

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Титова Екатерина Валерьевна

**Действие митохондриально-направленных антиоксидантов на
трансформированные фибробласты человека в культуре**

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена в Отделе математических методов в биологии Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

- Научный руководитель** – *Дугина Вера Борисовна, доктор биологических наук*
- Официальные оппоненты** – *Рубина Ксения Андреевна, доктор биологических наук, доцент, профессор Российской академии наук, заведующая лабораторией морфогенеза и репарации тканей факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»*
Андреева Елена Ромуальдовна, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук
Татарский Виктор Вячеславович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной онкобиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук

Защита диссертации состоится «18» ноября 2025 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.9 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: tlipina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале:

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/3619>

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Т.В. Липина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Усиление инвазивного потенциала клеток при неопластической трансформации сопровождается рядом морфологических изменений, в основе которых лежит реорганизация актинового цитоскелета и уменьшение экспрессии молекул межклеточных адгезий. Актиновые микрофиламенты в тандеме с актин-связывающими белками (АВР, actin binding proteins) и молекулами миозина обеспечивают поддержание клеточной формы, адгезию, деление и цитокинез. В нормальных фибробластах цитоплазматические актины образуют две системы: кортикальную сеть тонких филаментов, богатую γ -актином, и систему параллельно ориентированных плотных β -актиновых пучков, формирующих стресс-фибриллы и участвующих в натяжении и миграции. Нарушение пространственно-временной организации каждой из актиновых систем в ходе клеточной трансформации приводит к изменению морфологии, увеличению клеточной подвижности и дальнейшей опухолевой прогрессии. Реорганизация различных паралофов актина при трансформации связана с нарушениями регуляции клеточного цикла опосредованно через взаимодействие различных изоформ актина с MAP-киназами и другими сигнальными молекулами.

Учитывая высокое цитоплазматическое содержание актина, данный белок является одной из важных мишеней активных форм кислорода (АФК), уровень которых повышается при окислительном стрессе, характерном для опухолевых клеток. Показано, что АФК могут оказывать влияние на конформацию молекул актина и организацию актиновых филаментов и их взаимодействие с АВР, однако механизм таких изменений при опухолевой трансформации изучен недостаточно. Поиск агентов, модифицирующих окислительно-восстановительный статус трансформированных клеток, и, как следствие, влияющих на организацию различных актиновых систем, является важным направлением фундаментальных и прикладных исследований.

В дыхательной цепи митохондрий продуцируется основная часть внутриклеточных АФК и окислительные повреждения накапливаются в митохондриях быстрее, чем в других органеллах. Показано, что TRP^+ липофильные катионы имеют тенденцию к избирательному накоплению в митохондриях опухолевых клеток. Конъюгаты алкил-трифенилфосфониевого катиона (TRP^+) и молекул, обладающих противоопухолевой активностью могут являться перспективными агентами, избирательно накапливающимися в митохондриях опухолевых клеток, предположительно, оказывая минимальный эффект на здоровые клетки организма.

Остается открытым вопрос о влиянии изменения окислительно-восстановительного статуса клетки при воздействии митохондриально-направленных антиоксидантов (МАО) на пролиферацию и параметры клеточного цикла. До настоящего времени неизвестно, является ли уменьшение пролиферации трансформированных клеток при снижении уровня митохондриальных активных форм кислорода (МАФК) в присутствии МАО результатом ингибирования митотического цикла на какой-либо стадии, или же активацией апоптотической программы. Поэтому исследование

пролиферативных свойств и динамики клеточного цикла в условиях инкубации с МАО является актуальной задачей.

Целью работы является исследование влияния антиоксидантов, адресованных в митохондрии, на морфологию и пролиферацию трансформированных фибробластов человека в культуре.

Задачи исследования:

1. Проанализировать изменение морфологии нормальных, SV40-трансформированных и опухолевых фибробластов в присутствии МАО.

2. Исследовать влияние МАО на пространственную и структурную организацию β - и γ -актиновых систем в нормальных, SV40-трансформированных и опухолевых фибробластах.

3. Оценить влияние МАО на: организацию фокальных контактов (ФК), общее количество белка зрелых ФК винкулина, распределение α -актинина-1, поддерживающего структуру стресс-фибрилл, в SV40-трансформированных фибробластах.

4. Исследовать влияние МАО на структурную организацию маркера миофибробластной дифференцировки α -гладкомышечного актина и немышечного миозина II в SV40-трансформированных фибробластах.

5. Проанализировать влияние МАО на распределение белка p34 комплекса Arp2/3 в SV40-трансформированных фибробластах.

6. Оценить влияние МАО на пролиферацию и динамику клеточного цикла SV40-трансформированных и опухолевых фибробластов.

Объектом исследования являются линии нормальных, вирус-трансформированных и опухолевых клеток человека мезенхимального происхождения. **Предметом исследования** являются морфология клеток, организация актинового цитоскелета и АВР, количественные характеристики белков (α -гладкомышечного актина, винкулина, киназ фосфо-Аутога А, В, С и белка ретинобластомы фосфо-Rb), количество клеток в культуре, параметры клеточного цикла.

Научная новизна. Впервые показано изменение пространственно-структурной организации актинового цитоскелета, а также распределения актиновых изоформ (фенотипическая нормализация) в вирус-трансформированных клетках при снижении уровня МАФК в присутствии МАО семейства SkQ. Наблюдаемая реорганизация актина сопровождается восстановлением системы β -актиновых пучков, содержащих маркеры миофибробластной дифференцировки.

В данной работе впервые исследовано воздействие МАО группы SkQ на фокальные адгезии вирус-трансформированных клеток, показавшее увеличение размера ФК и появление популяции зрелых ФК, что указывает на нормализацию трансформированного фенотипа клеток. Данный эффект также сопровождается появлением актиновых пучков, содержащих α -гладкомышечный актин. Полученные данные говорят в пользу того, что снижение МАФК с помощью МАО вызывает ряд последовательных этапов модуляции трансформированных фибробластов в направлении миофибробластного фенотипа. Впервые показано, что уменьшение уровня МАФК при воздействии МАО семейства SkQ подавляет рост вирус-трансформированных фибробластов, а также клеток фибросаркомы

и рабдомиосаркомы в культуре. При этом данный эффект частично опосредован модуляцией белков APC, снижением уровня Aurora B и фосфорилированных форм киназ Aurora A/B/C.

Теоретическая и практическая значимость исследования. В ходе исследования проведен детальный анализ организации γ - и β -актиновых цитоскелетных систем с помощью современных методов визуализации и описаны их морфофункциональные отличия в нормальных и трансформированных мезенхимальных клетках. Получены данные о восстановлении системы β -актиновых пучков в вирус-трансформированных и опухолевых фибробластах и индукции дифференцировки SV40-трансформированных фибробластов в направлении миофибробластного фенотипа в присутствии мАО. В исследовании показано, что уменьшение уровня мАФК с помощью мАО уменьшает пролиферацию вирус-трансформированных и опухолевых фибробластов, а также индуцирует апоптоз в клетках рабдомиосаркомы. Полученные экспериментальные данные позволили выдвинуть гипотезу о том, что мАФК играют важную роль в процессе клеточной трансформации, регулируя реорганизацию цитоплазматических изоформ актина и АВР, а также процесс клеточного деления опухолевых и вирус-трансформированных фибробластов с участием киназ семейства Aurora. Результаты данного исследования позволяют рассматривать мАО как потенциальные средства противоопухолевой терапии, а дальнейшее изучение механизмов их действия – как важную не только теоретическую, но и практическую задачу. Проведенные в данной работе эксперименты внесли существенный вклад в разработку данного направления.

Положения, выносимые на защиту:

1. Для неопластически трансформированных мезенхимальных клеток характерно нарушение организации актиновых филаментов, β - и γ -актиновых цитоскелетных систем и распределения АВР. Снижение уровня мАФК при воздействии мАО приводит к фенотипической нормализации таких клеток и восстановлению системы β -актиновых пучков, увеличению размера ФК и появлению зрелых ФК.

2. Снижение уровня мАФК в присутствии мАО в культуре опухолевых фибробластов приводит к ингибированию пролиферации, изменению динамики клеточного цикла и индукции апоптоза.

Методология исследования. Данное исследование выполнено на модели *in vitro* (метод культуры клеток) с использованием современных методов клеточной и молекулярной биологии, биохимии. Анализ полученных результатов проведен с использованием релевантных методов статистической обработки данных.

Степень достоверности исследования. Используемые в работе методологические подходы соответствуют мировому уровню исследований. Достоверность полученных результатов подтверждена статистической обработкой данных с применением адекватных критериев с использованием современного программного обеспечения. Эксперименты выполнены в трёх – пяти повторах с хорошей воспроизводимостью.

Апробация результатов. Результаты исследования были представлены и обсуждены на 7 российских и международных конференциях и симпозиумах.

Публикации по теме исследования. По материалам исследования опубликовано 5 научно-исследовательских работ в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ им. М. В. Ломоносова по специальности и отрасли наук.

Личный вклад автора в проведение исследования. Автору диссертационного исследования принадлежит основная роль в анализе литературы по теме, формулировании задач работы, подготовке и проведении экспериментов, статистической обработке данных, интерпретации результатов, формулировании выводов и написании текста диссертации, подготовке тезисов и публикаций по теме исследования.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 154 страницах машинописного текста и включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы, содержащий 330 источников. Работа иллюстрирована 64 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Клеточные культуры и культивирование клеток. Для анализа влияния мАО на клетки мезенхимального происхождения были использованы различные культуры. В качестве контрольных клеток использовалась первичная культура нормальных фибробластов кожи человека HSCF из коллекции клеточных культур Института медицинской генетики РАН (Москва) и линия эмбриональных легочных фибробластов человека MRC-5 с ограниченным количеством пассажей. В качестве трансформированных фибробластов были использованы клональные производные клеток MRC-5, трансформированные вирусом SV40: линии MRC5-V1 и MRC5-V2. Клетки линии MRC5-V2 имели исходно более выраженный трансформированный фенотип (Huschtscha & Holiday, 1983). В качестве опухолевых клеток мезенхимального происхождения были использованы культуры HT1080 - линия фибросаркомы человека с одним эндогенным мутантным аллелем N-Ras (Gupta, 2001) и RD - линия рабдомиосаркомы человека (McAllister, 1969). Клетки культивировали на среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, (ПанЭко) с 5-10% сыворотки крупного рогатого скота (HyClone), 100 U/мл пенициллина, 100 U/мл стрептомицина, 5 mU L-глутамин (ПанЭко) при 37° С в увлажненной атмосфере 5% CO² на культуральном пластике.

Экстракция и фиксация клеток. Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки выращивали на покровных стеклах и промывали DMEM, содержащей 20 mM HEPES. Клетки фиксировали в течение 15 мин 1,5% параформальдегидом на среде DMEM (с 20 mM HEPES) без сыворотки при комнатной температуре с последующей экстракцией-фиксацией холодным метанолом при -20°С в течение 5 минут (для последующей окраски антителами), либо пермеабилizировали 0,1% тритоном X-100 на фосфатно-буферном растворе (PBS, phosphate-buffered saline) в течение 3 минут (для окраски фаллоидином, DAPI) при комнатной температуре. После отмывки PBS клетки подвергались окраске красителями или антителами для выявления цитоскелетных структур, ДНК и распределения анализируемых белков.

Анализ ростовых характеристик клеточных культур. Клетки рассаживали в культуральные чашки и подсчитывали количество клеток через каждые 24 часа с помощью фазово-контрастной микроскопии на микроскопе AxioPlan (Zeiss) с объективом 20x/0,50 (Plan-Neofluar). Анализировалось не менее 20 полей зрения для каждого из условий эксперимента.

Обогащение клеточной популяции митотическими клетками. Для обогащения культур опухолевых фибробластов митозами использовалось два метода. Для анализа параметров и динамики клеточного цикла клетки предынкубировали в среде без сыворотки в течение 24 часов. После этого клетки пересаживали и инкубировали в свежей среде, содержащей сыворотку, в течение 13-24 часов перед анализом для обогащения культур митотическими клетками без химической обработки. Для иммуноблоттинга использовали предынкубацию клеток с малыми дозами колцемида (0,02 мкг/мл, Sigma) для обогащения культур митозами. Клетки пересаживали на культуральный пластик и через 3 часа (после прикрепления к субстрату) добавляли колцеמיד в среду на 24 часа. Затем клетки промывали один раз средой без сыворотки и затем инкубировали в среде с сывороткой в течение 24 часов перед анализом. Данный способ является менее физиологичным, чем первый, однако позволяет получить большую популяцию митотических клеток в культуре для последующего анализа содержания белка.

Анализ параметров клеточного цикла. После 24-96 часов инкубации клетки снимали с помощью раствора трипсина с ЭДТА (ПанЭко) для анализа параметров клеточного цикла. Клетки снимали с пластиковой подложки, промывали PBS и фиксировали ледяным 80% этанолом (1:2), инкубировали в течение ночи при 4⁰С и хранили при 4⁰С до анализа методом проточной цитофлуориметрии. Непосредственно перед анализом клетки центрифугировали для удаления этанола, промывали PBS и окрашивали пропидий йодидом (MP Biomedicals) 30 мкг/мл с РНКазой А (Fermentas) 10 нг/мл в буфере PBS в течение 45 минут при 37⁰С в темноте. Анализировали не менее 20000 клеток на каждое условие эксперимента с помощью проточного цитометра Beckman Coulter Cytomics FC500. Для дальнейшей визуализации и анализа полученных данных использовалось программное обеспечение Beckman Coulter CXP.

Измерение внутриклеточных АФК. Для измерения внутриклеточных АФК клетки RD и HT1080 инкубировали в бессывороточной среде DMEM с 1,8 мкМ DCFH-DA (2',7'- дихлордигидрофлуоресцеин диацетат, Invitrogen) в течение 10 минут при 37⁰С в темноте. После окисления под действием АФК дихлордигидрофлуоресцеин превращается в высокофлуоресцентный дихлорфлуоресцеин (DCF). Затем клетки снимали с помощью раствора трипсина с ЭДТА (ПанЭко). Накопление АФК измеряли методом проточной цитофлуориметрии на приборе Beckman Coulter Cytomics FC500.

Фазово-контрастная микроскопия живых клеток. Клетки культивировали на покровных стеклах в закрытых стеклянных камерах в течение 24 часов перед началом наблюдения. Клетки анализировали с помощью фазово-контрастной микроскопии (микроскоп Opton, с использованием объектива 40x/1,0 Planapo с масляной иммерсией). Для динамических наблюдений использовали длительную цейтраферную видеосъемку (замедление в 120 раз) с помощью камеры Hamamatsu C2400-01. При исследовании

поддерживалась температура 37°C. Для обработки изображений использовалось программное обеспечение Studio Launcher. Для подсчета продолжительности митотических фаз анализировали не менее 30 митотических клеток для каждого из условий эксперимента.

Морфометрический анализ клеток. Изображения анализировали с помощью программы MetaMorph. Клетки фиксировали через 72 часа после рассадки на покровные стекла. Морфометрический анализ проводился на изображениях препаратов, окрашенных фаллоидином, выявляющим общий актин. Для исключения влияния на площадь и форму клеток межклеточных взаимодействий исследовали одиночные клетки в редких культурах. В качестве морфометрических характеристик была выбрана площадь проекции, занимаемая клеткой на субстрате, которую определяли по контурам клетки.

Морфометрия фокальных контактов проводилась с использованием программы Image J при анализе изображений, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа. Исследовались изображения препаратов, окрашенных антителами к паксиллину в комбинации с фаллоидином, выявляющим общий актин. Для измерения выбиралась квадратная зона площадью 500 мкм² вблизи ведущего края клетки. Длину фокальных адгезий измеряли как максимальный размер контакта независимо от его ориентации относительно края и тела клетки.

Антиоксиданты и ингибиторы. Вещества группы SkQ («Митотехнологии») – SkQ1, SkQB, SkQP, SkQR1, DPQ, SkQRC12, использовали в концентрации 10-100 нМ в среде для культивирования, при постановке эксперимента добавляли из спиртового раствора концентрацией 10-100 мМ, соответственно (1 мкл на 1 мл среды). Липофильный катион додецилтрифенилфосфония C12TPP и децилпродамина C12R1 в отличие от SkQ1 не имеют остатка пластохинона, отвечающего за антиоксидантную активность. DPQ – децилпластохинон не имеет катионной части, обеспечивающей адресное накопление вещества в митохондриях. Данные молекулы использовались в качестве контрольных соединений. Антиоксидант (АО) Тролокс (Sigma) использовался в концентрации 100 мМ, NAC (Sigma) - в концентрации 1 мМ в среде для культивирования. Ингибиторы каспаз использовались для предотвращения апоптоза в клетках рабдомиосаркомы RD. Ингибитор каспазной активности zVAD-fmk (Sigma) и ингибитор каспазы-3 DEVD (Sigma) использовались в концентрации 20 мМ в среде для культивирования. Митохондриальный разобщитель окислительного фосфорилирования FCCP (карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразон) (Sigma) использовался в концентрации 5 мМ в среде для культивирования.

Антитела. Использовали следующие первичные антитела: мышинные моноклональные антитела к цитоплазматическому β-актину (μA5775GA, AbD Serotec), γ-актину (μA5776GA, AbD Serotec), альфа-гладкомышечному актину (клон SM-1, IgG2a, были получены и любезно предоставлены проф. Шапонье, лаб. патологии и иммунологии медицинского центра университета Женевы, Швейцария), α-актинину-1 (Sigma), паксиллину (BD Transduction Lab), α-тубулину (клон DM1A, Cell Signaling), α-тубулину (клон DM1A, Sigma), Rb (Cell Signaling); виментину (клон V9, DAKO); кроличьи высокоспецифичные поликлональные антитела к белку p34-Arc/ARPC2 комплекса Arp2/3

(Upstate), кроличьи поликлональные антитела к миозину II (BTI), кроличьи антитела к Aurora B (клон E3R8N, Cell Signaling), фосфо-Aurora A/B/C (Cell Signaling), фосфо-Rb (Ser795) (Cell Signaling), фосфо-Rb (Ser 807/811) (Cell Signaling). Использовали следующие вторичные антитела: козы Alexa 488-, AlexaFluor 594-конъюгированные к иммуноглобулинам IgG1, IgG2b, IgG мыши (Molecular Probes) и родамин-конъюгированные к иммуноглобулинам кролика (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc), козы флуоресцеин- и родамин-конъюгированные антитела к иммуноглобулинам Ig2a, Ig2b и IgG1 мыши (Southern Biotechnology).

Флуоресцентная, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, микроскопия со структурированным освещением. Клетки фиксировались описанными выше методиками. Для окрашивания антителами клетки инкубировали 40 минут в растворе первых антител на PBS, отмывали 3 раза в PBS в течение 5 минут, затем инкубировали в растворе вторых антител на PBS в течение 30 минут. Окрашивание проводили при комнатной температуре. Препараты заключали в эльванол. Для выявления митохондрий использовался SkQR1 (SkQ1, меченный родамином), 20 мкМ в среде для инкубации. Иммунофлуоресцентное исследование проводили с помощью микроскопа AxioPlan (Zeiss) с увеличением 40×/0,75 и 63×/1,25 объективами Plan-Neofluar с масляной иммерсией. Окрашивание DAPI и родамин-конъюгированным фаллоидином использовали для оценки количества клеток на разных стадиях митоза (500 клеток на каждое условие эксперимента, от трех до пяти независимых экспериментов на каждое из экспериментальных условий). Окрашивание DAPI и антителами к Aurora B использовали для оценки флуоресценции Aurora B в митотических клетках. Интенсивность флуоресценции белка измеряли с помощью программы Image J в квадрате площадью 100 мкм² (10 мкм на 10 мкм) чтобы захватить всю область флуоресценции киназы в области клетки, где она была локализована. Для каждого экспериментального условия исследовали не менее 30 полей зрения. Микроскопию сверхвысокого разрешения со структурированным освещением (3D-SIM) использовали для анализа совместного распределения Aurora B, тубулина и ДНК. Анализ проводили с помощью микроскопа Nikon N-SIM (Nikon) с объективом 100×/1.49 NA с масляной иммерсией, диодным лазером 488 нм и 561 нм. возбуждения. Распределение изоформ актина и паксиллина анализировали методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Анализ проводили с помощью конфокального микроскопа LSM 510 с использованием аргон-неонового лазера (исходящая длина волны 488).

Электрофорез белков и иммуноблоттинг. Клетки экстрагировали холодным буфером для образцов (62,5 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 2% додецилсульфат натрия (SDS), 10% глицерин, 50 мМ дитиотреитол, 0,01% бромфеноловый синий). Лизаты разделяли в 10%-ном полиакриламидном геле с SDS и переносили на поливинилиденфторидную мембрану (Amersham GE Healthcare). После блокирования неспецифического связывания бычьим сывороточным альбумином, мембраны инкубировали со специфическими антителами. В качестве контроля нагрузки использовали α -тубулин. Мембраны инкубировали с вторичными антителами, связанными с пероксидазой хрена (Amersham GE Healthcare).

Мембраны окрашивали методом хемилюминесценции с использованием реагентов ECL (Amersham GE Healthcare) в соответствии с протоколом производителя.

Статистический анализ. Данные представлены с указанием среднего \pm стандартная ошибка среднего по трем - пяти независимым экспериментам. Межгрупповые различия анализировали с помощью U-критерия Манна-Уитни или t-теста Стьюдента, если это применимо. Значения $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), и $p < 0,05$ (*) считались статистически значимыми.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Воздействие МАО на морфологию нормальных, SV40-трансформированных и опухолевых фибробластов

Для исследования изменений в морфологии фибробластов под действием МАО были выбраны культуры мезенхимальных клеток человека. В качестве контрольных клеток использовали первичную культуру фибробластов кожи человека HSCF, состоящую из нормальных фибробластоподобных клеток классической морфологии (Dugina et al., 1998), а также линию легочных фибробластов MRC5. В культурах, выделенных из легочной ткани, таких как MRC5, фибробласты обладают повышенной стабильностью и сократимостью, связанной с экспрессией α -гладкомышечного актина (Hinz et al., 2002; Hinz et al., 2003), что характерно для миофибробластной дифференцировки. В культуре такие клетки хорошо распластаны и имеют сильно изрезанный край. Содержание α -гладкомышечного актина в миофибробластах и ремоделирование актинового цитоскелета зависит от активации SMAD- и RhoA (независимо от SMAD) сигнальных путей, индуцируемых TGF- β (Derynck et al., 2003). По данным наших коллег Поповой и др., длительная инкубация фибробластов с МАО приводит к миофибробластной дифференцировке по TGF- β -зависимому типу (Porova et al., 2010). Поэтому, кроме обычных фибробластов кожи с невысоким содержанием миофибробластов в культуре мы анализировали действие МАО на культуру легочных фибробластов MRC5 и культуры ее вирус-трансформированных производных - линии MRC5-V1 и MRC5-V2. По морфологическим критериям и степени опухолеродности MRC5-V2 – более трансформированное клональное производное клеток MRC5 по сравнению с линией MRC5-V1 (Huschtscha and Holliday, 1983). В перспективе данных исследований нашими соавторами планировалось проведение исследований на животной модели подкожных опухолевых ксенографтов (Agarova et al., 2008), поэтому мы анализировали действие МАО на две опухолевые линии мезенхимального происхождения: клетки фибросаркомы человека HT1080 - морфологически полиморфная культура, содержащая мутантный аллель онкогена N-Ras (Gupta and Stanbridge, 2001); и культуру клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека RD (McAllister et al., 1969).

При инкубации с МАО значительных изменений морфологии культур нормальных фибробластов не наблюдалось: клетки становились еще более распластанными, статистически значимого увеличения площади клеток, занимаемой ими на субстрате, выявлено не было (Рис. 1). При инкубации клеток MRC5-V1 и MRC5-V2 с МАО наблюдалась частичная морфологическая нормализация фенотипа клеток, уменьшалась

плотность исследуемой культуры по сравнению с контрольной, улучшалось распластывание: увеличивалась средняя площадь, занимаемая клетками на субстрате. Клетки культуры HT1080 в присутствии MAO становились более распланными, активность края по периметру клеток существенно снижалась (Рис. 2). MAO приводили к резкому уменьшению плотности клеток в культуре RD уже через 1-2 суток инкубации. Основная популяция клеток при этом имела измененную морфологию, характерную для апоптотических клеток (Рис. 2).

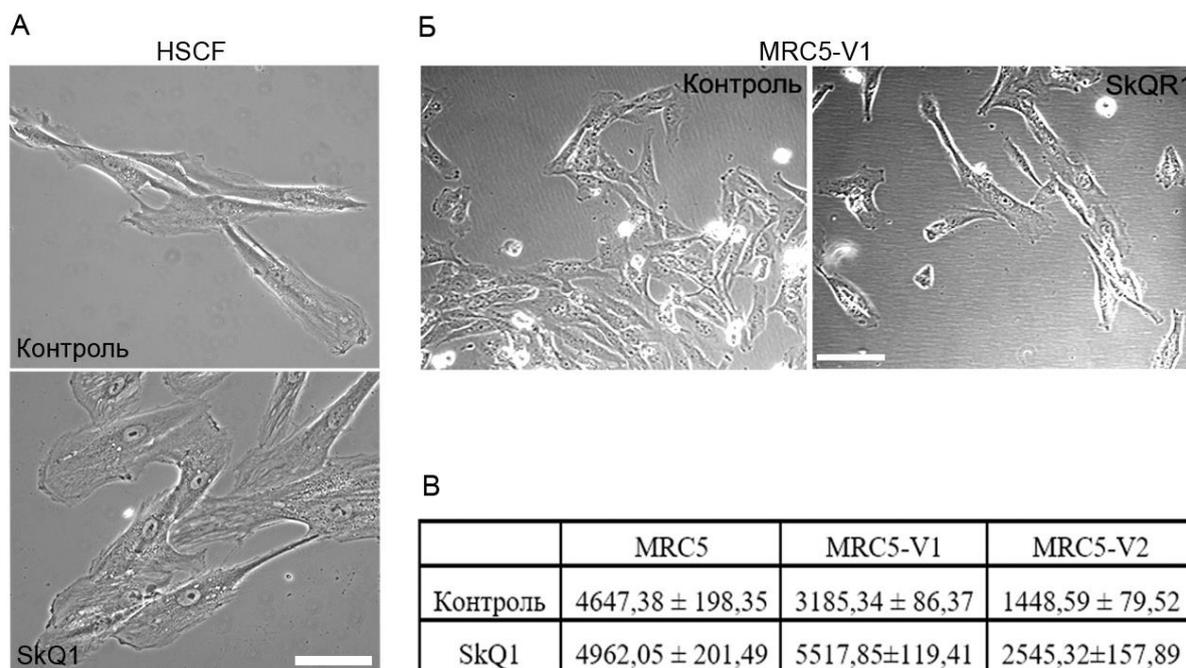


Рисунок 1. Эффект MAO на морфологию нормальных и трансформированных фибробластов; А – влияние SkQ1 (20нМ, 48 часов) на морфологию нормальных фибробластов кожи HSCF, общий вид культуры,; фазовый контраст, масштаб 50 мкм.; Б – влияние SkQR1 (20 нМ, 48 часов) на морфологию клеток MRC5-V1; фазовый контраст, масштаб 50 мкм; В - действие SkQ1 (20 нМ, 72 часа) на среднюю площадь клеток, занимаемую на субстрате; данные морфометрического анализа: среднее значение ± стандартная ошибка среднего, мкм²; $p < 0,001$ (для MRC5-V1) и $p < 0,01$ (для MRC5-V2) согласно критерию Манна-Уитни; три независимых эксперимента.

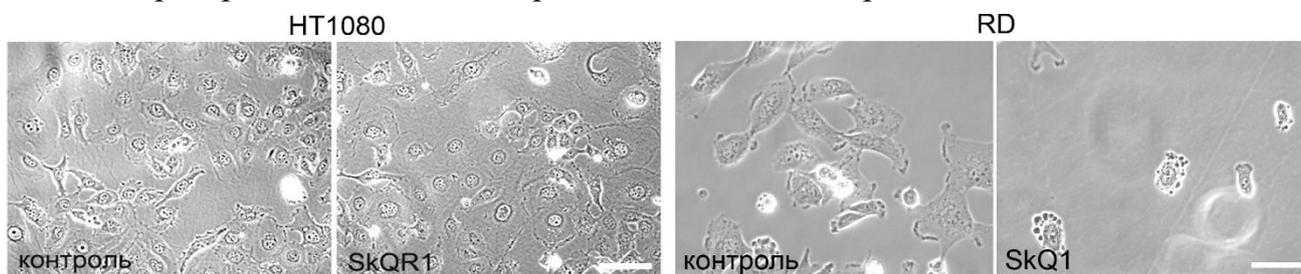


Рисунок 2. Эффект MAO на морфологию опухолевых фибробластов. 48 часов инкубации с MAO (40нМ – для клеток HT1080 и 20нМ для клеток RD); фазовый контраст, масштаб 50 мкм.

2. Оценка адресного действия MAO семейства SkQ

При инкубации нормальных и трансформированных фибробластов с SkQR1, родаминовым производным SkQ1, было показано избирательное накопление антиоксиданта в митохондриях (Рис. 3, А). Снижение уровня цитоплазматических АФК в присутствии SkQ1 было показано для клеток сарком HT1080 и RD методом проточной цитофлуориметрии с использованием специфического флуоресцентного красителя DCF (Рис. 3, Б), что согласуется с данными литературы (Antonenko et al., 2008). По данным, полученным ранее в нашей лаборатории, SkQ1 эффективно снижает подъем уровня АФК в нормальных фибробластах, вызванный перекисью водорода, а также предотвращает индуцированный при этом апоптоз (Antonenko et al., 2008).

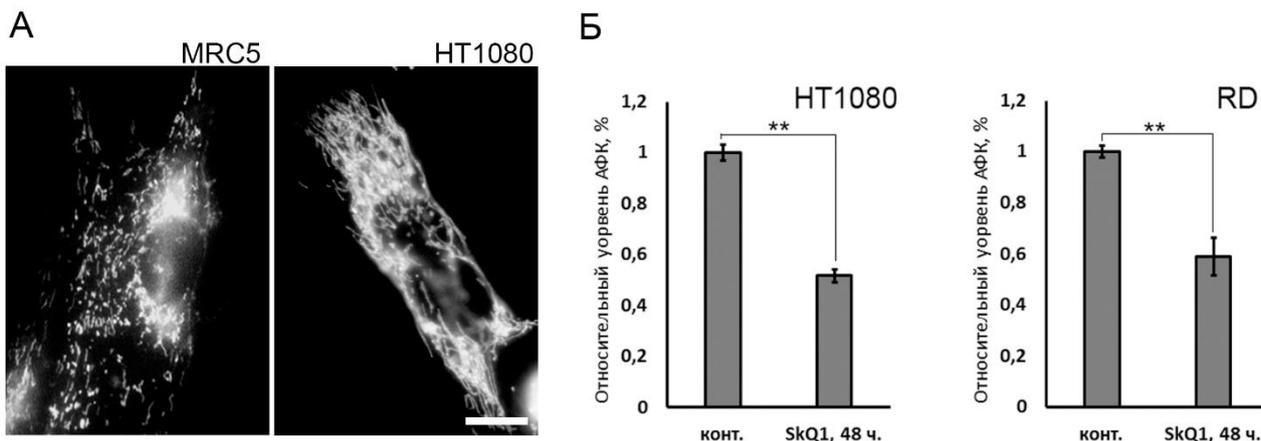


Рисунок 3. Адресное действие MAO группы SkQ. А - накопление родамин-меченного MAO SkQR1 (20 нМ, 2 часа) в митохондриях клеток MRC5 и HT1080; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм. Б - данные количественного анализа продукции АФК после инкубации с SkQ1 (40 нМ, 48 часов); на графиках показана относительная флуоресценция DCF (по сравнению с контролем); статистический анализ данных проточной цитофлуориметрии, значимые различия: ** – $p < 0,01$, согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента.

3. Влияние MAO на организацию актиновых цитоскелетных систем в нормальных, вирус-трансформированных и опухолевых фибробластах.

Для более детального изучения наблюдаемых морфологических изменений клеток в присутствии MAO был проведен анализ организации актиновых цитоскелетных систем. В нормальных клетках цитоплазматические изоформы актина образуют два типа структур. Первый тип, в котором преимущественно преобладает β -актин – это пучки микрофиламентов, образующие стресс-фибриллы, филоподии, пучки, участвующие в образовании межклеточных контактов и межклеточной перетяжки в ходе телофазы, что указывает на роль β -актина в клеточной адгезии и сокращении. Второй тип, преимущественно образованный γ -актином – кортикальные и ламеллярные сети ветвящихся микрофиламентов (Dugina et al., 2005). В литературе встречаются данные, указывающие на возможность использования β - и γ -актина в качестве маркеров в дифференциальной диагностике опухолей (Дугина и др., 2017). В нашей работе для более детального изучения морфологических изменений исследуемых культур в ходе трансформации и в присутствии MAO, также была проанализирована реорганизация

актинового цитоскелета как важного признака неопластической трансформации. Селективная организация актиновых систем наблюдалась нами как в нормальных, так и в трансформированных фибробластах. При анализе организации актиновых изоформ в клетках HSCF была выявлена характерная для нормальных фибробластов система пучков β -актина и сеть γ -актина (Рис. 4, А). β -актин был организован в толстые длинные пучки, идущие параллельно стабильным краям клетки. γ -актин формировал плотную сеть тангенциальных пучков. Ведущий край клетки был обогащен обеими изоформами актина. Инкубация клеток HSCF с мАО приводила к появлению клеток с миофибробластным фенотипом – у них были еще более выражены длинные пучки β -актина, клетки имели стабильный, изрезанный край (Рис. 4, Б).

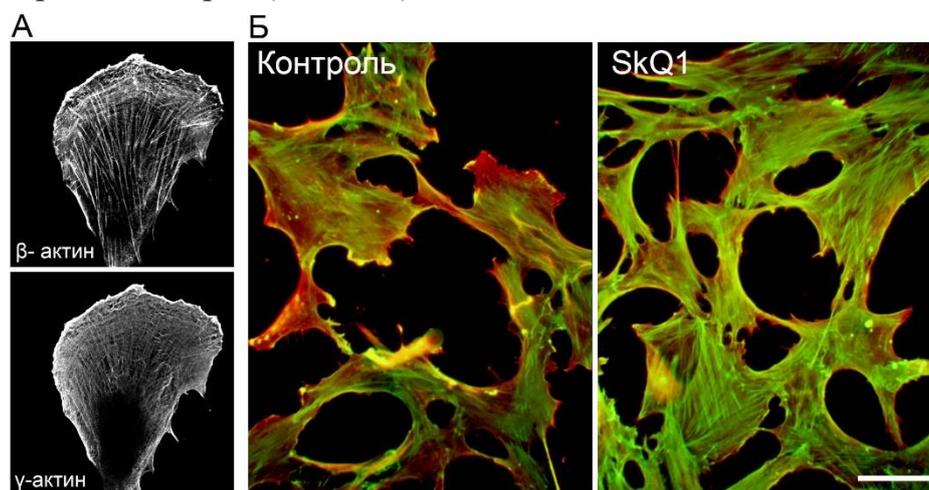


Рисунок 4. Влияние мАО на организацию β - и γ -актина в клетках HSCF. А – распределение β - и γ -актина в контрольных клетках, 72 часа инкубации; конфокальная микроскопия; масштаб 10мкм; Б - влияние мАО на организацию β - и γ -актина; 40 нМ SkQ1, 72 часа; β -актин – зеленый, γ -актин – красный; флуоресцентная микроскопия; масштаб 50 мкм.

Культура легочных фибробластов MRC-5 была представлена преимущественно миофибробластами. Миофибробласты – высоко дифференцированные мезенхимальные клетки, имеющие характеристики гладкомышечных клеток и фибробластов, способные к сокращению, с толстыми пучками актина (стресс-фибриллами), содержащими α -гладкомышечный актин (Hinz et al., 2002). Эти клетки играют ключевую роль в заживлении тканей и ремоделировании внеклеточного матрикса. Обычные фибробласты могут приобретать свойства миофибробластов как вынужденный ответ на изменение внеклеточного матрикса и в присутствии TGF- β (Tomasek et al., 2002). β -актиновая система в легочных фибробластах линии MRC-5 была сформирована толстыми стресс-фибриллами, содержащими также α -гладкомышечный актин. Плотная γ -актин-содержащая сеть была представлена тангенциальными и редкими радиальными пучками (Рис 5, А). После инкубации с мАО не наблюдалось значительных изменений в распределении цитоплазматических изоформ актина (Рис. 5, Б).

Клеток с миофибробластной морфологией практически не было в контрольной культуре HSCF. Инкубация с мАО приводила к появлению большего количества клеток, позитивных на α -гладкомышечный актин. С помощью иммуоблоттинга было

подтверждено, что МАО вдвое увеличивают количество данного маркера миофибробластной дифференцировки на седьмые сутки инкубации (Рис. 6). Ранее было показано, что снижение МАФК в нормальных подкожных фибробластах с помощью МАО приводит к миофибробластной дифференцировке через активацию Rho/ROCK/LIMK сигнального пути, приводящей к фосфорилированию кофилина и стабилизации актиновых стресс-фибрилл. Наблюдаемое при этом повышение количества маркеров миофибробластной дифференцировки - изоформы фибронектина EDA-FN и α -гладкомышечного актина было опосредовано фактором TGF- β 1, который активировался металлопротеазой MMP9 (matrix metalloprotease 9) (Popova et al., 2010).

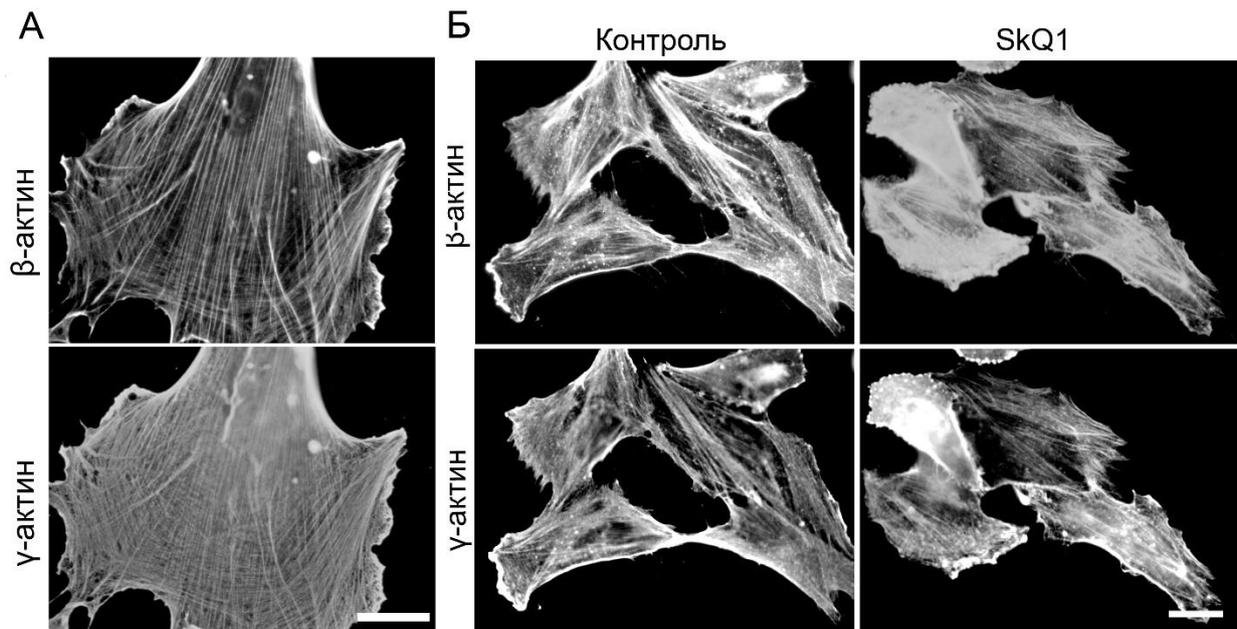


Рисунок 5. Влияние SkQ1 на организацию β - и γ -актина в клетках MRC-5. А - выявление β - и γ -актина в контрольных фибробластах линии MRC-5; 72 часа инкубации; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм; Б – действие SkQ1 (40 нМ, 48 часов) на организацию; β - и γ -актина; флуоресцентная микроскопия; масштаб 20 мкм.

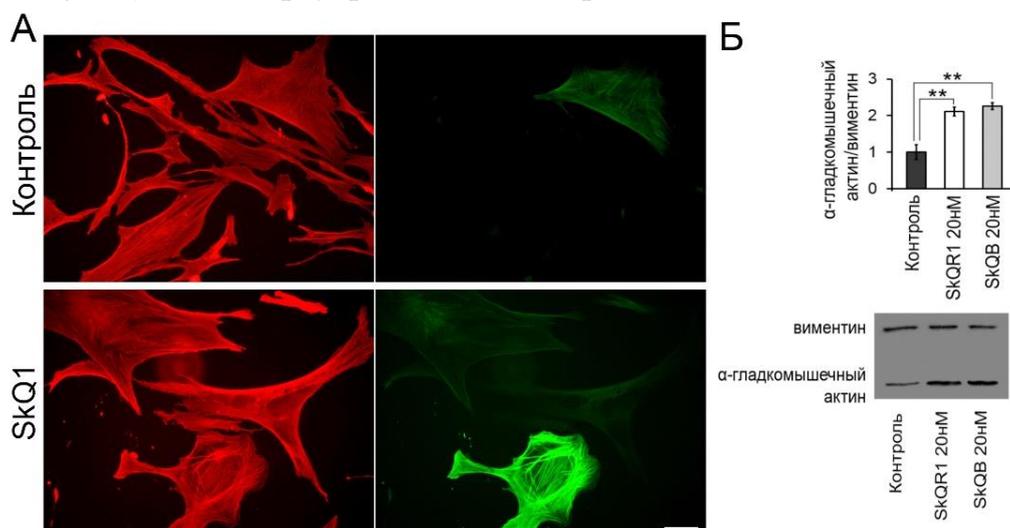


Рисунок 6. Влияние МАО на распределение и количество α -гладкомышечного актина в культуре HSCF. А – выявление клеток, позитивных на α -гладкомышечный актин в присутствии SkQ1 (20 нМ SkQ1, 72 часа); красный – актин (фаллоидин), зеленый – α -

гладкомышечный актин; флуоресцентная микроскопия; масштаб 20 мкм; Б - влияние МАО (7 суток) на содержание α -гладкомышечного актина; иммуноблоттинг (снизу) и количественная оценка иммуноблоттинга (сверху); нормализация по виментину; среднее и стандартная ошибка среднего; значимые различия: ** – $p < 0,01$ согласно критерию Манна-Уитни; 3 независимых эксперимента.

Нами был подробно исследован эффект МАО на реорганизацию актинового цитоскелета в трансформированных клетках. Вирус-трансформированные и опухолевые клетки демонстрировали схожую сегрегацию в распределении двух актиновых систем - β - и γ -актина, характерную для процесса трансформации. Клональные производные MRC5, трансформированные вирусом SV40 - MRC5-V1 и MRC5-V2 имели измененную морфологию, сопровождающуюся частичной потерей β -актиновых пучков, которая была более выражена в более трансформированной культуре MRC5-V2. γ -актин был организован в виде развитой сети фибрилл в кортикальном слое и ламеллиподиальных структурах, более выраженной в клетках MRC5-V2, что указывало на наличие многочисленных активных ведущих краев по периметру клетки. В присутствии МАО в клетках MRC5-V1 диффузное распределение β -актина со слабо выраженной сетью тонких коротких пучков и ярко выраженными обогащенными этой изоформой раффлами менялось на организацию β -актина в стресс-фибриллы, идущие преимущественно параллельно между собой вдоль длинной оси клетки, а также параллельно стабильным краям клетки. γ -Актин в контрольных клетках MRC5-V1 был организован в виде развитой сети пучков в кортикальном слое клетки и ламеллиподиальных структурах, кортекс был ярко выражен. После инкубации с МАО в клетках появлялись длинные радиальные и тангенциальные пучки, образующие плотную развитую сеть. Единичные раффлы встречались редко, кортекс был слабо выражен. Аналогичные изменения в реорганизации актиновых систем под действием МАО наблюдались в клетках MRC5-V2 (Рис. 7).

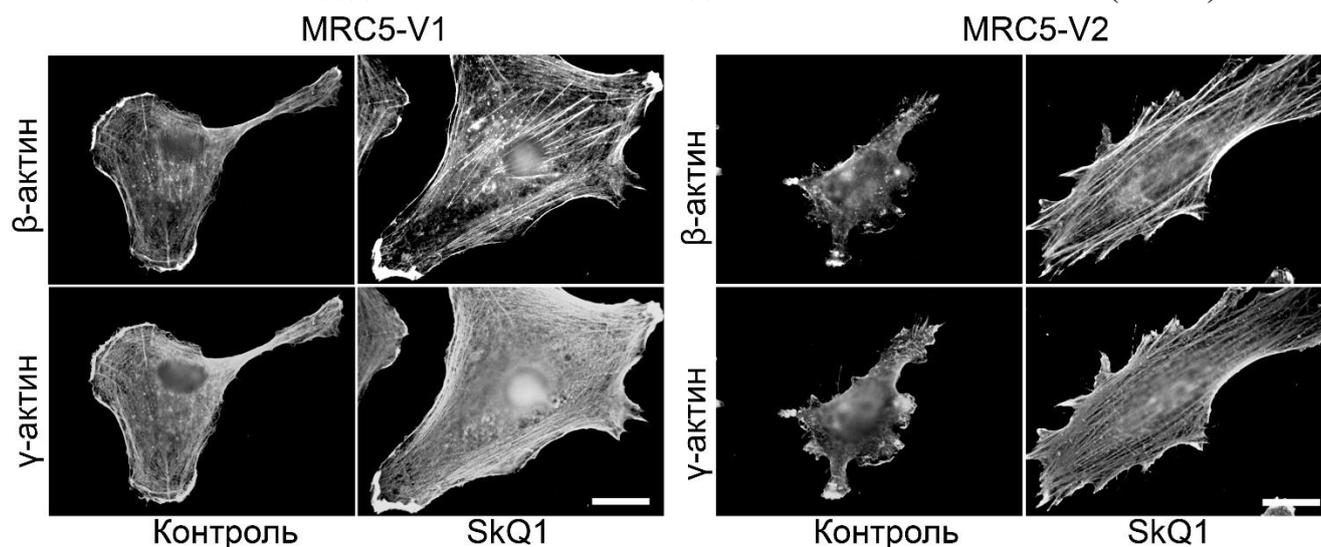


Рисунок 7. Реорганизация β - и γ -актиновых систем в клетках MRC5-V1 и MRC5-V2 в присутствии SkQ1 (20нМ, 72 часа инкубации); флуоресцентная микроскопия; масштаб 10мкм.

Для более подробного исследования реорганизации актинового цитоскелета по миофибробластному пути под действием МАО, мы проанализировали распределение

маркера миофибробластной дифференцировки α -гладкомышечного актина в SV40-трансформированных фибробластах. В литературе описано исчезновение α -гладкомышечного актина при спонтанной клеточной трансформации, его содержание также снижается в опухолевых клетках и в клетках, трансформированных вирусом SV40 (Leavitt et al., 1985, Okamoto-Inoue et al., 1990). Наблюдаемая реорганизация актина в клетках MRC5-V1 под действием МАО сопровождалась восстановлением β -актиновых пучков, позитивных на α -гладкомышечный актин (Рис. 8). При этом в клетках MRC5-V2 таких изменений не наблюдалось, что может быть связано с тем, что данная культура является более трансформированным клональным производным линии MRC5 в сравнении с MRC5-V1 и воздействия SkQ1 (в данной концентрации и сроках инкубации) недостаточно для индукции миофибробластной дифференцировки.

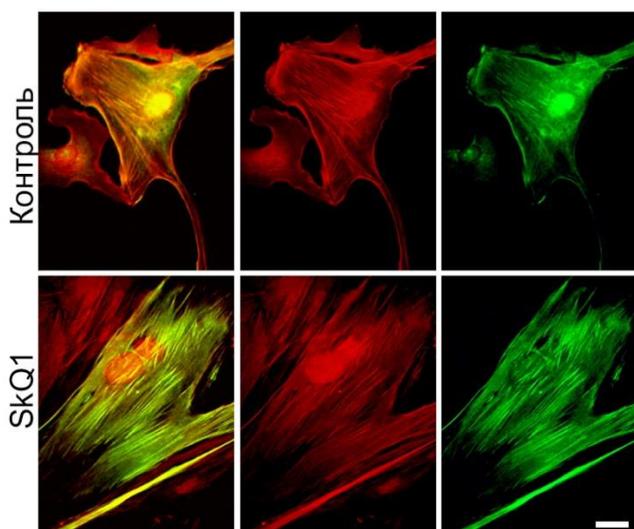


Рисунок 8. Влияние МАО на организацию α -гладкомышечного актина в клетках MRC5-V1; SkQ1 20нМ, 72 часа инкубации; зеленый - α -гладкомышечный актин; красный – β -актин; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм.

В клетках HT1080 была выявлена еще более измененная организация актинового цитоскелета: в цитоплазме наблюдалось диффузное распределение β -актина, ярко выраженные раффлы по всему периметру клетки содержали обе изоформы актина. Локализация γ -актина была также диффузна, был ярко выражен кортекс. Не наблюдалось окрашивания β - и γ -актина в пучках. (Рис. 9). Изменения цитоскелетных систем в виде потери организованных β -актиновых пучков, его диффузного распределения соотносятся с данными литературы об опухолеродности культуры фибросаркомы (Gupta and Stanbridge, 2001; Slovak et al., 1991). При этом данных об опухолеродности вирус-трансформированных фибробластов MRC5-V2, имеющих, по сравнению с HT1080, организованную сеть тонких β -актиновых пучков, в литературе не встречается. Таким образом, можно предположить, что редукция пучков β -актина является маркером опухолевой трансформации клеток фибросаркомы, что согласуется с данными литературы (Dugina et al., 2015). Сопоставление этих результатов и данных литературы для опухолевых тканей молочной железы человека подтверждает, что уменьшение экспрессии бета-актина и гомогенное распределение γ -актина можно считать характерными признаками трансформированных и злокачественных клеток. В исследуемых нами трансформированных культурах γ -актин был организован в виде сети в кортикальном слое клетки и ламеллиподиальных структурах, что согласуется с данными о его роли в клеточной подвижности. В работах по изучению процесса миграции

клеток в экспериментальную рану γ -актин преимущественно выявлялся в подвижных доменах клетки, в то время как экспрессия бета-актина преобладала в стабильных пучках микрофиламентов (Dugina et al., 2005).

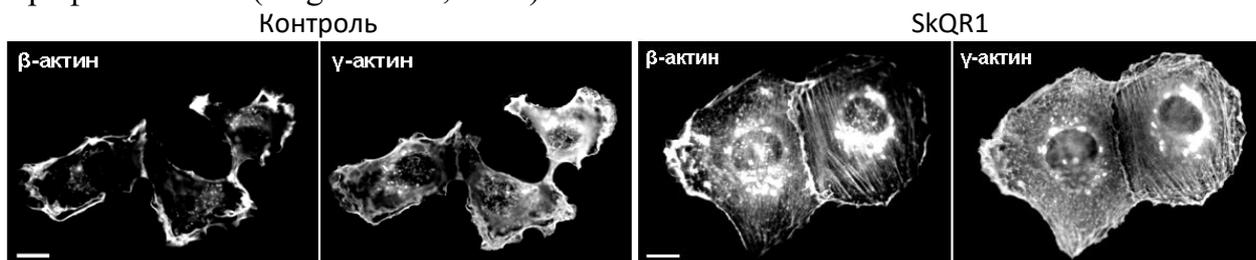


Рисунок 9. Реорганизация β - и γ -актиновых систем в клетках HT1080 в присутствии SkQR1 (20 нМ, 72 часа инкубации); флуоресцентная микроскопия; масштаб 10мкм.

Инкубация клеток фибросаркомы HT1080 с МАО вызывала аналогичные, но менее выраженные, чем в вирус-трансформированных сублиниях MRC-5, изменения организации актиновых систем. Показано, что трансформация p53^{-/-} мышечных фибробластов онкогеном N-Ras вызывает значительное уменьшение площади клеток, индуцируя разборку актиновых стресс-фибрилл и связанных с ними винкулин-содержащих фокальных контактов клеток с субстратом. Воздействие МАО на Ras-трансформированные фибробласты приводит к восстановлению актиновых пучков, фокальных контактов и адгезии клеток к субстрату, увеличению площади клеток, занимаемой ими на субстрате (Агарова et al., 2008). Фенотип клеток фибросаркомы человека HT1080 обусловлен активированным онкогеном N-Ras (Paterson et al., 1987). Активированный Ras повышает уровень внутриклеточных АФК (Archer et al., 2002; Serù et al., 2004). Вероятно, снижение уровня МАФК под действием МАО в нашей работе индуцировало Rho-зависимую реорганизацию актинового цитоскелета в клетках HT1080.

4. Влияние МАО на локализацию актин-связывающих белков в SV40-трансформированных фибробластах

Наиболее выраженный эффект МАО на клеточную морфологию - реорганизация актиновых систем и нормализация фенотипа, был продемонстрирован для клеток линии MRC5-V1. В данной культуре было исследовано изменение распределение немышечного миозина II. Немышечный миозин II отвечает за сокращение и натяжение актиновой системы. Ранее с помощью датчика натяжения и FLIM-FRET микроскопии была описана значительная пространственная и временная неоднородность натяжения вдоль актинового цитоскелета, опосредованного немышечным миозином II. Это указывает на роль такого актомиозинового взаимодействия как в миграции и движении клеток вперед, так и в ретракции «хвоста» клетки (Hart et al., 2024, Weissenbruch et al., 2024). При анализе локализации миозина II преимущественно диффузное распределение при инкубации с МАО сменялось образованием толстых длинных пучков β -актина, содержащих немышечный миозин II (Рис. 10). Таким образом, полученные данные могли указывать на улучшение контрактильности и снижение миграционной активности SV40-трансформированных фибробластов в присутствии МАО.

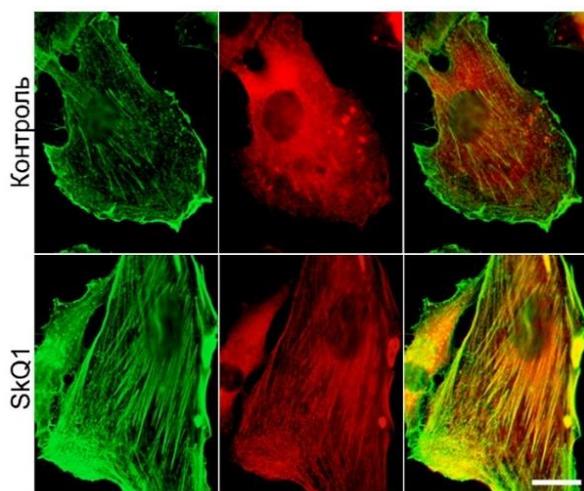


Рисунок 10. Изменение организации β -актина и немышечного миозина II в клетках линии MRC5-V1 в присутствии SkQ1 (20нМ, 72 часа инкубации); зеленый - β -актин, красный - миозин II; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм.

Данные иммунофлуоресцентного анализа распределения АВР показали перераспределение белка p34 комплекса Arp2/3 и α -актинина-1 в клетках MRC5-V1 и MRC5-V2 в присутствии MAO. Известно, что разные АВР участвуют в организации различных актиновых структур в клетке. Белок p34 является специфическим маркером ламеллиподий и в составе комплекса Arp2/3 обеспечивает сборку и динамику сети актиновых филаментов на ведущем крае клетки. α -Актинин-1 поддерживает организацию актина в пучки и стресс-фибриллы вдоль тела клетки в тандеме с миозином II, фасцином, тропомиозином и другими АВР. В трансформированных клетках p34 был распределен диффузно в цитоплазме и концентрировался на ведущем крае клетки. В присутствии MAO на фоне диффузного распределения в цитоплазме выявлялось пониженное присутствие p34 на ведущем крае поляризованных клеток для MRC5-V1 (Рис. 11, А) и в области нескольких краевых участков активности для MRC5-V2. MAO также вызывали перераспределение α -актинина-1 – диффузное распределение в цитоплазме контрольных клеток MRC5-V2 и MRC5-V1 (Рис. 11, Б) сменялось интенсивной окраской концевых участков микрофиламентов на краях и в теле клетки. Описанные изменения указывали на уменьшение активности клеточного края и стабилизацию актиновых пучков в трансформированных фибробластов в присутствии MAO.

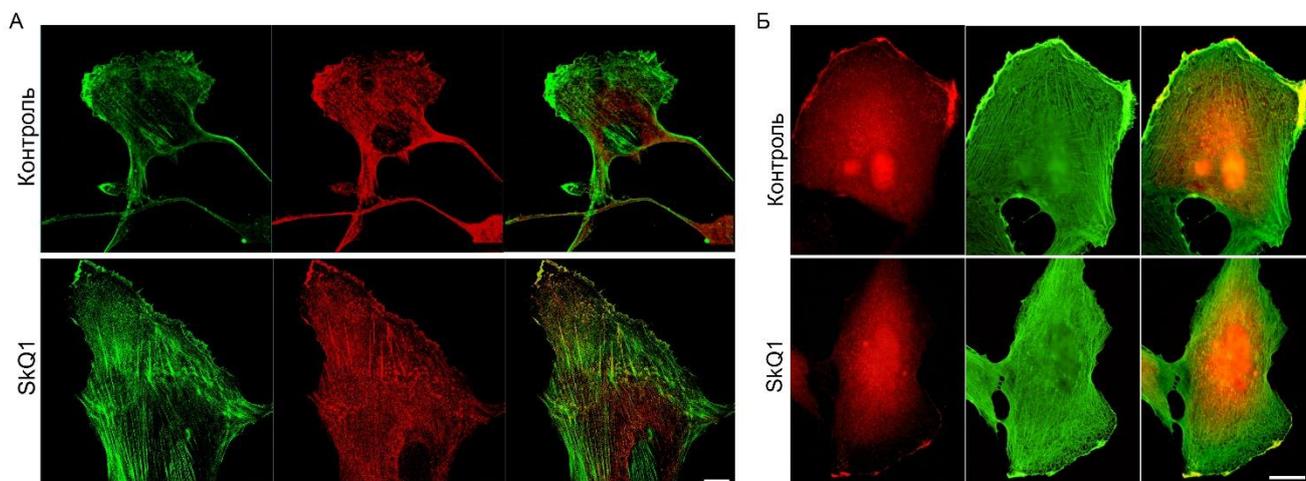


Рисунок 11. Влияние MAO на распределение АВР в клетках MRC5-V1. А - перераспределение α -актинина-1 под действием SkQ1 (20 нМ, 72 часа); зеленый – β -актин, красный – α -актинин-1; конфокальная микроскопия; масштаб 10 мкм; Б -

перераспределение белка p34 комплекса Arp2/3 под действием SkQ1 (20 нМ, 72 часа); зеленый – γ -актин, красный – p34; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм.

5. Влияние MAO на систему фокальных контактов в SV40-трансформированных фибробластах

Ранее были получены данные об изменении ФК и появлении популяции «суперзрелых» контактов большой длины при миофибробластном переходе и появлении в клетках α -гладкомышечного актина (Dugina, 2001). С помощью морфометрического анализа нами была исследована длина ФК клеток MRC5-V1 и MRC5. Для выявления контактов разной степени зрелости применялось иммунофлуоресцентное окрашивание на паксиллин, белок, присутствующий в адгезиях разной зрелости. В клетках MRC5 наблюдались крупные длинные ФК на концах стресс-фибрилл, на которые не оказывали видимого эффекта MAO. Тонкие, короткие контакты в контрольных клетках MRC5-V1 сменялись на более длинные и выраженные структуры на концах актиновых пучков под действием MAO (Рис. 12, А). Морфометрическое измерение длины ФК показало появление в присутствии MAO популяции зрелых (длина 5-8 мкм) и суперзрелых (длина более 8 мкм) контактов, характерных для нормальных миофибробластов MRC5 (Рис. 12, Б). Это сопровождалось увеличением содержания винкулина - белка зрелых фокальных контактов (Рис. 13, В). Полученные данные указывают на улучшение ФК в присутствии MAO, что может свидетельствовать об улучшении прикрепления к субстрату, стабилизации миграционной активности клеток.

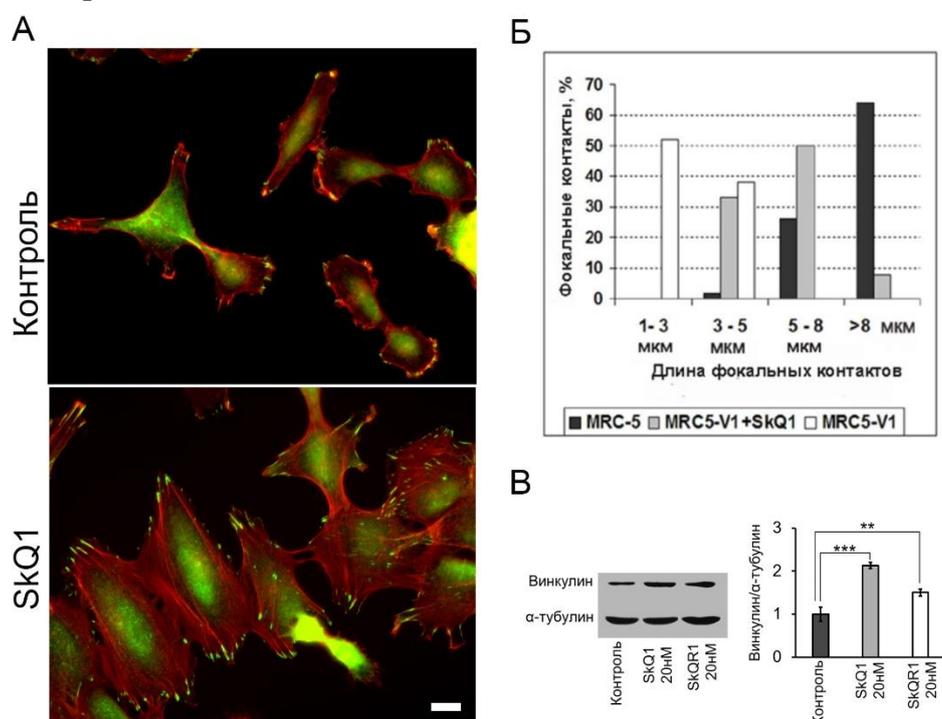


Рисунок 12. Влияние MAO на систему фокальных контактов клеток MRC5-V1. А – Выявление ФК (SkQ1 20нМ, 72 часа); зеленый - паксиллин, красный – общий актин (фаллоидин); флуоресцентная микроскопия; масштаб 10мкм; Б - влияние SkQ1 (20 нМ, 7 сут.) на распределение ФК по длине по сравнению с контрольными миофибробластами MRC5; данные морфометрии; В - влияние MAO (5 суток) на содержание винкулина в

клетках MRC5-V1. Иммуноблоттинг (слева) и количественная оценка иммуноблоттинга (справа); нормализация по α -тубулину. Показаны среднее и стандартная ошибка среднего; значимые различия: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ согласно критерию Манна-Уитни; 3 независимых эксперимента.

Реорганизация актинового цитоскелета является критически необходимым фактором в процессе клеточного деления. В ряде исследований показана роль в этом процессе взаимодействия различных актиновых систем с микротрубочками (Kunda and Baum, 2009; Plessner et al., 2019). β - и γ -актиновые структуры пространственно разделены на протяжении всего периода клеточного деления и выполняют различные функции. Показано, что уменьшение количества γ -актина в делящихся клетках приводит к нарушению веретена деления, а подавление полимеризации тубулина вызывает нарушение β -актиновой системы (Шагиева и др., 2020). Наблюдаемые нами в ходе исследования изменения в распределении изоформ актина в трансформированных клетках в присутствии MAO позволили сделать предположение о том, что воздействие веществ семейства SkQ1 может через реорганизацию актинового цитоскелета влиять на динамику клеточного цикла и митоза в исследуемых нами культурах.

6. Действие антиоксидантов на рост SV40-трансформированных и опухолевых фибробластов в культуре

При анализе общего вида культур контрольных фибробластов линий MRC5-V1 и MRC5-V2 и культур, инкубированных с MAO, нами было выявлено уменьшение количества клеток. Наиболее ярко данный эффект был показан для культуры клеток линии MRC5-V1 (Рис. 13).

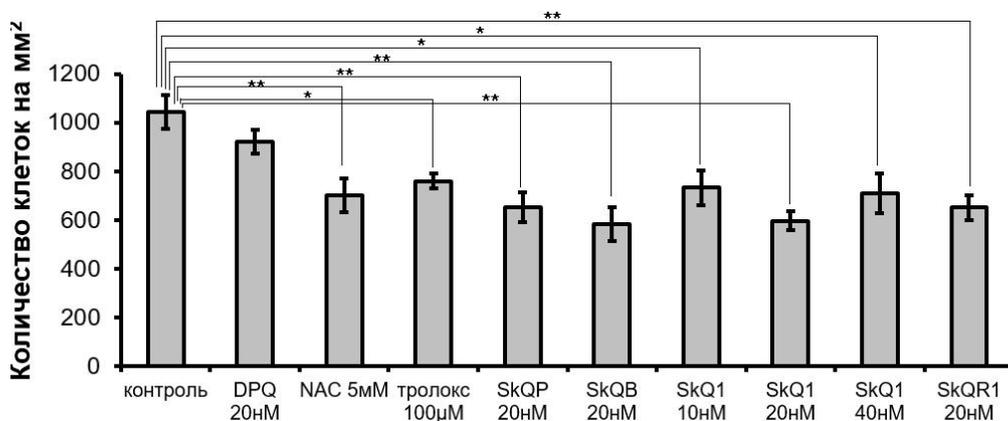


Рисунок 13. Влияние MAO на количество клеток в культуре MRC5-V1. Количество клеток после инкубации с NAC (5 мМ), тролокс (100 μ M), MAO семейства SkQ, (120 часов); статистический анализ данных фазово-контрастной микроскопии, значимые различия: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента.

При анализе культур опухолевых фибробластов после инкубации с MAO было выявлено уменьшение количества клеток по сравнению с контрольными культурами (Рис. 14). Особенно ярко данный эффект был показан для культуры клеток RD. При этом наблюдалось изменение фенотипа клеток - они становились поджатыми, с

многочисленными блябами по периметру клетки. Такая морфология клеток RD могла указывать на апоптоз (Рис. 15).

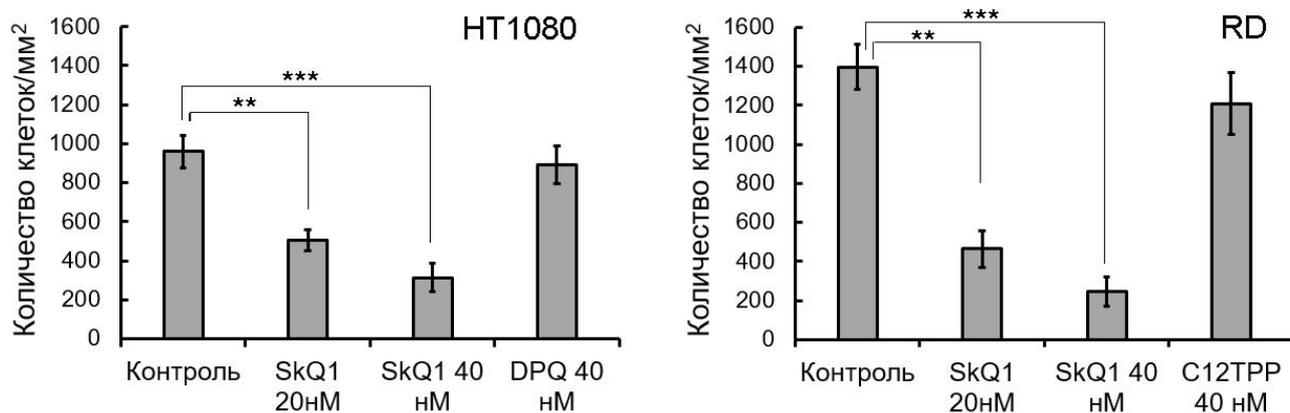


Рисунок 14. Влияние SkQ1 на количество клеток в культурах HT1080 и RD. 72 часа инкубации с SkQ1 (20 - 40 нМ) вызывает торможение пролиферации клеток HT1080 и RD, контрольная молекула DPQ (40 нМ) не оказывает такого эффекта; статистический анализ данных фазово-контрастной микроскопии; значимые различия: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента.

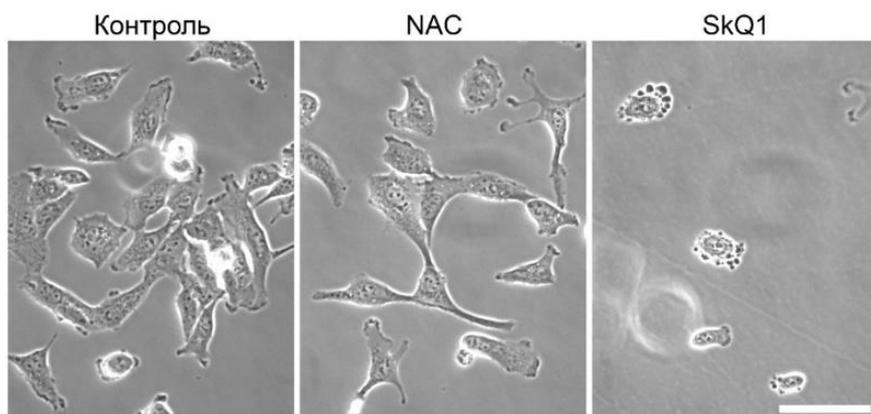


Рисунок 15. Влияние различных АО на количество клеток в культуре RD; SkQ1 (40 нМ), NAC (1 мМ), 48 часов; фазовый контраст; масштаб 40 мкм.

В нашем исследовании митохондриальный разобщитель окислительного фосфорилирования FCCP предотвращал индуцированное SkQ1 ингибирование роста клеток фибросаркомы HT1080, что подтверждает предположение о критической роли МАФК в регуляции пролиферации опухолевых клеток.

7. Выявление популяции больших многоядерных клеток в культурах SV40-трансформированных и опухолевых фибробластов после инкубации с МАО

При анализе культуры клеток MRC5-V1 и MRC5-V2, инкубируемых с МАО, была выявлена популяция *больших многоядерных клеток*. Такие клетки занимали на субстрате большую площадь и имели два и более ядер. При инкубации с МАО количество таких клеток существенно увеличивалось. Аналогичные данные были получены для клеток фибросаркомы HT1080 и рабдомиосаркомы RD (Рис. 16).

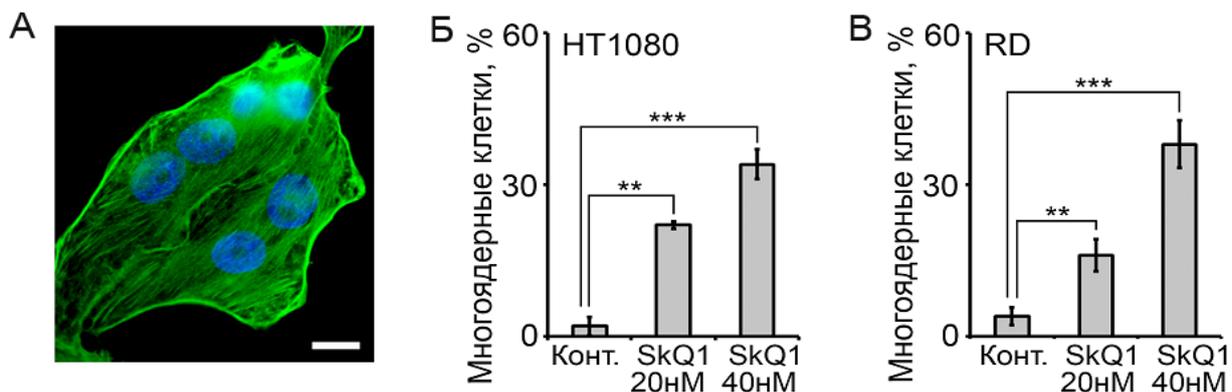


Рисунок 16. МАО увеличивают количество многоядерных клеток в культурах HT1080 и RD.

А - морфология многоядерных клеток HT1080 в присутствии SkQ1 (20нМ, 48 часов); зеленый - β -актин, синий - DAPI, масштаб 10 μ м;

Б - увеличение количества многоядерных клеток в культуре HT1080 после инкубации с SkQ1 (20 - 40 нМ, 48 часов); статистический анализ данных иммунофлуоресцентной микроскопии, значимые различия: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ согласно t-критерию Стьюдента; четыре независимых эксперимента;

В - увеличение количества многоядерных клеток в культуре RD после инкубации с SkQ1 (20 - 40 нМ, 72 часа); статистический анализ данных иммунофлуоресцентной микроскопии, значимые различия: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента.

Для более детального изучения выявленной популяции больших многоядерных клеток в культурах трансформированных фибробластов, клетки были проанализированы с помощью метода проточной цитофлуориметрии.

8. Влияние МАО на динамику клеточного цикла опухолевых клеток

С помощью метода проточной цитофлуориметрии были исследованы параметры клеточного цикла клеток культур HSCF, HT-1080 и RD в присутствии МАО. Культура клеток фибросаркомы HT-1080 была выбрана нами для более подробного описания как наиболее наглядная экспериментальная модель, где крупные многоядерные (преимущественно, двуядерные) клетки в популяции появлялись уже на вторые сутки после инкубации с МАО, при этом также изменялась динамика клеточного цикла. Так, SkQ1 (10 - 40нМ, 24 часов инкубации) вызывал уменьшение количества митотических клеток на стадии G1-фазы и приводил к увеличению G2/M популяции. Похожие изменения характеристик клеточного цикла, а также увеличение популяции клеток <G1 (область слева от пика G1 на графике распределения клеток по данным проточной цитофлуориметрии) и уменьшение G1 пула были описаны для культуры RD. При этом МАО не индуцировали статистически значимых изменений в динамике клеточного цикла в нормальных фибробластах человека.

Для культуры RD было показано, что ингибитор каспаз zVAD и ингибитор каспазы-3 DEVD блокируют эффект SkQ1 и количество клеток практически не снижалось. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что SkQ1

индуцирует апоптоз в клетках RD, который ингибируется zVAD и DEVD. Это объясняет снижение плотности культуры в культуральных чашках и появление популяции клеток < G1 по данным цитофлуориметрии в присутствии MAO (Рис. 17).

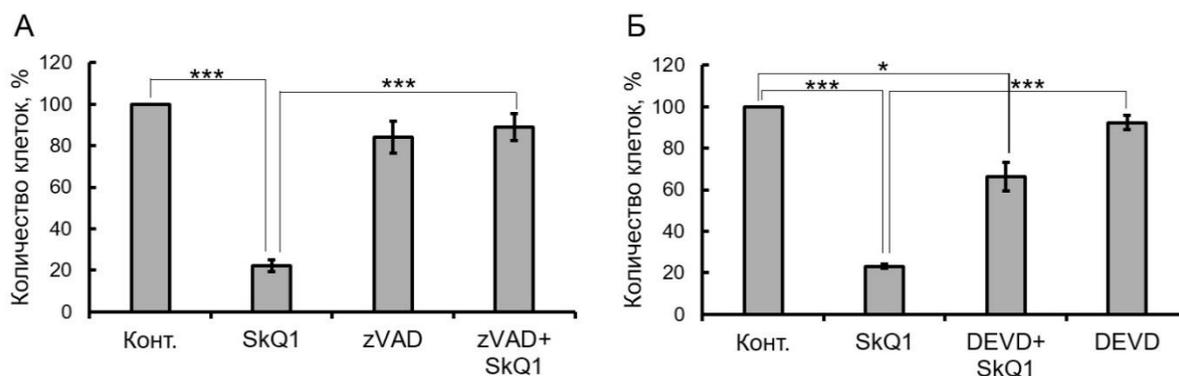


Рисунок 17. Влияние ингибиторов каспаз zVAD и DEVD на снижение плотности культур рабдомиосаркомы RD в присутствии MAO.

А - Изменение количества клеток RD на единицу площади (относительно контроля) в присутствии SkQ1 (20 нМ) и zVAD (20 мкМ), 24 часа инкубации; статистический анализ данных фазово-контрастной микроскопии, значимые различия: *** – $p < 0,001$ согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента;

Б - Изменение количества клеток RD на единицу площади (относительно контроля) в присутствии SkQ1 (20 нМ) и DEVD (20 мкМ), 24 часа инкубации; статистический анализ данных фазово-контрастной микроскопии, значимые различия: * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента.

Увеличение количества клеток в G2/M популяции в культуре HT-1080 под действием MAO могло свидетельствовать как об увеличении процента митотических клеток, так и о появлении популяции полиплоидных и многоядерных клеток. С целью более подробного описания состава G2/M популяции был проведен подсчет митотических клеток при разных сроках и условиях инкубации с MAO.

9. Влияние MAO на количество митозов и динамику митотического цикла в культуре клеток фибросаркомы HT1080

Данные проточной цитофлуориметрии были дополнены микроскопическим анализом культуры клеток HT1080 при воздействии MAO. Было выявлено, что инкубация с SkQ1 приводит к снижению числа митотических клеток (Рис. 18, А). Контрольные молекулы DPQ и C12TPP не оказывали действия на количество митозов. Дальнейший анализ количества митотических клеток для удобства в получении достаточного количества данных проводился в культурах HT1080, обогащенных митозами (путем инкубации клеток в бессывороточной среде 24 часа и последующей рассадки в среду с 5% сыворотки), для которых было также выявлено, что инкубация с MAO приводит к снижению числа митотических клеток. Подбор оптимальных условий для обогащения культуры митотическими клетками показал, что оптимальный срок инкубации с сывороткой (после культивации в бессывороточной среде) составляет 18 часов.

Для более подробного анализа состава G2/M популяции, выявленной методом проточной цитофлуориметрии, были проведены динамические наблюдения за

культурами клеток НТ1080 с помощью прижизненной цейтраферной видеомикроскопии. При этом была выявлена популяция митотических клеток с измененной морфологией, которые находились на стадии телофазы. Клетки имели асимметричные контуры, дочерние клетки заметно отличались друг от друга по размеру и форме, были вытянуты, имели неровные контуры и множество активных псевдоподий с многочисленными блябами. Стадия телофазы в таких клетках была затянута во времени (продолжительность составляла более 2 часов), клетки совершали частые ненаправленные движения. Стадию телофазы с описанными характеристиками называли *затянутой во времени телофазой*. Митозы с такой длительной телофазой называли *затянутыми во времени митозами*. Таким образом, в ходе динамических наблюдений было показано, что МАО приводят к значительному увеличению процента затянутых митозов в культуре НТ1080. Доля затянутых митозов от общего количества митотических клеток составляла $7,3 \pm 3,04\%$ для контрольной культуры и $60,9 \pm 18,86\%$ для опытной (Рис. 18, Б). В присутствии МАО количество митотических клеток на стадии нормальной телофазы уменьшалось на 40-50% относительно контрольной культуры, а доля клеток на стадии затянутой телофазы увеличивалась примерно в 4,5 раза (Рис. 18, В).

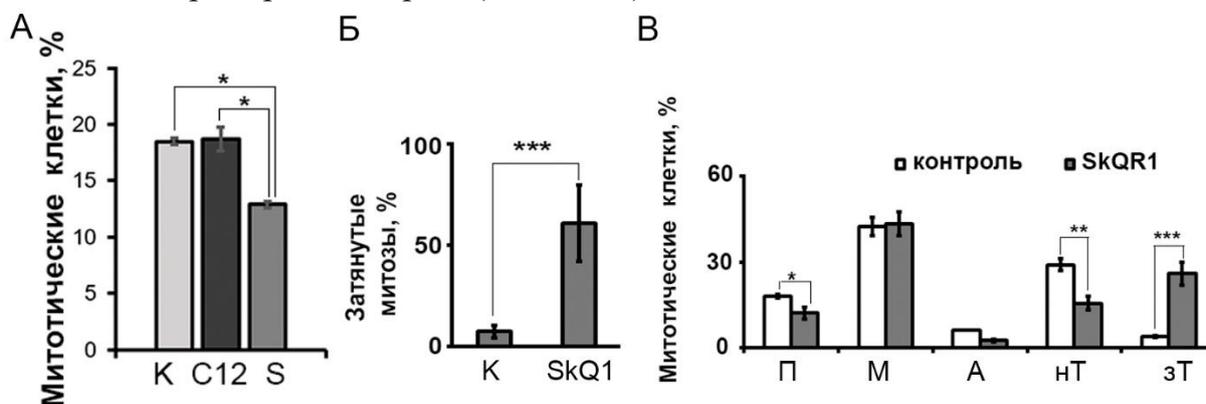


Рисунок 18. Изменение количества митотических делений, параметров клеточного цикла и продолжительности митозов в культуре клеток НТ1080 под действием МАО. А - действие МАО на количество митотических клеток в культуре НТ1080: К – контроль, С12 - С12ТРР (40 нМ) S - SkQ1 (40 нМ, 24 часа); статистический анализ данных фазово-контрастной микроскопии; показано среднее \pm стандартная ошибка среднего; значимые различия: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, согласно t-критерию Стьюдента; три независимых эксперимента; Б - индукция затянутых митозов в популяции делящихся клеток культуры фибросаркомы НТ1080 после инкубации с МАО; К – контроль, SkQ1 - 20 нМ, 72 часа; статистический анализ данных цейтраферной видеомикроскопии; показано среднее \pm стандартная ошибка среднего; значимые различия *** – $p < 0,001$ согласно t-критерию Стьюдента; семь независимых экспериментов (5-7 клеток на экспериментальное условие в одном эксперименте); В - распределение митотической клеточной популяции по фазам митоза в культуре клеток НТ1080, SkQ1 (40нМ, 24 часа): П – профаза, М – метафаза, А – анафаза, нТ – нормальная телофаза, зТ – затянута телофаза; статистический анализ данных цейтраферной видеомикроскопии; показано среднее \pm стандартная ошибка среднего; значимые различия: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ согласно t-критерию

Стьюдента; семь независимых экспериментов (5-7 клеток на экспериментальное условие в одном эксперименте).

В культуре фибросаркомы было показано значительное увеличение продолжительности митоза. Были выявлены: 1) увеличение продолжительности профазы и метафазы после инкубации с МАО; 2) задержка митотических клеток на стадии телофазы. В исследуемых опухолевых культурах в торможение пролиферации вносили вклад различные процессы. Так, в клетках HT1080 уменьшение количества клеток в культуральных чашках сопровождалось снижением числа митозов и значительным увеличением популяции многоядерных клеток, а также задержкой клеточного деления на стадии телофазы. В культуре рабдомиосаркомы RD, помимо тех же процессов, что и в клетках HT1080, МАО индуцировали гибель клеток через апоптоз. Помимо морфологической типичной картины гибели клеток RD, апоптоз блокировала предынкубация со специфическими ингибиторами каспаз zVAD и каспазы-3 DEVD, т.е. при ингибировании апоптоза клетки не погибали. Также апоптотический пик (популяция клеток $< G1$) был выявлен по результатам проточной цитофлуориметрии. Увеличение количества апоптотических клеток в культуре рабдомиосаркомы не было результатом окислительного действия, присущего SkQ1 в более высоких концентрациях (Skulachev et al., 2009), что было подтверждено методом проточной цитофлуориметрии с использованием DCFH-DA. Липофильный катион додецилтрифенилфосфония C12TPP (в отличие от SkQ1 не имеет остатка пластохинона, обладающего антиоксидантными свойствами) и молекула DPQ (не имеет катионной части, обеспечивающей адресное накопление вещества в митохондриях) не влияли на пролиферацию и плоидность клеток HT1080 и RD.

Выявленные в ходе динамических наблюдений изменения свойств клеток на стадии митоза, указывали на возможный эффект МАО на APC-комплекс. Известно, что активированный APC регулирует переход клетки из метафазы в анафазу, а также отвечает за финальные события в митозе через инактивацию циклин-зависимых киназ. На выходе из митотического деления APC отвечает за деградацию киназ семейства Aurora и завершение процесса цитокинеза (Littlepage et al., 2002; Stewart S et al., 2005). Киназы семейства Aurora представлены тремя белковыми изоформами (A, B и C), которые считаются перспективными молекулярными мишенями для противоопухолевой терапии (Титова и др, 2023; Baldini et al., 2012; Vats et al., 2025). В связи с этим, в данной работе были изучены изменения локализации Aurora B и содержания фосфорилированных Aurora A, B и C в исследуемых клетках HT1080 при действии МАО. В литературе описано повышение экспрессии киназ Aurora A и B при опухолевой прогрессии (Anand et al., 2003). МАО снижали количество фосфорилированной формы всех трех киназ Aurora, тем самым, по-видимому, подавляя их активность (Рис. 19). Известно, Aurora A регулирует вступление клеток в митоз, контролирует созревание центросом, дубликацию, разделение и сборку веретена деления в митозе (Carmena et al., 2003). Низкая активность Aurora A вызывает митотический арест на стадии G2/M и разборку веретена деления (Marumoto et al., 2003). Aurora-B активно функционирует как на ранних, так и на поздних стадиях митоза, сегрегации/конденсации хромосом и цитокинезе. Aurora-B и Rho-киназа/ROCK

регулируют продвижение цитокинеза в месте образования межклеточной перетяжки (Yokoyama et al., 2005). Мы наблюдали снижение количества киназы Aurora B и количество активной фосфорилированной формы белков Aurora A/B/C в присутствии MAO. В присутствии MAO задержка клеток HT1080 на стадии про- и метафазы может быть результатом снижения активности киназы Aurora A; изменения в содержании Aurora-B могут отвечать за появление многоядерных клеток и подавление роста культуры HT1080, а снижение уровня МАФК с помощью MAO при этом индуцировало сигнальные пути с участием Rho. MAO также снижали количество фосфорилированного белка ретинобластомы Rb в синхронизированных клетках HT1080 и RD (Рис. 19). Rb играет важную роль в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки, старения и апоптотической гибели клеток. Роль Rb в опухолевой прогрессии противоречива, поскольку он действует как ингибитор клеточного роста, так и как ингибитор клеточной гибели. Тем не менее, Rb играет центральную роль в ингибировании клеточной пролиферации, поэтому опухолевая прогрессия часто сопровождается инактивацией данного белка (Sherr, 1996). В большинстве опухолевых клеток человека функции Rb инактивируются через сигнальные пути, регулирующие его фосфорилирование (Sherr, 1996). Следовательно, активная пролиферация клеток HT1080 могла быть вызвана инактивацией Rb, связанной с его фосфорилированием.

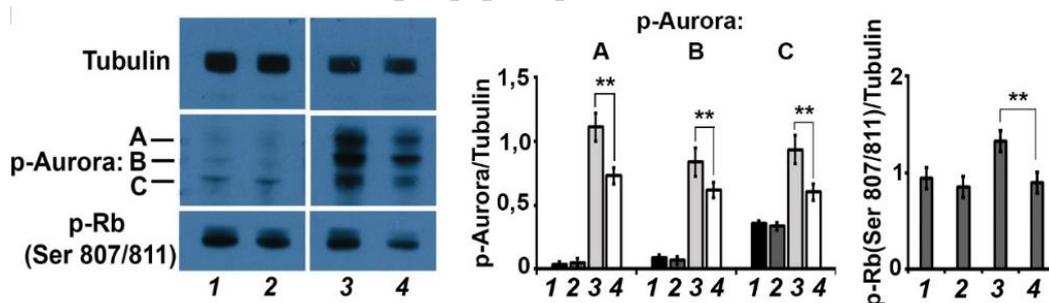


Рисунок 19. Изменение уровня экспрессии фосфокиназ семейства Ауорога и белка фосфо-Rb в митотических клетках линии HT1080 под действием MAO. Экспрессия белков фосфо-Auroга A, B, C, фосфо-Rb (Ser807/811) в клетках фибросаркомы HT1080 после 24 часов инкубации с MAO: 1 – контроль, 2 - SkQ1 (100 нМ), 3 – колцемид (0,02 мкг/мл), 4 – колцемид (0,02 мкг/мл) + SkQ1 (100 нМ). Иммуноблоттинг (слева) и количественная оценка иммуноблоттинга (справа); нормализация по α -тубулину; показано среднее \pm стандартная ошибка среднего; значимые различия: ** – $p < 0,01$ согласно критерию Манна-Уитни; четыре независимых эксперимента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании было подробно описано нарушение структурно-пространственного распределения актиновых цитоскелетных систем, потеря β -актиновых пучков и ухудшение адгезионных структур при неопластической трансформации. Было показано, что снижения уровня МАФК с помощью MAO вызывает нормализацию фенотипа вирус-трансформированных и опухолевых клеток, сопровождающуюся реорганизацией γ - и β -актиновых цитоскелетных систем. При этом в клетках восстанавливались плотные организованные β -актиновые пучки, богатые α -

гладкомышечным актином и немышечным миозином II. Перераспределение белков p34 комплекса Arp2/3 и α -актинина-1 в SV40-трансформированных культурах при воздействии мАО указывало на уменьшение активности клеточного края и стабилизацию системы актиновых пучков. Анализ воздействия мАО на фокальные адгезии SV40-трансформированных клеток выявил увеличение их размера и появление популяции зрелых ФК. Данный эффект также сопровождался появлением актиновых пучков, богатых α -гладкомышечным актином, что говорит в пользу того, что снижение мАФК с помощью мАО вызывает ряд последовательных этапов модуляции трансформированных фибробластов в направлении миофибробластной дифференцировки.

Уменьшение уровня мАФК в присутствии мАО подавляло рост вирус-трансформированных и опухолевых фибробластов. Мы предполагаем, что в опухолевых клетках мАО индуцируют изменение динамики клеточного цикла, а также вызывают апоптоз клеток рабдомиосаркомы. Известно, что после длительной задержки митоза, клетки либо погибают в результате апоптоза, либо выходят из митоза без деления и выживают - процесс, известный как митотическое проскальзывание (Topham et al., 2013). Этот процесс защищает клетки от анеуплоидии и генетической нестабильности, и его индукция в опухолевых клетках экзогенными агентами может быть перспективной терапевтической мишенью (Vitale et al., 2011). Подводя итог, можно сказать, что мАО подавляют рост опухолевых клеток HT1080 и RD благодаря своей антиоксидантной активности, хотя сохраняется вероятность того, что накопление мАО в митохондриях может вызывать локальное оксидантное действие (Skulachev, 2007).

Таким образом, полученные экспериментальные данные указывают на то, что мАФК играют важную роль в процессе клеточной трансформации. Они участвуют в реорганизации цитоплазматических изоформ актина и АВР, а также в процессе клеточного деления опухолевых и SV40-трансформированных фибробластов. Киназы семейства Aurora и белок Rb принимают участие в регуляции этих событий. Антиоксиданты семейства SkQ можно рассматривать как потенциальные противоопухолевые агенты, которые модулируют организацию актинового цитоскелета, приводя к восстановлению системы β -актиновых пучков, ФК и снижению пролиферации.

ВЫВОДЫ

1. Антиоксиданты, адресованные в митохондрии (мАО) вызывают реорганизацию актинового цитоскелета и нормализацию фенотипа SV-40-трансформированных клеток MRC5-V1 и MRC5-V2. Данный процесс сопровождается восстановлением системы β -актиновых пучков. Аналогичные, но менее выраженные изменения морфологии выявлены в опухолевых клетках фибросаркомы HT1080.

2. мАО индуцируют появление зрелых ФК и увеличение содержания белка зрелых ФК винкулина в клетках линии MRC5-V1, а также перераспределение α -актинина-1, поддерживающего структуру стресс-фибрилл.

3. мАО вызывают появление пучков β -актина, содержащих α -гладкомышечный актин (в клетках линии MRC5-V1), что характерно для миофибробластной дифференцировки, и немышечный миозин II (в клетках линий MRC5-V1 и MRC5-V2).

4. МАО индуцируют распределение белка ламеллиподий p34 комплекса Arp2/3, характерное для нормальных фибробластов, в клетках линий MRC5-V1 и MRC5-V2.

5. МАО снижают пролиферацию опухолевых клеток HT1080 и RD благодаря изменению динамики клеточного цикла. В культуре RD исследуемые вещества индуцируют апоптоз. Цитостатический эффект МАО сопровождается снижением количества фосфокиназ семейства Aurora и белка ретинобластомы фосфо-Rb.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

1. **Титова Е.В.**, Шагиева Г.С., Дугина В.Б., Копнин П.Б. Роль киназы Aurora B в нормальных и опухолевых клетках // Биохимия. – 2023. – Т. 88. – № 12. – С. 2435 – 2445. EDN: NKFCCKU. Импакт-фактор 2,200 (JIF) (1.155/0.809)

2. **Титова Е.В.**, Иванова О.Ю., Дугина В.Б. Нормализация ростовых характеристик клеток фибросаркомы в культуре при действии митохондриально-направленных антиоксидантов // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – Т. 10. – № 52. – С. 49-52. EDN: WWSEXZ. Импакт-фактор 0,141 (РИНЦ) (0.462/0/347)

3. **Titova E.**, Shagieva G., Ivanova O., Domnina L., Domninskaya M., Strelkova O., Khromova N., Koptin P., Chernyak B., Skulachev V., Dugina V. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 suppresses fibrosarcoma and rhabdomyosarcoma tumour cell growth // Cell Cycle. – 2018. V. 17. – P. 1797-1811. EDN: YBIAKD. Импакт-фактор 3,400 (SJR) (1.733/1.271)

4. Chernyak B.V., Antonenko Y.N., Galimov E.R., Domnina L.V., Dugina V.B., Zvyagilskaya R.A., Ivanova O.Y., Izyumov D.S., Lyamzaev K.G., Pustovidko A.V., Rokitskaya T.I., Rogov A.G., Severina I.I., Simonyan R.A., Skulachev M.V., Tashlitsky V.N., **Titova E.V.**, Trendeleva T.A., Shagieva G.S. Novel mitochondria-targeted compounds composed of natural constituents: Conjugates of plant alkaloids berberine and palmatine with plastoquinone // Biochemistry (Moscow) – 2012. V. 77, № 9. – P. 983-995. EDN: RGGPKF. Импакт-фактор 2,200 (JIF) (1.502/0.231)

5. Agapova L.S., Chernyak B.V., Domnina L.V., Dugina V.B., Efimenko A.Y., Fetisova E.K., Ivanova O.Y., Kalinina N.I., Khromova N.V., Koptin B.P., Koptin P.B., Korotetskaya M.V., Lichinitser M.R., Lukashev A.L., Pletjushkina O.Y., Popova E.N., Skulachev M.V., Shagieva G.S., Stepanova E.V., **Titova E.V.**, Tkachuk V.A., Vasiliev J.M., Skulachev V.P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 3. Inhibitory effect of SkQ1 on tumor development from p53-deficient cells // Biochemistry (Moscow). – 2008. V. 73, № 12. – P. 1300-1316. EDN: LLAIEZ. Импакт-фактор 2,200 (JIF) (2.310/0.347)

**В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.*