009). Как полагают Longo et al., такое различие связано с тем, что в высокой концентрации 4-РВА полностью подавляет «физиологический» стресс ЭПР, необходимый для нормальной дифференцировки адипоцитов, в частности, для адаптации ЭПР к повышенному синтезу белка в ходе дифференцировки. В низкой концентрации этот химический шаперон ингибирует только «патологический» стресс ЭПР.

Аналогично, при запуске физиологического стресса ЭПР индукторы стресса ЭПР могут стимулировать остеогенез (Shi et al., 2017). Так, например, в первичных остеобластах мышцы и мезенхимных стволовых клетках костного мозга крысы тапсигаргин повышает уровни синтеза маркеров дифференцировки остеокальцина (OCN) и костного сиалопротеина (BSP) (Shi et al., 2017). При этом использование более высокой дозой тапсигаргина вызывает повышенный (патологический) стресс ЭПР, который подавляет остеогенез и индуцирует апоптоз.

Таким образом, следствием UPR может быть как усиление, так и подавление секреторно-синтетической активности клеток в зависимости от типа стимула и его силы. В связи с этим можно предположить, что стресс ЭПР (UPR), индуцируемый АБК, является физиологическим, так как при нём секреторно-синтетическая

активность фибробластов усиливается. При этом UPR, индуцируемый ГК в фибробластах, может относиться к патологическому UPR, так как при нём секреторно-синтетическая активность фибробластов падает.

6.4. Влияние АБК и ГК на дифференцировку фибробластов

Фибробласты способны дифференцироваться в миофибробласты – клетки с повышенной секреторно-синтетической активностью, в частности с повышенным уровнем синтеза проколлагена I и фибронектина (Desai et al., 2014; Kendall and Feghali-Bostwick, 2014; Matsuzaki et al., 2015). Изменение секреторно-синтетической активности дермальных фибробластов при действии АБК и ГК, установленное в нашем исследовании, может быть связано с изменением количества миофибробластов в популяции дермальных фибробластов. Действительно, проведённый нами анализ уровня синтеза основного маркера миофибробластов – α -SMA, а также подсчёт количества миофибробластов в популяции фибробластов показал, что АБК вызывает повышение уровня синтеза α -SMA и количества миофибробластов. Эти данные коррелируют с данными о повышении секреторно-синтетической активности в популяции дермальных фибробластов при действии АБК. ГК, в свою очередь, снижала уровень синтеза α -SMA и количество миофибробластов, что коррелирует со снижением секреторно-синтетической активности в популяции дермальных фибробластов при действии этого фитогормона. 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.

Для того, чтобы выяснить, чем вызвано такое снижение количества миофибробластов при действии ГК – подавлением дифференцировки фибробластов в миофибробласты, гибелью миофибробластов или

де-дифференцировкой миофибробластов необходимо проведение дополнительных экспериментов, связанных с отслеживанием происхождения и судьбы отдельных клеток на протяжении длительного периода времени (lineage-tracing). Например, используя схему с технологией Cre-LoxP рекомбинации, предложенную авторами исследования де-дифференцировки β -клеток островков Лангерганса (Talchai et al., 2012). Для этого нужно внести в постоянно экспрессирующие GFP (и, следовательно, имеющие зелёное свечение при стимуляции синим светом в конфокальном микроскопе) фибробласты генетическую конструкцию, содержащую рекомбиназу Cre под промотором α -SMA и LoxP-сайты, ограничивающие стоп-последовательность, которая препятствует экспрессии Rosa-GFP (белок Rosa-GFP имеет красное свечение). Клетки, в которых активировалась экспрессия α -SMA, будут экспрессировать и Cre-рекомбиназу, которая, в силу своих свойств, вырежет по LoxP-сайтам стоп-последовательность, препятствующую экспрессии Rosa-GFP и, как следствие, красному свечению клеток. В результате клетки, в которых экспрессируется α -SMA, будут синтезировать и зелёный, и красный флуоресцентный белок, поэтому при наложении изображений, полученных на конфокальном микроскопе с использованием фильтров, пропускающих зелёную и красную флуоресценцию, будут жёлтого цвета. Соответственно, если после культивирования с ГК миофибробласты будут терять красное свечение и становиться зелёными вместо жёлтых, значит в данных клетках прекратилась экспрессия α -SMA и началась де-дифференцировка. Если количество жёлтых клеток будет уменьшаться, значит происходит избирательная гибель миофибробластов. Если количество жёлтых клеток перестанет увеличиваться, значит происходит подавление дифференцировки фибробластов в миофибробласты.

Известно, что сигнальные пути UPR участвуют не только в восстановлении гомеостаза ЭПР, но и играют ключевую роль в дифференцировке клеток разного тканевого происхождения, в том числе и фибробластов (Baek et al., 2012; Matsuzaki et al., 2015; Heindryckx et al., 2016; Chen et al., 2019a; Турищева и др., 2022). Наши данные о стимуляции дифференцировки фибробластов в миофибробласты

при действии АБК свидетельствуют о том, что UPR предшествует дифференцировке или сопровождает дифференцировку, индуцированную АБК. Кроме того, это даёт основание полагать, что АБК может запускать эту дифференцировку, активируя UPR.

По данным литературы, при индукции дифференцировки фибробластов в миофибробласты с помощью TGF- β и 1%-ного экстракта сигаретного дыма наблюдается повышение уровня синтеза GRP78 и sXBP1, но не CHOP (Baek et al., 2012; Song et al., 2019). Исследования уровня синтеза ATF4 в этих работах не проводилось, однако показано, что нокдаун гена, кодирующего PERK, мишенью которой является ATF4, подавляет дифференцировку фибробластов в миофибробласты (Chen et al., 2019a). Таким образом, полученные нами данные о повышении уровня экспрессии *GRP78* и *ATF4*, но не *CHOP*, при индукции дифференцировки фибробластов в миофибробласты соответствуют данным литературы. Отличия в данных по уровню экспрессии *sXBP1* в литературе и нашем исследовании могут быть связаны с тем, что сигнальные пути активации UPR при действии АБК отличаются от таковых при действии других индукторов дифференцировки.

В свою очередь, повышение экспрессии только *CHOP* при воздействии ГК вместе с данными о снижении секреторно-синтетической активности и количества миофибробластов в популяции фибробластов свидетельствуют о том, что индуцируемый ГК UPR в дермальных фибробластах связан не с активацией дифференцировки и секреторно-синтетической активности клеток, а с подавлением этих процессов.

Ранее было показано, что ГК индуцирует стресс ЭПР (UPR) и дифференцировку в нормальных и опухолевых клетках человека эпидермоидного происхождения (Vildanova et al., 2021). По-видимому, влияние ГК на дифференцировочный статус клеток разного происхождения различается. В свою очередь, данные об активации стресса ЭПР (UPR) параллельно с дифференцировкой при воздействии АБК в литературе отсутствуют. Было обнаружено стимулирующее влияние АБК на дифференцировку

предшественников мегакариоцитов при индукции их дифференцировки стандартной дифференцировочной смесью (Huang et al., 2021), однако индукция стресса ЭПР в этом процессе не изучалась, хотя показано участие стресса ЭПР в тромбоцитопоэзе (Kovuru et al., 2020).

Следует отметить, что результат влияния исследуемых факторов на дифференцировочный статус популяции фибробластов (или миофибробластов) *in vitro* часто оценивается через 4 и более суток воздействия этих факторов (Hinz et al., 2003; Desai et al., 2014; Basalova et al., 2020). Однако предметом нашего исследования была возможность именно индукции изменений дифференцировочного статуса популяции фибробластов (или миофибробластов) с помощью АБК и ГК с учётом того, что UPR, необходимый для дифференцировки фибробластов в миофибробласты (Baek et al., 2012; Турищева и др., 2022), активировался уже через 24 часа культивирования фибробластов в присутствии фитогормонов. Поэтому исследование уровня синтеза α -SMA и количества миофибробластов в популяции фибробластов при культивировании в присутствии АБК и ГК более, чем 2 суток, мы не проводили, однако предполагаем сделать это в ходе дальнейших исследований. Полученные нами данные подтвердили активацию синтеза маркера дифференцировки α -SMA и его встраивание в стресс-фибриллы фибробластов при действии АБК и подавление этих процессов при действии ГК, однако вполне возможно, что через 4 суток культивирования с АБК и ГК эти эффекты станут более выраженными, в частности новосинтезированный α -SMA встроится в стресс-фибриллы большего количества фибробластов, что приведёт к увеличению разницы между долей миофибробластов в контроле и при действии АБК.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы показали, что фитогормоны АБК и ГК вызывают активацию UPR в культивируемых дермальных фибробластах человека, имеющего, однако, разное происхождение и разный сигналинг. Более того, АБК стимулирует дифференцировку дермальных фибробластов в миофибробласты, повышая их секреторно-синтетическую активность и уровень синтеза маркера миофибробластов α -SMA. В свою очередь, ГК, напротив, подавляет секреторно-синтетическую активность дермальных фибробластов и снижает уровень синтеза маркера миофибробластов α -SMA. Это даёт основание полагать, что АБК и/или ГК могут стать агентами коррекции секреторно-синтетической активности и дифференцировочного статуса фибробластов, что может быть использовано при разработке подходов для нормализации секреторной активности и коррекции уровня дифференцировки фибробластов при фиброзе и нарушении заживления ран. Например, 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. При этом следует обратить внимание как на возможность введения АБК в рану в составе лекарственных препаратов для стимуляции дифференцировки фибробластов пациента в миофибробласты, так и на активацию дифференцировки аллогенных фибробластов *in vitro* с последующим введением полученных миофибробластов в рану (Ko et al., 2019).

До сих пор не существует клинически одобренных методов предотвращения формирования рубцов (терапии рубцов), специально разработанных для ограничения или предотвращения фиброза кожи (Tai et al., 2021). Предлагаемые стратегии лечения включают в себя резекцию рубца или уменьшение его размера, использование методов тканевой инженерии, использование антител и лекарственную терапию, направленную, в частности, на блокирование дифференцировки фибробластов. В связи с этим 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. Поэтому мы считаем важным детальное изучение механизмов действия разных фитогормонов на пути активации UPR, тем более что разные фитогормоны, вызывая стресс ЭПР (UPR), оказывают противоположный эффект на дифференцировочный статус разных типов клеток (Vildanova et al., 2021). Особенно интересным представляется исследование потенциальной способности ГК снижать уровень синтеза маркера миофибробластов α -SMA в популяции дермальных фибробластов на моделях фиброза *in vitro* и *in vivo*.

8. 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.

9. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

9.1. Статьи

1. **Турищева Е. П.**, Ашниева 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 приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.*

9.2. Тезисы докладов

1. **Турищева Е. П.**, Вильданова М. С., Вишнякова П. А., Матвеева Д. К., Онищенко Г. Е., Смирнова Е. А. Влияние растительных гормонов на секреторно-синтетическую активность дермальных фибробластов человека // Гены и Клетки - Материалы V Национального Конгресса по Регенеративной Медицине. Москва, 23–25 ноября 2022 года. — Т. 17 из *Материалы V Национального Конгресса по Регенеративной Медицине. Москва, 23–25 ноября*

- 2022 года. — Институт Стволовых Клеток Человека Россия Москва: 2022. — С. 233–234.
2. **Турищева Е.П.**, Вильданова М.С., Смирнова Е.А. Гиббереллиновая кислота оказывает влияние на секреторно-синтетическую активность дермальных фибробластов человека // Сборник материалов III Российской конференции Фундаментальные науки для медицины (FSM-2021), Нижний Новгород. - 2022. - С. 38-38.
 3. **Турищева Е. П.**, Ашниева Г. А., Смирнова Е. А. Изучение влияния индуктора стресса ЭПР ДТТ на морфологию культивируемых клеток соединительнотканного происхождения // Коллекции культур клеток человека и животных: современные вызовы и сетевые решения: сборник тезисов докладов Всероссийской школы-конференции. — ПОЛИТЕХ-ПРЕСС Санкт-Петербург: 2022. — С. 113–114.
 4. **Турищева Е.П.**, Вильданова М.С., Саидова А.А., Смирнова Е.А. Растительные гормоны вызывают появление признаков стресса эндоплазматического ретикулума в дермальных фибробластах человека // Гены и Клетки – Материалы VII молодёжной школы-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН 12-15 октября 2020. — С. 119.
 5. Вильданова М. С., **Турищева Е. П.**, Смирнова Е. А. Исследование влияния фитогормонов на клетки человека с помощью метода клеточных культур // Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине. — Сборник научных трудов международной конференции Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине, посвященной 85-летию ВИЛАР, 23-25 и июня 2016 года. — ФГБНУ ВИЛАР Москва: 2016. — С. 576–583.

10. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вильданова М. С., Савицкая М. А., Онищенко Г. Е., Смирнова Е. А. Действие растительных гормонов на компоненты секреторного пути нормальных и опухолевых клеток человека // Цитология. – 2014. – Т. 56. – №. 7. – С. 516-525.
2. Вильданова М. С., Саидова А. А., Фокин А. И., Поташникова Д. М., Онищенко Г. Е., Смирнова Е. А. Стресс эндоплазматического ретикулума, индуцированный жасмоновой кислотой, вызывает селективный ответ в культивируемых нормальных и опухолевых клетках эпидермального происхождения // Биохимия. – 2019. – Т. 84. – №. 9. – С. 1289-1300.
3. Вильданова М. С., Смирнова Е. А. Характер влияния и специфичность действия растительных гормонов на клетки животных // Цитология. – 2016. – Т. 58. – №. 1. – С. 5-15.
4. Матвеева Д. К., Андреева Е. Р., Буравкова Л. Б. Выбор оптимального протокола получения децеллюляризованного внеклеточного матрикса мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека // Вестник Московского Университета. – 2019. – Т. 74. – №. 4. – С. 294-300.
5. 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.
6. Шутова М. С., Александрова А. Ю. Сравнительное исследование распластывания нормальных и трансформированных фибробластов. Роль полимеризации микро-филаментов и актин-миозинового сокращения // Цитология. – 2010. – Т. 52. – №. 1. – С. 41-51.
7. Abdel-Aty O. A., Masoud R. A. Potential toxicity of plant growth regulator gibberellic acid (GA3) on the pancreatic structures and functions in the albino rat // Academia Anatomica International. – 2016. – Т. 2. – №. 2. – С. 11-26.
8. Abdelhamid A. M., Dorra T. M., Ali M. A., Abou-Egla E. H. Effect of gibberellic acid on broiler chickens performance and some metabolic parameters // Archives of Animal Nutrition. – 1994. – Т. 46. – №. 3. – С. 269-276.

9. Abdou M.I., Ayoub M. A., El Aalem M. M. Cytogenetic and pathological studies on the effect of gibberellic acid in rabbit // *Egyptian Journal of Chemistry and Environmental Health*. – 2016. – T. 2. – №. 2. – C. 566-579.
10. Abou-zeid N. R. A., Abd-Ellah H. F. Neurotoxic effects of gibberellic acid (GA3) and its withdrawal in adult male albino rats: a light and electron microscopic study // *Global Journal of Pharmacology*. – 2015. – T. 9. – №. 3. – C. 222-233.
11. Abu Amra E. S., Lashein, F. E. D. M., Seleem, A. A., Saleh, M. M. The protective role of olive oil against gibberellic acid-induced embryotoxicity at prenatal stages of mice // *The Journal of Basic and Applied Zoology*. – 2020. – T. 81. – №. 1. – C. 1-13.
12. Addis R., Cruciani, S., Santaniello, S., Bellu, E., Sarais, G., Ventura, C., ... & Pintore, G. Fibroblast proliferation and migration in wound healing by phytochemicals: Evidence for a novel synergic outcome // *International journal of medical sciences*. – 2020. – T. 17. – №. 8. – C. 1030-1042.
13. Alamgir, A. N. M. Biotechnology, In Vitro Production of Natural Bioactive Compounds, Herbal Preparation, and Disease Management (Treatment and Prevention) // *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 2, Phytochemistry and Bioactive Compounds, Progress Drug Res.* – 2018. – T. 74. C. – 586-664.
14. Albacete-Albacete L., Sánchez-Álvarez M., Del Pozo M. A. Extracellular vesicles: an emerging mechanism governing the secretion and biological roles of tenascin-C // *Frontiers in immunology*. – 2021. – T. 12. – C. 671485.
15. Ali M. H. M., El-Din W. A. N., Anter S. Possible ameliorative effect of Vitamin C on cerebellar toxicity induced by gibberellic acid during late pregnancy and early postnatal periods in albino rats // *European Journal of Anatomy*. – 2018. – T. 22. – №. 4. – C. 345-354.
16. Ali S., Moselhy, W. A., Mohamed H. M., Nabil T. M., Abo El-Ela F. I., Abdou K. Ameliorative effects of *Dictyota dichotoma* on hepatotoxicity induced by gibberellic acid in albino rats // *Toxicological Research*. – 2022. – T. 38. – №. 3. – C. 379-392.

17. Alliegro M. C. Effects of dithiothreitol on protein activity unrelated to thiol–disulfide exchange: for consideration in the analysis of protein function with Cleland's reagent // *Analytical biochemistry*. – 2000. – T. 282. – №. 1. – C. 102-106.
18. Almanza A., Carlesso A., Chintia C., Creedican S., Doultinos D., Leuzzi B., ... & Samali A. Endoplasmic reticulum stress signalling—from basic mechanisms to clinical applications // *The FEBS journal*. – 2019. – T. 286. – №. 2. – C. 241-278.
19. Alsemeh A. E., Moawad R. S., Abdelfattah E. R. Histological and biochemical changes induced by gibberellic acid in the livers of pregnant albino rats and their offspring: ameliorative effect of *Nigella sativa* // *Anatomical science international*. – 2019. – T. 94. – C. 307-323.
20. Amer M. G., Hussien W. F. Influence of gibberellic acid (GA3) on renal cortex of adult male albino rats (histological, immunohistochemical and biochemical study) // *Egypt J Histol*. – 2010. – T. 33. – C. 767-780.
21. Asselah T., Bièche I., Mansouri A., Laurendeau I., Cazals-Hatem D., Feldmann G., ... & Moreau R. In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C // *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. – 2010. – T. 221. – №. 3. – C. 264-274.
22. Atamian H. S., Harmer S. L. Circadian regulation of hormone signaling and plant physiology // *Plant Molecular Biology*. – 2016. – T. 91. – C. 691-702.
23. Baek H. A., Kim D. S., Park H. S., Jang K. Y., Kang M. J., Lee D. G., ... & Chung M. J. Involvement of endoplasmic reticulum stress in myofibroblastic differentiation of lung fibroblasts // *American journal of respiratory cell and molecular biology*. – 2012. – T. 46. – №. 6. – C. 731-739.
24. Balchin D., Miličić G., Strauss M., Hayer-Hartl M., Hartl F. U. Pathway of actin folding directed by the eukaryotic chaperonin TRiC // *Cell*. – 2018. – T. 174. – №. 6. – C. 1507-1521.
25. Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M., Evtushenko E., Kulebyakin K., Grigorieva O., ... & Efimenko A. Secretome of mesenchymal stromal cells prevents myofibroblasts differentiation by transferring fibrosis-associated microRNAs within extracellular vesicles // *Cells*. – 2020. – T. 9. – №. 5. – C. 1272.

26. Basseri S., Lhoták Š., Sharma A. M., Austin R. C. The chemical chaperone 4-phenylbutyrate inhibits adipogenesis by modulating the unfolded protein response // *Journal of lipid research*. – 2009. – T. 50. – №. 12. – C. 2486-2501.
27. Belloni D., Veschini L., Foglieni C., Dell'Antonio G., Caligaris-Cappio F., Ferrarini M., Ferrero E. Bortezomib induces autophagic death in proliferating human endothelial cells // *Experimental cell research*. – 2010. – T. 316. – №. 6. – C. 1010-1018.
28. Benedetti C., Fabbri M., Sitia R., Cabibbo A. Aspects of gene regulation during the UPR in human cells // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2000. – T. 278. – №. 3. – C. 530-536.
29. Bernales S., Schuck S., Walter P. ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum // *Autophagy*. – 2007. – T. 3. – №. 3. – C. 285-287.
30. Bittner A., Cieśla A., Gruden K., Lukan T., Mahmud S., Teige M., ... & Wurzinger B. Organelles and phytohormones: a network of interactions in plant stress responses // *Journal of Experimental Botany*. – 2022. – T. 73. – №. 21. – C. 7165-7181.
31. Bodrato N., Franco L., Fresia C., Guida L., Usai C., Salis A., ... & Zocchi E. Abscisic acid activates the murine microglial cell line N9 through the second messenger cyclic ADP-ribose // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – T. 284. – №. 22. – C. 14777-14787.
32. Bonnans C., Chou J., Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2014. – T. 15. – №. 12. – C. 786-801.
33. Boursiac Y., Lérant S., Corratgé-Faillie C., Gojon A., Krouk G., Lacombe B. ABA transport and transporters // *Trends in plant science*. – 2013. – T. 18. – №. 6. – C. 325-333.
34. Brückner B. R., Janshoff A. Importance of integrity of cell-cell junctions for the mechanics of confluent MDCK II cells // *Scientific reports*. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 14117.
35. Brüning A., Burger P., Vogel M., Rahmeh M., Friese K., Lenhard M., Burges A. Bortezomib treatment of ovarian cancer cells mediates endoplasmic reticulum stress,

- cell cycle arrest, and apoptosis // *Investigational new drugs*. – 2009. – T. 27. – C. 543-551.
36. Bruzzone S., Moreschi I., Usai C., Guida L., Damonte G., Salis A., ... & Zocchi E. Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – T. 104. – №. 14. – C. 5759-5764.
37. Bruzzone, S., Bodrato, N., Usai, C., Guida, L., Moreschi, I., Nano, R., ... & Zocchi, E. Abscisic acid is an endogenous stimulator of insulin release from human pancreatic islets with cyclic ADP ribose as second messenger // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – T. 283. – №. 47. – C. 32188-32197.
38. Bruzzone S., Battaglia F., Mannino E., Parodi A., Fruscione F., Basile G., ... & Fenoglio D. Abscisic acid ameliorates the systemic sclerosis fibroblast phenotype in vitro // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2012a. – T. 422. – №. 1. – C. 70-74.
39. Bruzzone S., Basile G., Mannino E., Sturla L., Magnone M., Grozio A., ... & Zocchi E. Autocrine abscisic acid mediates the UV-B-induced inflammatory response in human granulocytes and keratinocytes // *Journal of Cellular Physiology*. – 2012b. – T. 227. – №. 6. – C. 2502-2510.
40. Bruzzone S., Ameri P., Sturla L., Guida L., De Flora A., Zocchi E. Abscisic acid: a new mammalian hormone regulating glucose homeostasis // *Messenger*. – 2012c. – T. 1. – №. 2. – C. 141-149.
41. Bruzzone S., Magnone M., Mannino E., Sociali G., Sturla L., Fresia C., ... & Zocchi E. Abscisic acid stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from L-cells and its oral administration increases plasma glucagon-like peptide-1 levels in rats // *PLoS One*. – 2015. – T. 10. – №. 10. – C. e0140588.
42. Budovsky A., Yarmolinsky L., Ben-Shabat S. Effect of medicinal plants on wound healing // *Wound Repair and Regeneration*. – 2015. – T. 23. – №. 2. – C. 171-183.
43. Calton M., Zeng H., Urano F., Till J. H., Hubbard S. R., Harding H. P., ... & Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA // *Nature*. – 2002. – T. 415. – №. 6867. – C. 92-96.

44. Castorena-Gonzalez J. A., Staiculescu M. C., Foote C. A., Polo-Parada L., Martinez-Lemus L. A. The obligatory role of the actin cytoskeleton on inward remodeling induced by dithiothreitol activation of endogenous transglutaminase in isolated arterioles // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2014. – T. 306. – №. 4. – C. H485-H495.
45. Celik I., Tuluçe Y., Isik I. Evaluation of toxicity of abscisic acid and gibberellic acid in rats: 50 days drinking water study // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. – 2007. – T. 22. – №. 2. – C. 219-226.
46. Celli A., Mackenzie D. S., Crumrine D. S., Tu C. L., Hupe M., Bikle D. D., ... & Mauro T. Endoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion activates XBP1 and controls terminal differentiation in keratinocytes and epidermis // *British Journal of Dermatology*. – 2011. – T. 164. – №. 1. – C. 16-25.
47. Chadwick S. R., Lajoie P. Endoplasmic reticulum stress coping mechanisms and lifespan regulation in health and diseases // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2019. – T. 7. – C. 84.
48. Chan J. Y., Luzuriaga J., Bensellam M., Biden T. J., Laybutt D. R. Failure of the adaptive unfolded protein response in islets of obese mice is linked with abnormalities in β -cell gene expression and progression to diabetes // *Diabetes*. – 2013. – T. 62. – №. 5. – C. 1557-1568.
49. Chanclud E., Lacombe B. Plant hormones: key players in gut microbiota and human diseases? // *Trends in plant science*. – 2017. – T. 22. – №. 9. – C. 754-758.
50. Chang Z., Fu X. Biogenesis of Secretory Proteins in Eukaryotic and Prokaryotic Cells // *Encyclopedia of cell biology (second edititon)*. – 2023. – T. 1. – C. 689-702.
51. Chen J., Sun Z., Zhang Y., Zeng X., Qing C., Liu J., ... & Zhang H. Synthesis of gibberellin derivatives with anti-tumor bioactivities // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2009. – T. 19. – №. 18. – C. 5496-5499.
52. Chen Y. C., Chen B. C., Huang H. M., Lin S. H., Lin C. H. Activation of PERK in ET-1-and thrombin-induced pulmonary fibroblast differentiation: Inhibitory effects of curcumin // *Journal of cellular physiology*. – 2019a. – T. 234. – №. 9. – C. 15977-15988.

53. Chen K., Li, G. J., Bressan R. A., Song C. P., Zhu J. K., Zhao Y. Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants // *Journal of integrative plant biology*. – 2019b. – T. 62. – №. 1. – C. 25-54.
54. Chen X., Ding C., Liu W., Liu X., Zhao Y., Zheng Y., ... & Chen H. Abscisic acid ameliorates oxidative stress, inflammation, and apoptosis in thioacetamide-induced hepatic fibrosis by regulating the NF- κ B signaling pathway in mice // *European Journal of Pharmacology*. – 2021. – T. 891. – C. 173652.
55. Cheng X., Wang G., Liao Y., Mo J., Qing C. Chronic exposure to the gibberellin derivative GA-13315 sensitizes breast cancer MCF-7 cells but not colon cancer HCT116 cells to irinotecan // *Oncology Letters*. – 2020. – T. 20. – №. 6. – C. 1-9.
56. Chino H., Mizushima N. ER-phagy: quality control and turnover of endoplasmic reticulum // *Trends in Cell Biology*. – 2020. – T. 30. – №. 5. – C. 384-398.
57. Cichero E., Fresia C., Guida L., Booz V., Millo E., Scotti C., ... & Fossa P. Identification of a high affinity binding site for abscisic acid on human lanthionine synthetase component C-like protein 2 // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2018. – T. 97. – C. 52-61.
58. Colebrook E. H., Thomas S. G., Phillips A. L., Hedden P. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress // *Journal of experimental biology*. – 2014. – T. 217. – №. 1. – C. 67-75.
59. Corazzari M., Gagliardi M., Fimia G. M., Piacentini M. Endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, and cancer cell fate // *Frontiers in oncology*. – 2017. – T. 7. – C. 78.
60. Danquah A., De Zélicourt A., Colcombet J., Hirt H. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses // *Biotechnology advances*. – 2014. – T. 32. – №. 1. – C. 40-52.
61. Davière J. M., Achard P. Gibberellin signaling in plants // *Development*. – 2013. – T. 140. – №. 6. – C. 1147-1151.
62. Derosa G., Maffioli P., D'Angelo A., Preti P. S., Tenore G., Novellino E. Abscisic acid treatment in patients with prediabetes // *Nutrients*. – 2020. – T. 12. – №. 10. – C. 2931.

63. Desai V. D., Hsia H. C., Schwarzbauer J. E. Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells // *PloS one*. – 2014. – T. 9. – №. 1. – C. e86865.
64. Dugina V., Fontao L., Chaponnier C., Vasiliev J., Gabbiani G. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors // *Journal of cell science*. – 2001. – T. 114. – №. 18. – C. 3285-3296.
65. Diakogiannaki E., Welters H. J., Morgan N. G. Differential regulation of the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic β -cells exposed to long-chain saturated and monounsaturated fatty acids // *Journal of Endocrinology*. – 2008. – T. 197. – №. 3. – C. 553-563.
66. Eastell R., O'Neill T. W., Hofbauer L. C., Langdahl B., Reid I. R., Gold D. T., Cummings S. R. Postmenopausal osteoporosis // *Nature reviews Disease primers*. – 2016. – T. 2. – №. 1. – C. 1-16.
67. Efrat S. Beta-cell dedifferentiation in type 2 diabetes: concise review // *Stem Cells*. – 2019. – T. 37. – №. 10. – C. 1267-1272.
68. Eghiaian F., Rigato A., Scheuring S. Structural, mechanical, and dynamical variability of the actin cortex in living cells // *Biophysical journal*. – 2015. – T. 108. – №. 6. – C. 1330-1340.
69. El-Esawi M. A. Introductory chapter: Hormonal regulation in plant development and stress tolerance // *Phytohormones-Signaling Mechanisms and Crosstalk in Plant Development and Stress Responses*. – 2017.
70. El-Mofty M. M., Sakr S. A. Induction of neoplasms in the Egyptian toad *Bufo regularis* by gibberellin A3 // *Oncology*. 1988. – T. 45. – №. 1. – C. 61-64.
71. El-Mofty M. M., Sakr S. A., Rizk A. M., Moussa E. A. Carcinogenic effect of gibberellin A3 in Swiss albino mice // *Nutrition and Cancer*. 1994. – T. 21. – №. 2. – C. 183-190.
72. El-Sayyad H., Ramadan M., Abou-Egla M., Asiri A., El-Beeh M. Role of gibberellic and indole acetic acid in altering ocular structure and function of mother rats and their

- offspring // *British Journal of Medicine and Medical Research*. – 2015. – T. 10. – №. 12. – C. 1-14.
73. El-Sebai A., Abaza M., Elnagar S. A. Physiological effects of gibberellic acid (GA3) on female Japanese quail production and reproduction // *Egypt Poul Sci.* – 2003. – T. 23. – C. 977-992.
74. Erin N., Afacan B., Ersoy Y., Ercan F., Balcı M. K. Gibberellic acid, a plant growth regulator, increases mast cell recruitment and alters Substance P levels // *Toxicology*. – 2008. – T. 254. – №. 1-2. – C. 75-81.
75. Feige M. J., Hendershot L. M. Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis // *Current opinion in cell biology*. – 2011. – T. 23. – №. 2. – C. 167-175.
76. Földi I., Tóth A. M., Szabó Z., Mózes E., Berkecz R., Datki Z. L., ... & Janáky T. Proteome-wide study of endoplasmic reticulum stress induced by thapsigargin in N2a neuroblastoma cells // *Neurochemistry international*. – 2013. – T. 62. – №. 1. – C. 58-69.
77. Fregno I., Molinari M. Endoplasmic reticulum turnover: ER-phagy and other flavors in selective and non-selective ER clearance // *F1000Research*. 2019. – T. 7. – C. 1-9.
78. Fresia C., Vigliarolo T., Guida L., Booz V., Bruzzone S., Sturla L., ... & Zocchi E. G-protein coupling and nuclear translocation of the human abscisic acid receptor LANCL2 // *Scientific reports*. – 2016. – T. 6. – №. 1. – C. 26658.
79. Gardner B. M., Pincus D., Gotthardt K., Gallagher C. M., Walter P. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2013. – T. 5. – №. 3. – C. a013169.
80. González F. V., Bou-Iserte L., Miguel-López B., de la Hoz-Rodríguez S., Kersten C., Sánchez-Sarasúa S., ... & Sánchez-Pérez A. M. Design, Synthesis and Evaluation of Fluorescent Analogues of Abscisic Acid // *ChemistrySelect*. – 2020. – T. 5. – №. 26. – C. 8015-8019.
81. Gosavi P., Gleeson P. A. The function of the Golgi ribbon structure—an enduring mystery unfolds! // *Bioessays*. – 2017. – T. 39. – №. 11. – C. 1700063.
82. Grigorieva O. A., Vigovskiy M. A., Dyachkova U. D., Basalova N. A., Aleksandrushkina N. A., Kulebyakina M. A., ... & Efimenko A. Y. Mechanisms of

- endothelial-to-mesenchymal transition induction by extracellular matrix components in pulmonary fibrosis // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2021. – T. 171. – C. 523-531.
83. Guo Y., Wang W., Chen Y., Sun Y., Li Y., Guan F., ... & Zhang W. Continuous gibberellin A3 exposure from weaning to sexual maturity induces ovarian granulosa cell apoptosis by activating Fas-mediated death receptor signaling pathways and changing methylation patterns on caspase-3 gene promoters // *Toxicology Letters*. – 2019. – T. 319. – C. 175-186.
84. Guo Y., Shen D., Zhou Y., Yang Y., Liang J., Zhou Y., ... & Li W. Deep learning-based morphological classification of endoplasmic reticulum under stress // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2022. – T. 9. – C. 767866.
85. Gupta R., Chakrabarty S. K. Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved // *Plant signaling & behavior*. 2013. – T. 8. – №. 9. – C. e25504-1 - e25504-5.
86. Guri A. J., Hontecillas R., Si H., Liu D., Bassaganya-Riera J. Dietary abscisic acid ameliorates glucose tolerance and obesity-related inflammation in db/db mice fed high-fat diets // *Clinical Nutrition*. – 2007. – T. 26. – №. 1. – C. 107-116.
87. Guri A. J., Misyak S. A., Hontecillas R., Hasty A., Liu D., Si H., Bassaganya-Riera J. Abscisic acid ameliorates atherosclerosis by suppressing macrophage and CD4+ T cell recruitment into the aortic wall // *The Journal of nutritional biochemistry*. – 2010. – T. 21. – №. 12. – C. 1178-1185.
88. Ha T. W., Jeong J. H., Shin H., Kim H. K., Im J. S., Song B. H., ... & Lee M. R. Characterization of endoplasmic reticulum (ER) in human pluripotent stem cells revealed increased susceptibility to cell death upon ER stress // *Cells*. – 2020. – T. 9. – №. 5. – C. 1078.
89. Hedden P. The current status of research on gibberellin biosynthesis // *Plant and Cell Physiology*. – 2020. – T. 61. – №. 11. – C. 1832-1849.
90. Heindryckx F., Binet F., Ponticos M., Rombouts K., Lau J., Kreuger J., Gerwins P. Endoplasmic reticulum stress enhances fibrosis through IRE 1 α -mediated degradation of miR-150 and XBP-1 splicing // *EMBO molecular medicine*. – 2016. – T. 8. – №. 7. – C. 729-744.

91. Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2012. – T. 13. – C. 89-102.
92. Hinz B., Dugina V., Ballestrem C., Wehrle-Haller B., Chaponnier C. α -Smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts // *Molecular biology of the cell*. – 2003. – T. 14. – №. 6. – C. 2508-2519.
93. Hinz B. The role of myofibroblasts in wound healing // *Current research in translational medicine*. – 2016. – T. 64. – №. 4. – C. 171-177.
94. Hosseini M., Soltanlinejad F., Najafi G., Roshangar L. Effect of gibberellic acid on the quality of sperm and in vitro fertilization outcome in adult male rats // *Veterinary research forum: an international quarterly journal*. – Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, 2013. – T. 4. – №. 4. – C. 259.
95. Huang S., Wang Y. Golgi structure formation, function, and post-translational modifications in mammalian cells // *F1000Research*. – 2017. – T. 6. – C. 1-13.
96. Huang W., Gu H., Zhan Z., Wang R., Song L., Zhang Y., ... & Qian B. The plant hormone abscisic acid stimulates megakaryocyte differentiation from human iPSCs in vitro // *Platelets*. – 2022. – T. 33. – №. 3. – C. 462-470.
97. Hussein W. F., Farahat F. Y., Abass M. A., Shehata A. S. Hepatotoxic potential of Gibberellic Acid (GA3) in adult male albino rats // *Life Science Journal*. – 2011. – T. 8. – №. 3. – C. 373-383.
98. Hwang J., Qi L. Quality control in the endoplasmic reticulum: crosstalk between ERAD and UPR pathways // *Trends in biochemical sciences*. – 2018. – T. 43. – №. 8. – C. 593-605.
99. Ignashkova T. I., Gendarme M., Peschk K., Eggenweiler H. M., Lindemann R. K., Reiling J. H. Cell survival and protein secretion associated with Golgi integrity in response to Golgi stress-inducing agents // *Traffic*. – 2017. – T. 18. – №. 8. – C. 530-544.
100. Jahed Z., Shams H., Mofrad M. R. K. A disulfide bond is required for the transmission of forces through SUN-KASH complexes // *Biophysical Journal*. – 2015. – T. 109. – №. 3. – C. 501-509.

101. Jang W. G., Kim E. J., Kim D. K., Ryoo H. M., Lee K. B., Kim S. H., ... & Koh J. T. BMP2 protein regulates osteocalcin expression via Runx2-mediated Atf6 gene transcription // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – T. 287. – №. 2. – C. 905-915.
102. Jeon S. H., Kim N., Ju Y. J., Gee M. S., Lee D., Lee J. K. Phytohormone abscisic acid improves memory impairment and reduces neuroinflammation in 5xFAD mice by upregulation of LanC-Like protein 2 // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – T. 21. – №. 22. – C. 8425.
103. Jiang S., He R., Zhu L., Liang T., Wang Z., Lu Y., ... & Wang K. Endoplasmic reticulum stress-dependent ROS production mediates synovial myofibroblastic differentiation in the immobilization-induced rat knee joint contracture model // *Experimental cell research*. – 2018. – T. 369. – №. 2. – C. 325-334.
104. Jung Y., Cackowski F. C., Yumoto K., Decker A. M., Wang Y., Hotchkiss M., ... & Taichman R. S. Abscisic acid regulates dormancy of prostate cancer disseminated tumor cells in the bone marrow // *Neoplasia*. – 2021. – T. 23. – №. 1. – C. 102-111.
105. Kasamatsu A., Iyoda M., Usukura K., Sakamoto Y., Ogawara K., Shiiba M., ... & Uzawa K. Gibberellic acid induces α -amylase expression in adipose-derived stem cells // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2012. – T. 30. – №. 2. – C. 243-247.
106. Kendall R. T., Feghali-Bostwick C. A. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators // *Frontiers in pharmacology*. – 2014. – T. 5. – C. 123.
107. Khadrawy S. M., Mohamed D. S., Hassan R. M., Abdelgawad M. A., Ghoneim M. M., Alshehri S., Shaban N. S. Royal Jelly and *Chlorella vulgaris* Mitigate Gibberellic Acid-Induced Cytogenotoxicity and Hepatotoxicity in Rats via Modulation of the PPAR α /AP-1 Signaling Pathway and Suppression of Oxidative Stress and Inflammation // *Foods*. – 2023. – T. 12. – №. 6. – C. 1223.
108. Khalaf et al., 2019 Khalaf H. A., Arafat E. A., Ghoneim F. M. A histological, immunohistochemical and biochemical study of the effects of pomegranate peel extracts on gibberellic acid induced oxidative stress in adult rat testes // *Biotechnic & Histochemistry*. – 2019. – T. 94. – №. 8. – C. 569-582.

109. Kharenko, O. A., Polichuk, D., Nelson, K. M., Abrams, S. R., & Loewen, M. C. Identification and characterization of interactions between abscisic acid and human heat shock protein 70 family members // *The journal of biochemistry*. – 2013. – T. 154. – №. 4. – C. 383-391.
110. Khorasani A., Abbasnejad M., Esmaeili-Mahani S. Phytohormone abscisic acid ameliorates cognitive impairments in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease through PPAR β/δ and PKA signaling // *International Journal of Neuroscience*. – 2019. – T. 129. – №. 11. – C. 1053-1065.
111. Kim S. J., Bale S., Verma P., Wan Q., Ma F., Gudjonsson J. E., ... & Varga J. Gut microbe-derived metabolite trimethylamine N-oxide activates PERK to drive fibrogenic mesenchymal differentiation // *Iscience*. – 2022. – T. 25. – №. 7.
112. Ko U. H., Choi J., Choung J., Moon S., Shin J. H. Physicochemically tuned myofibroblasts for wound healing strategy // *Scientific reports*. – 2019. – T. 9. – №. 1. – C. 16070.
113. Kohno K., Hiragun A., Mitsui H., Takatsuki A., Tamura G. Effect of tunicamycin on cell growth and morphology of nontransformed and transformed cell lines // *Agricultural and Biological Chemistry*. – 1979. – T. 43. – №. 7. – C. 1553-1561.
114. Kooshki R., Anaeigoudari A., Abbasnejad M., Askari-Zahabi K., Esmaeili-Mahani S. Abscisic acid interplays with PPAR γ receptors and ameliorates diabetes-induced cognitive deficits in rats // *Avicenna Journal of Phytomedicine*. – 2021. – T. 11. – №. 3. – C. 247.
115. Kovuru N., Raghuwanshi S., Sharma D. S., Dahariya S., Pallepati A., Gutti R. K. Endoplasmic reticulum stress induced apoptosis and caspase activation is mediated through mitochondria during megakaryocyte differentiation // *Mitochondrion*. – 2020. – T. 50. – C. 115-120.
116. Kumar, S., Shah, S. H., Vimala, Y., Jatav, H. S., Ahmad, P., Chen, Y., & Siddique, K. H. Abscisic acid: Metabolism, transport, crosstalk with other plant growth regulators, and its role in heavy metal stress mitigation // *Frontiers in Plant Science*. – 2022. – T. 13. – C. 972856.

117. Lam W. Y., Bhattacharya D. Metabolic links between plasma cell survival, secretion, and stress // Trends in immunology. – 2018. – T. 39. – №. 1. – C. 19-27.
118. Las Heras K., Igartua M., Santos-Vizcaino E., Hernandez R. M. Chronic wounds: Current status, available strategies and emerging therapeutic solutions // Journal of controlled release. – 2020. – T. 328. – C. 532-550.
119. Le Page-Degivry M. T., Bidard J. N., Rouvier E., Bulard C., Lazdunski M. Presence of abscisic acid, a phytohormone, in the mammalian brain // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1986. – T. 83. – №. 4. – C. 1155-1158.
120. Leber A., Hontecillas R., Tubau-Juni N., Zoccoli-Rodriguez V., Goodpaster B., Bassaganya-Riera J. Abscisic acid enriched fig extract promotes insulin sensitivity by decreasing systemic inflammation and activating LINC01292 in skeletal muscle // Scientific Reports. – 2020. – T. 10. – №. 1. – C. 10463.
121. Ledger P. W., Uchida N., Tanzer M. L. Immunocytochemical localization of procollagen and fibronectin in human fibroblasts: effects of the monovalent ionophore, monensin // The Journal of cell biology. – 1980. – T. 87. – №. 3. – C. 663-671.
122. Lee A. H., Iwakoshi N. N., Glimcher L. H. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response // Molecular and cellular biology. – 2003. – T. 23. – №. 21. – C. 7448-7459.
123. Lenghel A., Gheorghita A. M., Vacaru A. M., Vacaru A. M. What is the sweetest UPR flavor for the β -cell? That is the question // Frontiers in Endocrinology. – 2021. – T. 11. – C. 614123.
124. Li B., Yi, P., Zhang B., Xu C., Liu Q., Pi Z., ... & Liu J. Differences in endoplasmic reticulum stress signalling kinetics determine cell survival outcome through activation of MKP-1 // Cellular signalling. – 2011a. – T. 23. – №. 1. – C. 35-45.
125. Li H. H., Hao R. L., Wu S. S., Guo P. C., Chen C. J., Pan L. P., Ni H. Occurrence, function and potential medicinal applications of the phytohormone abscisic acid in animals and humans // Biochemical pharmacology. – 2011b. – T. 82. – №. 7. – C. 701-712.

126. Li J., Wu Y., Xie Q., Gong Z. Abscisic acid // Hormone metabolism and signaling in plants, Academic Press, United States of America. – 2017. – C. 161-189.
127. Lievens L., Pollier J., Goossens A., Beyaert R., Staal J. Abscisic acid as pathogen effector and immune regulator // Frontiers in plant science. – 2017. – T. 8. – C. 587.
128. Lin L., Tan R. X. Cross-kingdom actions of phytohormones: a functional scaffold exploration // Chemical reviews. – 2011. – T. 111. – №. 4. – C. 2734-2760.
129. Lingwood D., Schuck S., Ferguson C., Gerl M. J., Simons K. Generation of cubic membranes by controlled homotypic interaction of membrane proteins in the endoplasmic reticulum // Journal of Biological Chemistry. – 2009. – T. 284. – №. 18. – C. 12041-12048.
130. Liu E. S., Ou J. H., Lee A. S. Brefeldin A as a regulator of grp78 gene expression in mammalian cells // Journal of Biological Chemistry. – 1992. – T. 267. – №. 10. – C. 7128-7133.
131. Liu J., Gu X., Zou R., Nan W., Yang S., Wang H. L., Chen X. T. Phytohormone abscisic acid improves spatial memory and synaptogenesis involving NDR1/2 kinase in rats // Frontiers in Pharmacology. – 2018. – T. 9. – C. 1141.
132. Longo M., Spinelli R., D'Esposito V., Zatterale F., Fiory F., Nigro C., ... & Di Jeso B. Pathologic endoplasmic reticulum stress induced by glucotoxic insults inhibits adipocyte differentiation and induces an inflammatory phenotype // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2016. – T. 1863. – №. 6. – C. 1146-1156.
133. Lowe M. Structural organization of the Golgi apparatus // Current opinion in cell biology. – 2011. – T. 23. – №. 1. – C. 85-93.
134. Lu Y., Tan J., Zhang J., Ma L., Guo F., Guo Y. Abscisic acid inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cells // Basic & Clinical Medicine. – 2008. – T. 4. – C. 017.
135. Luo X., Wang G., Wang Y., Wang M., Tan Z., Luo M., ... & Qing, C. Gibberellin derivative GA-13315 overcomes multidrug resistance in breast cancer by up-regulating BMP6 expression // Frontiers in Pharmacology. – 2022. – T. 13. – C. 1059365.

136. Ma Q., Wu B., Lu Y., Chu W., Guo Y. The effect of induced differentiation of abscisic acid on human HCC cell line SMMC-7721 // *Journal of Kunming Medical College*. – 2006. – T. 3. – C. 007.
137. Magnone M., Bruzzone S., Guida L., Damonte G., Millo E., Scarfi S., ... & Zocchi E. Abscisic acid released by human monocytes activates monocytes and vascular smooth muscle cell responses involved in atherogenesis // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – T. 284. – №. 26. – C. 17808-17818.
138. Magnone M., Sturla L., Jacchetti E., Scarfi S., Bruzzone S., Usai C., ... & Zocchi E. Autocrine abscisic acid plays a key role in quartz-induced macrophage activation // *The FASEB Journal*. – 2012. – T. 26. – №. 3. – C. 1261-1271.
139. Magnone M., Ameri P., Salis A., Andraghetti G., Emionite L., Murialdo G., ... & Zocchi E. Microgram amounts of abscisic acid in fruit extracts improve glucose tolerance and reduce insulinemia in rats and in humans // *The FASEB Journal*. – 2015. – T. 29. – №. 12. – C. 4783-4793.
140. Magnone M., Emionite L., Guida L., Vigliarolo T., Sturla L., Spinelli S., ... & Zocchi E. Insulin-independent stimulation of skeletal muscle glucose uptake by low-dose abscisic acid via AMPK activation // *Scientific reports*. – 2020. – T. 10. – №. 1. – C. 1454.
141. Magnone M., Spinelli S., Begani G., Guida L., Sturla L., Emionite L., & Zocchi E. Abscisic acid improves insulin action on glycemia in insulin-deficient mouse models of type 1 diabetes // *Metabolites*. – 2022. – T. 12. – №. 6. – C. 523.
142. Makhoul C., Gosavi P., Gleeson P. A. Golgi dynamics: the morphology of the mammalian Golgi apparatus in health and disease // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2019. – T. 7. – C. 112.
143. Malara A., Fresia C., Di Buduo C. A., Soprano P. M., Moccia F., Balduini C., ... & Balduini A. The plant hormone abscisic acid is a prosurvival factor in human and murine megakaryocytes // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – T. 292. – №. 8. – C. 3239-3251.

144. Matsuzaki S., Hiratsuka T., Taniguchi M., Shingaki K., Kubo T., Kiya K., ... & Katayama T. Physiological ER stress mediates the differentiation of fibroblasts // *PloS one*. – 2015. – T. 10. – №. 4. – C. e0123578.
145. Meleigy S. A., Khalaf M. A. Biosynthesis of gibberellic acid from milk permeate in repeated batch operation by a mutant *Fusarium moniliforme* cells immobilized on loofa sponge // *Bioresource Technology*. – 2009. – T. 100. – №. 1. – C. 374-379.
146. Murao N., Nishitoh H. Role of the unfolded protein response in the development of central nervous system // *The journal of biochemistry*. – 2017. – T. 162. – №. 3. – C. 155-162.
147. Muthuraman P., Srikumar K. A comparative study on the effect of homobrassinolide and gibberellic acid on lipid peroxidation and antioxidant status in normal and diabetic rats // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. – 2009. – T. 24. – №. 5. – C. 1122-1127.
148. Naderi R., Esmaeili-Mahani S., Abbasnejad M. Phosphatidylinositol-3-kinase and protein kinase C are involved in the pro-cognitive and anti-anxiety effects of phytohormone abscisic acid in rats // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2017. – T. 96. – C. 112-119.
149. Nagamune K., Hicks L. M., Fux B., Brossier F., Chini E. N., Sibley L. D. Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii* // *Nature*. – 2008. – T. 451. – №. 7175. – C. 207-210.
150. Nakanishi K., Kakiguchi K., Yonemura S., Nakano A., Morishima N. Transient Ca²⁺ depletion from the endoplasmic reticulum is critical for skeletal myoblast differentiation // *The FASEB Journal*. – 2015. – T. 29. – №. 5. – C. 2137-2149.
151. Nani B. D., Rosalen P. L., Lazarini J. G., de Cássia Orlandi Sardi J., Romário-Silva D., de Araújo L. P., ... & Franchin M. A Study on the Anti-NF-κB, Anti-Candida, and Antioxidant Activities of Two Natural Plant Hormones: Gibberellin A4 and A7 // *Pharmaceutics*. – 2022. – T. 14. – №. 7. – C. 1347.
152. Nguyen D. C., Joyner C. J., Sanz I., Lee F. E. H. Factors affecting early antibody secreting cell maturation into long-lived plasma cells // *Frontiers in immunology*. – 2019. – T. 10. – C. 2138.

153. Oakes S. A., Papa F. R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology // *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. – 2015. – T. 10. – C. 173-194.
154. Ogata M., Hino S. I., Saito A., Morikawa K., Kondo S., Kanemoto S., ... & Imaizumi K. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic ReticulumStress // *Molecular and cellular biology*. – 2006. – T. 26. – №. 24. – C. 9220-9231.
155. Olds C. L., Glennon E. K. K., Luckhart S. Abscisic acid: new perspectives on an ancient universal stress signaling molecule // *Microbes and Infection*. – 2018. – T. 20. – №. 9-10. – C. 484-492.
156. Osowski C. M., Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system // *Methods in enzymology*. – Academic Press, 2011. – T. 490. – C. 71-92.
157. Petrosyan A. Unlocking Golgi: why does morphology matter? // *Biochemistry (Moscow)*. – 2019. – T. 84. – C. 1490-1501.
158. Pizzio G. A. Potential Implications of the Phytohormone Abscisic Acid in Human Health Improvement at the Central Nervous System // *Ann. Epidemiol. Public Health*. – 2022. – T. 5. – C. 1090.
159. Puce S., Basile G., Bavestrello G., Bruzzone S., Cerrano C., Giovine M., ... & Zocchi E. Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in hydroid regeneration // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – T. 279. – №. 38. – C. 39783-39788.
160. Pydi S. P., Jaggupilli A., Nelson K. M., Abrams S. R., Bhullar R. P., Loewen M. C., & Chelikani P. Abscisic acid acts as a blocker of the bitter taste G protein-coupled receptor T2R4 // *Biochemistry*. – 2015. – T. 54. – №. 16. – C. 2622-2631.
161. Qi C. C., Ge J. F., Zhou J. N. Preliminary evidence that abscisic acid improves spatial memory in rats // *Physiology & Behavior*. – 2015. – T. 139. – C. 231-239.
162. Qin X., Lin X., Liu L., Li Y., Li X., Deng Z., ... & Hu Y. Macrophage-derived exosomes mediate silica-induced pulmonary fibrosis by activating fibroblast in an endoplasmic reticulum stress-dependent manner // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2021. – T. 25. – №. 9. – C. 4466-4477.

163. Ravichandran Y., Goud B., Manneville J. B. The Golgi apparatus and cell polarity: Roles of the cytoskeleton, the Golgi matrix, and Golgi membranes // *Current opinion in cell biology*. – 2020. – T. 62. – C. 104-113.
164. Reihill J. A., Malcomson B., Bertelsen A., Cheung S., Czerwiec A., Barsden R., ... & Schock B. C. Induction of the inflammatory regulator A 20 by gibberellic acid in airway epithelial cells // *British journal of pharmacology*. – 2016. – T. 173. – №. 4. – C. 778-789.
165. Ren B., Wang Y., Wang H., Wu Y., Li J., Tian J. Comparative proteomics reveals the neurotoxicity mechanism of ER stressors tunicamycin and dithiothreitol // *Neurotoxicology*. – 2018. – T. 68. – C. 25-37.
166. Ribes-Navarro A., Atef M., Sánchez-Sarasúa S., Beltrán-Bretones M. T., Olucha-Bordonau F., & Sánchez-Pérez A. M. Abscisic acid supplementation rescues high fat diet-induced alterations in hippocampal inflammation and IRSs expression // *Molecular Neurobiology*. – 2019. – T. 56. – C. 454-464.
167. Saito A., Ochiai K., Kondo S., Tsumagari K., Murakami T., Cavener D. R., Imaizumi K. Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2 α -ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2 // *Journal of biological chemistry*. – 2011. – T. 286. – №. 6. – C. 4809-4818.
168. Sánchez-Sarasúa S., Moustafa S., García-Avilés Á., López-Climent M. F., Gómez-Cadenas A., Olucha-Bordonau F. E., Sánchez-Pérez A. M. The effect of abscisic acid chronic treatment on neuroinflammatory markers and memory in a rat model of high-fat diet induced neuroinflammation // *Nutrition & metabolism*. – 2016. – T. 13. – №. 1. – C. 1-11.
169. Scarfi S., Ferraris C., Fruscione F., Fresia C., Guida L., Bruzzone S., ... & Zocchi E. Cyclic ADP-ribose-mediated expansion and stimulation of human mesenchymal stem cells by the plant hormone abscisic acid // *Stem Cells*. – 2008. – T. 26. – №. 11. – C. 2855-2864.
170. Scarfi S., Fresia C., Ferraris C., Bruzzone S., Fruscione F., Usai C., ... & Zocchi E. The plant hormone abscisic acid stimulates the proliferation of human hemopoietic

- progenitors through the second messenger cyclic ADP-ribose // *Stem Cells*. – 2009. – T. 27. – №. 10. – C. 2469-2477.
171. Schiano E., Maisto M., Piccolo V., Novellino E., Annunziata G., Ciampaglia R., ... & Tenore G. C. Beneficial Contribution to Glucose Homeostasis by an Agro-Food Waste Product Rich in Abscisic Acid: Results from a Randomized Controlled Trial // *Foods*. – 2022. – T. 11. – №. 17. – C. 2637.
172. Schuck S., Gallagher C. M., Walter P. ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery // *Journal of cell science*. – 2014. – T. 127. – №. 18. – C. 4078-4088.
173. Seo M., Marion-Poll A. Abscisic acid metabolism and transport // *Advances in botanical research*. – Academic Press, 2019. – T. 92. – C. 1-49.
174. Serebrenik Y. V., Hellerschmied D., Toure M., López-Giráldez F., Brookner D., Crews C. M. Targeted protein unfolding uncovers a Golgi-specific transcriptional stress response // *Molecular Biology of the Cell*. – 2018. – T. 29. – №. 11. – C. 1284-1298.
175. Shabani M., Naderi R. Phytohormone abscisic acid elicits positive effects on harmaline-induced cognitive and motor disturbances in a rat model of essential tremor // *Brain and Behavior*. – 2022. – T. 12. – №. 5. – C. e2564.
176. Shah S. H., Islam S., Mohammad F., Siddiqui M. H. Gibberellic Acid: A Versatile Regulator of Plant Growth, Development and Stress Responses // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2023. – C. 1-22.
177. Sharma A., Khanna S., Kaur G., Singh I. Medicinal plants and their components for wound healing applications // *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2021. – T. 7. – №. 1. – C. 1-13.
178. Shi M., Song W., Han T., Chang B., Li G., Jin J., Zhang Y. Role of the unfolded protein response in topography-induced osteogenic differentiation in rat bone marrow mesenchymal stem cells // *Acta Biomaterialia*. – 2017. – T. 54. – C. 175-185.
179. Sicari D., Delaunay-Moisan A., Combettes L., Chevet E., Igarria A. A guide to assessing endoplasmic reticulum homeostasis and stress in mammalian systems // *The FEBS Journal*. – 2020. – T. 287. – №. 1. – C. 27-42.

180. Snapp E. L., Hegde R. S., Francolini M., Lombardo F., Colombo S., Pedrazzini E., ... & Lippincott-Schwartz J. Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions // *The Journal of cell biology*. – 2003. – T. 163. – №. 2. – C. 257-269.
181. Soliman H. A. E., Mantawy M. M., Hassan H. M. Biochemical and molecular profiles of gibberellic acid exposed albino rats // *American Journal of Science*. – 2010. – T. 6. – №. 8. – C. 224-229.
182. Soliman M. M., Aldhahrani A., Gaber A., Alsanie W. F., Shukry M., Mohamed W. A., & Metwally M. M. Impacts of n-acetyl cysteine on gibberellic acid-induced hepatorenal dysfunction through modulation of pro-inflammatory cytokines, antifibrotic and antioxidant activity // *Journal of Food Biochemistry*. – 2021a. – T. 45. – №. 4. – C. e13706.
183. Soliman M. M., Aldhahrani A., Gaber A., Alsanie W. F., Shukry M., Mohamed W. A., ... & Mohamed A. A. Impacts of n-acetyl cysteine on gibberellic acid-induced testicular dysfunction through regulation of inflammatory cytokines, steroid and antioxidant activity // *Andrologia*. – 2021b. – T. 53. – №. 5. – C. e14036.
184. Song S., Tan J., Miao Y., Zhang Q. Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery // *Journal of cellular physiology*. – 2018. – T. 233. – №. 5. – C. 3867-3874.
185. Song M., Peng H., Guo W., Luo M., Duan W., Chen P., Zhou Y. Cigarette smoke extract promotes human lung myofibroblast differentiation by the induction of endoplasmic reticulum stress // *Respiration*. – 2019. – T. 98. – №. 4. – C. 347-356.
186. Spinelli S., Begani G., Guida L., Magnone M., Galante D., D'Arrigo C., ... & Sturla L. LANCL1 binds abscisic acid and stimulates glucose transport and mitochondrial respiration in muscle cells via the AMPK/PGC-1 α /Sirt1 pathway // *Molecular Metabolism*. – 2021. – T. 53. – C. 101263.
187. Spinelli S., Cossu V., Passalacqua M., Hansen J. B., Guida L., Magnone M., ... & Zocchi E. The ABA/LANCL1/2 Hormone/Receptor System Controls Adipocyte Browning and Energy Expenditure // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – T. 24. – №. 4. – C. 3489.

188. Sriburi R., Jackowski S., Mori K., Brewer J. W. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum // *The Journal of cell biology*. – 2004. – T. 167. – №. 1. – C. 35-41.
189. Stauffer W. T., Blackwood E. A., Azizi K., Kaufman R. J., Glembotski C. C. The ER unfolded protein response effector, ATF6, reduces cardiac fibrosis and decreases activation of cardiac fibroblasts // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – T. 21. – №. 4. – C. 1373.
190. Sturla L., Fresia C., Guida L., Grozio, A., Vigliarolo T., Mannino E., ... & Zocchi E. Binding of abscisic acid to human LANCL2 // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2011. – T. 415. – №. 2. – C. 390-395.
191. Sturla L., Mannino E., Scarfi S., Bruzzone S., Magnone M., Sociali G., ... & Zocchi E. Abscisic acid enhances glucose disposal and induces brown fat activity in adipocytes in vitro and in vivo // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2017. – T. 1862. – №. 2. – C. 131-144.
192. Tai Y., Woods E. L., Dally J., Kong D., Steadman R., Moseley R., Midgley A. C. Myofibroblasts: function, formation, and scope of molecular therapies for skin fibrosis // *Biomolecules*. – 2021. – T. 11. – №. 8. – C. 1095.
193. Talchai C., Xuan S., Lin H. V., Sussel L., Accili D. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure // *Cell*. – 2012. – T. 150. – №. 6. – C. 1223-1234.
194. Tawfik S. M. Histological and immunohistochemical study on the effect of gibberellic acid on the liver of adult male albino rats and the possible protective role of green tea // *Egyptian Journal of Histology*. – 2015. – T. 38. – №. 2. – C. 317-331.
195. Tellier J., Shi W., Minnich M., Liao Y., Crawford S., Smyth G. K., ... & Nutt S. L. Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response // *Nature immunology*. – 2016. – T. 17. – №. 3. – C. 323-330.
196. Tersey S. A., Nishiki Y., Templin A. T., Cabrera S. M., Stull N. D., Colvin S. C., ... & Mirmira R. G. Islet β -cell endoplasmic reticulum stress precedes the onset of

- type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse model // *Diabetes*. – 2012. – T. 61. – №. 4. – C. 818-827.
197. Teske B. F., Wek S. A., Bunpo P., Cundiff J. K., McClintick J. N., Anthony T. G., Wek R. C. The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress // *Molecular biology of the cell*. – 2011. – T. 22. – №. 22. – C. 4390-4405.
198. Tojkander S., Gateva G., Lappalainen P. Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles // *Journal of cell science*. – 2012. – T. 125. – №. 8. – C. 1855-1864.
199. Troudi A., Samet A. M., Zeghal N. Hepatotoxicity induced by gibberellic acid in adult rats and their progeny // *Experimental and Toxicologic Pathology*. – 2010. – T. 62. – №. 6. – C. 637-642.
200. Troudi A., Amara I. B., Samet A. M., Fetoui H., Soudani N., Guermazi F., ... & Zeghal N. Oxidative stress and thyroid impairment after gibberellic acid treatment in pregnant and lactating rats and their offspring // *Biofactors*. – 2011a. – T. 37. – №. 6. – C. 429-438.
201. Troudi A., Amara I. B., Soudani N., Bouaziz H., Boudawara T., Zeghal N. Oxidative stress induced by gibberellic acid in bone of suckling rats // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2011b. – T. 74. – №. 4. – C. 643-649.
202. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes // *Genome biology*. – 2002. – T. 3. – №. 7. – C. 1-12.
203. Vega-Avila E., Pugsley M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells // *Proc West Pharmacol Soc*. – 2011. – T. 54. – №. 10. – C. 4.
204. Vigliarolo T., Guida L., Millo E., Fresia C., Turco E., De Flora A., Zocchi E. Abscisic acid transport in human erythrocytes // *Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – T. 290. – №. 21. – C. 13042-13052.

205. Vigliarolo T., Zocchi E., Fresia C., Booz V., Guida L. Abscisic acid influx into human nucleated cells occurs through the anion exchanger AE2 // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2016. – T. 75. – C. 99-103.
206. Vildanova M., Vishnyakova P., Saidova A., Konduktorova V., Onishchenko G., Smirnova E. Gibberellic acid initiates ER stress and activation of differentiation in cultured human immortalized keratinocytes HaCaT and epidermoid carcinoma cells A431 // *Pharmaceutics*. – 2021. – T. 13. – №. 11. – C. 1813.
207. Wang Y. H., Irving H. R. Developing a model of plant hormone interactions // *Plant signaling & behavior*. – 2011. – T. 6. – №. 4. – C. 494-500.
208. Wei J. H., Seemann J. Golgi ribbon disassembly during mitosis, differentiation and disease progression // *Current opinion in cell biology*. – 2017. – T. 47. – C. 43-51.
209. Weiss K., Racho J., Riemer J. Compartmentalized disulfide bond formation pathways // *Redox Chemistry and Biology of Thiols*. – Academic Press, 2022. – C. 321-340.
210. Xiang X. Y., Yang X. C., Su J., Kang J. S., Wu Y., Xue Y. N., ... & Sun L. K. Inhibition of autophagic flux by ROS promotes apoptosis during DTT-induced ER/oxidative stress in HeLa cells // *Oncology reports*. – 2016. – T. 35. – №. 6. – C. 3471-3479.
211. Xu F., Du W., Zou Q., Wang Y., Zhang X., Xing X., ... & Yu L. COPII mitigates ER stress by promoting formation of ER whorls // *Cell Research*. – 2021. – T. 31. – №. 2. – C. 141-156.
212. Yang M. C., O'Connor A. J., Kalionis B., Heath D. E. Improvement of mesenchymal stromal cell proliferation and differentiation via decellularized extracellular matrix on substrates with a range of surface chemistries // *Frontiers in Medical Technology*. – 2022. – T. 4. – C. 834123.
213. Ye J., Rawson R. B., Komuro R., Chen X., Davé U. P., Prywes R., ... & Goldstein J. L. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs // *Molecular cell*. – 2000. – T. 6. – №. 6. – C. 1355-1364.

214. Yorimitsu T., Nair U., Yang Z., Klionsky D. J. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – T. 281. – №. 40. – C. 30299-30304.
215. Yoshida H., Haze K., Yanagi H., Yura T., Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins: involvement of basic leucine zipper transcription factors // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – T. 273. – №. 50. – C. 33741-33749.
216. Yoshida, I., Monji, A., Tashiro, K. I., Nakamura, K. I., Inoue, R., & Kanba, S. Depletion of intracellular Ca²⁺ store itself may be a major factor in thapsigargin-induced ER stress and apoptosis in PC12 cells // *Neurochemistry international*. – 2006. – T. 48. – №. 8. – C. 696-702.
217. Zhang W., Feng D., Li Y., Iida K., McGrath B., Cavener D. R. PERK EIF2AK3 control of pancreatic β cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis // *Cell metabolism*. – 2006. – T. 4. – №. 6. – C. 491-497.
218. Zhang W., Chen D. Q., Qi F., Wang J., Xiao W. Y., Zhu W. Z. Inhibition of calcium–calmodulin-dependent kinase II suppresses cardiac fibroblast proliferation and extracellular matrix secretion // *Journal of cardiovascular pharmacology*. – 2010. – T. 55. – №. 1. – C. 96-105.
219. Zhang Y., Zhang H., Chen J., Zhao H., Zeng X., Zhang H., Qing C. Antitumor and antiangiogenic effects of GA-13315, a gibberellin derivative // *Investigational new drugs*. – 2012. – T. 30. – C. 8-16.
220. Zhao H. W., Li L. J., Pan J., Han B., Wen Y. M. Effect on induction of differentiation of Tca8113 cells affected by abscisic acid in vitro // *West China Journal of Stomatology*. – 2007. – T. 25. – №. 5. – C. 508-512.
221. Zhao H. W., Li L. J., Pan J., Han B., Xia H., Wen Y. M. Apoptosis of Tca8113 squamous cell carcinoma cells induced by abscisic acid in animal models // *China J Clinic Oncol*. – 2008. – T. 35. – №. 9. – C. 523.

222. Zhao M., Wang L., Wang M., Zhou S., Lu Y., Cui H., ... & Yao Y. Targeting fibrosis: Mechanisms and clinical trials // *Signal transduction and targeted therapy*. – 2022. – T. 7. – №. 1. – C. 206.
223. Zhivodernikov I. V., Ratushnyy A. Y., Matveeva D. K., Buravkova L. B. Extracellular matrix proteins and transcription of matrix-associated genes in mesenchymal stromal cells during modeling of the effects of microgravity // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2020. – T. 170. – C. 230-232.
224. Zhong Q., Zhou B., Ann D. K., Minoo P., Liu Y., Banfalvi A., ... & Borok Z. Role of endoplasmic reticulum stress in epithelial–mesenchymal transition of alveolar epithelial cells: effects of misfolded surfactant protein // *American journal of respiratory cell and molecular biology*. – 2011. – T. 45. – №. 3. – C. 498-509.
225. Zhou N., Yao Y., Ye H., Zhu W., Chen L., Mao Y. Abscisic-acid-induced cellular apoptosis and differentiation in glioma via the retinoid acid signaling pathway // *International journal of cancer*. – 2016. – T. 138. – №. 8. – C. 1947-1958.
226. Zhou N., Wei Z., Qi Z., Chen L. Abscisic acid-induced autophagy selectively via MAPK/JNK signalling pathway in glioblastoma // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 2021. – T. 41. – №. 4. – C. 813-826.
227. Ziegler W. H., Liddington R. C., Critchley D. R. The structure and regulation of vinculin // *Trends in cell biology*. – 2006. – T. 16. – №. 9. – C. 453-460.
228. Zocchi E., Carpaneto A., Cerrano C., Bavestrello G., Giovine M., Bruzzone S., ... & Usai C. The temperature-signaling cascade in sponges involves a heat-gated cation channel, abscisic acid, and cyclic ADP-ribose // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – T. 98. – №. 26. – C. 14859-14864.
229. Zocchi E., Hontecillas R., Leber A., Einerhand A., Carbo A., Bruzzone S., ... & Bassaganya-Riera J. Abscisic acid: a novel nutraceutical for glycemic control // *Frontiers in nutrition*. – 2017. – T. 4. – C. 24.
230. Zou M. L., Teng Y. Y., Wu J. J., Liu S. Y., Tang X. Y., Jia Y., ... & Yuan F. L. Fibroblasts: heterogeneous cells with potential in regenerative therapy for scarless wound healing // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – T. 9. – C. 713605.