

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ISSN 0041-3771

# ЦИТОЛОГИЯ

TSITOLOGIYA

2024. Том 66

2024. Vol. 66

4



---

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

*Российская академия наук*

# **ЦИТОЛОГИЯ**

№ 4 2024 Июль–Август

Основан в 1959 г.

Выходит 6 раз в год

ISSN 0041-3771

*Журнал издается под руководством  
Отделения биологических наук РАН*

**Главный редактор**

**А. Н. Томилин**

Утвержден в соответствии с постановлением президиума РАН  
от 22 июня 2021 г. № 126 главным редактором журнала «Цитология»  
сроком на пять лет.

**Первый заместитель главного редактора**

**И. В. Гужова**

Институт цитологии Российской академии наук,  
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4

**Второй заместитель главного редактора**

**И. О. Боголюбова**

Институт цитологии Российской академии наук,  
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4

**Ответственный секретарь**

**И. А. Гамалей**

Институт цитологии Российской академии наук,  
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4

**Редакционная коллегия:**

**И. И. Адамейко,  
Н. Г. Еременко,  
Б. Д. Животовский,  
Е. В. Казначеева,  
Н. Ю. Куприна,  
И. Н. Лаврик,  
М. А. Лагарькова,  
А. Л. Лapidус,  
А. Б. Малашичева,**

**С. В. Разин,  
А. В. Родионов,  
О. Л. Серов,  
В. С. Тарабыкин,  
В. А. Ткачук,  
М. Циглер,  
А. С. Цимоха,  
О. А. Черепанова,  
М. А. Шевцов**

В журнале «Цитология» публикуются статьи по всем основным разделам клеточной биологии (морфология, физиология, иммунология, генетика, биохимия, молекулярная биология, биофизика). В журнале печатаются ранее не опубликованные оригинальные работы, выполненные как на животных, так и на растительных клетках, обзорные статьи, дискуссионные статьи, сообщения о новых методах исследования, рецензии на книги, опубликованные в текущем году.

Статьи журнала «Цитология» в полном объеме размещены на сайте:

Научная электронная библиотека: eLIBRARY

Подписка на журнал принимается без ограничения всеми отделениями «Роспечати» (№ 71063 в каталоге).

Адрес редакции: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.

Телефон: 7 (812) 297-18-29; факс: 7 (812) 297-35-41;

e.mail: j.cytology@incras.ru

<http://www.tsitologiya.incras.ru>

---

© Российская академия наук, 2024  
© Редакция журнала «Цитология»  
(составитель), 2024

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 66, номер 4, 2024

---

---

Роль микроцефалина в нейрогенезе и эволюции головного мозга человека <i>А. М. Юнусова, Т. А. Шнайдер</i>	309
Активация адгезивных свойств клеток меланомы в условиях 3D-культивирования <i>Д. В. Черных, И. С. Зинченко, Т. Г. Рукша</i>	330
Новая линия мезенхимных стволовых клеток, выделенная из вартонова студня пупочного канатика донора мужского пола <i>А. М. Кольцова, А. С. Мусорина, В. И. Турилова, А. Н. Шатрова, Т. К. Яковлева, Г. Г. Полянская</i>	341
Культивирование мезенхимных стволовых/стромальных клеток из жировой ткани лошади в бессывороточной среде <i>И. П. Савченкова</i>	355
Влияние нанокластерного полиоксометаллата $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ на морфофункциональное состояние макрофагов в культуре <i>С. А. Титова, М. О. Тонкушина, К. В. Гржегоржевский, И. Г. Данилова, В. А. Поздина, М. В. Улитко, А. А. Остроушко</i>	367
Разработка <i>in vitro</i> модели дисферлинопатии посредством crispr/cas-опосредованной активации гена <i>DYSF</i> <i>И. А. Яковлев, Я. С. Слесаренко, И. Г. Старостина, А. А. Шаймарданова, В. В. Соловьева, П. А. Бобровский, Е. Н. Графская, Л. Д. Беликова, С. Н. Бардаков, А. А. Ризванов, А. А. Исаев, Р. В. Деев</i>	380

---

---

# CONTENTS

---

---

Volume 66, No. 4, 2024

---

---

Functions of microcephalin in neurogenesis and human brain evolution <i>A. M. Yunusova, T. A. Shnaider</i>	309
Melanoma cells adhesive properties activation in 3D spheroids <i>D. V. Chernykh, I. S. Zinchenko, T. G. Ruksha</i>	330
New line of mesenchymal stem cell isolated from Warton's jelly of the umbical cord of male human donor <i>A. M. Koltsova, A. S. Musorina, A. N. Shatrova, V. I. Turilova, T. K. Yakovleva, G. G. Poljanskaya</i>	341
The culture of equine adipose tissue-derived mesenchymal cells in serum-free media <i>I. P. Savchenkova</i>	355
Effect of nanocluster polyoxometalate $\{Mo_7Fe_{30}\}$ on morphofunctional state of macrophages in cultures <i>S. A. Titova, M. O. Tonkushina, K. V. Grzhegorzhevskii, I. G. Danilova, V. A. Pozdina, M. V. Ulitko, A. A. Ostroushko</i>	367
Development of an <i>in vitro</i> model of dysferlinopathy via crispr/cas-mediated transcriptional activation of the <i>DYSF</i> gene <i>I. A. Yakovlev, Y. S. Slesarenko, I. G. Starostina, A. A. Shaimardanova, V. V. Solovyova, P. A. Bobrovsky, E. N. Grafskaya, L. D. Belikova, S. N. Bardakov, A. A. Rizvanov, A. A. Isaev, R. V. Deev</i>	380

---

---

УДК 575.8:577.25

## РОЛЬ МИКРОЦЕФАЛИНА В НЕЙРОГЕНЕЗЕ И ЭВОЛЮЦИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. А. М. Юнусова<sup>1, \*</sup>, Т. А. Шнайдер<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН,  
Новосибирск, 630090, Россия

\* E-mail: anastasiajunusova@gmail.com

Поступила в редакцию 08.04.2024

После доработки 25.04.2024

Принята к публикации 26.04.2024

Первичная микроцефалия представляет собой тяжелую патологию развития головного мозга человека, основным фенотипическим проявлением которой является уменьшение его размера и умственная отсталость разной степени тяжести. *Микроцефалин 1 (MCPH1)* – первый ген, для которого была установлена связь с первичной микроцефалией. Кодированный им белок микроцефалин (MCPH1) обладает широким спектром функций, нарушения которых могут негативно влиять на нейрогенез. Настоящий обзор посвящен описанию клинических случаев MCPH1-опосредованной микроцефалии, а также животных моделей с мутациями в различных доменах MCPH1. Отдельное внимание уделено роли MCPH1 в эволюции мозга человека.

**Ключевые слова:** первичная микроцефалия, животные модели, микроцефалин (MCPH1), эволюция головного мозга человека

**Принятые сокращения:** ак – аминокислота; ГР – гомологичная рекомбинация

**DOI:** 10.31857/S0041377124040012 **EDN:** QDENJE

Увеличение размера головного мозга человека, сопровождающееся развитием уникальных когнитивных навыков, является одним из фундаментальных эволюционных изменений, которое отличает человека от других приматов. Развитие коры головного мозга представляет собой сложный процесс, в ходе которого нейральные предшественники пролиферируют и дифференцируются, образуя высокоспециализированные клетки – нейроны (Sun, Hevner, 2014; Casas Gimeno, Paridaen, 2022). Параметры пролиферации нейральных предшественников во многом и определяют размер головного мозга. Любые отклонения в этом процессе, будь то нарушения баланса между симметричным и асимметричным делением, изменение длительности стадий клеточного цикла или дефекты центросом, приводят к аномалиям развития головного мозга (Bettencourt-Dias et al., 2011).

Первичная микроцефалия (MCPH, OMIM251200) – врожденная аномалия развития головного мозга, характеризующаяся умень-

шением его размера и умственной отсталостью разной степени тяжести (Mochida, Walsh, 2001). При микроцефалии наблюдается уменьшение объема белого вещества, при этом сама архитектура мозга не нарушена. К настоящему времени (08.04.2024) идентифицировано 30 локусов, ассоциированных с первичной микроцефалией (<https://omim.org/entry/251200>), и благодаря развитию геномных технологий этот список постоянно пополняется. Гены, мутации в которых вызывают микроцефалию, чаще всего связаны с регуляцией митоза, биогенезом центросом, а также со сборкой и функционированием веретена деления, что еще раз подчеркивает важность клеточного деления при формировании кортикального слоя головного мозга (Bond, Woods, 2006; Jean et al., 2020).

Первым описанным геном, ассоциированным с первичной микроцефалией, является *микроцефалин 1 (MCPH1)* (Jackson et al., 1998, 2002). Мутации в этом гене обнаруживаются в 1–9% случаев первичной микроцефалии, их частота отличается в разных популяциях,

достигая максимума в пакистанской популяции с высокой частотой близкородственных браков (Kumar et al., 2002; Woods et al., 2005).

В этом обзоре мы проанализируем опубликованные в настоящее время клинические случаи *MCPH1*-опосредованной микроцефалии, опишем животные модели (мыши и макаки), созданные для изучения функций белка *MCPH1* и рассмотрим возможную роль *MCPH1* в эволюции головного мозга человека.

### СТРУКТУРА *MCPH1*

Ген *MCPH1* расположен на коротком плече хромосомы 8 (8p23) и состоит из 14 экзонов, занимая около 241 кб геномной ДНК. Среди структурных особенностей гена – большое число инсерций Alu-элементов (Britten, 2010). Они локализуются как в интронах, так и в экзонах гена; их общее количество насчитывает тысячи копий, составляя до 57% последовательности гена. При этом последний экзон (14) состоит из Alu-элементов на 88% (Britten, 2010). Известно, что инвазия и амплификация мобильных элементов генома вносят значительный вклад в формирование разнообразия, обеспечивая изменчивость генома (Cordaux, Batzer, 2009; Erwin et al., 2014). Alu-повторы влияют на регуляцию экспрессии генов, полиаденилирование и сплайсинг РНК (Häsler, Strub, 2006; Shen et al., 2011; Payer et al., 2019, 2021). В то же время Alu-элементы могут нарушать функцию генов, участвуя в неаллельной рекомбинации, которая приводит к вариациям числа копий, и, как результат, к заболеваниям и нарушениям развития организма (Ade et al., 2013; Payer et al., 2019). Вероятно, из-за большого содержания Alu-повторов *MCPH1* может являться “горячей точкой” возникновения мутаций. Недавно для транскриптов *MCPH1* в префронтальной коре головного мозга человека было впервые описано явление Alu-экзонизации (Florea et al., 2021). В этом случае благодаря альтернативному сплайсингу происходит инсерция дополнительного экзона между 13 и 14-м экзонами, а также добавление 11 нуклеотидов к экзону 14 с нарушением рамки считывания. Специфичен ли этот транскрипт для мозга человека, и обладает ли эта изоформа белка дополнительными функциями остается под вопросом и требует дальнейшего изучения.

### СТРУКТУРА И ЛОКАЛИЗАЦИЯ *MCPH1* В КЛЕТКЕ

Белок, кодируемый *MCPH1*, имеет название по ассоциированному заболеванию – микроцефалин (*MCPH1*). У человека его полноразмерная форма (*MCPH1*-FL) включает 835 аминокислот и содержит три BRCT-домена (от англ. breast cancer type 1 C-terminus); один из них локализуется на N-конце белка (ак 1–93), два других – на C-конце (ак 672–730 и 751–833 соответственно). BRCT-домены имеют высоко консервативную структуру и опосредуют белок-белковые взаимодействия (Manke et al., 2003; Yu et al., 2003). Центральный регион *MCPH1* представляет особый интерес, поскольку включает несколько малоизученных доменов, которые отвечают за связывание с белками комплексов конденсина II и шелтерина, а также с топоизомеразой TopBP1 (Yamashita et al., 2011; Zhang et al., 2014; Cicconi et al., 2020; Houllard et al., 2021). Наряду с полноразмерной формой предсказано существование еще нескольких изоформ, но функциональной считается лишь одна из них – *MCPH1* Δe9–14 (611 ак) (Gavvovidis et al., 2012). *MCPH1*-FL локализуется в фокусах репарации ДНК после индукции повреждений, а *MCPH1*Δe9–14 равномерно распределен в ядре. Помимо того, что эти изоформы обладают разными функциями и локализацией в клетке, для них показана различная представленность на протяжении клеточного цикла. Количество мРНК полноразмерной формы *MCPH1*-FL убывает в ходе фаз S-G<sub>2</sub> клеточного цикла, в то время как количество *MCPH1*Δe9–14, наоборот, достигает максимума в S-фазе (Gavvovidis et al., 2012). В митозе активность обеих изоформ снижается за счет фосфорилирования киназами клеточного цикла и деградации комплексом APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) (Liu et al., 2017; Meyer et al., 2019; Houllard et al., 2021).

Удивительно, но вопрос о распределении *MCPH1* в клетке до сих пор является открытым. В большинстве исследований показана исключительно его ядерная локализация (Xu et al., 2004; Wood et al., 2007, 2008; Wu et al., 2009; Gavvovidis et al., 2012; Zhang et al., 2013; Mai et al., 2014; Houllard et al., 2021). Однако ряд работ свидетельствует о том, что *MCPH1* входит в состав centrosom, локализуясь вместе

с  $\gamma$ -тубулином на всем протяжении клеточного цикла (Zhong et al., 2006; Jeffers et al., 2008; Rai et al., 2008; Tibelius et al., 2009; Brown et al., 2010). Еще одна работа описывает митохондриальную локализацию МСРН1, которая опосредуется его взаимодействием с митохондриальными белками ионных каналов (Journiac et al., 2020).

Высокий уровень экспрессии МСРН1 характерен для развивающегося мозга на эмбриональной стадии развития, а также для семенников, печени, почек и лимфоцитов (Gavvovidis et al., 2012; Oluwole, 2024). При этом для изоформ МСРН1 показан дифференциальный паттерн экспрессии как в ходе развития, так и в разных тканях и органах. Так, например, МСРН1 $\Delta\epsilon$ 9–14 имеет примерно в пять раз больший уровень экспрессии в развивающемся эмбриональном мозге чем в мозге взрослого организма (Gavvovidis et al., 2012). На более низком уровне МСРН1 экспрессируется в сердце, легких, тимусе и селезенке (Gavvovidis et al., 2012). Были детально изучены параметры экспрессии МСРН1 в головном мозге развивающихся эмбрионов человека и мыши, а также его субклеточная локализация (Journiac et al., 2020). Так, у обоих исследованных видов пик экспрессии наблюдается преимущественно в клетках радиальной глии на ранних стадиях развития неокортекса, в период, характеризующийся их активной пролиферацией. Однако имеются и важные различия: Мсрп1 локализуется преимущественно в цитоплазме, тогда как МСРН1 широко представлен и в цитоплазме, и в ядре. Кроме того, экспрессия МСРН1 наблюдается и на поздних стадиях развития неокортекса, хотя и на более низком уровне.

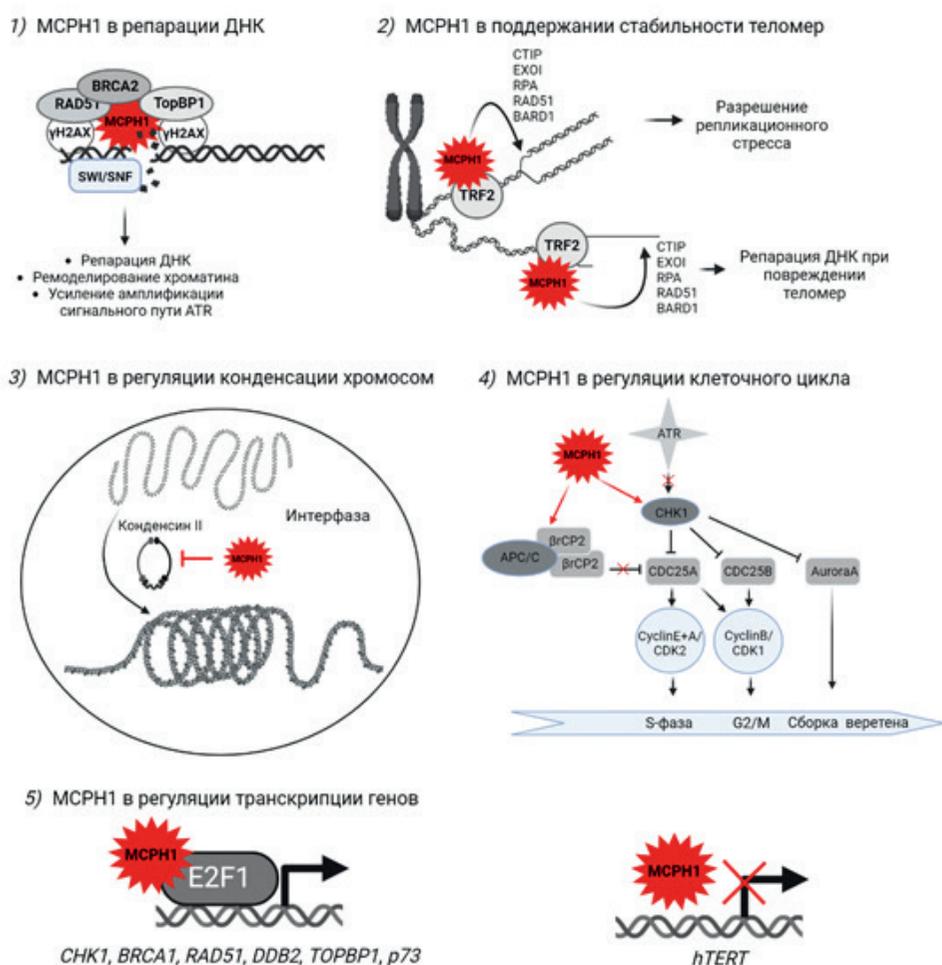
### ФУНКЦИИ МСРН1

**Репарация ДНК.** В настоящий момент накоплено большое количество данных, свидетельствующих об участии МСРН1 в репарации ДНК (рис. 1). Показано, что С-концевые BRCT-домены МСРН1 связываются с фосфорилированными гистонами H2AX и привлекают к месту разрыва ДНК факторы репарации, такие как BRCA2 и RAD51 (Lin et al., 2005; Rai et al., 2006; Wood et al., 2007; Wu et al., 2009; Chang et al., 2020). Известно, что RAD51 является ключевым эффектором гомологичной

рекомбинации (ГР), способствуя инвазии одноцепочечной ДНК и поиску гомологии (Renkawitz et al., 2014). N-концевой BRCT домен МСРН1 связывается с комплексом ремоделирования хроматина SWI–SNF, который деконденсирует и релаксирует хроматин, облегчая факторам репарации доступ к месту повреждения ДНК (Peng et al., 2009). Деплеция МСРН1 приводит к снижению эффективности репарации ДНК как по типу ГР, так и по типу негомологичного соединения концов, — основных путей репарации двухцепочечных разрывов ДНК (Peng et al., 2009). Путем привлечения TopBP1 МСРН1 поддерживает и усиливает ATR-сигнальный каскад, способствуя разрешению репликативного стресса (Zhang et al., 2014).

**Поддержание целостности теломер.** Центральный домен МСРН1 взаимодействует с белком TRF2 (входит в комплекс шелтерина), и при дисфункции теломер способствует позиционированию факторов ГР на теломерах (Kim et al., 2009; Cicconi et al., 2020) (рис. 1). МСРН1 локализуется на репликативных вилках по всему геному, привлекая факторы ГР к одноцепочечной ДНК и предотвращая коллапс репликативных вилок (Cicconi et al., 2020). Это особенно важно для теломерной ДНК, являющейся сложной мишенью для репликативного комплекса за счет своей структуры (Cicconi et al., 2020). Помимо этого, МСРН1 участвует в репрессии гена теломеразы *hTERT*, и при нарушении его функции наблюдается увеличение длины теломер (Shi et al., 2012). Примечательно, что впервые *МСРН1* был идентифицирован при скрининге генов, влияющих на экспрессию *hTERT*, и его первоначальное название *BRIT1* (от англ. BRCT: repeat inhibitor of hTERT expression) (Lin, Elledge, 2003). Поэтому в литературе часто встречается такой вариант названия этого гена: *МСРН1/BRIT1*.

**Регуляция трехмерной организации генома.** N-терминальный и центральный домены МСРН1 взаимодействуют с комплексом конденсина II, предотвращая его преждевременное связывание с хроматином в интерфазе (Wood et al., 2008; Yamashita et al., 2011; Houliard et al., 2021) (рис. 1). При нарушении функции МСРН1 происходит преждевременная конденсация хроматина, что выражается в увеличенной доле клеток с “профазоподобными” хромосо-



**Рис. 1.** Функции микроцефалина (МСРН1): 1) участвует в репарации ДНК посредством деконденсации хроматина (через комплекс SWI/SNF), привлечения факторов репарации (BRCA2 и RAD51), а также путем усиления сигнала амплификации ATR-сигнального пути за счет взаимодействия с TopBP1; 2) регулирует стабильность теломер и в случае их дисфункции привлекает факторы репарации ДНК, а также способствует разрешению репликационного стресса в теломерных районах; 3) в интерфазном ядре поддерживает трехмерную организацию хроматина путем ингибирования взаимодействия комплексов конденсина II с хроматином; контролирует клеточный цикл посредством регуляции Chk1–Cdc25b; 4) через взаимодействие с E2F1 активирует экспрессию белков, участвующих в репарации ДНК, контроле клеточного цикла и апоптоза; 5) репрессирует экспрессию *hTERT*. Красными крестами отмечены те взаимосвязи, которые оказываются нарушенными при деpleции МСРН1. Рисунок выполнен с помощью сервиса BioRender (<https://biorender.com>).

мами в интерфазе (Trimborn et al., 2004). Примечательно, что деpleция МСРН1 сказывается и на морфологии митотических хромосом: они гиперконденсированы и в силу этого более короткие (примерно на 25%), чем в норме. Это сопровождается увеличением длительности митоза и нарушением расхождения сестринских хроматид (Arroyo et al., 2017).

**Регуляция клеточного цикла.** Путем модулирования сигнального пути ATR-CHK1 МСРН1 регулирует клеточный цикл в контрольных точках клеточного цикла S

и G<sub>2</sub>/M (рис. 1). Это осуществляется следующими путями: во-первых, МСРН1 через взаимодействие с транскрипционным фактором E2F1 активирует экспрессию *CHK1* (киназы контрольной точки 1); во-вторых, МСРН1 напрямую связывается с *CHK1*, обеспечивая centrosомную локализацию этого белка (Alderton et al., 2006; Tibelius et al., 2009). Помимо этого, МСРН1 способствует деградации фосфатазы Cdc25A посредством участия в сборке убиквитин-лигазного комплекса SCF-βTrCP2 (Liu et al., 2017). При нарушении функции

МСПН1 наблюдается гипофосфорилирование Cdc25B, активация комплекса Циклин-В/CDK1 и преждевременный выход в митоз (Tibelius et al., 2009). Это сопровождается увеличением количества центриолей, повышением частоты хромосомных повреждений и анеуплоидией (Alderton et al., 2006; Rai et al., 2008; Brown et al., 2010).

**Регуляция экспрессии генов.** МСПН1 взаимодействует с транскрипционным фактором E2F1 и участвует в активации экспрессии генов, регулирующих клеточный цикл и репарацию ДНК, в том числе *CHK1*, *RAD51*, а также генов проапоптотических белков – *p73*, *APAF1*, каспаз 3 и 7, запускающих программу апоптоза в ответ на повреждение ДНК (Yang et al., 2008) (рис. 1).

### МУТАЦИИ МСПН1 У ЧЕЛОВЕКА

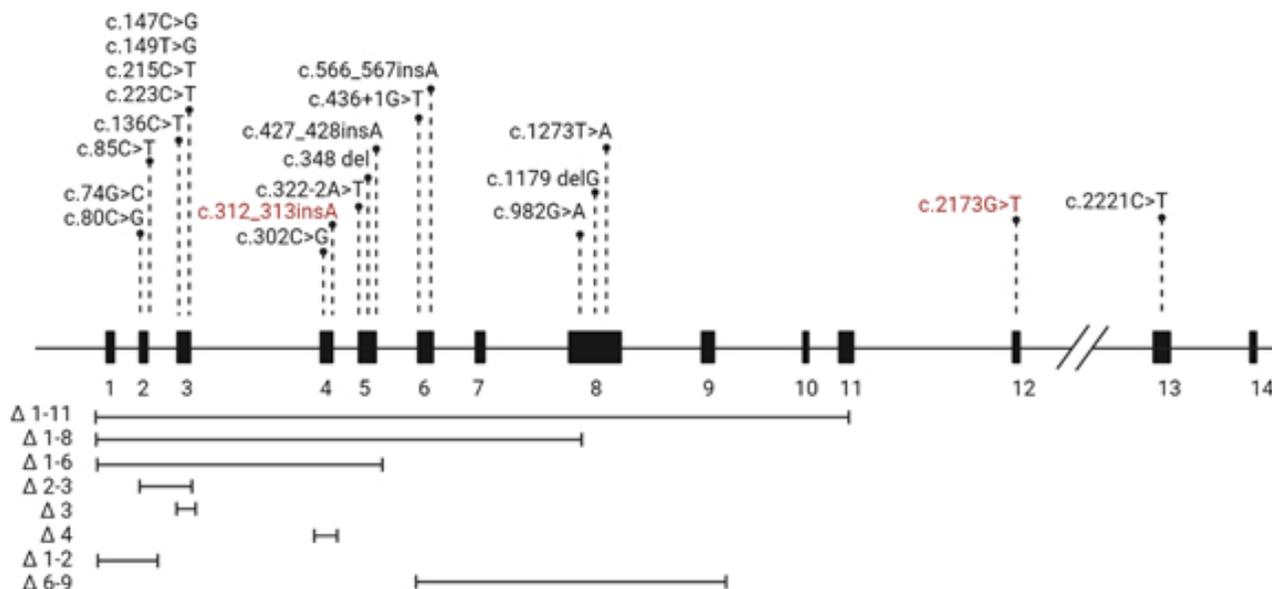
Благодаря своей поразительной многофункциональности МСПН1 участвует во многих фундаментальных биологических процессах. Неудивительно, что мутации *МСПН1* и нарушение его экспрессии могут приводить к развитию заболеваний у человека. К настоящему моменту собран целый ряд работ, которые демонстрируют связь мутаций *МСПН1* с онкологическими заболеваниями (Rai et al., 2006; Brüning-Richardson et al., 2011; Giallongo et al., 2011; Bhattacharya et al., 2013; Zhang et al., 2013; Mantere et al., 2016). Появляются свидетельства возможной связи мутаций *МСПН1* с несиндромальным нарушением слуха (Oluwole, 2024), а также с такими психическими расстройствами, как шизофрения, биполярное расстройство (Al Eissa et al., 2019) и аутизм (Ozgen et al., 2009).

Самой известной патологией, для которой связь с *МСПН1* достоверно установлена, является первичная микроцефалия (Jackson et al., 1998, 2002). К настоящему времени описаны несколько десятков клинических случаев, вызванных мутациями *МСПН1*. Большинство из них сопровождается умственной отсталостью разной степени тяжести. Удивительным в этой связи является семейный случай, в котором у одного из двух сибсов с микроцефалией, вызванной одной и той же гомозиготной мутацией, интеллектуальное развитие не пострадало (Ghafouri-Fard et al., 2015). Другие серьезные неврологические нарушения или

краниофациальные дисморфозы у пациентов диагностируются достаточно редко (Hemmat et al., 2017; Naseer et al., 2018; Caraffi et al., 2022).

Еще одна отличительная особенность многих пациентов с мутациями *МСПН1* обнаруживается при цитогенетическом анализе. За редким исключением (Ghafouri-Fard et al., 2015), культуры клеток пациентов демонстрируют повышенное количество профазоподобных клеток по причине преждевременной конденсации хромосом (Trimborn et al., 2004). Такая особенность даже легла в основу альтернативного названия первичной микроцефалии, вызванной мутациями *МСПН1* – синдром преждевременной конденсации хромосом, однако широкого распространения он не получил.

Фенотипически большинство пациентов имеют схожие клинические проявления, однако мутации в гене у них демонстрируют большое разнообразие (рис. 2). К настоящему моменту описано почти три десятка уникальных мутаций, варьирующих как по локализации, так и размеру. Важно отметить, что подавляющее большинство из них затрагивают N-концевую часть белка, где расположен N-концевой BRCT-домен (кодируется экзонами 1–4), а также регионы связывания с комплексом конденсина II (кодируются экзонами 1–6, 8). Среди мутаций обнаружены точечные, включая небольшие инсерции, дупликации и делеции, большая часть из которых расположены в экзонах 2, 3, 5 и 8. Более крупные мутации, представленные исключительно делециями, затрагивают как отдельные экзоны, так и более продолжительные участки с несколькими экзонами. Многие из таких мутаций затрагивают часть межгенного участка, в котором могут располагаться различные регуляторные *цис*-элементы, удаление которых может потенциально усиливать эффект мутации. Однако эта проблема до сих пор остается неизученной. Кроме того, есть несколько описанных клинических случаев тяжелого нарушения развития, вызванного крупными хромосомными делециями, которые включают сразу несколько генов, в том числе *МСПН1* (Glancy et al., 2009; Sheth et al., 2013; Marques et al., 2021). Оценить вклад делеции конкретного гена в синергетическом эффекте крупной делеции в подобных случаях не представляется возможным.



**Рис. 2.** Схематичное строение гена *MCPH1* и расположение мутаций, описанных у пациентов с микроцефалией. Экзоны обозначены черными прямоугольниками; Δ – делеции экзонов. Мутации, выделенные красным, идентифицированы в базе данных проекта DECIPHER у пациентов, имеющих признаки микроцефалии и задержки роста. Рисунок выполнен с помощью сервиса BioRender (<https://biorender.com>).

Первичная микроцефалия, вызванная мутациями *MCPH1*, имеет аутосомно-рецессивный тип наследования. При этом большинство описанных клинических случаев представляют собой пациентов с гомозиготными мутациями, в то время как компаунд-гетерозиготные встречаются довольно редко (Naseer et al., 2018). Это связано с тем, что подавляющее большинство пациентов рождено в близкородственных браках (Jackson et al., 1998; Garshasbi et al., 2006; Ghani-Kakhki et al., 2012; Pfau et al., 2013; Ghafouri-Fard et al., 2015; Hemmat et al., 2017; Caraffi et al., 2022). Описано несколько клинических случаев с гетерозиготными мутациями *MCPH1* (Perche et al., 2013; Duerinckx et al., 2017). Однако в этих случаях пациенты также были носителями клинически значимых мутаций в других генах. В связи с этим было выдвинуто предположение, что в гетерозиготном состоянии мутации *MCPH1* могут усиливать эффект мутаций в других генах.

Благодаря описанным клиническим случаям связь первичной микроцефалии с мутациями *MCPH1* не вызывает сомнений. Однако остается много открытых вопросов. Есть ли корреляция между положением мутации в гене и фенотипическими особенностями пациентов? Какие молекулярные механизмы могут лежать в основе данной патологии, учитывая многофункциональность данного белка?

Клиническая картина пациентов с мутациями *MCPH1* в основном ограничивается врожденными патологиями развития головного мозга. Следовательно, *MCPH1* играет особую роль в нейрогенезе, и для того, чтобы понять молекулярные механизмы, лежащие в основе *MCPH1*-опосредованной микроцефалии, необходимо использовать модели, позволяющие изучать раннее развитие головного мозга, например, животные модели.

## ЖИВОТНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ *MCPH1*-ОПОСРЕДОВАННОЙ МИКРОЦЕФАЛИИ

### I. Трансгенные мыши с мутациями *McpH1*

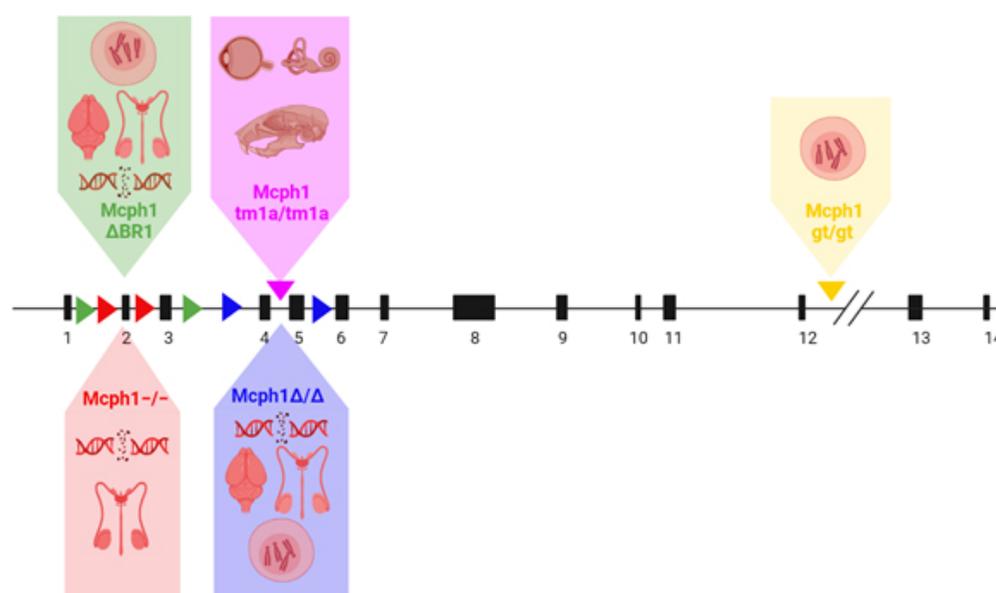
В период с 2010 по 2020 г. научными группами, сфокусированными на изучении *MCPH1*, было получено несколько линий трансгенных мышей с мутациями *McpH1*. Результаты этих экспериментов очень интересны, а иногда и крайне неожиданны (рис. 3).

**Линия *McpH1*<sup>-/-</sup>.** Первая мышьяная модель с нокаутом *McpH1* была получена путем таргетного удаления экзона 2, приводящего к сдвигу рамки считывания и образованию нефункционального белка (Lin et al., 2010) (рис. 3). Вес мутантных мышей меньше, чем у мышей дикого типа (до 80%). Кроме того,

в клетках животных нарушено формирование фокусов репарации разрывов ДНК, в частности Rad51/Brcal, вследствие чего животные гиперчувствительны к облучению. Описана полная стерильность мышей, сопряженная с уменьшением размера гонад. Частота рождения мышей *Mcp1*<sup>-/-</sup> отклоняется от менделевского наследования и составляет около 10%, что может свидетельствовать о сублетальности мутации *Mcp1* в раннем развитии. Как это не удивительно, несмотря на полное отсутствие функционального продукта с мутантного аллеля *Mcp1*, подтвержденное методами саузерн-блоттинга и вестерн-блоттинга, у *Mcp1*<sup>-/-</sup> мышей не обнаружено микроцефалии. Было бы интересно узнать степень конденсации хромосом в интерфазе, однако исследователи не предоставляют данных об этом важном фенотипическом проявлении. И хотя для изучения микроцефалии эта линия оказалась непригодной, тем не менее она используется для изучения дефектов систем репарации путем скрещивания с линиями, несущими мутации в других компонентах систем репарации ДНК (Lin et al., 2010; Liang et al., 2015; Yen et al., 2017).

**Линия *Mcp1*gt/gt.** Линия мышей получена с помощью инсерционного мутагенеза, приводящего к удалению большей части последнего

С-концевого BRCT-домена (Trimborn et al., 2010) (рис. 3). Авторы отмечают значительно сниженный уровень экспрессии укороченного белка. Трансгенные мыши имеют нормальный размер тела и головного мозга. При этом они фертильны, нарушений в мейозе не обнаружено. Отмечается лишь несколько сниженная продолжительность жизни. Среди значимых отличий от мышей дикого типа – преждевременная конденсация хромосом в интерфазе, классический признак, наблюдаемый у пациентов с МСРН1-опосредованной микроцефалией. Транскриптомный анализ различных тканей мутантных мышей не выявил отличий от дикого типа, в том числе в уровне экспрессии генов *Chk1*, *Brcal*, *Topbp1*, *Rad51*, *Ddb2*, *p73*, *Apafl* и каспазы, которые, как показано на клеточных моделях, регулируются посредством взаимодействия МСРН1 с транскрипционным фактором E2F1 (Yang et al., 2008). Также не обнаружено нарушений формирования фокусов репарации ДНК, хотя в многочисленных работах установлено, что именно последний BRCT3-домен играет наибольшую роль в восстановлении повреждений ДНК путем взаимодействия с другими факторами репарации. Таким образом, фенотип линии *Mcp1*gt/gt явно расходится с другими описанными в литературе



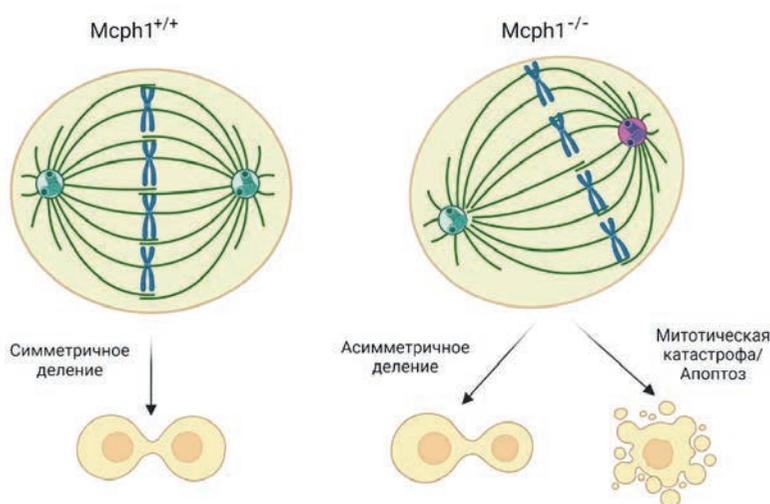
**Рис. 3.** Схематическое расположение мутаций и их фенотипическое проявление в трансгенных мышах с мутациями *Mcp1*. Треугольники, расположенные в интронах фланкируют удаленные экзоны в трансгенных линиях мышей. Треугольники над интронами указывают место интеграции кассеты для создания делеций. Рисунок выполнен с помощью сервиса BioRender (<https://biorender.com>).

экспериментальными данными, полученными на клеточных моделях.

**Линия *McpH1*Δ/Δ.** Это наиболее изученная мышинная модель *McpH1*-опосредованной микроцефалии получена путем таргетного удаления экзонов 4–5, что приводит к формированию стоп-кодона в экзоне 6; полное отсутствие белка подтверждено вестерн-блоттингом (Gruber et al., 2011) (рис. 3). Клетки мышей *McpH1*Δ/Δ имеют классический фенотип с преждевременно конденсированными хромосомами в интерфазе. Мутантные мыши стерильны и имеют уменьшенный размер гонад (Zhou et al., 2013). Кроме того, у них наблюдается уменьшение размера мозга: мозг новорожденных мышат на 20% меньше, чем у контрольных. Это обусловлено нарушением развития неокортекса из-за асимметричного деления нейральных предшественников, приводящего к истощению их пула и раннему формированию нейронов в вентрикулярной и субвентрикулярных зонах. Механизм данной патологии реализуется при участии сигнального каскада *Chk1*–*Cdc25b* и заключается в нарушении созревания центросом и связанных с этим дефектов митотического веретена деления (рис. 4). Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными ранее на клетках пациентов с МСРН1-опосредован-

ной микроцефалией (Alderton et al., 2006), что говорит в пользу того, что линия *McpH1*Δ/Δ рекапитулирует фенотип микроцефалии, наблюдаемой у пациентов, и может быть использована для изучения патогенеза этой врожденной аномалии развития мозга.

Исследование причин микроцефалии на этой мышинной модели было продолжено той же научной группой, но на этот раз авторы сконцентрировались на изучении аспектов репарации ДНК (Zhou et al., 2013). Оказалось, что на поздней эмбриональной стадии развития в мозге мышей *McpH1*Δ/Δ значительно увеличено число апоптирующих клеток. Поскольку в этих клетках не было повышенного формирования фокусов репарации  $\gamma$ -H2AX, авторы связывают их гибель с митотической катастрофой. Помимо этого, клетки неокортекса оказались менее устойчивы к радиооблучению, а наибольшая доля апоптирующих клеток наблюдается в зоне нейральных предшественников и ранних нейронов. В этой же работе показано, что МСРН1 не задействован в миграции нейронов. Мутантные мыши также не демонстрируют отклонений в строении мозжечка, следовательно, роль *McpH1* в нейрогенезе мыши ограничена неокортексом (Zhou et al., 2013).



**Рис. 4.** МСРН1 поддерживает баланс между симметричным и асимметричным делением нейральных предшественников. Деpletion МСРН1 (*McpH1*<sup>-/-</sup>) приводит к снижению центросомального пула *Chk1* и активации *Cdk1*. Это в свою очередь вызывает преждевременный переход фаз клеточного цикла  $G_2$ – $M$ , когда созревание дочерней центросомы еще не завершено. В результате, в митозе центросомы имеют разный потенциал к организации микротрубочек, что является причиной асимметрии веретена деления. При симметричном делении происходит равномерное наследование белков и обе дочерние клетки сохраняют пролиферативный потенциал. Асимметричное деление приводит к неравному наследованию апикальных белков и дифференцировке клеток в нейроны. Адаптировано из: Gruber et al., 2011. Рисунок выполнен с помощью сервиса BioRender (<https://biorender.com>).

**Линия *Mcphtmla/tmla*.** Получена путем таргетного удаления экзона 4 и является гипоморфной; остаточный уровень транскриптов *McpH1* в мутантных мышцах содержится на уровне 1–4% от нормы (Chen et al., 2013) (рис. 3). Гомозиготные мыши стерильны и имеют несколько меньший размер черепа. Авторы также отмечают отклонения от менделевского наследования в частоте рождения потомков с гомозиготной мутацией *McpH1* (около 14%) (Chen et al., 2013). Фокус этой исследовательской группы (Chen et al., 2013) изначально был направлен на изучение роли МСРН1 в воспалении среднего уха и вызванной этим потери слуха. Поскольку ранее в нескольких исследованиях была показана центросомальная локализация МСРН1, исследователи предположили, что нарушение его функций может сказаться на структуре цилий ольфакторного эпителия, составным компонентом которых являются центриоли. Действительно, при детальном гистологическом анализе мышцей *Mcphtmla/tmla* обнаружили множественные аномалии развития слухового аппарата, а также глаз. При этом для мутантных мышцей оказалась характерна потеря слуха легкой или средней степени тяжести с пенетрантностью 70% (Chen et al., 2013). Авторы предполагают, что это может быть обусловлено нарушением мукоцилиарного клиренса и накоплением слизи. Интересно, что этот фенотип не был описан ранее ни для других мутантных мышечных моделей МСРН1-опосредованной микроцефалии, ни для пациентов за исключением одного случая (Oluwole et al., 2021). Вероятно, такой признак, как глухота, может быть легко упущен при анализе фенотипа на мышечных моделях. Однако эта информация крайне важна для диагностики пациентов, поскольку вовремя не выявленный средний отит может привести к потере слуха. Дефективность цилий также может объяснить дезорганизацию и дегенерацию слоя фоторецепторных клеток, а также мужскую стерильность. Однако стоит отметить, что для мышцей линии *Mcphtmla/tmla* не описано других характерных для цилиопатий фенотипических проявлений, например, таких, как поликистозная болезнь почек и нефронофтиз.

**Линия *McpH1lox/lox; Emx1kiCre/+*.** Трансгенная линия мышцей с условным нокаутом гена *McpH1* в кортикальных предшественниках

(Journiac et al., 2020). Для мышцей этой линии описана микроцефалия, которая вызвана массовой гибелью нейральных предшественников из-за нарушений в митозе. Анализ транскриптома нейральных стволовых клеток, выделенных из неокортекса мутантных мышцей, наряду с отличиями экспрессии генов-регуляторов клеточного цикла, в том числе *Cdk1* и *Chk1*, выявил значительные изменения в активности генов митохондриальных белков и окислительного фосфорилирования (Journiac et al., 2020). Было показано, что в нейральных стволовых клетках и человека, и мышцей *McpH1* локализуется в непосредственной близости от внешней мембраны митохондрий, взаимодействуя с белками GRP75 (из семейства белков теплового шока) и VDAC1 (митохондриальный потенциал-зависимый анионный канал), и регулирует активность митохондрий (Journiac et al., 2020). Помимо этого, через сигнальный путь ATF4/PERK МСРН1 участвует в глутаминолизе – процессе пополнения уровня промежуточных продуктов в цикле трикарбоновых кислот, чрезвычайно важном для пролиферации и выживания клеток в условиях метаболического стресса (Colombo et al., 2011; Méndez-Lucas et al., 2014; Vincent et al., 2015). В клетках мутантных мышцей с нокаутом *McpH1* отмечено нарушение митохондриальной сети с повышенной долей фрагментированных митохондрий (Journiac et al., 2020). Эти дефекты сопровождаются значительным снижением уровня АТФ, свидетельствуя об изменении митохондриальной активности. Известно, что в ходе развития неокортекса активно пролиферирующие клетки радиальной глии синтезируют АТФ преимущественно за счет гликолиза (Lange et al., 2016). Авторы полагают, что глутаминолиз может быть использован клетками радиальной глии в дополнение к гликолизу (Journiac et al., 2020). И нарушение этого биохимического пути при нокауте *McpH1* играет немаловажную роль в гибели клеток радиальной глии и также способствует микроцефалии (Journiac et al., 2020).

**Линия *McpH1-ΔBR1*.** Эта трансгенная линия мышцей была получена для изучения функции N-концевого домена МСРН1 путем удаления экзонов 2–3; укороченный белок детектируется на уровне 70% от исходного (Liu et al., 2021) (рис. 3). Примечательно, что эта линия мышцей рекапитулирует все признаки полного нокаута

*McpH1*: микроцефалию, стерильность, снижение эффективности систем репарации ДНК, а также увеличенное количество клеток с преждевременно конденсированными хромосомами в интерфазе (Liu et al., 2021). Анализ структуры мозга мышей на стадии E17.5 выявил истончение кортикальной пластинки за счет уменьшения пула нейральных предшественников и ранней дифференцировки в нейроны, что соответствует ранее полученным данным на мышинных моделях с микроцефалией (Gruber et al., 2011; Zhou et al., 2013; Journiac et al., 2020; Liu et al., 2021). Наряду с недоразвитием гонад и полной стерильностью обоих полов у самок обнаружена высокая частота рака яичника (Liu et al., 2021). Это важное исследование показывает функциональную эквивалентность полноразмерного белка и N-концевого домена МСРН1 и свидетельствует о чрезвычайной важности этого домена в нейрогенезе, по крайней мере на мышинной модели.

**Индукция микроцефалии посредством ингибирования VIP.** В ряд описанных выше моделей можно добавить также фармакологическую индукцию микроцефалии путем блокады вазоактивного интестинального полипептида (VIP). Материнский фактор VIP контролирует пролиферацию нейральных предшественников плода посредством регуляции длины клеточного цикла (Gressens et al., 1998). Более 30 лет назад было установлено, что инъекция беременным самкам мыши VA (антагониста VIP) на стадиях раннего нейрогенеза (E9–E11) приводит к критическим изменениям коры головного мозга эмбрионов. Эти изменения не затрагивают архитектуру головного мозга, но влияют на его размер (уменьшение на 20%), имитируя микроцефалию у человека (Gressens et al., 1994). В 2011 г. был описан механизм, приводящий к микроцефалии при блокаде VIP; и в основе этого механизма стоит МСРН1 (Passemar et al., 2011). Авторы полагают, что VA, действуя через сигнальный путь VPAC1/РКА, негативно регулирует экспрессию гена *McpH1*. При этом действие VA специфично: среди генов МСРН-локусов только *McpH1* имеет значительно сниженный уровень экспрессии в конечном мозге эмбрионов при инъекции VA. На молекулярном уровне ингибирование VIP влечет за собой нарушение активности сигнального пути Chk1, и при участии сигнального каскада циклин В/Chk1–

Cdc25 способствует ранней дифференцировке нейральных предшественников в нейроны. Это соответствует данным, полученным при использовании других мышинных моделей с мутациями *McpH1*, рекапитулирующих фенотип микроцефалии и дополняет их, добавляя нового участника регуляции *McpH1* – материнский фактор VIP. Пока новых исследований, расширяющих наши знания об этом типе регуляции, нет.

## II. Трансгенные обезьяны с мутациями МСРН1

Итак, не все мышинные модели воспроизводят ключевой фенотип мутации МСРН1 – микроцефалию. Помимо этого, для мутантных мышей описано увеличение частоты развития онкологических заболеваний и в одном случае – потеря слуха (Gruber et al., 2011; Chen et al., 2013). В данной литературе не встречается упоминание о таких признаках в клинической картине МСРН1-опосредованной микроцефалии (Kristofova et al., 2022). Были показаны отличия временного интервала экспрессии МСРН1 в раннем развитии мыши и человека, а также локализации МСРН1 в субкомпартаментах клетки и степени вовлеченности в регуляцию транскрипции генов (Yang et al., 2008; Trimborn et al., 2010; Journiac et al., 2020). Все это свидетельствует о видоспецифических функциях МСРН1 у человека и других млекопитающих, часть из которых невозможно изучить на мышинных моделях. Таким образом, МСРН1 и его роль в нейрогенезе человека требует детального изучения на более релевантной модели, например на приматах. К настоящему времени получена одна трансгенная линия обезьян с нокаутом гена МСРН1.

**Линия МСРН1mt/mt.** Эта трансгенная линия макак-крабоедов получена путем удаления экзонов 2–3 гена *McpH1* (Ke et al., 2016). Обезьяны МСРН1mt/mt отличаются меньшим размером тела и головного мозга по сравнению с обезьянами дикого типа. Среди других значимых различий – гипоплазия мозолистого тела, – признак, описанный и для некоторых пациентов с МСРН1-опосредованной микроцефалией (Neitzel et al., 2002; Trimborn et al., 2004; Ghani-Kakhki et al., 2012; Pfau et al., 2013). Для трансгенных животных характерны увеличенная доля клеток с преждевременно

конденсированными хромосомами и повышенная активность теломеразы, что согласуется с результатами, полученными на клеточных линиях с деплецией *MCPH1* (Kim et al., 2009). Помимо этого, для трансгенных животных описана спастичность мышц, что встречается и в клинической картине пациентов с мутациями *MCPH1* (Neitzel et al., 2002). Связь спастичности с патологией мозолистого тела уже была описана при мутациях в других генах (Ma et al., 2014; Heimer et al., 2015). Все вместе это может свидетельствовать о влиянии *MCPH1* на двигательные навыки посредством участия в развитии мозолистого тела (Ke et al., 2016).

Отсутствие неврологических симптомов у трансгенных мышей с *McpH1*-опосредованной микроцефалией, позволяет предположить, что у приматов *MCPH1* играет более важную роль в развитии мозга, чем у мышей. В основе этого может лежать функциональная дивергенция. Установлено, что *MCPH1* отличается высокой скоростью эволюции (Wang, Su, 2004), которая подразумевает наличие значительного количества несинонимичных замен, и как следствие, изменения в белковой последовательности. Такие структурные изменения могут приводить к модификации имеющихся функций или появлению новых уникальных. Так, было показано, что видоспецифические отличия аминокислотных последовательностей *MCPH1* человека, макака-резуса и гиббона сказываются на его активности (Shi et al., 2013). В частности, были показаны значительные изменения уровня экспрессии целевых генов белкового комплекса *MCPH1-E2F1: p73, CyclinE1* и *p14ARF*. Кроме того, внесение мутаций в сайты, специфичные для человека, также приводят к изменению экспрессии генов, регулируемых *MCPH1* (Shi et al., 2013).

Еще одним свидетельством функциональной дивергенции может служить впечатляющая работа, в которой были получены трансгенные макака-резусы, несущие в геноме копии *MCPH1* человека (Shi et al., 2019). Было показано, что трансгенные животные не обладают бóльшим размером головного мозга, но демонстрируют признаки неотении, характерные для мозга человека: задержку дифференцировки и созревания нейронов (Shi et al., 2019). Транскриптомный анализ мозга на разных стадиях развития выявил изменения

в профиле экспрессии генов в нейральных предшественниках и нейронах. Эти изменения касаются временного сдвига в экспрессии генов, связанных с формированием синапсов. Так, для генов *MEF2A* и *SYP* у трансгенных животных наблюдается задержка экспрессии, а сам временной профиль экспрессии схож с таковым у человека (Shi et al., 2019). Примечательно, что когнитивные тесты показали улучшение кратковременной памяти у трансгенных макака-резусов (Shi et al., 2019). Авторы предполагают, что помимо регуляции пролиферации нейральных предшественников, *MCPH1* также играет важную роль в обеспечении синаптической пластичности нейронов в мозге человека (Shi et al., 2019). Вкупе с фактом, что активность *MCPH1* напрямую связана с размером мозга, это позволяет предположить особую роль *MCPH1* в эволюции головного мозга человека.

#### РОЛЬ *MCPH1* В ЭВОЛЮЦИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Последний общий предок шимпанзе и человека жил около пяти миллионов лет назад. За это время человек успел претерпеть целый ряд масштабных эволюционных изменений, например, значительные преобразования в скелете, репродуктивной системе и коже. Однако самым выдающимся эволюционным приобретением стал большой размер головного мозга. Увеличение размеров сопровождалось появлением новых или совершенствованием уже имеющихся у приматов уникальных навыков: самопознание, речь, использование инструментов. В основе таких глобальных морфологических и функциональных преобразований лежит масштабное изменение сложных молекулярно-генетических систем, регулирующих процесс развития головного мозга. Однако точные механизмы до сих пор мало изучены.

Гены, ассоциированные с микроцефалией, сразу же после их открытия привлекли к себе пристальное внимание как возможные генетические кандидаты, играющие важную роль в эволюции головного мозга человека (Gilbert et al., 2005; Ponting, Jackson, 2005; Woods et al., 2005; Evans et al., 2006). Еще в XIX в. Карл Фогт предположил, что микроцефалия является реверсией к предковым формам. И до сих пор в литературе нередко встречается трактовка первичной

микроцефалии как атавистического признака (Ponting, Jackson, 2005; Woods et al., 2005). С одной стороны, в пользу этого говорит тот факт, что размер мозга пациентов с микроцефалией сравним с размером мозга ранних гоминид, при этом краниофациальный дисморфизм и другие явные неврологические нарушения отсутствуют. Однако все же считается, что такая трактовка остается в сфере спекуляций. Во-первых, первичная микроцефалия и ее молекулярные и клеточные механизмы изучены к настоящему времени недостаточно. Во-вторых, наши знания о нейроанатомии предковых форм человека являются лишь экстраполяцией на основе сравнительного анализа структуры мозга современных видов приматов (Gilbert et al., 2005; Pulvers, 2015).

В поисках генетической основы эволюционных изменений, была проведена масштабная работа по изучению генов, участвующих в различных аспектах биологии нервной системы у нескольких видов млекопитающих (Dogus et al., 2004). Сравнительный анализ последовательностей показал, что темпы эволюции генов, вовлеченных в развитие головного мозга, ускоряются у приматов относительно других млекопитающих, и это ускорение особенно заметно в линии, ведущей к человеку (Dogus et al., 2004). *MCPH1* оказался одним из обнаруженных генов с динамичными молекулярными изменениями. Возросшая скорость эволюции гена может иметь две трактовки: с одной стороны, это может свидетельствовать об ослаблении функциональных ограничений, с другой стороны, напротив, о действии сильного положительного отбора. Учитывая важную роль *MCPH1* в развитии головного мозга человека и других млекопитающих, наиболее вероятным сценарием развития событий считается адаптивная эволюция, действовавшая через сильный положительный отбор, что было подтверждено в нескольких независимых исследованиях (Evans, 2004; Wang, Su, 2004; Montgomery et al., 2011). Более детальный анализ молекулярной эволюции *MCPH1* выявил, что наиболее выраженное ускорение обнаруживается в ранние периоды линии, ведущей к человеку (Evans, 2004; Wang, Su, 2004). При этом действие положительного отбора не ограничилось только ранним

периодом в ветке гоминид, а продолжилось после появления анатомически современных людей (Evans et al., 2005). Кроме того, по мере увеличения видового разнообразия в исследованиях, было установлено, что ускоренная эволюция *MCPH1* характерна не только для ветви ведущей к человеку, но и для других видов приматов (Montgomery et al., 2011). А согласно более поздним исследованиям, такая тенденция распространена гораздо шире и наблюдается у разных видов плацентарных млекопитающих (McGowen et al., 2011; Montgomery, Mundy, 2014).

Помимо высокой скорости эволюции *MCPH1* у разных видов млекопитающих, была обнаружена еще одна отличительная особенность данного гена – высокая полиморфность в современных популяциях человека (Wang, Su, 2004; Scala et al., 2010). Поскольку размеры головного мозга в популяциях человека варьируют и вероятнее всего генетически обусловлены, было выдвинуто предположение, что полиморфизмы в генах, вызывающих микроцефалию, могут быть ассоциированы с данным признаком (Atwood et al., 2004). Однако анализ полиморфизмов в современных популяциях человека не позволил выявить четкой связи между отдельными SNP в гене *MCPH1* и размерами головного мозга или уровнем интеллекта (Woods et al., 2006; Dobson-Stone et al., 2007; Mekel-Bobrov et al., 2007; Rushton et al., 2007; Bates et al., 2008; Pierzak-Sominka et al., 2016). В связи с этим считается, что вариация в объеме головного мозга либо нейтральная, либо находится под очень слабым действием отбора.

Поскольку наличие сильного положительного отбора в случае самого гена *MCPH1* не ставится под сомнение, выдвинуто предположение, что его действие может быть направлено на другие признаки. Об этом косвенно свидетельствуют филогенетические исследования, проведенные на представителях инфраотряда китообразных. В данном случае выбор объекта исследования не случаен, поскольку представители этого инфраотряда демонстрируют значительную энцефализацию, характерную также для эволюционной ветви, ведущей к приматам. Китообразные имеют развитые социальные навыки и сложное когнитивное поведение. Таким образом, они могут служить своеобраз-

ным контролем для изучения роли *MCPH1* в эволюции размера головного мозга. И хотя в этой работе авторы также показали наличие положительного отбора, связь *MCPH1* с размером головного мозга не была установлена (McGowen et al., 2011). Однако исследователи обратили внимание и на другие физиологические и анатомические особенности китообразных: наибольшие абсолютные размеры тела среди животных, долгая продолжительность жизни и очень высокая скорость роста на эмбриональной стадии развития. Поскольку одна из функций *MCPH1* – контроль клеточного цикла и участие в репарации ДНК, – было выдвинуто предположение, что действие положительного отбора может быть направлено на скорость пролиферации и абсолютное количество клеток в организме, а также обеспечение онкосупрессорной функции (McGowen et al., 2011). Также нельзя исключить, что в качестве еще одного возможного “субстрата” для отбора может рассматриваться половая система (Nielsen et al., 2005). В частности, известно, что *MCPH1* важен для формирования половых клеток, о чем свидетельствуют высокий уровень его экспрессии в семенниках и стерильность нокаутных мышей (Liang et al., 2010; Gruber et al., 2011; Liu et al., 2021).

Таким образом, роль *MCPH1* в эволюции человека и других млекопитающих до сих пор не установлена. Тем не менее, несмотря на отсутствие очевидного признака для действия отбора, к настоящему моменту наличие адаптивной эволюции *MCPH1* не вызывает сомнений, поскольку подтверждено многочисленными данными сравнительной геномики.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

*MCPH1* – многофункциональный белок, участвующий во множестве клеточных процессов, нарушение каждого из которых потенциально приводит к патологии развития мозга. Тем не менее вопрос о том, что именно вызывает микроцефалию при мутации *MCPH1*, до сих пор остается без однозначного ответа. Связь *MCPH1* с сигнальным путем ATR, изначально считалась определяющей для развития микроцефалии (Alderton et al., 2006; Rai et al., 2006; Zhang et al., 2014). Этому способствовал тот факт, что мутации сигнальных путей ATM и ATR, играю-

щих центральную роль в репарации поврежденной ДНК, также ассоциированы с микроцефалией (синдром Секкеля и синдром Неймегена) (McKinnon, 2009; Taylor et al., 2019). Однако стоит отметить, что для пациентов с мутациями *MCPH1* не описаны случаи злокачественных новообразований и дисморфозов, характерных для синдромов, связанных с дефектами систем репарации ДНК (Kristofova et al., 2022). Клеточные культуры пациентов с мутациями *MCPH1* не демонстрируют тяжелых нарушений в виде остановки клеточного цикла и/или апоптоза в ответ на индукцию повреждений ДНК (Alderton et al., 2006; Gavvovidis et al., 2010).

Несмотря на различную этиологию, в большинстве случаев в основе первичной микроцефалии лежат мутации в генах, связанных с архитектурой цитоскелета и клеточным делением: например, *ASPM* (Li et al., 2017), *CDK5RAP2* (Lancaster et al., 2013), *CENPJ* (Gabriel et al., 2016), *WDR62* (Xu et al., 2014; Zhang et al., 2019). Установлено, что дефекты веретена деления и нарушения биогенеза centrosом приводят к митотической катастрофе и вызывают массовую гибель нейральных предшественников (Rauch et al., 2008; Yingling et al., 2008; Nigg, Holland, 2018). Данные о centrosомальной локализации *MCPH1* и его влиянии на регуляцию биогенеза centrosом противоречивы, но связывают *MCPH1*-опосредованную микроцефалию с другими хорошо охарактеризованными случаями первичной микроцефалии.

Важно отметить, что роль *MCPH1* в поддержании стабильности теломер, и организации интерфазного хроматина совсем не изучена на существующих моделях *MCPH1*-опосредованной микроцефалии. Между тем накоплено много доказательств важности поддержания функционирования теломер в нейрогенезе: их дисфункция приводит к массовой гибели нейральных предшественников через активацию сигнальных путей, задействованных в репарации ДНК (Zhang et al., 2006; Lee et al., 2014; Lobanova et al., 2017). Синдром Хойераала–Хрейдарссона, вызванный мутациями либо белков комплекса шелтерина, либо мутациями теломеразы, включает среди фенотипических проявлений и микроцефалию (Kocak et al., 2014; Glousker et al., 2015).

Примечательно, что и мутации комплексов конденсинов приводят к многочисленным нарушениям развития организма, в том числе микроцефалии (Perche et al., 2013; Martin et al., 2016; Khan et al., 2019). Этот спектр заболеваний был назван отдельным термином – конденсинопатии. Показано, что в случае дефектов комплексов конденсинов также происходит нарушение декатенации и сегрегации сестринских хроматид, что негативно сказывается на пролиферации и выживаемости нейральных предшественников (Nishide, Hirano, 2014). Таким образом, нарушение длительности митоза и расхождения сестринских хроматид в *МСПН1*-дефицитных клетках также может играть важную роль в нарушении нейрогенеза, приводящего к микроцефалии.

Животные модели *МСПН1*-опосредованной микроцефалии позволили исследователям получить целый ряд важной информации о молекулярных основах патогенеза этой патологии развития. Согласно им можно полагать, что основной причиной микроцефалии является нарушение регуляции клеточного деления в нейральных предшественниках, вызванное подавлением активности сигнального пути киназы клеточного цикла Chk1 (Gruber et al., 2011; Journiac et al., 2020; Liu et al., 2021). Одновременно с этим были выявлены видоспецифические различия, которые не позволяют должным образом оценить вклад других аспектов функциональной активности *МСПН1* при данном типе нарушения нейрогенеза. Так, например, действие *МСПН1* как транскрипционного фактора и его участие в поддержании целостности теломер показано только на линиях клеток человека, но не мыши. Исследований по изучению роли *МСПН1* на приматах очень ограниченное количество (Shi et al., 2013; Ke et al., 2016). Однако даже эти немногие показали существование важных функций *МСПН1* в нейрогенезе, отсутствующих у мышей.

Видоспецифические особенности в формировании мозга человека ограничивают изучение различных его патологий на модельных животных. В течение долгого времени исследователям не удавалось преодолеть эти ограничения, однако с развитием технологий репрограммирования и редактирования генома был сделан большой прорыв в этой области (Takahashi, Yamanaka, 2006). Получение пациент-специфичных индуцирован-

ных плюрипотентных стволовых клеток и возможность их дифференцировки в нейральные стволовые клетки и нейроны, а также создание любых направленных модификаций генома позволили не только изучать последствия мутаций, но также тестировать лекарственные препараты и проводить скрининги химических соединений (Rowe, Daley, 2019). В 2013 году была опубликована ключевая работа (Lancaster et al., 2013), где впервые было описано получение трехмерных структур, названных церебральными органоидами. Церебральные органоиды точно воспроизводят процессы, происходящие при развитии коры головного мозга аналогично первым трем месяцам эмбрионального развития человека. Измерение различных морфометрических параметров органоидов исключительно удобно и информативно в случае микроцефалии (Lancaster et al., 2013; Cugola et al., 2016; Fair et al., 2023). Удивительно, но *МСПН1* – исторически первый описанный ген, ассоциированный с микроцефалией, еще не был изучен на модели церебральных органоидов. Мы полагаем, что использование такой модели также может принести важные результаты и пролить свет на роль *МСПН1* в развитии и эволюции головного мозга человека.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-00112).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не участвовали животные или люди в качестве объектов исследования.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ade C., Roy-Engel A.M., Deininger P.L. 2013. Alu elements: an intrinsic source of human genome instability. *Curr. Opin. Virol.* V. 3. P. 639.
- Al Eissa M.M., Sharp S.I., O'Brien N.L., Fiorentino A., Bass N.J., Curtis D., McQuillin A. 2019. Genetic association and functional characterization of *МСПН1*

- gene variation in bipolar disorder and schizophrenia. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* V. 180. P. 258.
- Alderton G.K., Galbiati L., Griffith E., Surinya K.H., Neitzel H., Jackson A.P., Jeggo P.A., O'Driscoll M.* 2006. Regulation of mitotic entry by microcephalin and its overlap with ATR signalling. *Nat. Cell Biol.* V. 8. P. 725.
- Arroyo M., Kuriyama R., Trimborn M., Keifenheim D., Cañuelo A., Sánchez A., Clarke D.J., Marchal J.A.* 2017. MCPH1, mutated in primary microcephaly, is required for efficient chromosome alignment during mitosis. *Sci. Rep.* V. 7. P. 13019.
- Atwood L.D., Wolf P.A., Heard-Costa N.L., Massaro J.M., Beiser A., D'Agostino R.B., DeCarli C.* 2004. Genetic variation in white matter hyperintensity volume in the framingham study. *Stroke.* V. 35. P. 1609.
- Bates T.C., Luciano M., Lind P.A., Wright M.J., Montgomery G.W., Martin N.G.* 2008. Recently-derived variants of brain-size genes ASPM, MCPH1, CDK5RAP and BRCA1 not associated with general cognition, reading or language. *Intelligence.* V. 36. P. 689.
- Bettencourt-Dias M., Hildebrandt F., Pellman D., Woods G., Godinho S.A.* 2011. Centrosomes and cilia in human disease. *Trends Genet.* V. 27. P. 307.
- Bhattacharya N., Mukherjee N., Singh R.K., Sinha S., Alam N., Roy A., Roychoudhury S., Panda C.K.* 2013. Frequent alterations of MCPH1 and ATM are associated with primary breast carcinoma: clinical and prognostic implications. *Ann. Surg. Oncol.* V. 20. P. 424.
- Bond J., Woods C.G.* Cytoskeletal genes regulating brain size. 2006. *Curr. Opin. Cell Biol.* V. 18. P. 95.
- Britten R.J.* 2010. Transposable element insertions have strongly affected human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 107. P. 19945.
- Brown J.A.L., Bourke E., Liptrot C., Dockery P., Morrison C.G.* 2010. MCPH1/BRIT1 limits ionizing radiation-induced centrosome amplification. *Oncogene.* V. 29. P. 5537.
- Brüning-Richardson A., Bond J., Alsiary R., Richardson J., Cairns D.A., McCormack L., Hutson R., Burns P., Wilkinson N., Hall G.D., Morrison E.E., Bell S.M.* 2011. ASPM and microcephalin expression in epithelial ovarian cancer correlates with tumour grade and survival. *Br. J. Cancer.* V. 104. P. 1602.
- Caraffi S.G., Pollazzon M., Farooq M., Fatima A., Larsen L.A., Zuntini R., Napoli M., Garavelli L.* 2022. MCPH1: A novel case report and a review of the literature. *Genes (Basel).* V. 13. P. 634.
- Casas Gimeno G., Paridaen J.T.M.L.* 2022. The symmetry of neural stem cell and progenitor divisions in the vertebrate brain. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 10. P. 885269.
- Chang H.-Y., Lee C.-Y., Lu C.-H., Lee W., Yang H.-L., Yeh H.-Y., Li H.-W., Chi P.* 2020. Microcephaly family protein MCPH1 stabilizes RAD51 filaments. *Nucleic Acids Res.* V. 48. P. 9135.
- Chen J., Ingham N., Clare S., Raisen C., Vancollie V.E., Ismail O., McIntyre R.E., Tsang S.H., Mahajan V.B., Dougan G., Adams D.J., White J.K., Steel K.P.* 2018. Mcph1-deficient mice reveal a role for MCPH1 in otitis media. *PLoS One.* V. 8. P.: e58156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058156>.
- Cicconi A., Rai R., Xiong X., Broton C., Al-Hiyasat A., Hu C., Dong S., Sun W., Garbarino J., Bindra R.S., Schildkraut C., Chen Y., Chang S.* 2020. Microcephalin 1/BRIT1-TRF2 interaction promotes telomere replication and repair, linking telomere dysfunction to primary microcephaly. *Nat. Commun.* V. 11. P. 5861.
- Colombo S.L., Palacios-Callender M., Frakich N., Carcamo S., Kovacs I., Tudzarova S., Moncada S.* 2011. Molecular basis for the differential use of glucose and glutamine in cell proliferation as revealed by synchronized HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 108. P. 21069.
- Cordaux R., Batzer M.A.* 2009. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat. Rev. Genet.* V. 10. P. 691.
- Cugola F.R., Fernandes I.R., Russo F.B., Freitas B.C., Dias J.L.M., Guimarães K.P., Benazzato C., Almeida N., Pignatari G.C., Romero S., Polonio C.M., Cunha I., Freitas C.L., Brandão W.N., Rossato C. et al.* 2016. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature.* V. 534. P. 267.
- Posthuma D., De Geus E.J.C., Neale M. C., Hulshoff Pol H. E., Baare W.E.C., Kahn R.S., Boomsma D.* 2000. Multivariate genetic analysis of brain structure in an extended twin design. *Behav. Genet.* V. 30. P. 311.
- Dobson-Stone C., Gatt J.M., Kuan S.A., Grieve S.M., Gordon E., Williams L.M., Schofield P.R.* 2007. Investigation of MCPH1 G37995C and ASPM A44871G polymorphisms and brain size in a healthy cohort. *Neuroimage.* V. 37. P. 394.
- Dorus S., Vallender E.J., Evans P.D., Anderson J.R., Gilbert S.L., Mahowald M., Wyckoff G.J., Malcom C.M., Lahn B.T.* 2004. Accelerated evolution of nervous system genes in the origin of *Homo sapiens*. *Cell.* V. 119. P. 1027.
- Duerinckx S., Verhelst H., Perazzolo C., David P., Desmyter L., Pirson I., Abramowicz M.* 2017. Severe congenital microcephaly with AP4M1 mutation, a case report. *BMC Med. Genet.* V. 18. P. 48.
- Erwin J.A., Marchetto M.C., Gage F.H.* 2014. Mobile DNA elements in the generation of diversity and complexity in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 15. P. 497.
- Evans P.D.* 2004. Reconstructing the evolutionary history of microcephalin, a gene controlling human brain size. *Hum. Mol. Genet.* V. 13. P. 1139.

- Evans P.D., Gilbert S.L., Mekel-Bobrov N., Vallender E.J., Anderson J.R., Vaez-Azizi L.M., Tishkoff S.A., Hudson R.R., Lahn B.T. 2005. Microcephalin, a gene regulating brain size, continues to evolve adaptively in humans. *Science*. V. 309. P. 1717.
- Evans P.D., Vallender E.J., Lahn B.T. 2006. Molecular evolution of the brain size regulator genes CDK5RAP2 and CENPJ. *Gene*. V. 375. P. 75.
- Fair S.R., Schwind W., Julian D.L., Biel A., Guo G., Rutherford R., Ramadesikan S., Westfall J., Miller K.E., Kararoudi M.N., Hickey S.E., Mosher T.M., McBride K.L., Neinast R., Fitch J. et al. 2023. Cerebral organoids containing an AUTS2 missense variant model microcephaly. *Brain*. V. 146. P. 387.
- Florea L., Payer L., Antonescu C., Yang G., Burns K. 2021. Detection of Alu exonization events in human frontal cortex from RNA-Seq data. *Front. Mol. Biosci.* V. 8: 727537.  
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.727537>
- Gabriel E., Wason A., Ramani A., Gooi L.M., Keller P., Pozniakovskiy A., Poser I., Noack F., Telugu N.S., Calegari F., Šarić T., Hescheler J., Hyman A.A., Gottardo M., Callaini G. et al. 2016. CPAP promotes timely cilium disassembly to maintain neural progenitor pool. *EMBO J.* V. 35. P. 803.
- Garshasbi M., Motazacker M.M., Kahrizi K., Behjati F., Abedini S.S., Nieh S.E., Firouzabadi S.G., Becker C., Rüschemdorf F., Nürnberg P., Tzschach A., Vazifehmand R., Erdogan F., Ullmann R., Lenzner S. et al. 2006. SNP array-based homozygosity mapping reveals MCPH1 deletion in family with autosomal recessive mental retardation and mild microcephaly. *Hum. Genet.* V. 118. P. 708.
- Gavvovidis I., Pöhlmann C., Marchal J.A., Stumm M., Yamashita D., Hirano T., Schindler D., Neitzel H., Trimborn M. 2010. MCPH1 patient cells exhibit delayed release from DNA damage-induced G<sub>2</sub>/M checkpoint arrest. *Cell Cycle*. V. 9. P. 4893.
- Gavvovidis I., Rost I., Trimborn M., Kaiser F.J., Purps J., Wiek C., Hanenberg H., Neitzel H., Schindler D. 2012. A Novel MCPH1 Isoform complements the defective chromosome condensation of human MCPH1-deficient cells. *PLoS One*. V. 7: e40387.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040387>
- Ghafouri-Fard S., Fardaei M., Gholami M., Miryounesi M. 2015. A case report: Autosomal recessive microcephaly caused by a novel mutation in MCPH1 gene. *Gene*. V. 571. P. 149.
- Ghani-Kakhki M., Robinson P.N., Morlot S., Mitter D., Trimborn M., Albrecht B., Varon R., Sperling K., Neitzel H. 2012. Two missense mutations in the primary autosomal recessive microcephaly gene MCPH1 disrupt the function of the highly conserved N-Terminal BRCT domain of microcephalin. *Mol. Syndromol.* V. 3. P. 6.
- Giallongo C., Tibullo D., La Cava P., Branca A., Parrinello N., Spina P., Stagno F., Conticello C., Chiarenza A., Vigneri P., Palumbo G.A., Di Raimondo F. 2011. BRIT1/MCPH1 Expression in chronic myeloid leukemia and its regulation of the G<sub>2</sub>/M Checkpoint. *Acta Haematol.* V. 126. P. 205.
- Gilbert S.L., Dobyns W.B., Lahn B.T. 2005. Genetic links between brain development and brain evolution. *Nat. Rev. Genet.* V. 6. P. 581.
- Glancy M., Barnicoat A., Vijeratnam R., de Souza S., Gilmore J., Huang S., Maloney V.K., Thomas N.S., Bunyan D.J., Jackson A., Barber J.C.K. 2009. Transmitted duplication of 8p23.1–8p23.2 associated with speech delay, autism and learning difficulties. *Eur. J. Hum. Genet.* V. 17. P. 37.
- Glousker G., Touzot F., Revy P., Tzfati Y., Savage S.A. 2015. Unraveling the pathogenesis of Hoyeraal–Hreidarsson syndrome, a complex telomere biology disorder. *Br. J. Haematol.* V. 170. P. 457.
- Gressens P., Hill J.M., Paindaveine B., Gozes I., Fridkin M., Brenneman D.E. 1994. Severe microcephaly induced by blockade of vasoactive intestinal peptide function in the primitive neuroepithelium of the mouse. *J. Clin. Invest.* V. 94. P. 2020.
- Gressens P., Marret S., Martin J., Laquerrière A., Lomet A., Evrard P. 1998. Regulation of neuroprotective action of vasoactive intestinal peptide in the murine developing brain by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase cascades: *in vivo* and *in vitro* studies. *J. Neurochem.* V. 70. P. 2574.
- Gruber R., Zhou Z., Sukchev M., Joerss T., Frappart P.-O., Wang Z.-Q. 2011. MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1–Cdc25 pathway. *Nat. Cell Biol.* V. 13. P. 1325.
- Häsler J., Strub K. 2006. Alu elements as regulators of gene expression. *Nucleic Acids Res.* V. 34. P. 5491.
- Heimer G., Marek-Yagel D., Eyal E., Barel O., Oz Levi D., Hoffmann C., Ruzzo E.K., Ganelin-Cohen E., Lancet D., Pras E., Rechavi G., Nissenkorn A., Anikster Y., Goldstein D.B., Ben Zeev B. 2015. SLC1A4 mutations cause a novel disorder of intellectual disability, progressive microcephaly, spasticity and thin corpus callosum. *Clin. Genet.* V. 88. P. 327.
- Hemmat M., Rumpel M.J., Mahon L.W., Morrow M., Zach T., Anguiano A., Elnaggar M.M., Wang B.T., Boyar F.Z. 2017. CMA analysis identifies homozygous deletion of MCPH1 in 2 brothers with primary Microcephaly-1. *Mol. Cytogenet.* V. 10. P. 33.
- Houlard M., Cutts E.E., Shamim M.S., Godwin J., Weisz D., Presser Aiden A., Lieberman Aiden E., Schermelleh L., Vannini A., Nasmyth K. 2021. MCPH1 inhibits Condensin II during interphase by regulating its SMC2-Kleisin interface. *Elife*. V. 10: e73348.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.73348>

- Jackson A.P., Eastwood H., Bell S.M., Adu J., Toomes C., Carr I.M., Roberts E., Hampshire D.J., Crow Y.J., Mighell A.J., Karbani G., Jafri H., Rashid Y., Mueller R.F., Markham A.F. et al. 2002. Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain. *Am. J. Hum. Genet.* V. 71. P. 136.
- Jackson A.P., McHale D.P., Campbell D.A., Jafri H., Rashid Y., Mannan J., Karbani G., Corry P., Levene M.I., Mueller R.F., Markham A.F., Lench N.J., Woods C.G. 1998. Primary autosomal recessive microcephaly (MCPH1) maps to chromosome 8p22-pter. *Am. J. Hum. Genet.* V. 63. P. 541.
- Jean F., Stuart A., Tarailo-Graovac M. 2020. Dissecting the genetic and etiological causes of primary microcephaly. *Front. Neurol.* V. 11. P. 570830.
- Jeffers L.J., Coull B.J., Stack S.J., Morrison C.G. 2008. Distinct BRCT domains in McpH1/Brit1 mediate ionizing radiation-induced focus formation and centrosomal localization. *Oncogene.* V. 27. P. 139.
- Journiac N., Gilabert-Juan J., Cipriani S., Benit P., Liu X., Jacquier S., Faivre V., Delahaye-Duriez A., Csaba Z., Hourcade T., Melinte E., Lebon S., Violle-Poirsier C., Oury J.-F., Adle-Biassette H. et al. 2020. Cell Metabolic Alterations due to McpH1 Mutation in Microcephaly. *Cell Rep.* V. 31.
- Ke Q., Li W., Lai X., Chen H., Huang L., Kang Z., Li K., Ren J., Lin X., Zheng H., Huang W., Ma Y., Xu D., Chen Z., Song X. et al. 2016. TALEN-based generation of a cynomolgus monkey disease model for human microcephaly. *Cell Res.* V. 26. P. 1048.
- Khan T.N., Khan K., Sadeghpour A., Reynolds H., Perilla Y., McDonald M.T., Gallentine W.B., Baig S.M., Davis E.E., Katsanis N., Allori A., Angrist M., Ashley P., Bidegain M., Boyd B. et al. 2019. Mutations in NCAPG2 cause a severe neurodevelopmental syndrome that expands the phenotypic spectrum of condensinopathies. *Am. J. Hum. Genet.* V. 104. P. 94.
- Kim H., Lee O.-H., Xin H., Chen L.-Y., Qin J., Chae H.K., Lin S.-Y., Safari A., Liu D., Songyang Z. 2009. TRF2 functions as a protein hub and regulates telomere maintenance by recognizing specific peptide motifs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* V. 16. P. 372.
- Kocak H., Ballew B.J., Bisht K., Eggebeen R., Hicks B.D., Suman S., O'Neil A., Giri N., Maillard I., Alter B.P., Keegan C.E., Nandakumar J., Savage S.A. 2014. Hoyeraal-Hreidarsson syndrome caused by a germline mutation in the TEL patch of the telomere protein TPP1. *Genes Dev.* V. 28. P. 2090.
- Kristofova M., Ori A., Wang Z.-Q. 2022. Multifaceted microcephaly-related gene MCPH1. *Cells.* V. 11. P. 275.
- Kumar A., Markandaya M., Girimaji S.C. 2002. Primary microcephaly: microcephalin and ASPM determine the size of the human brain. *J. Biosci.* V. 27. P. 629.
- Lancaster M.A., Renner M., Martin C.-A., Wenzel D., Bicknell L.S., Hurles M.E., Homfray T., Penninger J.M., Jackson A.P., Knoblich J.A. 2013. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* V. 501. P. 373.
- Lange C., Turrero Garcia M., Decimo I., Bifari F., Eelen G., Quaegebeur A., Boon R., Zhao H., Boeckx B., Chang J., Wu C., Le Noble F., Lambrechts D., Dewerchin M., Kuo C.J. et al. 2016. Relief of hypoxia by angiogenesis promotes neural stem cell differentiation by targeting glycolysis. *EMBO J.* V. 35. P. 924.
- Lee Y., Brown E.J., Chang S., McKinnon P.J. 2014. Pot1a prevents telomere dysfunction and ATM-dependent neuronal loss. *J. Neurosci.* V. 34. P. 7836.
- Li R., Sun L., Fang A., Li P., Wu Q., Wang X. 2017. Recapitulating cortical development with organoid culture in vitro and modeling abnormal spindle-like (ASPM related primary) microcephaly disease. *Protein Cell.* V. 8. P. 823.
- Liang Y., Gao H., Lin S.-Y., Goss J.A., Du C., Li K. 2015. McpH1/Brit1 deficiency promotes genomic instability and tumor formation in a mouse model. *Oncogene.* V. 34. P. 4368.
- Liang Y., Gao H., Lin S.-Y., Peng G., Huang X., Zhang P., Goss J.A., Brunnicardi F.C., Multani A.S., Chang S., Li K. 2010. BRIT1/MCPH1 is essential for mitotic and meiotic recombination DNA repair and maintaining genomic stability in mice. *PLoS Genet.* V. 6: e1000826. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000826>
- Lin S.-Y., Elledge S.J. 2003. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell.* V. 113. P. 881.
- Lin S.-Y., Liang Y., Li K. 2010. Multiple roles of BRIT1/MCPH1 in DNA damage response, DNA repair, and cancer suppression. *Yonsei Med. J.* V. 51. P. 295.
- Lin S.-Y., Rai R., Li K., Xu Z.-X., Elledge S.J. 2005. BRIT1/MCPH1 is a DNA damage responsive protein that regulates the Brca1-Chk1 pathway, implicating checkpoint dysfunction in microcephaly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 102. P. 15105.
- Liu X., Schneble-Löhnert N., Kristofova M., Qing X., Labisch J., Hofmann S., Ehrenberg S., Sannai M., Jörß T., Ori A., Godmann M., Wang Z.-Q. 2021. The N-terminal BRCT domain determines MCPH1 function in brain development and fertility. *Cell Death Dis.* V. 12. P. 143.
- Liu X., Zong W., Li T., Wang Y., Xu X., Zhou Z., Wang Z. 2017. The E3 ubiquitin ligase APC/CCdh1 degrades MCPH1 after MCPH1-βTrCP2-Cdc25A-mediated mitotic entry to ensure neurogenesis. *EMBO J.* V. 36. P. 3666.
- Lobanova A., She R., Pieraut S., Clapp C., Maximov A., Denchi E.L. 2017. Different requirements of functional

- telomeres in neural stem cells and terminally differentiated neurons. *Genes Dev.* V. 31. P. 639.
- Ma J., Xiong L., Chang Y., Jing X., Huang W., Hu B., Shi X., Xu W., Wang Y., Li X. 2014. Novel mutations c.[5121\_5122insAG]+[6859C>T] of the SPG11 gene associated with cerebellum hypometabolism in a Chinese case of hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Parkinsonism Relat. Disord.* V. 20. P. 256–259.
- Mai L., Yi F., Gou X., Zhang J., Wang C., Liu G., Bu Y., Yuan C., Deng L., Song F. 2014. The overexpression of MCPH1 inhibits cell growth through regulating cell cycle-related proteins and activating cytochrome c-caspase 3 signaling in cervical cancer. *Mol. Cell. Biochem.* V. 392. P. 95.
- Manke I.A., Lowery D.M., Nguyen A., Yaffe M.B. 2003. BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science.* V. 302. P. 636.
- Mantere T., Winqvist R., Kauppila S., Grip M., Jukkola-Vuorinen A., Tervasmäki A., Rapakko K., Pylkäs K. 2016. Targeted next-generation sequencing identifies a recurrent mutation in MCPH1 associating with hereditary breast cancer susceptibility. *PLOS Genet.* V. 12: e1005816.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005816>
- Marques P.T., Zulfiqar Ali Q., Selvarajah A., Faghfoury H., Wennberg R.A., Andrade D.M. 2021. Hyperammonemic encephalopathy associated with perampanel: case report and discussion. *Can. J. Neurol. Sci.* V. 48. P. 438.
- Martin C.-A., Murray J.E., Carroll P., Leitch A., Mackenzie K.J., Halachev M., Fetit A.E., Keith C., Bicknell L.S., Fluteau A., Gautier P., Hall E.A., Joss S., Soares G., Silva J. et al. 2016. Mutations in genes encoding condensin complex proteins cause microcephaly through decatenation failure at mitosis. *Genes Dev.* V. 30. P. 2158–2172.
- McGowen M.R., Montgomery S.H., Clark C., Gatesy J. 2011. Phylogeny and adaptive evolution of the brain-development gene microcephalin (MCPH1) in cetaceans. *BMC Evol. Biol.* V. 11. P. 98.
- McKinnon P.J. 2009. DNA repair deficiency and neurological disease. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 10. P. 100.
- Mekel-Bobrov N., Posthuma D., Gilbert S.L., Lind P., Gosso M.F., Luciano M., Harris S.E., Bates T.C., Polderman T.J.C., Whalley L.J., Fox H., Starr J.M., Evans P.D., Montgomery G.W., Fernandes C. et al. 2007. The ongoing adaptive evolution of ASPM and microcephalin is not explained by increased intelligence. *Hum. Mol. Genet.* V. 16. P. 600.
- Méndez-Lucas A., Hyroššová P., Novellademunt L., Viñals F., Perales J.C. 2014. Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) is a pro-survival, endoplasmic reticulum (ER) stress response gene involved in tumor cell adaptation to nutrient availability. *J. Biol. Chem.* V. 289. P. 22090.
- Meyer S.K., Dunn M., Vidier D.S., Porter A., Blain P.G., Jowsey P.A. 2019. Phosphorylation of MCPH1 isoforms during mitosis followed by isoform-specific degradation by APC/C-CDH1. *FASEB J.* V. 33. P. 2796.
- Mochida G.H., Walsh C.A. 2001. Molecular genetics of human microcephaly. *Curr. Opin. Neurol.* V. 14. P. 151.
- Montgomery S.H., Capellini I., Venditti C., Barton R.A., Mundy N.I. 2011. Adaptive evolution of four microcephaly genes and the evolution of brain size in anthropoid primates. *Mol. Biol. Evol.* V. 28. P. 625.
- Montgomery S.H., Mundy N.I. 2014. Microcephaly genes evolved adaptively throughout the evolution of eutherian mammals. *BMC Evol. Biol.* V. 14. P. 120.
- Naseer M.I., Rasool M., Abdulkareem A.A., Bassiouni R.I., Algahtani H., Chaudhary A.G., Al-Qahtani M.H. 2018. Novel compound heterozygous mutations in MCPH1 gene causes primary microcephaly in Saudi family. *Neurosci.* V. 23. P. 346.
- Neitzel H., Neumann L.M., Schindler D., Wirges A., Tönnies H., Trimborn M., Krebsova A., Richter R., Sperling K. 2002. Premature chromosome condensation in humans associated with microcephaly and mental retardation: a novel autosomal recessive condition. *Am. J. Hum. Genet.* V. 70. P. 1015.
- Nielsen R., Bustamante C., Clark A.G., Glanowski S., Sackton T.B., Hubisz M.J., Fledel-Alon A., Tanenbaum D.M., Civello D., White T.J., J. Sninsky J., Adams M.D., Cargill M. 2005. A scan for positively selected genes in the genomes of humans and chimpanzees. *PLoS Biol.* V. 3: e170.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030170>
- Nigg E.A., Holland A.J. 2018. Once and only once: mechanisms of centriole duplication and their deregulation in disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 19. P. 297.
- Nishide K., Hirano T. 2014. Overlapping and non-overlapping functions of condensins I and II in neural stem cell divisions. *PLoS Genet.* V. 10: e1004847.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004847>
- Oluwole O.G. 2024. The analyses of human MCPH1 DNA repair machinery and genetic variations. *Open Med.* V. 19.
- Oluwole O.G., Esoh K.K., Wonkam-Tingang E., Manyisa N., Noubiap J.J., Chimusa E.R., Wonkam A. 2021. Whole exome sequencing identifies rare coding variants in novel human-mouse ortholog genes in African individuals diagnosed with non-syndromic hearing impairment. *Exp. Biol. Med.* V. 246. P. 197.
- Ozgen H., Van Daalen E., Bolton P., Maloney V., Huang S., Cresswell L., Van Den Boogaard M., Eleveld M.,

- Van't Slot R., Hochstenbach R., Beemer F., Barrow M., Barber J., Poot M.* 2009. Copy number changes of the microcephalin 1 gene ( MCPH1 ) in patients with autism spectrum disorders. *Clin. Genet.* V. 76. P. 348.
- Passemard S., El Ghouzzi V., Nasser H., Verney C., Vodjdani G., Lacaud A., Lebon S., Laburthe M., Robberecht P., Nardelli J., Mani S., Verloes A., Gressens P., Lelièvre V.* 2011. VIP blockade leads to microcephaly in mice via disruption of Mcph1-Chk1 signaling. *J. Clin. Invest.* V. 121. P. 3072.
- Payer L.M., Steranka J.P., Ardeljan D., Walker J., Fitzgerald K.C., Calabresi P.A., Cooper T.A., Burns K.H.* 2019. Alu insertion variants alter mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.* V. 47. P. 421.
- Payer L.M., Steranka J.P., Kryatova M.S., Grillo G., Lupien M., Rocha P.P., Burns K.H.* 2021. Alu insertion variants alter gene transcript levels. *Genome Res.* V. 31. P. 2236.
- Peng G., Yim E.-K., Dai H., Jackson A.P., Burgt I. van der, Pan M.-R., Hu R., Li K., Lin S.-Y.* 2009. BRIT1/MCPH1 links chromatin remodelling to DNA damage response. *Nat. Cell Biol.* V. 11. P. 865.
- Perche O., Menuet A., Marcos M., Liu L., Pâris A., Utami K.H., Kervran D., Cacheux V., Laudier B., Briault S.* 2013. Combined deletion of two condensin II system genes (NCAPG2 and MCPH1) in a case of severe microcephaly and mental deficiency. *Eur. J. Med. Genet.* V. 56. P. 635.
- Pfau R.B., Thrush D.L., Hamelberg E., Bartholomew D., Botes S., Pastore M., Tan C., del Gaudio D., Gastier-Foster J.M., Astbury C.* 2013. MCPH1 deletion in a newborn with severe microcephaly and premature chromosome condensation. *Eur. J. Med. Genet.* V. 56. P. 609.
- Pierzak-Sominka J., Skonieczna-Żydecka K., Rudnicki J., Karakiewicz B.* 2016. The Impact of rs3762271 and rs930557 Polymorphisms of ASPM and MCPH1 genes on the anatomy and function of the brain. *Biol. Res. Nurs.* V. 18. P. 386.
- Ponting C., Jackson A.P.* 2005. Evolution of primary microcephaly genes and the enlargement of primate brains. *Curr. Opin. Genet. Dev.* V. 15. P. 241.
- Pulvers J.N.* 2015. MCPH1: a window into brain development and evolution. *Front. Cell. Neurosci.* V. 9. P. 92.
- Rai R., Dai H., Multani A.S., Li K., Chin K., Gray J., Lahad J.P., Liang J., Mills G.B., Meric-Bernstam F., Lin S.-Y.* 2006. BRIT1 regulates early DNA damage response, chromosomal integrity, and cancer. *Cancer Cell.* V. 10. P. 145.
- Rai R., Phadnis A., Haralkar S., Badwe R.A., Dai H., Li K., Lin S.-Y.* 2008. Differential regulation of centrosome integrity by DNA damage response proteins. *Cell Cycle.* V. 7. P. 2225.
- Rauch A., Thiel C.T., Schindler D., Wick U., Crow Y.J., Ekici A.B., van Essen A.J., Goecke T.O., Al-Gazali L., Chrzanowska K.H., Zweier C., Brunner H.G., Becker K., Curry C.J., Dallapiccola B., et al.* 2008. Mutations in the pericentrin ( PCNT ) gene cause primordial dwarfism. *Science.* V. 319. P. 816.
- Renkawitz J., Lademann C.A., Jentsch S.* 2014. Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 15. P. 369.
- Rowe R.G., Daley G.Q.* 2019. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat. Rev. Genet.* V. 20. P. 377.
- Rushton J.P., Vernon P.A., Bons T.A.* 2007. No evidence that polymorphisms of brain regulator genes microcephalin and ASPM are associated with general mental ability, head circumference or altruism. *Biol. Lett.* V. 3. P. 157.
- Scala I., Titomanlio L., Del Giudice E., Passemard S., Figliuolo C., Annunziata P., Granese B., Scarpato E., Verloes A., Andria G.* 2010. Absence of microcephalin gene mutations in a large cohort of non-consanguineous patients with autosomal recessive primary microcephaly. *Am. J. Med. Genet. Part A.* V. 152A. P. 2882.
- Shen S., Lin L., Cai J.J., Jiang P., Kenkel E.J., Stroik M.R., Sato S., Davidson B.L., Xing Y.* 2011. Widespread establishment and regulatory impact of Alu exons in human genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 108. P. 2837.
- Sheth F., Andrieux J., Tewari S., Sheth H., Desai M., Kumari P., Nanavaty N., Sheth J.* 2013. Chromosomal imbalance letter: Phenotypic consequences of combined deletion 8pter and pduplication 15qter. *Mol. Cytogenet.* V. 6. P. 24.
- Shi L., Li M., Lin Q., Qi X., Su B.* 2013. Functional divergence of the brain-size regulating gene MCPH1 during primate evolution and the origin of humans. *BMC Biol.* V. 11. P. 1.
- Shi L., Li M., Su B.* 2012. MCPH1/BRIT1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Gene.* V. 495. P. 1.
- Shi L., Luo X., Jiang J., Chen Y., Liu C., Hu T., Li M., Lin Q., Li Y., Huang J., Wang H., Niu Y., Shi Y., Styner M., Wang J. et al.* 2019. Transgenic rhesus monkeys carrying the human MCPH1 gene copies show human-like neoteny of brain development. *Natl. Sci. Rev.* V. 6. P. 480.
- Sun T., Hevner R.F.* 2014. Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 15. P. 217.
- Takahashi K., Yamanaka S.* 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* V. 126. P. 663.
- Taylor A.M.R., Rothblum-Oviatt C., Ellis N.A., Hickson I.D., Meyer S., Crawford T.O., Smogorzewska A., Pietrucha B., Weemaes C., Stewart G.S.* 2019.

- Chromosome instability syndromes. *Nat. Rev. Dis. Prim.* V. 5. P. 64.
- Tibelius A., Marhold J., Zentgraf H., Heilig C.E., Neitzel H., Ducommun B., Rauch A., Ho A.D., Bartek J., Krämer A.* 2009. Microcephalin and pericentrin regulate mitotic entry via centrosome-associated Chk1. *J. Cell Biol.* V. 185. P. 1149.
- Trimborn M., Bell S.M., Felix C., Rashid Y., Jafri H., Griffiths P.D., Neumann L.M., Krebs A., Reis A., Sperling K., Neitzel H., Jackson A.P.* 2004. Mutations in microcephalin cause aberrant regulation of chromosome condensation. *Am. J. Hum. Genet.* V. 75. P. 261.
- Trimborn M., Ghani M., Walther D.J., Dopatka M., Dutrannoy V., Busche A., Meyer F., Nowak S., Nowak J., Zabel C., Klose J., Esquitino V., Garshasbi M., Kuss A.W., Ropers H.-H., et al.* 2010. Establishment of a mouse model with misregulated chromosome condensation due to defective Mcph1 function. *PLoS One.* V. 5: e9242.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009242>
- Vincent E.E., Sergushichev A., Griss T., Gingras M.-C., Samborska B., Nimbane T., Coelho P.P., Blagih J., Raissi T.C., Choinière L., Bridon G., Loginicheva E., Flynn B.R., Thomas E.C., Tavaré J.M. et al.* 2015. Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase regulates metabolic adaptation and enables glucose-independent tumor growth. *Mol. Cell.* V. 60. P. 195.
- Wang Y., Su B.* 2004. Molecular evolution of microcephalin, a gene determining human brain size. *Hum. Mol. Genet.* V. 13. P. 1131.
- Wood J.L., Liang Y., Li K., Chen J.* 2008. Microcephalin/MCPH1 associates with the condensin ii complex to function in homologous recombination repair. *J. Biol. Chem.* V. 283. P. 29586.
- Wood J.L., Singh N., Mer G., Chen J.* 2007. MCPH1 functions in an H2AX-dependent but MDC1-independent pathway in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* V. 282. P. 35416.
- Woods C.G., Bond J., Enard W.* 2005. Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): a review of clinical, molecular, and evolutionary findings. *Am. J. Hum. Genet.* V. 76. P. 717.
- Woods R.P., Freimer N.B., De Young J.A., Fears S.C., Sicotte N.L., Service S.K., Valentino D.J., Toga A.W., Mazzionta J.C.* 2006. Normal variants of microcephalin and ASPM do not account for brain size variability. *Hum. Mol. Genet.* V. 15. P. 2025.
- Wu X., Mondal G., Wang X., Wu J., Yang L., Pankratz V.S., Rowley M., Couch F.J.* 2009. Microcephalin regulates BRCA2 and Rad51-associated DNA double-strand break repair. *Cancer Res.* V. 69. P. 5531.
- Xu D., Zhang F., Wang Y., Sun Y., Xu Z.* 2014. Microcephaly-associated protein WDR62 regulates neurogenesis through JNK1 in the developing neocortex. *Cell Rep.* V. 6. P. 104.
- Xu X., Lee J., Stern D.F.* 2004. Microcephalin is a DNA damage response protein involved in regulation of CHK1 and BRCA1. *J. Biol. Chem.* V. 279. P. 34091.
- Yamashita D., Shintomi K., Ono T., Gavvovidis I., Schindler D., Neitzel H., Trimborn M., Hirano T.* 2011. MCPH1 regulates chromosome condensation and shaping as a composite modulator of condensin II. *J. Cell Biol.* V. 194. P. 841.
- Yang S., Lin F., Lin W.* 2008. MCPH1/BRIT1 cooperates with E2F1 in the activation of checkpoint, DNA repair and apoptosis. *EMBO Rep.* V. 9. P. 907.
- Yen W.-F., Chaudhry A., Vaidyanathan B., Yewdell W.T., Pucella J.N., Sharma R., Liang Y., Li K., Rudensky A.Y., Chaudhuri J.* 2017. BRCT-domain protein BRIT1 influences class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 114. P. 8354.
- Yingling J., Youn Y.H., Darling D., Toyo-oka K., Pramparo T., Hirotsune S., Wynshaw-Boris A.* 2008. Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division. *Cell.* V. 132. P. 474.
- Yu X., Chini C.C.S., He M., Mer G., Chen J.* 2003. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science.* V. 302. P. 639.
- Zhang B., Wang E., Dai H., Shen J., Hsieh H.-J., Lu X., Peng G.* 2014. Phosphorylation of the BRCA1 C terminus (BRCT) repeat inhibitor of hTERT (BRIT1) protein coordinates TopBP1 protein recruitment and amplifies ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) signaling. *J. Biol. Chem.* V. 289. P. 34284.
- Zhang J., Wu X.-B., Fan J.-J., Mai L., Cai W., Li D., Yuan C.-F., Bu Y.-Q., Song F.-Z.* 2013. MCPH1 Protein expression in normal and neoplastic lung tissues. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* V. 14. P. 7295.
- Zhang P., Furukawa K., Opresko P.L., Xu X., Bohr V.A., Mattson M.P.* 2006. TRF2 dysfunction elicits DNA damage responses associated with senescence in proliferating neural cells and differentiation of neurons. *J. Neurochem.* V. 97. P. 567.
- Zhang W., Yang S.-L., Yang M., Herrlinger S., Shao Q., Collar J.L., Fierro E., Shi Y., Liu A., Lu H., Herrling B.E., Guo M.-L., Buch S., Zhao Z., Xu J. et al.* 2019. Modeling microcephaly with cerebral organoids reveals a WDR62–CEP170–KIF2A pathway promoting cilium disassembly in neural progenitors. *Nat. Commun.* V. 10. P. 2612.
- Zhong X., Pfeifer G.P., Xu X.* 2006. Microcephalin encodes a centrosomal protein. *Cell Cycle.* V. 5. P. 457.
- Zhou Z.-W., Tapias A., Bruhn C., Gruber R., Sukchev M., Wang Z.-Q.* 2013. DNA damage response in microcephaly development of MCPH1 mouse model. *DNA Repair (Amst).* V. 12. P. 645.

## FUNCTIONS OF MICROCEPHALIN IN NEUROGENESIS AND HUMAN BRAIN EVOLUTION

A. M. Yunusova<sup>1, \*</sup>, T. A. Shnaider<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

\* *E-mail: anastasiajunusova@gmail.com*

Primary microcephaly is a brain growth disorder of which the main phenotypic hallmarks is a reduction of brain size with varying degrees of intellectual disability. *MCPH1* is the first gene reported to cause primary microcephaly. Microcephalin (MCPH1), the encoded protein product, has been implicated in various cellular processes deregulation of which can negatively affects neurogenesis. In our review we will discuss the clinical cases of MCPH1 primary microcephaly and summarize the knowledge about the functions of MCPH1 employing animal models with mutations in various domains of *MCPH1*. We also pay special attention to the role of MCPH1 in in the evolution of the human brain.

*Keywords:* primary microcephaly, microcephalin (*MCPH1*), animal models of *MCPH1* primary microcephaly, human brain evolution

УДК 576.08:616-006

## АКТИВАЦИЯ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ В УСЛОВИЯХ 3D-КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2024 г. Д. В. Черных<sup>1</sup>, И. С. Зинченко<sup>1</sup>, Т. Г. Рукша<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого,  
кафедра патологической физиологии г. Красноярск, 660022, Россия

\* E-mail: tatyana\_ruksha@mail.ru

Поступила в редакцию 28.02.2024

После доработки 02.05.2024

Принята к публикации 29.05.2024

В настоящей работе на модели меланомы оценивали жизнеспособность и адгезивные свойства клеток линий BRO и SK-MEL-2. Показано, что в клетках линии BRO развитие апоптоза после воздействия дакарбазином сочеталось с переходом доли клеток в фазу G<sub>0</sub> клеточного цикла, что подтверждает ранее полученные результаты. В клетках меланомы SK-MEL-2 наблюдали отсутствие апоптоза в 3D-сфероидах и отсутствие выхода из клеточного цикла. Также выявлено, что в контрольных сфероидах (клетки без воздействия) линий меланомы BRO и SK-MEL-2 адгезия к фибронектину была выше по сравнению с клетками монослоя контроля, что объясняется трехмерной структурой, требующей коммуникации клеток с внеклеточным матриксом. В сфероидах, сформированных клетками SK-MEL-2, дакарбазин индуцировал снижение адгезии к фибронектину, что может быть связано с развитием лекарственной устойчивости. После воздействия дакарбазином повышаются уровни экспрессии интегринов  $\alpha V$  и  $\beta 8$  в клетках BRO и SK-MEL-2, а также интегрин  $\beta 5$  в клетках SK-MEL-2, что может указывать на участие этих молекул в утрате пролиферативного статуса опухолевых клеток.

**Ключевые слова:** меланома, сфероиды, солидные опухоли, дакарбазин, адгезия, апоптоз, фибронектин

**Принятые сокращения:** ДМСО – диметилсульфоксид; FAK – киназа фокальной адгезии; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор; PI – йодистый пропилий.

**DOI:** 10.31857/S0041377124040025 **EDN:** QDCKFT

Разработка новых способов терапии онкологических заболеваний требует постоянного совершенствования технологий воспроизведения канцерогенеза *in vitro* и *in vivo* для объективного отображения патологических изменений, протекающих в организме онкологических больных. В связи с этим сохраняется актуальность создания и валидации трехмерных моделей культивирования клеток (Colella et al., 2018). Преодолевая недостатки двумерных культур, такие модели способны имитировать нативную гистологическую архитектуру опухоли, клеточную гетерогенность, взаимодействие опухолевых клеток с внеклеточным матриксом и в целом более точно воспроизводить фенотипическое поведение исходных опухолей (Zanoni et al., 2020).

Одним из видов трехмерных моделей являются «многоклеточные сфероиды» или тумороиды. Они представляют собой самособирающиеся

структуры, возникающие за счет клеточной агрегации и взаимодействия между клетками. Сфероиды могут содержать различные клеточные типы подобно гетерогенности опухоли. Как и солидные опухоли, клеточные сфероиды состоят из трёх основных областей: внешней пролиферативной области, содержащей высокопролиферирующие клетки, средней зоны покоя, содержащей клетки с признаками старения, а также внутренней области, где находятся клетки в состоянии некроза (Zanoni et al., 2016) (рис. 1).

Сфероиды являются привлекательной моделью для изучения межклеточной коммуникации. Фокальная адгезия – это процесс, в ходе которого клетки активно взаимодействуют с окружающим внеклеточным матриксом и другими клетками, что, в свою очередь, способно влиять не только на рост и дифференцировку опухолевых клеток, но

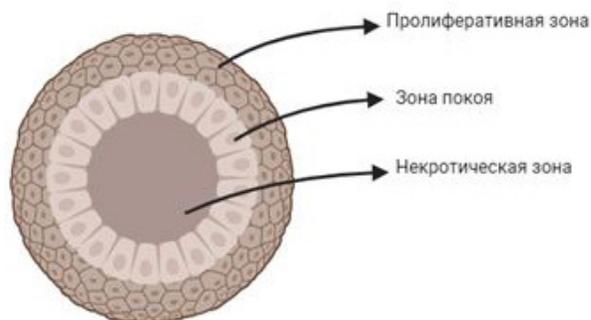


Рис. 1. Структура сфероиды (по: Zanoni et al., 2020).

и обеспечивать формирование новых метастатических очагов опухоли (Sakalem et al., 2021). Механизм взаимосвязи адгезии и клеточного цикла изучен пока недостаточно ясно. Тем не менее известно, что внеклеточный матрикс посредством интегринов способен влиять на ход клеточного цикла и его контрольные точки. Так, сигнальный модуль FAK (киназа фокальной адгезии) FAK/Rac передает зависимые от упругой силы внеклеточного матрикса сигналы на контрольную точку  $G_1/S$ ; повышенная жесткость внеклеточного матрикса влияет на прогрессию клеточного цикла путем активирования пути Hippo; киназа FAK, необходимая для переориентации митотического веретена, в ответ на механическое сжатие или растяжение может направлять киназу ATR к ядерной оболочке, где она предотвращает ошибки репликации. Известно, что тесная координация процессов пролиферации и адгезии у опухолевых клеток нарушена, хотя точные механизмы и особенности этого не установлены (Zhou et al., 2019).

Ранее нами на двумерной культуре клеток меланомы было показано, что химиотерапевтический агент дакарбазин индуцирует переход клеток меланомы в фазу покоя клеточного цикла  $G_0$ ; кроме того, было показано, что такие клетки демонстрируют повышенные адгезивные свойства к экстраклеточному матриксу (Esimbekova et al., 2023).

В связи с этим цель данного исследования заключалась в культивировании клеток меланомы в виде трехмерных структур, оценке их жизнеспособности, адгезии и экспрессии молекул, непосредственно опосредующих процесс адгезии. Для этого клетки меланомы BRO и SK-MEL-2 подвергали воздействию дакарбазином и формировали из них

сфероиды. Далее оценивали жизнеспособность получившихся структур, а затем адгезивные свойства клеток, входящих в эти структуры.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Культивирование клеток.** Клетки линии меланомы SK-MEL-2 (“БиоЛот”, Россия) и BRO (любезно предоставлена НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия), а также сфероиды культивировали в питательной среде ДМЕМ, содержащей глутамин и глюкозу (4.5 г/л; “ПанЭко”, Россия), а также 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Cytiva, США) и 1% пенициллина-стрептомицина (“ПанЭко”, Россия), в инкубаторе MSO-5ACCO<sub>2</sub> (Sanyo Electric Co., Ltd., Япония) при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

**Формирование сфероидов.** Использовали метод «висячей капли» на чашах Петри (Nest, Китай). Суспензию клеток линии BRO и SK-MEL-2 наносили по 20 капель (в каждой 2500 клеток в 20 мкл полной питательной среды) на крышку чаши Петри, затем крышку переворачивали. В саму чашу добавляли 4 мл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) (“ЭкоСервис”, Россия) для избегания испарения капель. Расчет клеток производили с помощью камеры Горяева. Клетки формировали сфероиды в течение 4 сут.

**Воздействие цитотоксическим агентом дакарбазин.** Перед формированием клеточных сфероидов к клеткам меланомы BRO и SK-MEL-2 в концентрации 10<sup>5</sup> кл./мл добавляли 1.2 мМ раствора дакарбазина (Sigma-Aldrich, США), растворенного в ДМСО (“ПанЭко”, Россия) и культивировали в течение 72 ч при 37°C. Затем клетки промывали PBS и далее культивировали в полной питательной среде без дакарбазина в течение 48 ч для элиминации апоптотических клеток. В качестве контроля использовали исходные культуры клеток, обработанные 1% ДМСО.

**Иммуноцитохимия.** Метод использовали согласно описанному протоколу (Liu, Sheikh, 2014). В первые сутки клетки высевали в лунки 24-луночного планшета в концентрации 9 × 10<sup>3</sup> кл./мл и культивировали при температуре 37°C и концентрации CO<sub>2</sub> 5%.

На вторые сутки клетки фиксировали в 15%-ном формалине в 24-луночном планшете 1 ч при комнатной температуре. Сфероиды

предварительно осаждали с помощью центрифугирования в течение 4 мин при 1000 об/мин. Далее клетки промывали 2 раза 300 мкл PBS. Затем к клеткам добавляли 200 мкл 0.1%-ного TritonX-100 (Gerbu, Германия) для пермеабиллизации и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Далее клетки вновь промывали PBS, затем вносили 200 мкл блокирующего буфера (0.5% Tween 20 (v/v; Gerbu, Германия), 0.2% (v/v) TritonX-100 и 3% бычьего сывороточного альбумина (“ПанЭко”, Россия) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Затем удаляли буфер и вносили первичные антитела к Ki-67 (MA5-14520; ThermoFisher Scientific, США), предварительно разведенные в блокирующем буфере (1:50). Инкубировали смесь ночь при температуре 4°C на лабораторном шейкере.

На третьи сутки удаляли раствор первичных антител и промывали клетки 300 мкл промывочного буфера 0.1% (v/v) Tween 20 (Gerbu, Германия), 0.2% (v/v) TritonX-100 (Gerbu, Германия) и 100 мл 1-кратного PBS 2 раза. Далее добавляли вторичные антикроличьи антитела (H+L) (A11034; ThermoFisher Scientific, США), предварительно разведенные в блокирующем буфере (1:100) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После инкубации раствор вторичных антител удаляли и промывали клетки 300 мкл PBS 2 раза. Далее добавляли 100 мкл DAPI (PanReacApplichem, США) (1:1000), также предварительно разведенного в блокирующем буфере, и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Далее раствор DAPI удаляли, промывали PBS 2 раза и добавляли 100 мкл PBS во избежание высыхания лунок. Флуоресценцию оценивали в системе визуализации Fluid (ThermoFisher Scientific, США) с помощью синего и зеленого светофильтров.

**Определение уровня апоптоза в монослое и сфероиде.** Для оценки уровня апоптоза в монослое использовали набор AnnexinV-FITC Apoptosis Kit (FineTest, США). Согласно протоколу производителя, в каждую лунку вносили 195 мкл 1-кратного связывающего буфера, 5 мкл аннексина, 10 мкл йодистого пропидия (PI) и инкубировали при комнатной температуре в темноте 10 мин. После инкубации удаляли смесь из лунок, добавляли 15%-ный раствор формалина и инкубировали 20 мин при комнатной температуре тоже в темноте.

Затем аккуратно промывали 300 мкл PBS 2 раза. Далее в лунки добавляли 100 мкл PBS. Флуоресценцию оценивали в системе визуализации Fluid с помощью зеленого светофильтра для аннексина и красного светофильтра для PI.

Для оценки апоптотических клеток в сфероиде их предварительно собирали в пробирки и осаждали. После осаждения сфероидов супернатант удаляли и далее действовали согласно указанному выше протоколу производителя.

**Оценка уровня адгезии клеток к фибронектину в монослое и сфероиде.** В первые сутки эксперимента создавали фибронектиновую подложку, как описано (Chen et al., 2008). Для этого лиофилизат фибронектина (Sigma-Aldrich, США) разводили в дистиллированной воде до конечной концентрации 100 мкг/мл и в каждую лунку вносили по 30 мкл получившегося раствора. Планшет выдерживали ночь при температуре 4°C. На 2-е сут раствор из лунок удаляли и промывали лунки 300 мкл PBS 3 раза. В каждую лунку вносили 500 мкл полной питательной среды ДМЕМ, содержащей глутамин, 10% FBS, 1%. В каждую лунку добавляли 4500 клеток. Для оценки уровня адгезии сфероидов к фибронектиновой подложке их предварительно разрушали механически до получения однородной клеточной суспензии и культивировали 2.5 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Далее визуально оценивали прикрепленные клетки. Затем удаляли питательную среду из лунок, промывали PBS 3 раза. После промывки в каждую лунку вносили по 150 мкл красителя метиленового синего на 1–3 мин при комнатной температуре. Затем краситель из лунок удаляли, промывали PBS 3 раза, в каждую лунку вносили 150 мкл ДМСО (“ПанЭко”, Россия) и инкубировали еще 1–3 мин. Интенсивность окраски оценивали на спектрофотометре Эфос (“Сапфир”, Россия) при длине волны 620–660 нм.

**Выделение РНК и реакция обратной транскрипции.** Выделение РНК из культур клеток проводили с помощью набора реагентов DiaGene (“Диаэм”, Россия) согласно протоколу производителя. Выделение тотальной РНК осуществляли после двойной отмывки клеток от питательной среды стерильным PBS с дальнейшим лизисом клеток лизирующим раствором, входящим в состав набора. Полученные РНК-элюаты объемом 30 мкл использовали сразу,

выполняя дальнейшие этапы исследования, или сохраняли при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Для синтеза первой цепи кДНК проводили реакцию обратной транскрипции набором MMLV RT kit (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Каждый образец состоял из 3 мкл раствора полученной РНК, 1.5 мкл случайного декануклеотидного праймера и 5.5 мкл реакционной смеси, состоящей из 1 мкл смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP), 1 мкл 1,4-дистрофитол (DTT), 2 мкл 5-кратного реакционного буфера, 0.5 мкл обратной транскриптазы MMLV и 1 мкл безнуклеазной воды. Образец инкубировали в термостате при  $40^{\circ}\text{C}$  в течение 50 мин, а затем реакцию останавливали, нагревая образцы в течение 10 мин при  $70^{\circ}\text{C}$ .

**Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ).** Реакционная смесь для каждой реакции амплификации в общем объеме 20 мкл состояла из 2 мкл кДНК, 1 мкл специфичных праймеров, 8 мкл 2.5-кратной реакционной смеси для ПЦР в присутствии ROX (Синтол, Россия), 1.2 мкл раствора хлорида магния ( $\text{MgCl}_2$ ) и 6.8 мкл безнуклеазной воды. ПЦР-РВ выполняли на амплификаторе StepOne™ (Applied Biosystems, Сингапур) с протоколом термоциклирования: 1 цикл  $50^{\circ}\text{C} - 2$  мин,  $95^{\circ}\text{C} - 10$  мин, затем 40 циклов  $95^{\circ}\text{C} - 15$  с,  $60^{\circ}\text{C} - 1$  мин.

Используемые праймеры и зонды для определения экспрессии мРНК: *ITGB8*, *ITGAV* и *ITGB5*; в качестве эндогенных контролей использовали *HPRT1* и *GAPDH* (все от “ДНК-синтез”, Россия).

Данные анализировали количественно с определением относительных уровней экспрессии исследуемых молекул при помощи метода  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (Livak, Schmittgen, 2001). Для этого относительные уровни экспрессии генов по каждому эндогенному контролю рассчитывали по формуле  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , где  $\text{Ct}$  – средние пороговые циклы образцов, при которых кривая флуоресценции ROX пересекала заданную линию фона, а  $\Delta\text{Ct}$  определяли разницей  $\text{Ct}$  исследуемого маркера и  $\text{Ct}$  эндогенного нормирующего контроля для данного маркера. Кроме нормализации по эндогенному контролю осуществляли нормализацию по эталонному образцу.  $\Delta\Delta\text{Ct}$  – разница  $\Delta\text{Ct}$  образца после воздействия и  $\Delta\text{Ct}$  интактного образца без какого-либо воздействия. Для

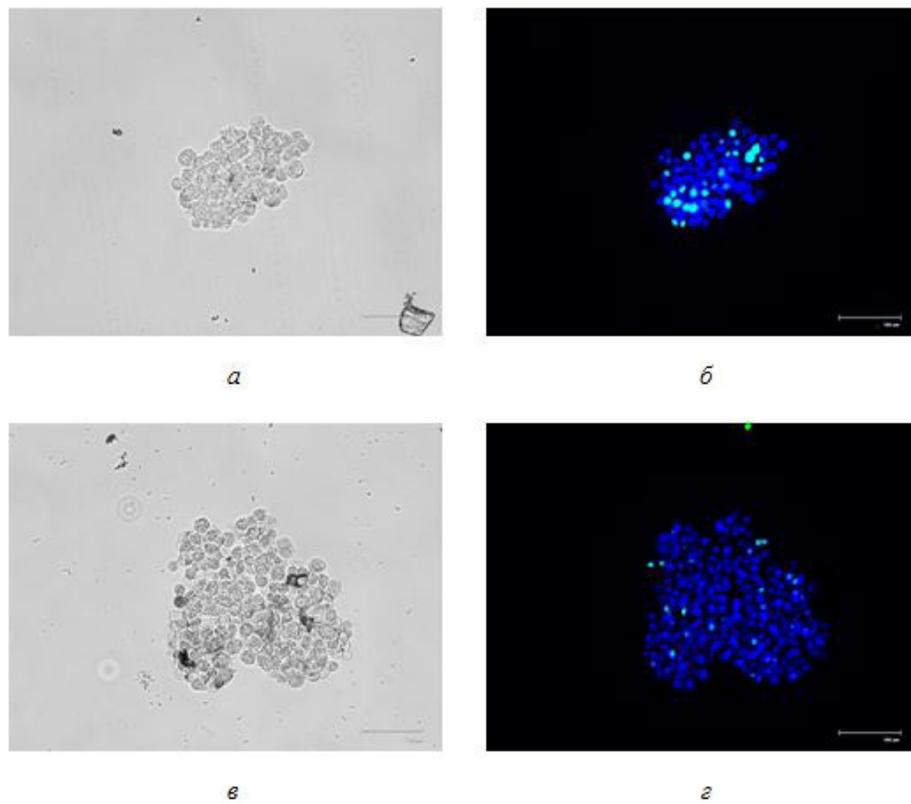
каждой исследуемой пробы методом ПЦР-РВ выполняли два технологических повтора.

**Статистическая обработка.** Все эксперименты проводили в трех повторностях. Полученные результаты представлены в виде среднего значения из трех повторов и его стандартной ошибки. Различия считали статистически значимыми при  $P < 0.05$ . Достоверность различий оценивали на основе критерия Краскелла-Уоллеса с дальнейшим сравнением попарно с помощью критерия Манна-Уитни. Использовали программное обеспечение Statistica 7.0 (StatSoft, Россия). Статистические результаты обработаны с использованием GraphPadPrism (GraphPad Software, USA).

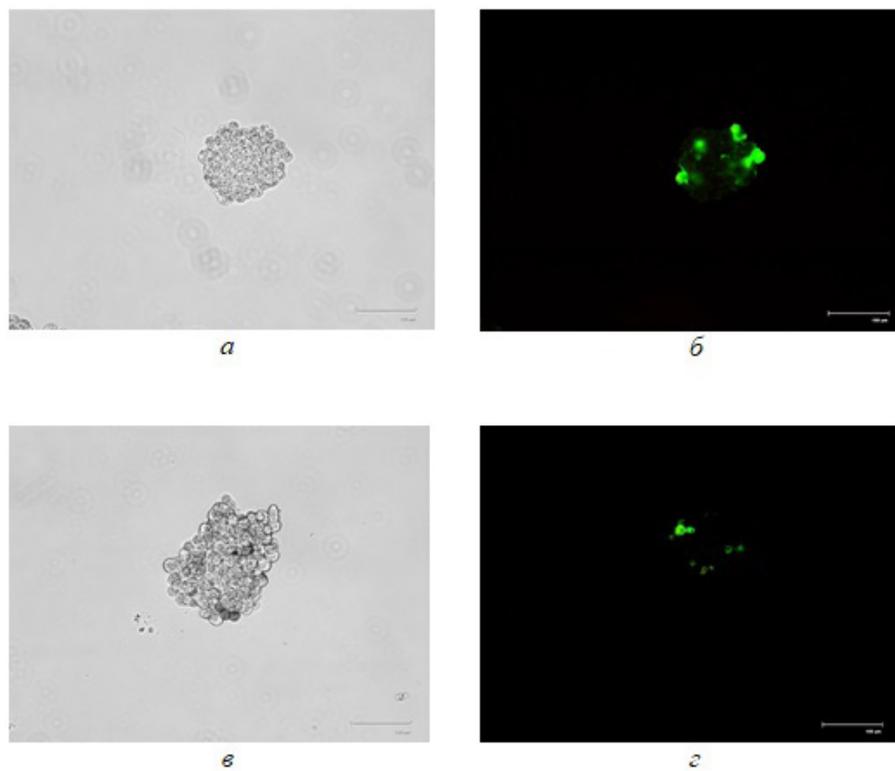
## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Валидация сфероидов.** Визуально сфероиды, сформированные клетками меланомы BRO (рис. 2а, б) и SK-MEL-2 (рис. 2в, г) имели плотную шарообразную структуру до 100 мкм в диаметре и не подвергались распаду при пипетировании. Известно, что клеточная плотность является одним из ключевых признаков сфероида (Achill et al., 2012). В полученных структурах регистрировали области, состоящие из апоптотических и пролиферирующих клеток в сфероидах как линии BRO (рис. 2а, б; 3а, б), так и линии SK-MEL-2 (рис. 2в, г; 3в, г).

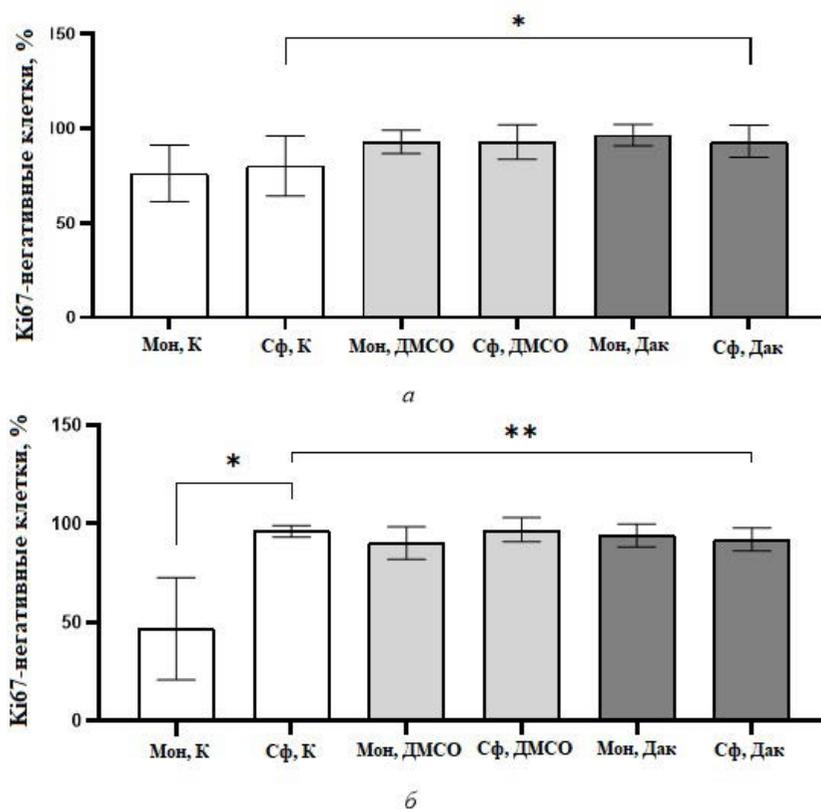
**Влияние дакарбазина на жизнеспособность клеток в 3D-структурах.** В клетках линии BRO, которые были подвергнуты действию дакарбазина и которые в дальнейшем культивировались в 3D-структурах, было обнаружено повышение уровня Ki-67-негативных клеток, соответствующих клеткам в фазе  $G_0$  клеточного цикла, по сравнению с клетками контрольной группы 3D-сфероидов без воздействия, ( $P = 0.0092$ ) (рис. 4а). В 3D-структурах контрольных клеток меланомы SK-MEL-2 наблюдали увеличение доли Ki-67-негативных клеток по сравнению с клетками, культивируемыми в виде монослоя ( $P < 0.05$ ). В 3D-структурах контрольных клеток меланомы SK-MEL-2 наблюдали увеличение доли Ki-67-негативных клеток по сравнению с клетками, культивируемыми в виде монослоя ( $P < 0.05$ ). После воздействия дакарбазином на клетки SK-MEL-2 и культивирования их в виде 3D-структур доля Ki67-негативных клеток уменьшалась по сравнению со сфероидами



**Рис. 2.** Сфероиды, состоящие из клеток линии BRO (*а, б*) и SK-MEL-2 (*в, г*). Ядра клеток окрашены DAPI (синий цвет), зеленый цвет (вторичные антитела) – экспрессия Ki67, иммуноцитохимия, флуоресцентная микроскопия.



**Рис. 3.** Распределение апоптотических клеток в сфероиды линий BRO (*а, б*) и SK-MEL-2 (*в, г*). Зеленый цвет (аннексин) – апоптотические клетки.



**Рис. 4.** Доля Ki-67-негативных клеток в монослое (Мон) и сфероиде (Сф) клеток BRO (а) и SK-MEL-2 (б) в контроле (К, без воздействий) и после действия ДМСО и дакарбазина (Дак). Показаны средние значения ( $n = 3$ ) и их стандартные отклонения; различия достоверны при:  $*P = 0.0092$ ,  $**P < 0.05$  и  $***P = 0.0045$  (критерий Манна–Уитни).

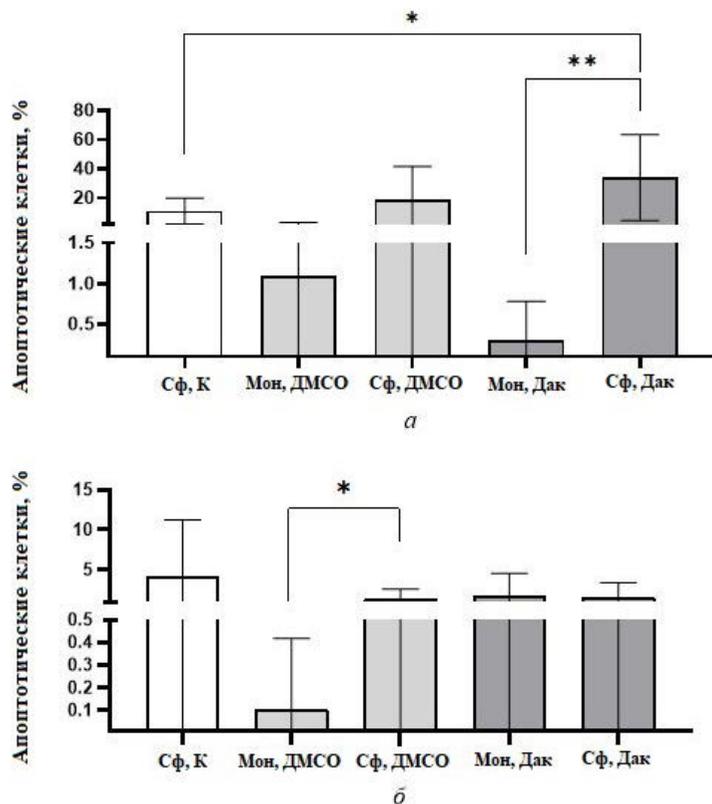
контрольной группы ( $P = 0.0045$ ) (рис. 4б). Таким образом, алкилирующий агент дакарбазин оказывает разнонаправленное действие на экспрессию маркера пролиферации Ki-67 в 3D-структурах, образованных опухолевыми клетками.

В клетках меланомы BRO после воздействия дакарбазином в 3D-сфероиде отмечено увеличение доли клеток в состоянии апоптоза по сравнению с их долей в монослойных клетках ( $P = 0.0006$ ) и по сравнению с 3D-сфероидом BRO контрольной группы ( $P = 0.0213$ ) (рис. 5а). В SK-MEL-2 в 3D-структурах контрольной группы отмечено повышение доли апоптотических клеток по сравнению с клетками в монослое, обработанном ДМСО ( $P = 0.0055$ ) (рис. 5б).

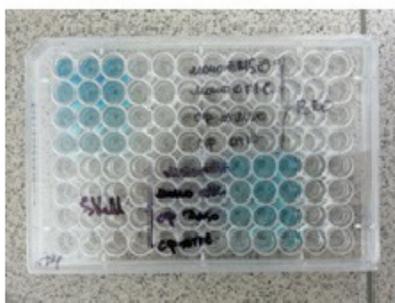
**Адгезия клеток меланомы, устойчивых к действию дакарбазина, к фибронектину.** Оценку проводили спектрофотометрическим методом (рис. 6а). В клеточной линии BRO в монослое наблюдали повышение адгезии к фибронектину

после воздействия дакарбазином по сравнению с контрольным монослоем без воздействия ( $P = 0.0495$ ). В сфероиде контрольной группы адгезия к фибронектину была выше, чем в монослое BRO ( $P = 0.0495$ ). В сфероиде, сформированном BRO и состоящем из клеток, подвергнутых воздействию 1% ДМСО, адгезия к фибронектину снижалась по сравнению с этими клетками в монослое, также обработанными ДМСО ( $P = 0.0495$ ). В сфероиде BRO, подвергнутых воздействию дакарбазином, адгезия к фибронектину была ниже, чем в клетках монослоя после этого же воздействия ( $P = 0.0495$ ) (рис. 6б).

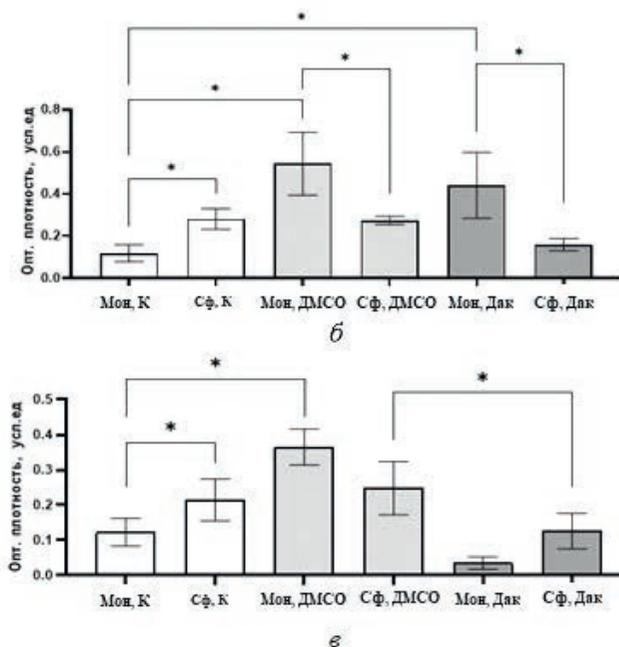
У клеток SK-MEL-2 в монослое адгезия к фибронектину после воздействия ДМСО увеличивалась по сравнению с SK-MEL-2, культивируемыми в монослое без воздействия ( $P = 0.0495$ ). В сфероиде, состоящем из клеток, подвергнутых воздействию дакарбазином, адгезия к фибронектину снижалась по сравнению со сфероидом, клетки которых



**Рис. 5.** Доля апоптотических клеток в монослое и сфероиде клеток BRO (а) и SK-MEL-2 (б) в контроле (К) и после действия ДМСО и дакарбазина. Показаны средние значения ( $n = 3$ ) и их стандартные отклонения; различия достоверны при: \* $P = 0.0213$ , \*\* $P = 0.0006$  и \*\*\* $P = 0.0055$  (критерий Манна–Уитни). Обозначения те же, что на рис. 4.



**а**



**Рис. 6.** Интенсивность цвета при разных степенях адгезии к фибронектиновой подложке (а, чем ярче цвет, тем выше степень адгезии) и степень адгезии к фибронектиновой подложке клеток линии BRO (б) и SK-MEL-2 (в). Показаны данные для монослоя и сфероидов в контроле и после действия ДМСО и дакарбазина. Обозначения те же, что на рис. 4. Даны средние значения ( $n = 3$ ) и их стандартные отклонения; различия достоверны при: \* $P = 0.0495$  (критерий Манна–Уитни).

подвергали обработке ДМСО ( $P = 0.0495$ ). У сфероидов SK-MEL-2 из клеток, не подвергавшихся никаким воздействиям, адгезия к фибронектину была выше по сравнению с монослойными SK-MEL-2 без воздействия ( $P = 0.0495$ ) (рис. 6в).

**Уровень экспрессии адгезивных молекул в клетках меланомы после воздействия дакарбазином.** В сфероидах клеток BRO уровень экспрессии генов интегринов *ITGB8* (рис. 7а) и *ITGAV* (рис. 7б) после воздействия дакарбазином повышался по сравнению с показателями в 3D-структурах без воздействий ( $P = 0.0495$ ). В сфероидах клеток SK-MEL-2 дакарбазин повышал уровень экспрессии гена *ITGB8* ( $P = 0.0495$ ), *ITGAV* ( $P = 0.0495$ ) и *ITGB5* ( $P = 0.0495$ ) (рис. 7г–е) по сравнению со структурами, клетки которых не подвергали никаким воздействиям.

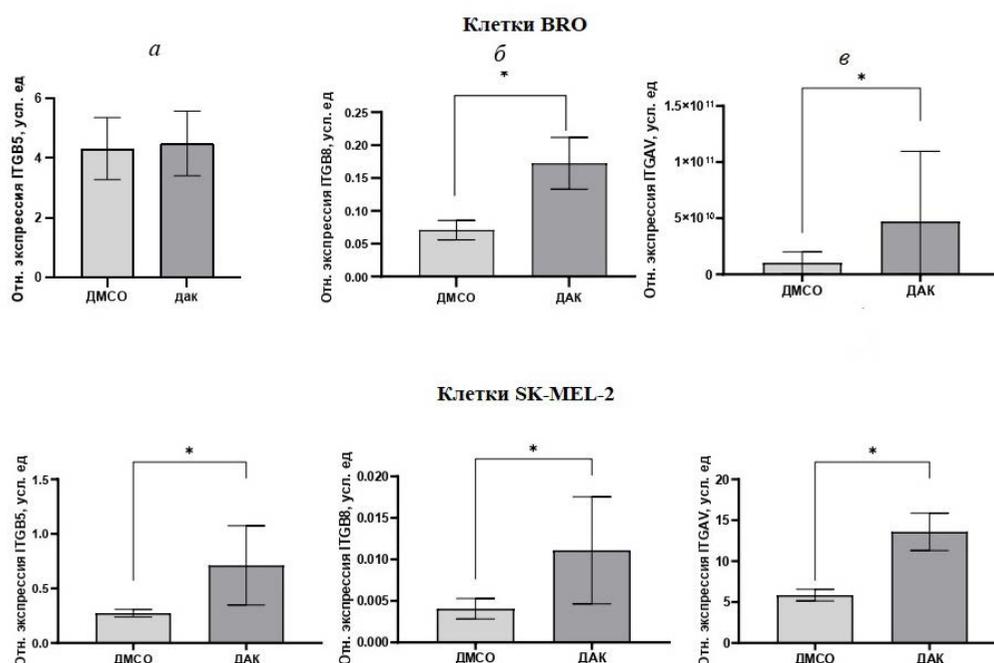
### ОБСУЖДЕНИЕ

Для повышения репрезентативности результатов экспериментальных исследований, выполняемых *in vitro*, были разработаны методы 3D-культивирования, которые способны со-

здать более приближенную модель к опухоли (Zanoni et al., 2016; Srisongkram et al., 2020; Lee et al., 2023).

Дакарбазин – противоопухолевый препарат, используемый для терапии различных видов злокачественных новообразований. Этот препарат представляет собой алкилирующий агент, который способен инициировать повреждение ДНК (Kewitz et al., 2014). Известно, что процессы деления и адгезии клетки тесно связаны. Соответственно арест клеточного цикла может приводить к изменению адгезивных свойств опухолевых клеток, изменению репертуара адгезивных молекул на поверхности клетки и внутриклеточных сигнальных каскадов. Понимание механизмов взаимосвязи этих процессов может иметь значение для оценки эффектов противоопухолевой терапии, прогнозирования течения новообразований и развития лекарственной устойчивости.

В клетках линии BRO, культивируемых в виде 3D-структур было выявлено, что дакарбазин повышает долю Ki-67-негативных клеток (т. е. клеток, которые перешли в фазу G<sub>0</sub> клеточного цикла), а также долю апоптотических клеток. Также после воздействия



**Рис. 7.** Относительная экспрессии генов интегрин *ITGB5* (а), *ITGB8* (б) и *ITGAV* (в), в сфероидах клеточной линии BRO и SK-MEL-2 и после воздействия ДМСО и дакарбазином (ДАК). Экспрессию генов интегринов в клетках после воздействия дакарбазином оценивали относительно клеток, подвергнутых действию ДМСО. Даны средние значения ( $n = 3$ ) и их стандартные отклонения; (\*) – различия достоверны при  $P = 0.0495$  (критерий Манна–Уитни).

дакарбазином в 3D-структурах увеличивается доля клеток в состоянии апоптоза по сравнению с монослоем, а также со сфероидами, клетки в которых не подвергали никаким воздействиям. Этот результат предполагает, что дакарбазин индуцирует в клетках меланомы как апоптоз, так и выход из клеточного цикла.

В 3D-сфероидах клеток меланомы линии SK-MEL-2 регистрировали повышение доли апоптотических клеток и доли Ki-67-негативных клеток по сравнению с клетками монослоя, что можно объяснить строением 3D-клеточных структур, предполагающим неравномерный доступ клеток к кислороду и нутриентам. После воздействия дакарбазином на SK-MEL-2 в 3D-структурах по сравнению с 3D-структурами контрольной группы наблюдали уменьшение доли Ki-67-негативных клеток. В клетках BRO, у которых регистрировали развитие апоптоза после воздействия дакарбазином, наблюдали и переход определенной доли клеток в фазу G<sub>0</sub> клеточного цикла. В SK-MEL-2 регистрировали и отсутствие апоптоза в 3D-сфероидах, и отсутствие индукции их выхода из клеточного цикла.

Фибронектин рассматривается как протуморогенный компонент внеклеточного матрикса, коммуникация которого с интегринами опухолевых клеток индуцирует формирование метастатических ниш и поддержание у опухолевых клеток фенотипа, аналогичному стволовым клеткам (Wu et al., 2023). Фибронектин рассматривается как белок, участвующий в ремоделировании органов, в том числе, при изменениях редокс-статуса и гипоксии (Aksenenko et al., 2019; Syed et al., 2022).

Адгезия клеток BRO и SK-MEL-2 в сфероидах в контроле (без воздействия) к фибронектину была выше по сравнению с контрольными клетками, культивируемыми в монослое, что может быть обусловлено самой трехмерной структурой, требующей более выраженной коммуникации клеток с внеклеточным матриксом. Вместе с тем в сфероидах SK-MEL-2 дакарбазин индуцировал снижение адгезии к фибронектину. В условиях *in vivo* фибронектин обычно продуцируется фибробластами и макрофагами и стимулирует инвазию и миграцию опухолевых клеток. Таким образом, внеклеточный фибронектин активирует метастазирование и прогрессию опухолевого роста. Напротив, снижение адгезии

к фибронектину может быть связано с развитием лекарственной устойчивости и поддержанием дормантного, а не пролиферативного или миграционного фенотипа клеток (Azimian-Zavareh et al., 2019; Lin et al., 2019). Установлено, что интегрины  $\alpha V$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 8$  гетеродимеризуются с интегринами  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 8$  при взаимодействии с фибронектином, приводя к активации FAK (Azimian-Zavareh et al., 2019; Komina et al., 2019). Стоит отметить, что оценку адгезии и экспрессионный анализ интегринов мы выполняли в разных сериях экспериментов, что не позволяет соотнести эти данные, а дает возможность оценивать только действие дакарбазина на вышеуказанные параметры. В нашем исследовании было определено повышение уровня экспрессии интегринов  $\alpha V$  и  $\beta 8$  в BRO, повышение уровня экспрессии интегринов  $\alpha V$ ,  $\beta 5$  и  $\beta 8$  в SK-MEL-2, что может указывать на участие этих молекул в фенотипическом переключении опухолевых клеток.

Таким образом, при воздействии алкилирующим агентом дакарбазином определяется разница в выраженности критических для опухолевых клеток параметров (биологических процессов) – апоптоза, пролиферации, взаимодействия с внеклеточным матриксом. В клетках 3D-моделей под действием дакарбазина наблюдается фенотипическое переключение, а также регистрируется апоптоз-индуцирующее действие данного препарата. В это же время апоптоз-резистентные клетки сохраняли пролиферативный фенотип.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00110, <https://rscf.ru/project/19-15-00110/>).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Achill T. M., Meye J., & Morgan J. R.* 2012. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Exp. Op. Biol. Ther.* V. 12. P. 1347. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.707181>
- Aksenenko M.B., Palkina N.V., Sergeeva O.N., Sergeeva E.Yu., Kirichenko A.K., Ruksha T.G.* 2019. miR-155 overexpression is followed by downregulation of its target gene, NFE2L2, and altered pattern of VEGFA expression in the liver of melanoma B16-bearing mice at the premetastatic stage. *Int. J. Exp. Pathol.* V. 100. P. 311. <https://doi.org/10.1111/iep.12342>
- Azimian-Zavareh V., Dehghani-Ghobadi Z., Ebrahimi M., Mirzazadeh K., Nazarenko I., Hossein G.* 2021. Wnt5A modulates integrin expression in a receptor-dependent manner in ovarian cancer cells. *Sci. Rep.* V. 11. P. 5885. doi: 10.1038/s41598-021-85356-6
- Chen G., Kawazoe N., Tateishi T.* 2008. Effects of ECM proteins and cationic polymers on the adhesion and proliferation of rat islet cells. *The Open Biotechnol. J.* V. 2: e1874070727154. <https://doi.org/10.2174/1874070700802010133>
- Colella G., Fazioli F., Gallo M., De Chiara A., Apice G., Ruosi C., Cimmino A., De Nigris F.* 2018. Sarcoma spheroids and organoids — promising tools in the era of personalized medicine. *Int. J. Mol. Sci.* V. 19. P. 615. <https://doi.org/10.3390/ijms19020615>
- Esimbekova A.R., Palkina N.V., Zinchenko I.S., Belenyuk V.D., Savchenko A.A., Sergeeva E.Y., Ruksha T.G.* 2023. Focal adhesion alterations in G0-positivemelanoma cells. *Cancer Med.* V. 12. P. 7294. <https://doi.org/10.1002/cam4.5510>
- Kewitz S., Stiefel M., Kramm C.M., & Staeger M.S.* 2014. Impact of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation and MGMT expression on dacarbazine resistance of Hodgkin's lymphoma cells. *Leukemia research.* V. 38. P. 138. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2013.11.001>
- Komina A.V., Palkina N.V., Aksenenko M.B., Lavrentev S.N., Moshev A.V., Savchenko A.A., Averchuk A.S., Rybnikov Y.A., Ruksha T.G.* 2019. Sema-phorin-5A downregulation is associated with enhanced migration and invasion of BRAF-positive melanoma cells under vemurafenib treatment in melanomas with heterogeneous BRAF status. *Melanoma Res.* V. 29. P. 544. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000621>
- Lee S. Y., Koo I. S., Hwang H. J., Lee D. W.* 2023. *In vitro* three-dimensional (3D) cell culture tools for spheroid and organoid models. *SLAS Discov.* V. 29. P. 5 131. <https://doi.org/10.1016/j.slasd.2023.03.006>
- Lin T. C., Yang C. H., Cheng L. H., Chang W. T., Lin Y. R., Cheng H.C.* 2019. Fibronectin in cancer: friend or foe. *Cells.* V. 9. P. 27. doi: 10.3390/cells9010027.
- Livak K. J., Schmittgen T. D.* 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* V. 25. P. 402. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Liu Y., Sheikh M. S.* 2014. Melanoma: molecular pathogenesis and therapeutic management. *Mol. Cell. Pharmacol.* V. 6. P. 228.
- Sakalem M. E., De Sibio M. T., da Costa F. A. D. S., de Oliveira M.* 2021. Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine. *Biotechnol. J.* V. 16: 2000463. <https://doi.org/10.1002/biot.202000463>
- Srisongkram T., Weerapreeyakul N., Thumanu K.* 2020. Evaluation of melanoma (SK-MEL-2) cell growth between three-dimensional (3D) and two-dimensional (2D) cell cultures with fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21: 4141. <https://doi.org/10.3390/ijms21114141>
- Syed A. M., Kundu S., Ram C., Kulhari U., Kumar A., Murgale M. N., Murty U.S., Sahu B. D.* 2022. Aoin alleviates pathological cardiac hypertrophy via modulation of the oxidative and fibrotic response. *Life Sci.*, V. 288: 120159. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120159>
- Zanoni M., Cortesi M., Zamagni A., Arienti C., Pignatta S., Tesei A.* 2020. Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *J. Hematol. Oncol.* V. 13. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00931-0>
- Zanoni M., Piccinini F., Arienti C., Zamagni A., Santi S., Polico R., Bevilacqua A., Tesei A.* 2016. 3D tumor spheroid models for *in vitro* therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci. Rep.* V. 6: 19103. <https://doi.org/10.1038/srep19103>
- Zhou J., Yi Q., Tang L.* 2019. The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on cancer: a focused review. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* V. 38. P. 250. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1265-1>
- Wu C., Weis S. M., Cheresh D. A.* 2023. Upregulation of fibronectin and its integrin receptors — an adaptation to isolation stress that facilitates tumor initiation. *J. Cell Sci.* V. 136: 261483. <https://doi.org/10.1242/jcs.261483>

**MELANOMA CELLS ADHESIVE PROPERTIES ACTIVATION IN 3D SPHEROIDS****D. V. Chernykh<sup>a</sup>, I. S. Zinchenko<sup>a</sup>, T. G. Ruksha<sup>a, \*</sup>**<sup>a</sup> *Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022, Russia**\* E-mail: tatyana\_ruksha@mail.ru*

In this study, the viability and adhesive features of BRO and SK-MEL-2 cell lines were evaluated using a melanoma model. It was revealed that in BRO cells, the development of apoptosis after exposure to dacarbazine was combined with the transition of the proportion of cells to the G<sub>0</sub> phase of the cell cycle, that corresponded to previously obtained results. The absence of apoptosis in 3D spheroids and the absence of exit from the cell cycle were observed in SK-MEL-2 melanoma cells. It was also revealed that in the control spheroids (cells without exposure) of the BRO and SK-MEL-2 melanoma lines, adhesion to fibronectin was higher compared with the cells of the control monolayer, which is explained by the three-dimensional structure requiring cell communication with the extracellular matrix. In spheroids formed by SK-MEL-2 cells, dacarbazine induced a decrease in adhesion to fibronectin, which may be associated with the development of drug resistance. An increase in the expression of integrins AV and β8 in BRO and SK-MEL-2, as well as integrin β5 in SK-MEL-2, was determined in cells after exposure to dacarbazine, which may indicate the involvement of aforementioned molecules in the exit from proliferative stage of tumor cells.

*Keywords:* melanoma, spheroids, solid tumors, dacarbazine, adhesion, apoptosis, fibronectin

УДК 57.085.23

## НОВАЯ ЛИНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННАЯ ИЗ ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ДОНОРА МУЖСКОГО ПОЛА

© 2024 г. А. М. Кольцова<sup>1</sup>, \*, А. С. Мусорина<sup>1</sup>, В. И. Турилова<sup>1</sup>, А. Н. Шатрова<sup>1</sup>, Т. К. Яковлева<sup>1</sup>, Г. Г. Полянская<sup>1</sup>, \*\*

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

\* E-mail: koltsova.am@mail.ru

\*\* E-mail: gpolanskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 27.04.2024

После доработки 05.06.2024

Принята к публикации 07.06.2024

Получена и охарактеризована новая неиммортилизованная фибробластоподобная клеточная линия, названная MSCWJ-3. Характеристики в процессе длительного культивирования (6–24 пассажи), подтверждают статус МСК. Показано: 1) постепенное увеличение доли стареющих клеток в процессе длительного культивирования; 2) значительное снижение индекса пролиферации к 24-му пассажу; 3) сохранение нормального диплоидного кариотипа мужчины (46, XY) в процессе всего срока культивирования, трисомия по разным аутосомам в единичных клетках, отсутствие структурных хромосомных перестроек; 4) высокая доля клеток, несущих поверхностные антигены, характерные для МСК: CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC и низкая – с антигенами CD34, CD45 и HLA-DR на протяжении 24 пассажей. Клетки линии MSCWJ-3 способны дифференцироваться в остеогенном и адипогенном направлениях на ранних и поздних пассажах; дифференцировка в хондрогенном направлении отсутствует. В целом отмечаются некоторые различия с ранее полученными линиями, выделенными из этого же источника и связанные, в основном, со степенью выраженности ряда статусных характеристик.

**Ключевые слова:** мезенхимные стволовые клетки человека, репликативное старение, пролиферативная активность, поверхностные клеточные маркеры, кариотип, дифференцировка

**Принятые сокращения:** ИП – индекс пролиферации; ИФА – иммунофлуоресцентный анализ; МСК – мезенхимные стволовые клетки; РС – репликативное старение.

DOI: 10.31857/S0041377124040035 EDN: QDCCGY

В настоящее время продолжается активное использование мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека для биомедицинских исследований, связанных с широким спектром заболеваний (Alavi-Dana et al., 2023; Bruckner et al., 2023; Cui et al., 2023; Faria et al., 2023; Mou et al., 2023; Sousa et al., 2023; Turano et al., 2023; Ashoobi et al., 2024; Gorio et al., 2024; Kanafi, Bronde, 2024) и расширяется спектр фундаментальных исследований, необходимых для понимания механизмов воздействия МСК на разные аномальные процессы в организме (Мусорина и др., 2023; Ashiba et al., 2023; Chen et al., 2023; Chopra et al., 2023; Drobiova et al., 2023; Hsu et al., 2023; Kim et al., 2023; Lifshagerd, Safari., 2023; Tan et al., 2023; Tomcy, Sindhu, 2023; Zhao et al., 2023; Fard et al., 2024; Mahmoodi et al.,

2024; Poblano-Perez et al., 2024; Rojas et al., 2024; Sattar et al., 2024; Saxena et al., 2024; Selvaraj et al., 2024).

Важная задача клеточной биологии состоит в получении и сравнении между собой линий МСК человека, выделенных из разных источников, к которым относятся, в частности, одинаковые ткани от разных доноров. Актуальность таких исследований связана с особенностями взаимодействия клеток с их микроокружением, специфичным для конкретного донора (Poljanskaya et al., 2022).

МСК, независимо от источника получения, характеризуются рядом определенных (статусных) свойств (Dominici et al., 2006; Sensebé et al., 2010; Barkholt et al., 2013).

Данные литературы указывают на то, что степень выраженности статусных характеристик у линий МСК разная (Stanko et al., 2014; Topoluk et al., 2017; Полянская, 2018; Li et al., 2018; Jin et al., 2019; Мусорина и др., 2019, 2023; Ельцова и др., 2020; Semenova et al., 2021; Shin et al., 2021; Tai et al., 2021; Yigitbilek et al., 2021; Wu et al., 2022; Yi et al., 2022; Zou et al., 2022; Mert et al., 2023; Zhu et al., 2023).

Линии МСК, как неиммортиализованные клеточные линии, в процессе длительного культивирования подвергаются репликативному старению (РС), которое является комплексным процессом и индуцировано генетическими и эпигенетическими изменениями (Poljanskaya et al., 2022). Исследования линий МСК, охарактеризованные на ранних и на поздних пассажах, позволяют расширить фундаментальные знания об этих линиях и регламентировать сроки использования разных линий в биомедицинских технологиях.

Привлекает внимание выделение МСК из тканей, получаемых без использования инвазивных процедур, в частности как побочного продукта оперативного вмешательства. К таким источникам МСК относятся, в частности, внезародышевые органы, десна, пульпа зуба, грудное молоко (Крылова и др., 2012, 2017; Кольцова и др., 2018, 2022; Rahmani-Moghadam et al., 2022). Одним из внезародышевых органов является пупочный канатик, состоящий из нескольких компартментов, включающих и Вартонов студень. Сравнительный анализ основных характеристик МСК из разных компартментов пупочного канатика показал, что МСК из Вартонова студня являются лучшим источником для использования в биомедицинских технологиях. (Conconi et al., 2011).

Ранее нами получены 2 линии (MSCWJ-1 и MSCWJ-2), выделенные из Вартонова студня пупочного канатика двух доноров (соответственно женского и мужского пола) и показано сходство основных статусных характеристик (Крылова и др., 2017; Кольцова и др., 2017). Исключение составили кариотипические различия – одна клональная перестройка в клетках MSCWJ-2 на раннем пассаже, вызвавшая ряд изменений в процессе РС. Поэтому цель настоящей работы заключалась в выделении еще одной линии из той же ткани донора мужского пола, подтверждения ее МСК-стату-

са, исследования ее в процессе РС и сравнении с ранее полученными линиями (MSCWJ-1 и MSCWJ-2).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Выделение клеток.** Клетки были выделены из Вартонова студня пупочного канатика от донора мужского пола. Из фрагмента пупочного канатика (7–9 см в длину), тщательно отмытого от клеток крови в среде, содержащей гентамицин, стерильным одноразовым хирургическим скальпелем вырезали участок Вартонова студня, расположенного между двумя пупочными венами и артерией. Клетки выделяли ферментативным методом, который состоит в следующем: фрагмент Вартонова студня механически измельчали и инкубировали в диссоциирующем растворе, состоящем из 10 частей дезоксирибонуклеазы в концентрации 400 мкг/мл (Worthington, США) и 1 части коллагеназы I типа в концентрации 1 мг/мл (Worthington, США), в течение 30 мин при температуре 37°C при легком покачивании. Затем суспензию пропускали через нейлоновый фильтр с размером пор 70 мкм и осаждали центрифугированием при 400 g в течение 4 мин. Для элиминации оставшихся эритроцитов клетки в осадке обрабатывали лизирующим буфером АСК (Gibco, США) в течении 3–5 мин при комнатной температуре и трижды отмывали избытком среды DMEM/F12 (Gibco-Invitrogen, США) с использованием центрифугирования при 400 g в течение 4 мин. Полученные клетки высевали на чашки Петри [(5–6)×10<sup>4</sup> кл/см<sup>2</sup>] и культивировали в ростовой среде, содержащей 90% среды DMEM/F12 и 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) в условиях 5% CO<sub>2</sub> при 37°C и влажности 90%. Среду меняли каждые 2–3 сут до образования 80%-ного конfluence. Культивировали на протяжении 5 пассажей, получив в результате неиммортиализованную клеточную линию, названную MSCWJ-3. Все характеристики этой линии получали на 6-м пассаже; динамику их изменений отслеживали при длительном культивировании (24 пассажа).

Микробиологический анализ подтвердил отсутствие бактериальной, грибковой и микоплазменной контаминации.

**Репликативное старение клеток** оценивали по активности фермента SA-β-галактозидазы на протяжении 24 пассажей. Клетки выращивали

в чашках Петри 35 мм (Nunc, Дания) в течение 24 ч. Затем среду удаляли и окрашивали клетки с помощью набора реактивов (Senescence Cells Histochemical Staining Kit, SIGMA, США), согласно инструкции. В реакционную смесь дополнительно вводили Hoechst 33342 (Invitrogene, США) для визуализации ядер. У клеток, вступающих в фазу РС, цитоплазма окрашивается в ярко синий цвет. Количественную оценку проводили с использованием программного обеспечения Mosaic 2.4 (Tucson, Китай).

#### **Характеристика пролиферативной активности.**

*Эффективность клонирования* клеточных линий определяли в чашках Петри в условиях редкого посева – не более 4 кл./см<sup>2</sup> (120 кл. на 1 чашку 70 мм). Через 21 сут клетки окрашивали 1%-ным водным раствором кристалл-виолета и считали колонии. Эффективность клонирования (%) определяли как отношение числа выросших колоний (клонов) к числу посеянных клеток. Учитывали колонии, состоящие из не менее 50 клеток. Эффективность клонирования анализировали на 6-м, 16-м и 24-м пассажах.

*Индекс пролиферации* (ИП) определяли как отношение числа клеток в текущий момент  $M_t$  к исходному числу  $M_0$  посеянных клеток и строили кривые роста клеточных популяций согласно ИП в определенный момент. Среднее время одного удвоения клеточной популяции  $a_0$  определяли по формуле (Седова, 2008):  $a_0 = t \ln 2 / \ln (M_t / M_0)$ , где  $t$  – время логарифмической фазы роста культуры. Для оценки среднего времени удвоения клеточной популяции каждый экспериментальный вариант повторяли 3 раза. Клетки считали ежедневно на протяжении 144 ч. Анализировали пассажи 6, 16 и 24.

#### **Кариотипический анализ полученной линии.**

Для получения препаратов метафазных хромосом за 2 ч до фиксации в культуру вводили колцемид (Demecolcine, 10 мкг/мл в растворе Хэнкса; Sigma, США) до конечной концентрации 0.1 мкг/мл, клетки снимали с поверхности чашки с помощью 0.05%-ного раствора трипсина с EDTA (Gibco, США), проводили гипотоническую обработку смесью 0.075 М раствора KSi и 1%-ного раствора цитрата натрия. Клетки фиксировали смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3:1). Для количественного кариотипического анализа препараты метафазных хромосом окрашивали водным раствором Гимза

(1:50). Модальное число хромосом и пределы изменчивости клеток по числу хромосом определяли при анализе 100 метафазных пластинок; долю полиплоидных клеток оценивали при анализе 1000 метафазных пластинок.

Для структурного кариотипического анализа проводили дифференциальное G-окрашивание хромосом в соответствии с ранее описанной методикой (Ozkinay, Mitelman, 1979). Анализировали 100 метафаз. Клетки исследуемой линии анализировали на пассажах 6, 16, и 24. Кариотипы анализировали с помощью микроскопа Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, ФРГ) с системой автоматического кариотипирования Ikaros 4 Karyotyping System (MetaSystems, Германия) и описывали в соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека ISCN (McGowan-Jordan et al., 2016).

**Иммунофлуоресцентный анализ.** Для иммунофлуоресцентного анализа присутствия маркеров ранней дифференцировки в производные трех зародышевых листков использовали антитела против  $\alpha$ -актина (тест на мезодерму),  $\alpha$ -фетопротеина (тест на энтодерму) (Sigma, США) и нестина (тест на эктодерму) (Santa Cruz Biotechnology, США). Клетки выращивали на покровных стеклах, фиксировали 10%-ным раствором формалина (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин при комнатной температуре, пермеабелизовали 0.1%-ным раствором Тритона X100 в течение 15 мин при комнатной температуре, неспецифичные сайты связывания антител блокировали 0.1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA; Sigma, США) в течение 1 ч при 37°C. Затем инкубировали с перечисленными выше антителами в течение ночи при 4°C. Все антитела разводили в соотношении 1:50. Для выявления локализации связанных с белками антител инкубировали препараты в течение 2 ч при 4°C с антителами против иммуноглобулинов мыши (FITC; Chemicon, США), разведенных в соотношении 1:500. Каждому этапу предшествовала трехкратная отмывка препаратов PBS, не содержащем ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  (“Биолот”, Россия). Для визуализации морфологии клеток (актинового цитоскелета) и их ядер препараты последовательно окрашивали родамин-фаллоидином (Invitrogen, США) в концентрации 0.1 мкМ/мл и Hoechst 33342 в концентрации 0.1 мкг/мл в течение 10 мин при комнатной температуре. В качестве отрица-

тельного контроля использовали клетки, инкубированные только с антителами против иммуноглобулинов мыши (FITC; Chemicon, США). Визуализацию проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа OLYMPUS FV3000 (Япония). Анализ проводили на раннем 6-м пассаже.

**Определение статуса МСК с помощью проточной цитофлуориметрии.** Анализировали наличие поверхностных антигенов с помощью проточной цитофлуориметрии на цитометре Beckman Coulter (США). Экспрессию каждого маркера оценивали по результатам трех экспериментов для клеток, находящихся на пассажах 6, 16 и 25. Иммунофенотипирование полученных клеточных линий проводили с помощью панели конъюгатов CD-маркерных моноклональных антител с флуорохромами. В работе использовали моноклональные антитела против CD-34, HLA-ABC и HLA-DR (Caltac, США), CD-44, CD-73, CD-105 (Beckman Coulter, США), CD-90 (Chemicon, США). В качестве негативного контроля использовали очищенные мышинные антитела IgG1/FITC и IgG1/RFE (DAKO, Дания). Клетки снимали с поверхности чашки с помощью 0.05%-ного раствора трипсина с EDTA (Gibco, США) и отмывали от него раствором PBS, не содержащем ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  (“Биолот”, Россия). Полученную суспензию клеток (1 млн/мл) в PBS делили на пробы по 30 мкл, добавляли к каждой из них по 3 мкл антител и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Далее пробы доводили до оптимального объема (0.3–0.4 мл) буфером FACS (PBS, содержащий 1% BSA и 0.05% азида натрия).

**Индукция остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировки для определения статуса МСК.** Использовали модифицированный метод (Reyes et al., 2001). Клетки высевали на в культуральные чашки Петри диаметром 35 мм (50 000 клеток на 1 чашку). Через 1 сут меняли обычную ростовую среду на среду для адипогенной или остеогенной дифференцировок (StemPro, Gibco, США). Хондрогенную дифференцировку проводили в культуре микромасс в хондрогенной дифференцировочной среде (StemPro, Gibco, США). Индукцию проводили в течение 3 нед., меняя среду через каждые 7 сут.

Идентификацию остеогенной дифференцировки проводили с помощью выявления солей

кальция двумя методами. 1. По модифицированному методу Мак–Ги–Рассела (Луппа, 1980): клетки однократно промывали PBS без ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  и фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 20 мин, окрашивали ализариновым красным (Alizarin Red Solution; Merck, Германия) в течение 5 мин при комнатной температуре; визуализацию окрашенных в оранжево-красный цвет отложений кальция проводили с помощью микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal (Германия). 2. Для реакции Вон Косса: клетки фиксировали 2 мин в метаноле при  $-20^{\circ}C$  и окрашивали 2%-ным раствором нитрата серебра (“Вектон”, Россия) в течение 1 ч под лампой мощностью 60 Вт. Окрашенные клетки промывали дистиллированной водой и помещали на 5 мин в 2.5%-ный раствор тиосульфата натрия. Затем клетки снова промывали водой и заливали 70%-ным глицерином. Визуализацию проводили с помощью микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal (Германия).

Для идентификации адипогенной дифференцировки клетки промывали PBS без ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , фиксировали в метаноле в течение 2 мин при  $-20^{\circ}C$ . Фиксированные клетки промывали 50%-ным этанолом и окрашивали красным масляным (Oil Red O, Sigma, США) в течение 10 мин. Далее клетки промывали 50%-ным этанолом, затем дистиллированной водой и заливали 70%-ным глицерином. Визуализацию окрашенных в оранжево-красный капелек жира проводили с помощью микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal (Германия).

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

Идентификацию дифференцировок для линии MSCWJ-3 проводили на 6-м и 24-м пассажах.

Полученные в работе количественные результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы  $P < 0.05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Морфологический анализ.** Выделенные фибробластоподобные клетки культивировали в течение 24 пассажей. В результате получена линия, названная, согласно источнику получения, MSCWJ-3. Морфологический анализ этой линии показал однородность клеточных популяций со средними по размеру вытянутыми фибробластоподобными клетками на 6-м пассаже и существенно увеличенными по размеру вытянутыми клетками на 24-м пассаже (рис. 1).

**Репликативное старение.** Репликативное старение клеток MSCWJ-3 оценивали по активности фермента SA-β-галактозидазы (табл. 1). На пассажах 6 и 17 обнаружена небольшая доля стареющих клеток, а на пассаже 24 увеличивается доля окрашенных клеток, что свидетельствует о вступлении клеток в активную стадию РС. По времени вступления в активную стадию РС клетки MSCWJ-3 совпадают с ранее исследованной линией MSCWJ-1. Сравнение по этому показателю с другой линией, MSCWJ-2, свидетельствует о различиях: клетки MSCWJ-2 вступают в стадию активного РС значительно раньше, что, возможно, связано с наличием

**Таблица 1.** Доля клеток с выраженной активностью β-галактозидазы (β-гал) в линии MSCWJ-3 в процессе длительного культивирования

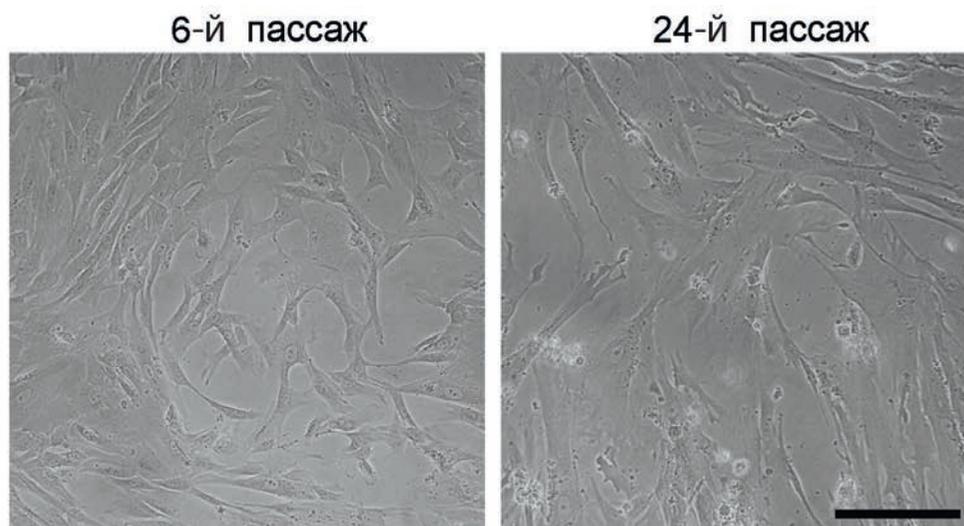
Пассаж	Число клеток	Клетки с активностью β-гал, %
6	1109	11.36 ± 0.95
17	1133	9.18 ± 0.86
24	1001	34.47 ± 1.50

*Примечание.* Показаны средние значения и их ошибки на 1000 клеток.

у них клональной хромосомной перестройки (Кольцова и др., 2017).

**Ростовые характеристики.** Анализ показал, что на 6-м пассаже эффективность клонирования клеток низкая и составляет  $3.20 \pm 1.31\%$ . На 16-м и 24-м пассажах клоны не образуются. В линиях, выделенных из Вартонова студня пупочного канатика человека двух других доноров, уровень эффективности клонирования на раннем пассаже тоже низкий (Крылова и др. 2017). В целом анализ разных линий МСК свидетельствует, что клоногенная активность постепенно снижается вплоть до исчезновения в процессе РС (Szepesi et al., 2016; Кольцова и др., 2018, 2019, 2020; Мусорина и др., 2023).

Клеточная линия MSCWJ-3 на 6-м пассаже характеризуется активной пролиферацией (рис. 2). Индексы пролиферации (ИП) свидетельствуют о длительности логарифмической фазы роста, равной 72 ч (в интервале роста 24–96 ч). Средний ИП составляет 4.9. Среднее



**Рис. 1.** Морфология клеток линии MSCWJ-3 на пассажах 6 и 24. Прижизненные фотографии. Инвертированный световой микроскоп Nikon Eclipse TS100 (Япония). Масштабная линейка: 200 мкм.

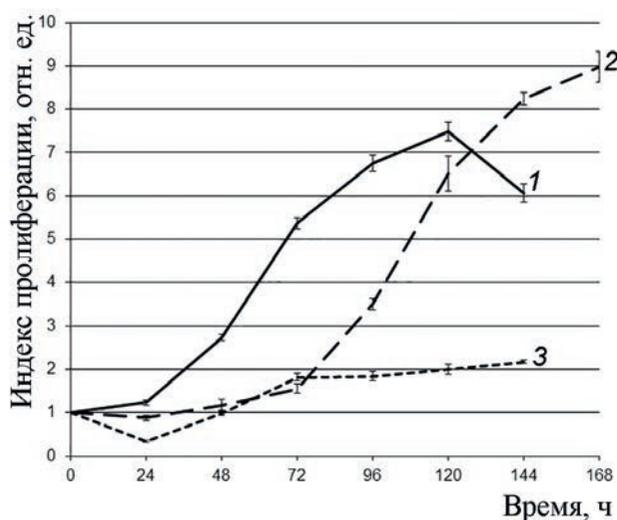


Рис. 2. Кривые роста клеток линии MSCWJ-3 на пассажах 6 (кривая 1), 16 (кривая 2) и 24 (кривая 3).

время одного удвоения клеточной популяции составляет  $26.1 \pm 0.4$ .

На 16-м пассаже ИП постоянно повышается от 72 до 120 ч, т.е. активная логарифмическая фаза составляет 72 ч (72–144) (рис. 2). Средний ИП составляет 4.4, т.е. существенной разницы между 6-м и 16-м пассажами по интенсивности пролиферации нет.

Среднее время одного удвоения клеточной популяции составляет  $23.7 \pm 0.2$ . Несмотря на очень небольшую разницу по времени удвоения между 6-м и 16-м пассажами, она достоверна ( $P < 0.01$ ). Таким образом, к 16-му пассажу пролиферативная активность несколько замедляется. Отметим, что, согласно табл. 1, заметные процессы РС еще не начались.

На 24-м пассаже в стадии активного РС (табл. 1) наблюдается существенное уменьшение ИП. Через 24 ч после посева ИП снижается из-за гибели клеток. Уровень ИП начинает превышать единицу только после 48 ч. Наблюдается тенденция к постепенному увеличению ИП в процессе культивирования от 72 до 144 ч; максимальный уровень его достигается к 144 ч, который уже значительно отличается от 72 ч ( $P < 0.05$ ). Активной логарифмической фазой роста можно условно считать 72 ч в период от 72 до 144 ч. Средний ИП составляет 1.5. Среднее время одного удвоения клеточной популяции составляет  $64.5 \pm 1.3$  ч, что свидетельствует о значительном снижении пролиферативной активности в процессе РС. Сравнение по пролиферативной ак-

тивности линии MSCWJ-3 с ранее полученными линиями MSCWJ-1 и MSCWJ-2 показало, что при длительном культивировании во всех трех линиях увеличивается среднее время удвоения клеточных популяций. Различия выражаются только степенью увеличения (Кольцова и др., 2017).

**Кариотипический анализ** вновь полученной линии MSCWJ-3, выделенной из Вартонова студня пупочного канатика донора мужского пола проведен на 6-м, 16-м и 24-м пассажах. Клетки сохраняли нормальный диплоидный кариотип мужчины (46, XY) на протяжении всего срока культивирования. Тем не менее при анализе 100 клеток на каждом исследуемом пассаже в единичных клетках были выявлены трисомии по разным аутосомам (рис. 3). Так, на пассаже 6 — трисомия по хромосоме 2 в одной клетке и трисомия по хромосоме 20 — в другой; на пассаже 16 — трисомия по хромосомам 2 и 17 также в двух разных клетках; на пассаже 24 — трисомия по хромосомам 1, 8 и 11 в трех разных клетках. Таким образом, доля трисомий на 100 клеток составила 2% на 6-м и 16-м пассаже по 2 клетки и 3% (3 клетки) на 24-м пассаже. В этих клетках было по 47 хромосом. Структурные хромосомные перестройки не были обнаружены ни на одном из исследованных пассажей. Доля полиплоидных клеток в популя-

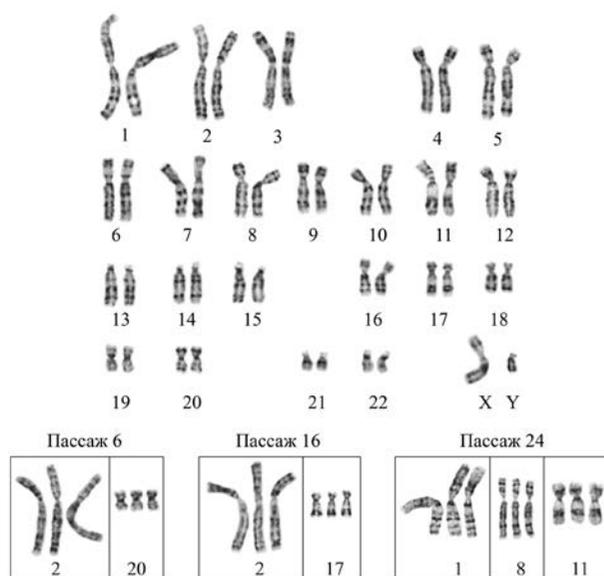


Рис. 3. Кариотип клеточной линии MSCWJ-3. Нормальный кариотип: 46, XY. На врезках показаны трисомии по разным аутосомам, выявленные в единичных клетках с числом хромосом 47, на пассажах 6, 16 и 24.

ции, оцененная по 1000 метафазных пластинок, составляла 2, 3.1 и 0.6% на пассажах 6, 16 и 24 соответственно.

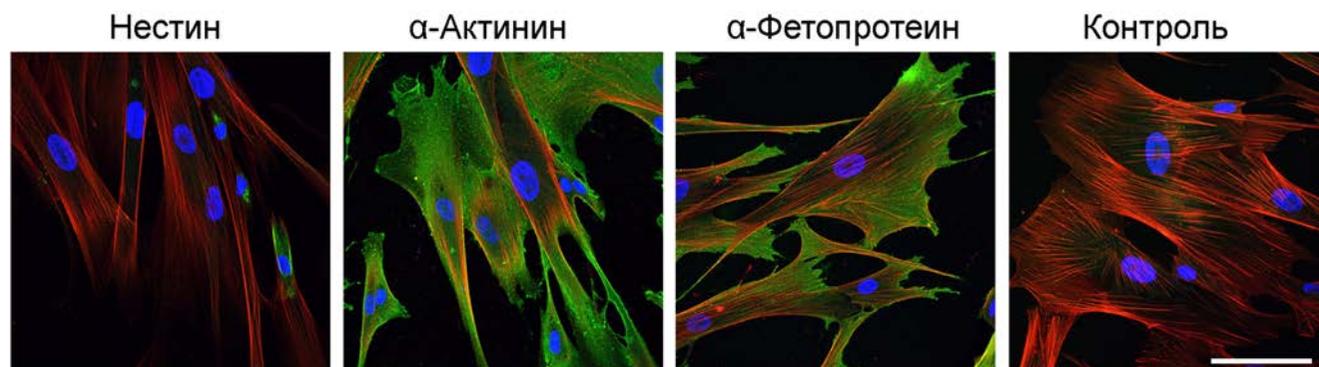
Надо отметить, что трисомии в МСК встречаются редко. Ранее нами были проанализированы 19 линий МСК, выделенные из разных источников. 9 линий были проанализированы только на ранних пассажах, а 10 линий – на ранних и поздних пассажах, включая РС. Анализ 10 линий показал, что только в одной линии – ADH-MSK, выделенной из эпикардиальной жировой ткани человека в процессе аортокоронарного шунтирования, выявили трисомию на раннем и позднем пассажах (Мусорина и др., 2019). Имеющийся небольшой материал пока не позволяет делать выводы о систематическом появлении трисомий в линиях МСК в процессе длительного культивирования, включая активную стадию РС.

**Иммунофлуоресцентный анализ.** В полученной линии показано наличие маркеров ранней дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в производные трех зародышевых листков (рис. 4). Идентифицированы следующие маркеры:  $\alpha$ -актинин (маркер мезодермы),  $\alpha$ -фетопротеин (маркер энтодермы). Нестин (маркер эктодермы) визуализировался в единичных клетках. Полученные клетки MSCWJ-3 по маркерам мезодермы и энтодермы совпадают с ранее полученными MSCWJ-1 и MSCWJ-2 (Крылова и др., 2017). Есть много совпадений не только между линиями МСК, выделенными из одного органа, но и между линиями МСК разного происхождения (Riekstina et al., 2009; Кольцова и др, 2015, 2018, 2020, 2022, Мусорина 2019, 2023). Предположительно, функ-

циональная роль этих маркеров связана либо с дифференцировочной пластичностью МСК, либо с эмбриональным происхождением МСК. Известно, что МСК могут дифференцироваться в производные всех трех зародышевых листков. Так, в наших работах показано, что в клеточных линиях, выделенных из пульпы зуба и десны, наблюдается экспрессия гена нейроспецифической элоназы (NSE), участвующего в нейрональной дифференцировке, соответствующей эктодермальному направлению (Кольцова и др., 2018, 2019). ПЦР-анализ в других исследованиях показал экспрессию нестина (эктодерма), TGF- $\beta$  и GATA4 (мезодерма), PDX1 (энтодерма) в разных по происхождению линиях МСК (Huang et al., 2010; Antonucci et al., 2011; Mamidi et al., 2011).

**Статус МСК.** Поверхностные антигены полученной линии, оцененные с помощью проточной цитофлуориметрии, в целом подтвердили наличие у них статуса МСК (табл. 2). Так, на пассаже 6 большая доля клеток несет антигены CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC, а малая – антигены CD34, CD45 и HLA-DR. В процессе РС на пассаже 16 все соотношение этих долей остается на том же уровне. В активной стадии РС на 25-м пассаже принципиальных изменений не наблюдали. Эти результаты одинаковы для разных линий МСК. (Полянская, 2018).

**Остеогенная, адипогенная и хондрогенная дифференцировки.** Результаты анализа дифференцировочного потенциала в клеточной линии MSCWJ-3 представлены на рис. 5 и свидетельствуют об активной адипогенной дифференцировке на 6-м пассаже и ее ослаблении на 24-м



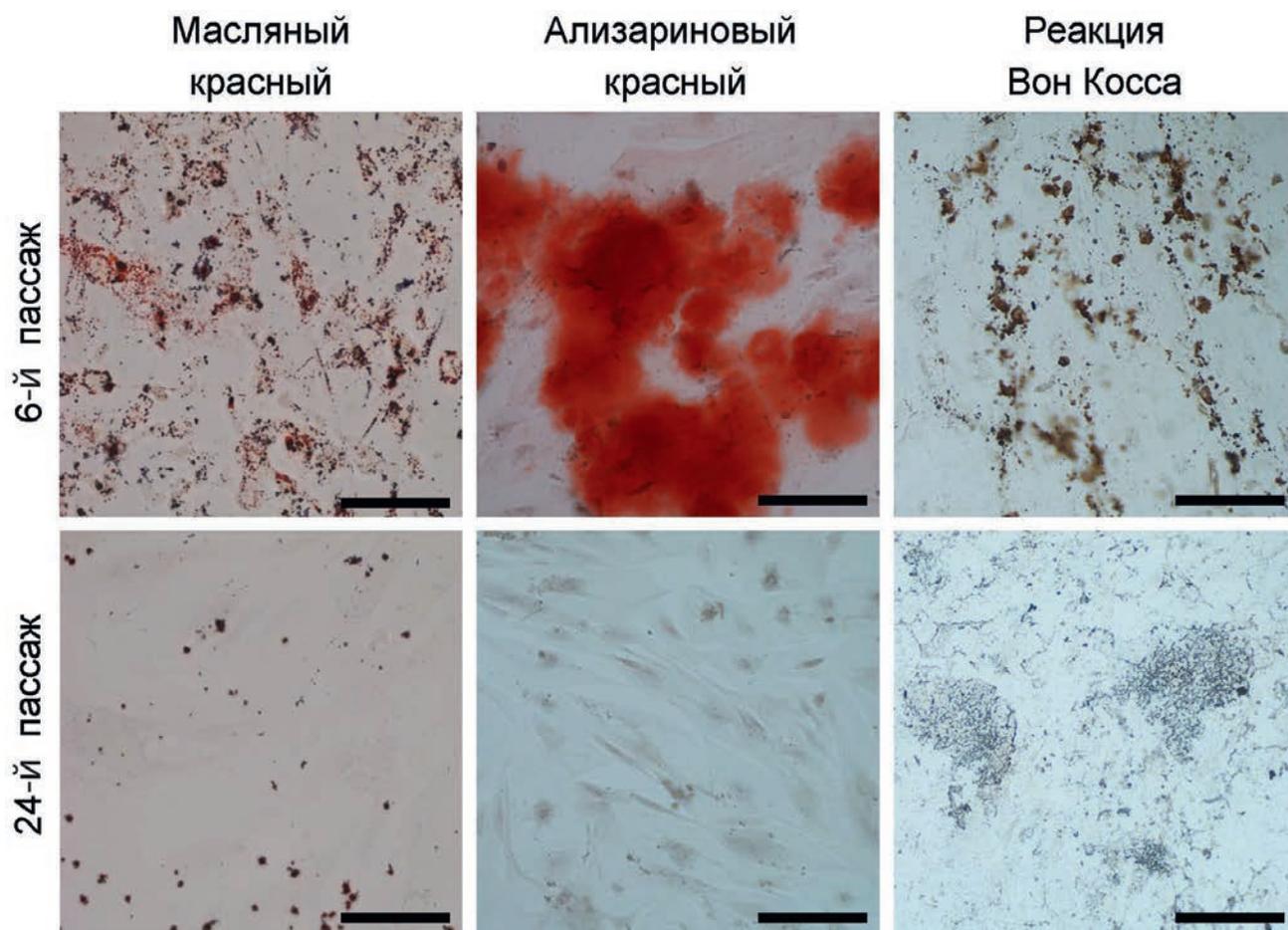
**Рис. 4.** Идентификация маркеров ранней дифференцировки эмбриональных стволовых клеток человека в клетках линии MSCWJ-3 на 6-м пассаже по флуоресценции соответствующих моноклональных антител.

Зеленым цветом показаны маркеры эктодермы (нестин), мезодермы ( $\alpha$ -актинин), энтодермы ( $\alpha$ -фетопротеин). Ядра окрашены Hoechst 33342. Масштабная линейка: 100 мкм.

**Таблица 2.** Доли клеток линии MSCWJ-3 с разными поверхностными маркерами (%)

Маркер	Пассаж 6	Пассаж 16	Пассаж 25
CD44	99.92 ± 0.02	99.88 ± 0.09	98,24 ± 0.09
CD73	99.67 ± 0.74	86.19 ± 2.51	98.71 ± 0.08
CD90	99.96 ± 0.02	99.88 ± 0.15	98.24 ± 0.85
CD105	95.73 ± 1.75	99.17 ± 0.70	91.26 ± 3.19
HLA-ABC	62.86 ± 1.32	99.52 ± 0.12	92.00 ± 3.15
HLA-DR	0.14 ± 0.06	0.39 ± 0.06	0.92 ± 0.27
CD45	0.54 ± 0.02	0.28 ± 0.07	0.87 ± 0.26
CD34	1.63 ± 0.25	0.63 ± 0.10	3.17 ± 0.87

*Примечание.* Показаны средние значения и их ошибки из трех экспериментов.



**Рис. 5.** Визуализация дифференцировки клеток линии MSCWJ-3 в адипогенном и остеогенном направлении на пассажах 6 и 24. Жировые включения (адипогенная дифференцировка) окрашены масляным красным (масштабная линейка: 100 мкм), соли кальция в межклеточном пространстве выявлены окраской ализариновым красным и реакцией Вон Косса (масштабная линейка: 200 мкм).

пассаже. Наблюдается и активная остеогенная дифференцировка на пассаже 6, идентифицированная по окраске ализариновым красным и реакция Вон Косса. На 24-м пассаже эта дифференцировка значительно слабеет. Хондрогенная дифференцировка, индуцированная при культивировании клеток в микромассе, отсутствовала полностью и на раннем и позднем пассажах (не показано).

Следует отметить, что в большинстве случаев на ранних пассажах имеют место все три дифференцировки. Но, тем не менее, встречаются исключения, когда проявляются две дифференцировки. Так, нами и рядом других авторов обнаружено отсутствие адипогенной дифференцировки на раннем пассаже линии МСК, выделенной из пульпы зуба, (Zhang et al., 2006; Sonoyama et al., 2008; Кольцова и др., 2018; Monterubbianesi et al., 2019). Данные об отсутствии хондрогенной дифференцировки в линии, выделенной из Вартонова студня пупочного канатика, получены впервые. В двух ранее полученных линиях, MSCWJ-1 и MSCWJ-2, выделенных из этой же ткани, но от разных доноров, на ранних пассажах присутствовали все три дифференцировки (Крылова и др. 2017). Причины этих различий пока неясны. Основываясь на результатах других исследований, можно предположить, что условия культивирования или гетерогенность клеточных популяций могут влиять на уровень дифференцировки (Chen et al., 2023; Hatori et al., 2023; Hsu et al., 2023; Sattar et al., 2024). Можно предположить, что и в данном случае имеет место одна из этих причин. В нашем ранее проведенном исследовании трех популяций клеток, выделенных из одной линии эмбриональных стволовых клеток человека (линия SC7), показано, что все три выделенные клеточные популяции принципиально различаются между собой по дифференцировочному потенциалу (Кольцова и др., 2022).

В целом, анализ всех статусных характеристик линии MSCWJ-3, выделенной из Вартонова студня пупочного канатика донора мужского пола и сравнение их с ранее полученными двумя линиями этого же происхождения, свидетельствует о том, что, несмотря на ряд различий между ними, линия MSCWJ-3, как и ранее полученные MSCWJ-1 и MSCWJ-2 соответствует статусу МСК (Крылова и др. 2017; Кольцова и др., 2017). Межлинейные различия связаны,

в основном, со степенью выраженности ряда статусных характеристик. Причем наибольшие различия наблюдаются между вновь полученной линией MSCWJ-3 и линией MSCWJ-2, что, по-видимому, связано с наличием на ранних пассажах клеток линии MSCWJ-2 клональной хромосомной перестройки, которая, возможно, влияет и на наступление в этой линии ранней активной стадии РС. Также надо подчеркнуть, что сравнение трех полученных линий свидетельствует об отсутствии гендерных различий по статусным характеристикам, что совпадает с ранее полученными сравнительными данными по разным МСК, выделенных из пульпы зуба (Мусорина и др., 2023).

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От пациентки, являющейся донором ткани, было получено подписанное информированное добровольное согласие на предоставление гистологического материала для проведения научных исследований.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кольцова А.М., Зенин В.В., Петросян М.А., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2020. Получение и характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из разных областей плаценты одного донора. Цитология. Т. 62. № 9. С. 713. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Petrosyan M.A., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2021. Isolation and characterization of Mesenchymal Stem Cell Line Derived from different regions of the placenta of the same donor. Cell Tiss. Biol. V. 15. P. 356.)  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120090035>

- Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.* 2018. Получение и характеристика линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из пульпы молочного зуба человека. Цитология. Т. 60. № 12. С. 955. (*Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G.* 2018. The derivation and characterization of mesenchymal stem cell line, isolated from human pulp of a deciduous tooth. *Tsitologiya*. V. 60. P. 955.) <https://doi.org/10.1134/S0041377118120015>
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.* 2019. Получение и характеристика линии мезенхимных стволовых клеток, выделенной из десны человека. Цитология. Т. 61. № 8. С. 658. (*Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G.* 2019. The derivation and characterization of mesenchymal stem cell line, isolated.)
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.* 2015. Характеристика новой линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эмбриональных стволовых клеток человека. Цитология. Т. 57. № 11. С. 761. (*Koltsova A.M., Zenin V.V., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G.* 2015. Characteristics of new mesenchymal stem cell line derived from human embryonic stem cells. *Tsitologiya*. V. 57 P. 761. from human gingival. *Tsitologiya*. V. 61. P. 658.) <https://doi.10.1134/S0041377119080029>
- Кольцова А.М., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.* 2017. Динамика свойств двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека, при длительном культивировании. Цитология. Т. 59. № 9. С. 574. (*Koltsova A.M., Krylova T.A., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G.* 2017. Dynamics properties of two lines of mesenchymal stem cells, derived from the Wharton' jelly of the human umbilical cord, during long-term cultivation. *Tsitologiya*. V. 59. P. 574.)
- Крылова Т.А., Кольцова А.М., Зенин В.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.* 2012. Сравнительные характеристики новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и крайней плоти человека. Цитология. 54. № 1. С. 5. (*Krylova T.A., Koltsova A.M., Zenin V.V., Musorina A.S., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G.* 2012. Comparative characteristics of new mesenchymal stem cell lines derived from human embryonic stem cells, bone marrow and foreskin. *Tsitologiya*. V. 54. P. 5)
- Крылова Т.А., Кольцова А.М., Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.* 2017. Характеристика двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека. Цитология. Т. 59. № 5. С. 315. (*Krylova T.A., Koltsova A.M., Musorina A.S., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G.* 2017. Derivation and characteristic of two lines of human mesenchymal stem cells, generated from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Tsitologiya*. V. 59. P. 315.)
- Лунна Х.* 1980. Методы гистохимического выявления неорганических веществ. В кн.: Основы гистохимии. Москва: Мир. С. 267. (*Luppa X.* 1980. Methods for histochemical detection of inorganic substances. In: *Fundamentals of histochemistry*. Moscow: Mir. P. 267.)
- Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.* 2019. Характеристика неиммortalизованной линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эпикардальной жировой ткани человека. Цитология. Т. 61. № 4. С. 272. (*Musorina A.S., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G.* 2019. a Rzat of a nonimmortalized mesenchymal stem cell line isolated from human epicardial adipose tissue. *Cell Tiss. Biol*. V. 13. P. 247.)
- Мусорина А.С., Турилова В.И., Шатрова А.Н., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.* 2023. Получение и сравнительная характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из пульпы молочного зуба детей разного возраста. Цитология Т. 65. № 5. С. 420. (*Musorina A.S., Shatrova A.N., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G.* 2019. The derivation and comparative characterization of mesenchymal stem cell lines, isolated from human pulp of a deciduous tooth of children of different sexes. *Tsitologiya*. V. 65. P. 420.)
- Полянская Г.Г.* 2018. Сравнительный анализ характеристик линий мезенхимных стволовых клеток человека, полученных в коллекции культур клеток позвоночных (обзор). Сб. «Клеточные культуры», Т. 34. С. 3. (*Poljanskaya G.G.* 2018. Comparative analysis of the lines of human mesenchymal stem cells derived in the collection of cell cultures of vertebrates (review). *Collection «Cell cultures»*. V. 34. P. 3.)
- Седова Г.П.* 2008. Количественные аспекты злокачественного роста. Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал. Т. 7. № 2. (*Sedova G. P.* 2008. Quantitative aspects of malignant body height. *Mathematical morphology. Electronic Math. Medicobiol. J.* V. 7.) <http://sgma.alpha-design.ru/MMORPH/N-18-html/sedova/sedova.htm>
- Alavi-Dana S., Gholami Y., Meghdadi M., Fadaei S., Askari V.* 2023. Mesenchymal stem cell therapy for COVID-19 infection. *Inflammopharmacol*. V. 32. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s10787-023-01394-8>

- Antonucci I., Stuppia L., Kaneko Y., Yu S., Tajiri N., Bae E.C., Chheda S.H., Weinbren N.L., Borlongan C.V.* 2011. Amniotic fluid as rich source of mesenchymal stromal cells for transplantation therapy. *Cell Transplant.* V. 20. P. 789.  
<https://doi.org/10.3727/096368910x539074>
- Ashiba K., Mino K., Okido Y., Sato K., Kawakami H.* 2023. Senescence recovering by dual drug-encapsulated liposomal nanoparticles for large-scale humancell expansion. *J. Artif. Organs* V. 26. P. 246.  
<https://doi.org/10.1007/s10047-022-01356-x>
- Ashoobi M., Hemmati H., Aghayan H., Zarei-Behjani Z., Keshavars S., Babaloo H., Maroufizadeh S., Yousefi S., Farzin M., Vojoudi E.* 2024. Wharton's jelly mesenchymal stem cells transplantation for critical limb ischemia in patients with type 2 diabetes mellitus: A preliminary report of phase 1 clinical trial. *Cell Tissue Res.* V. 395. P. 211.  
<https://doi.org/10.1007/s00441-023-03854-7>
- Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., Buscher D., Fibbe W., Foussat A., Kwa M., Lantz O., Maciulaitis R., Palomaki T., Schneider C.K., Sensebe L., Tachdjian G., Tarte K., Tosca L., Salmikangas P.* 2013. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies – bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytother.* V. 15. P. 753.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.03.005>
- Bruckner S., Capria V., Zeno B., Leblebicioglu B., Goyal K., Vasileff W., Avan H., Willis W., Ganesan L., Jarjour W.* 2023. The therapeutic effects of gingival mesenchymal stem cells and their exosomes in a chimeric model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* V. 25. P. 211.  
<https://doi.org/10.1186/s13075-023-03185-6>
- Chen Y., Wang X., Wu Z., Jia S., Wan M.* 2023. Epigenetic regulation of dental-derived stem cells and their application in pulp and periodontal regeneration. *Biochem., Biophys. Mol. Biol.* V. 11: e14550.  
<https://doi.org/10.7717/peerj14550>
- Chopra H., Cao C., Sommer C., Dahlkemper A., Sugai J., Sherley J., Kaigler D.* 2023. Quantification of the culture stability of stem cell fractions from oral-derived, human mesenchymal stem cell preparations: A significant step towards the clinical translation of cell therapies. *Cells.* V. 12. P. 2703.  
<https://doi.org/10.3390/cells12232703>
- Conconi M.T., Di Liddo R., Tommasini M., Calore C., Parnigotto P.P.* 2011. Phenotype and differentiation potential of stromal populations obtained from various zones of human umbilical cord: an overview. *J. Open Tiss. Eng. Reg. Med.* V. 4. P. 6.
- Cui E., Lv Lu., Chen W., Chen Na., Pan R.* 2023. Mesenchymal stem/stromal cell-based cell-free therapy for the treatment of acute lung injury. *J. Cell. Ther.* V. 124. P. 1241.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.30469>
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E.* 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Int. Soc. Cell. Ther. Position Statement. Cytother.* V. 8. P. 315.  
<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Drobiova H., Sindhu S., Ahmad R., Haddad D., Al-Mulla F., Madhoun A.* 2023; Wharton's jelly mesenchymal stem cells: a concise review of their secretome and prospective clinical application. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 11: 1211217.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1211217>
- Fard A., Leeson H., Aguado J., Pietrogrande G., Power D., Gomez-Inclan C., Zheng H., Nelson, Soheilmjghadam F., Glass N., Dharmaratne M., Watson E., Lu J., Martin S., Pickett H., Coope-White J., Wolvetang E., Mar J.* 2024. Deconstructing heterogeneity of replicative senescence in human mesenchymal stem cells at single cell resolution. V. 46. P. 999.  
<https://doi.org/10.1007/s11357-023-00829-y>
- Faria J., Cervera S., Skovronova R., Broeksma B., Berends A., Zaal E., Bussolati B., O' Brien T., Michaila S., Masereeuw R.* 2023. Mesenchymal stromal cells secretome restores bioenergetic and redox homeostasis in human proximal tubule cells after ischemic injury. *Stem Cell Res.* V. 14. P. 353.  
<https://doi.org/10.1186/s13287-023-03563-6>
- Gorio A., Gao H., Klinger M., Vinci V., Paino F.* 2024. Mechanically activated adipose tissue as a source for novel therapies in neurological disease/injury. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* V. 19. P. 688.  
<https://doi.org/10.2174/1574888X18666230605120546>
- Jin Q., Yuan K., Lin W., Niu C., Ma R., Huang Z.* 2019. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and adipose tissue for bone regeneration potential. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* V. 47. P. 1577.  
<https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1594861>
- Hatori A., Yamakawa D., Al-Maaw Si., Dohle E., Chikira J., Fujii Y., Miki M., Sader R., Chikazu, Ghanaati S., Kawase-Koga Y.* 2023. Platelet-Rich fibrin-conditioned medium as an alternative to fetal bovine serum promotes osteogenesis of human dental pulp stem cells. *Bioengineering* V. 10. P. 1196.
- Hsu Y-H., Chen C-N., Chang H-I., Tsai H-L., Chang Y-H., Cheng I-S., Yang Y-S., Huang K-Y.* 2023. Manipulation of osteogenic and adipogenic differentiation of human degenerative disc and ligamentum flavum derived progenitor cells using IL-1 $\beta$ , IL-19 and IL-20. *Eur. Spine J.* V. 32. P. 3413.  
<https://doi.org/10.1007/s00586-023-07878-z>

- Huang H.I., Chen S.K., Ling Q.D., Chien C.C., Liu H.T., Chan S.H.* 2010. Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. *Tiss. Eng. A*. V. 16. P. 1491.  
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0431>
- Kanafi M. and Bronde R.* 2024. Diverse approaches toward application of dental pulp stem cells from human permanent and deciduous teeth in the treatment of diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* V. 20: e210323214822.  
<https://doi.org/10.2174/1573399819666230321120734>
- Kim S., Kwon S., Chung S., Lee E., Park S., Choi J. Oh S., Ryu G., Jeon H., Chang J.* 2023. Nervonic acid inhibits replicative senescence of human Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells. *Int. J. Stem Cells*. V. 17. P. 80.  
<https://doi.org/10.15283/ijsc23101>
- Li J., Xu S-Q., Zhao Y-M, Yu S., Ge L-H., Xu B-H.* 2018. Comparison of the biological characteristics of human mesenchymal stem cells derived from exfoliated deciduous teeth, bone marrow, gingival tissue, and umbilical cord. *Mol. Med. Rep.* V. 18. P. 4969.  
<https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9501>
- Lifshagerd M., Safari F.* 2023. Therapeutic effects of hAMSCs secretome on proliferation of MDA-MB-231 breast cancer cells by the cell cycle arrest in G1/S phase. *Clin. Transl. Oncol.* V. 25. P. 1702.  
<https://doi.org/10.1007/s12094-022-03067-4>
- McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M.* 2016. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger. 140 p.
- Mahmoodi M., Cheraghi E., Riahi A.* 2024. The effect of Warton's Jelly-derived conditioned medium on the in vitro maturation of immature oocytes, embryo development and genes expression involved apoptosis. *Reprod. Sci.* V. 31. P. 190.  
<https://doi.org/10.1007/s43032-023-01345-2>
- Mamidi M.K., Pal R., Mori N.A., Arumugam G., Thrichelvam S.T., Noor P.J., Abdullah H.M., Gupta P.K., Das A.K., Zakaria Z., Bhonde R.* 2011. Co-culture of mesenchymal-like stromal cells derived from human foreskin permits long term propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *J. Cell Biochem.* V. 112. P. 1353.  
<https://doi.org/10.1002/jab.23052>
- Mert S., Malyaran H., Craveiro R., Wolf M., Modabber A., Jahnen-Dechent W., Neuss S.* 2023. Comparative analysis of proliferative and multilineage differentiation potential of human periodontal ligament stem cells from maxillary and mandibular molars. *J. Periodontol.* V. 94. P. 882.  
<https://doi.org/10.1002/JPER.22-0706>
- Monterubbianesi R., Bencun M., Pagella P., Woloszyk A., Orsini G., Mitsiadis T.A.* 2019. A comparative *in vitro* study of the osteogenic and adipogenic potential of human dental pulp stem cells, gingival fibroblasts and foreskin fibroblasts. *Sci. Rep.* V. 9. P. 1761.
- Mou C., Wang X., Li W., Li Z., Liu N., Xu Y.,* 2023. Efficacy of mesenchymal stromal cells intraspinal transplantation for patients with different degrees of spinal cord injury: A systematic review and meta-analysis. *Cytotherapy.* V. 25. P. 530.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2023.01.012>
- Ozkinay C., Mitelman F.* 1979. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous Gand C-banding in human chromosomes. *Hereditas.* V. 90. P. 1.  
<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1979.tb01287.x>
- Poblano-Perez L., Casto-Manrreza, Gonzalez-Alva P., Fajardo-Orduna G., Montesinos J.* 2024. Mesenchymal stromal cells derived from dental tissues: Immunomodulatory properties and clinical potencial. *Int. J. Mol. Sci.* V. 25. P. 1986.  
<https://doi.org/10.3390/ijms25041986>
- Poljanskaya G., Bobkov D., Koltsova A., Musorina A., Mikhailova N.* 2022. Creation, working principles, development of applied and scientific activities of the Collection of Cell Cultures of Vertebrate. (review). *Biol. Commun.* V 67. P 312.  
<https://doi.org/10.21638/spbu03.2022.406>
- Rahmani-Moghadam E., Zarrin V., Mahmoodzadeh A., Owrang M., Talaei-Khozani T.* 2022. Comparison of the characteristics of Breast Milk derived stem cells with the stem cells derived from the other sources: a comparative review. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* V. 17. P. 71.  
<https://doi.org/10.2174/1574888X16666210622125309>
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C.M.* 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* V. 98. P. 2615.  
<https://doi.org/10.1182/blood.v98.9.2615>
- Riekstina U., Cakstina I., Parfejevs V., Hoogduijn M., Jankovskis G., Muiznieks I., Muceniece R., Ancans J.* 2009. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev.* V. 5. P. 378. <https://doi.org/10.1007/s12015-009-9094-9>
- Rojas J., Munerala L., Mira S.* 2024. Comparison between platelet lysate, platelet lysate serum and Fetal bovine serum as supplements for cell culture, expansion, and cryopreservation. *Biomedicines.* V. 12. P. 140.  
<https://doi.org/10.3390/biomedicines12010140>
- Sattar M., Lingens L., Guillaume V., Goetzl R., Beier J., Ruhl T.* 2024. Association between donor age and osteogenic potencial of human adipose stem cells in bone tissue engineering. V. 46. P. 1424.  
<https://doi.org/10.3390/cimb46020092>

- Saxena P., Srivastava J., Rai B., Tripathy N., Raza S., Sinha R., Gupta R., Yadav S., Nityanand S., Chaturvedi C.* 2024. Elevated senescence in the bone marrow mesenchymal stem cells of acquired aplastic anemia patients: a possible implication of DNA damage responses and telomere attrition. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* V. 1870: 167025. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2024.167025>
- Selvaraj S., Rupert S., Nandabalan S., Anbalagan C., Rajaram P., Satyanesan J., Vennila R., Rajagopal S.* 2024. Effect of cell-derived matrices on growth and differentiation of human Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs.* V. 213. P. 67. <https://doi.org/10.1159/000526153>
- Semenova E., Grudniak M. P., Machaj E.K., Bocian K., Chroscinska-Krawczyk M., Trochonowicz M., Stepaniec I.M., Murzyn M., Zagorska K.E., Boruczkowski D. Kolanowski T.J., Oldak T., Rozwadowska N.* 2021. Mesenchymal stromal cells from different parts of umbilical cord: approach to comparison and characteristics. *Stem Cell Rev. Rep.* V. 17. P. 1780. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10157-3>
- Sensebé L., Krampfer M., Schrezenmeier H., Bourin P., Giordano R* 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* V. 98. P. 93. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01227.x>
- Shin S., Lee J., Kwon Y., Park K-S, Jeong J-H., Choi S-J., Bang S., Chang J., Lee C.* 2021. Comparative proteomic analysis of the mesenchymal stem cells secretome from adipose, bone marrow, placenta and Wharton's jelly. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22: 845. <https://doi.org/10.3390/ijms22020845>
- Sonoyama W., Liu Y., Yamaza T., Tuan RS., Wang S., Shi S., Huang G.T.* 2008. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J. Endod.* V. 34. P. 166. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.021>
- Sousa A., Coelho P., Leite F., Teixeira C., Rocha A., Santos I., Baylina P., Fernandes R., Soares R., Costa R, Gomes A.* 2023. Impact of umbilical cord mesenchymal stromal/stem cell secretome and cord blood serum in prostate cancer progression. *Hum. Cell.* V. 36. P. 1160. <https://doi.org/10.1007/s13577-023-00880-z>
- Stanko P., Kaiserova K., Altanerova V., Altaner C.* 2014. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Bio. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* V. 158. P. 373. <https://doi.org/10.5507/bp.2013.078>
- Szepesi A., Manila Z., Szigeti A., Varady G., Szalma J., Szabo G., Ghur F., Sarkadi B., Nemet K.* 2016. *In vitro* characterization of human mesenchymal stem cells isolated from different tissues with a potential to promote complex bone regeneration. *Stem Cells Int.* V. 2016: 3595941. <https://doi.org/10.1155/2016/3595941>
- Tai C., Wang L., Xie Y., Gao T., Huang F., Wang B.* 2021. Analysis of key distinct biological characteristics of human placenta-derived mesenchymal stromal cells and individual heterogeneity attributing to donors. *Cell Tiss. Organs.* V. 210. P. 45. <https://doi.org/10.1159/000513038>
- Tan S., Aisyah P., Firmansyah Y., Nathasia N., Budi E., Hendrawan S.* 2023. Effectiveness of secretome from human umbilical cord mesenchymal stem cells in gel (10% SM- hUCMSC Gel) for chronic wounds (Diabetic and Trophic Ulcer) – Phase 2 Clinical trial. *J. Multidiscip Healthc.* V. 16. P. 1763. <https://doi.org/10.2147/JMDH.S408162>
- Tomcy T.A., Sindhu E.* 2023. Mesenchymal stem cells- an excellent therapeutic agent for cancer. *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* V. 20. P. 7. <https://doi.org/10.1111/ajco.13969>
- Topoluk N., Hawkins R., Tokish J., Mercuri J.* 2017. Amnionic mesenchymal stromal cells exhibit preferential osteogenic and chondrogenic differentiation and enhanced matrix production compared with adipose mesenchymal stromal cells. *Am. J. Sports Med.* V. 45. P. 2637. <https://doi.org/10.1177/0363546517706138>
- Turano E., Scambi I., Virla F., Bonetti B., Mariotti R.* 2023. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells: towards novel therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24. P. 2917. <https://doi.org/10.3390/ijms24032917>
- Wu W., Zhou J., Xu C-T., Zhang J., Jin Y-J., Sun G-L.* 2022. Derivation and growth characteristics of dental pulp stem cells from patients of different ages. *Mol. Med. Rep.* V. 12. P. 5127. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4106>
- Yi X., Liu F., Chen F., Wang Y., Gao Y.* 2022. Comparison of biological characteristics of placenta mesenchymal stem cells derived from fetus. *Chin. J. Biotechnol.* V. 38. P. 1183. <https://doi.org/10.13345Zj.cjb.210244>
- Yigitbilek F., Conley S.M., Tang H., Saadiq I.M., Jordan K.L., Lerman L.O: Taner T.* 2021. Comparable *in vitro* function of human liver-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells: Implications for cell-based therapy. *Front Cell Dev. Biol.* V. 9: 641792. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.641792>
- Zhang W., Walboomers X.F., Shi S., Fan M., Jansen J.A.* 2006. Multilineage differentiation potential of

stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng.* V. 12. P. 2813.

<https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2813>

Zhao Q., Larios K., Naaldijk Y., Sherman L., Chemerinski A., Okereke K., Rameshwar P., Lemenze A., Douglas N., Morelli S. 2023. Mesenchymal stem cell secretome alters gene expression and upregulates motility of human endometrial stromal cells. *Reproduction.* V. 166. P. 161.

<https://doi.org/10.1530/REP-22-0485>

Zhu X., Xu X., Shen M., Wang Y., 2023. Transcriptomic heterogeneity of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, dental pulp, adipose tissue and umbilical cord. *Cell Reprogram.* V. 25. P. 162.

<https://doi.org/10.1089/cell.2023.0019>

Zou D., Vigen M., Putman A., Cao C., Tarle S., Guinn T., Kaigler D. 2022. Phenotypic, trophic, and regenerative properties of mesenchymal stem cells from different osseous tissues. *Cell Tiss. Res.* V. 388. P. 75.

<https://doi.org/10.1007/s00441-021-03563-z>

## NEW LINE OF MESENCHYMAL STEM CELL ISOLATED FROM WARTON'S JELLY OF THE UMBILICAL CORD OF MALE HUMAN DONOR

A. M. Koltsova<sup>a</sup>\*, A. S. Musorina<sup>a</sup>, A. N. Shatrova<sup>a</sup>, V. I. Turilova<sup>a</sup>,  
T. K. Yakovleva<sup>a</sup>, G. G. Poljanskaya<sup>a</sup>,\*\*

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

\* *E-mail: koltsova.am@mail.ru*

\*\* *E-mail: gpolanskaya@gmail.com*

A new non-immortalized fibroblast-like cell line, named MSCWJ-3, was generated and characterized. Characteristics during long-term cultivation (6–24 passages) confirm the status of MSCs. It is shown: 1) a gradual increase in the proportion of senescent cells during long-term cultivation; 2) a significant decrease in the proliferation index by the 24th passage; 3) preservation of the normal diploid karyotype of the man (46, XY) during the entire period of cultivation, trisomy for different autosomes in single cells, absence of structural chromosomal rearrangements; 4) a high proportion of cells carrying surface antigens characteristic of MSCs: CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC and a low proportion with antigens CD34, CD45 and HLA-DR over 24 passages. Cells of the MSCWJ-3 line are capable of differentiation in the osteogenic and adipogenic directions at early and late passages; differentiation in the chondrogenic direction is absent. In general, there are some differences with previously obtained lines isolated from the same source and are associated mainly with the degree of expression of a number of status characteristics.

**Keywords:** human mesenchymal stem cells, replicative senescence, proliferative activity, cell surface markers, karyotype, differentiation

УДК 576.3:576.53

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ/СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЛОШАДИ В БЕССЫВОРОТОЧНОЙ СРЕДЕ

© 2024 г. И. П. Савченкова\*

Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, Москва, 109428, Россия

\* E-mail: s-ip@mail.ru

Поступила в редакцию 02.04.2024

После доработки 16.04.2024

Принята к публикации 17.04.2024

Мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК), выделенные из жировой ткани (ЖТ) лошадей, представляют собой перспективный материал для создания биоветеринарных продуктов с целью профилактики и лечения многих заболеваний. Производство этих клеток для клинического применения требует совершенствования условий бессывороточного культивирования. Микроокружение может оказывать влияние на свойства МСК. Считается, что требования к условиям культивирования без сыворотки крови животных являются видоспецифичными. Целью настоящего исследования было оценить коммерчески доступную бессывороточную среду (БС) MesenCult (STEMCELL Technologies, США), созданную для МСК человека, для культивирования МСК(ЖТ) лошади. Одну часть клеток размножали в течение 10 пассажей в стандартной среде ДМЕМ с низким содержанием глюкозы (1 г/л) и 10% сыворотки крови плодов коров (СКПК), а вторую – в БС. Результаты показывают, что размножение МСК лошади в БС (MesenCult), предназначенной для культивирования МСК человека, возможно, так как клетки хорошо к ней адаптируются и сохраняют свойства, характерные для клеток, которые культивируются в ДМЕМ с СКПК: морфологию, скорость роста, время удвоения и митотический индекс, клонообразующие способности, диплоидный набор хромосом, большое количество клеток с фенотипом CD90 (90.8%) и низкое с фенотипом CD31 (0.8%), CD34 (0.9%), а также потенции при индукции к дифференцировке в адипо-, остео- и хондрогенном направлениях. МСК(ЖТ) лошади демонстрировали стабильные характеристики после культивирования в течение 10 пассажей в БС, что обеспечивает многообещающую основу для их дальнейшего использования. Наши результаты демонстрируют, что среда MesenCult может быть альтернативой для бессывороточного культивирования МСК(ЖТ) лошади с целью их размножения в предклинических исследованиях.

**Ключевые слова:** мезенхимные стволовые/стромальные клетки, лошадь, жировая ткань, культивирование, бессывороточная среда MesenCult

**Принятые сокращения:** БС – бессывороточная среда; КМ – костный мозг; ЖТ – жировая ткань; МСК – мезенхимные стволовые/стромальные клетки; ПК – пуповинная кровь; СКПК – сыворотка крови плодов коров.

**DOI:** 10.31857/S0041377124040043 **EDN:** QCYGNE

Клетки, выделенные из разных источников тканей, таких как костный мозг (КМ), жировая ткань (ЖТ), пуповинная кровь (ПК), плацента, дентин пульпы зуба, дерма кожи, с фенотипом мезенхимных стволовых/стромальных клеток (МСК) у разных видов животных, в том числе и человека, демонстрируют схожие свойства при адаптации их к условиям культивирования. Это вытянутые веретенообразные клетки с фибробластоподобной морфологией, с круглым или овальным ядром, в котором хорошо

визуализируются 2–4 ядрышка. Они обладают высокой адгезивной способностью, быстро прикрепляются ко дну культурального флакона, размножаются, образуя монослой, имеют клонообразующие способности и сохраняют во время длительного культивирования геномную стабильность при самообновлении (более 50–55 цитогенераций). До сих пор не найден специфический маркер (ген), экспрессия которого бы на транскрипционном или трансляционном уровнях, подтверждала их происхождение.

Поэтому эти клетки оцениваются по транскриптому (комплексу мРНК) и/или иммунофенотипу (комплексу CD-маркеров), который характеризуется наличием поверхностных антигенов CD73, CD90, CD105 и отсутствием CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a или CD19 или антигенов комплекса гистосовместимости класса II (HLA II, лейкоцитарные антигены класса II человека). Основным критерием принадлежности клеток к популяции МСК остается функциональный тест *in vitro* – способность при индукции к дифференцировке в адипо-, остео- и хондрогенном направлениях. Эти клетки должны обладать прогениторными свойствами – дифференцироваться во все типы клеток костной, хрящевой и жировой тканей (Dominici et al., 2006; Bianco et al., 2008; Andrzejska et al., 2019).

В последние годы МСК исследуются на предмет их потенциального клинического применения при различных заболеваниях, включая ортопедические травмы и воспалительные/иммуноопосредованные заболевания (Jones, McTaggart, 2008; Menard et al., 2020; Watanabe et al., 2021; Паюшина и др., 2022). Учитывая иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства, Каплан (Caplan, 2017) предложил называть их медицинскими сигнальными клетками (medicinal signaling cells). Для лечения широкого спектра заболеваний разрабатываются клеточные, на основе МСК, (Wang et al., 2016) и неклеточные (кондиционированная среда, экзосомы) продукты (Huang, Lai, 2019; Nan et al., 2022). Число клинических исследований, успешно завершивших фазу II и вошедших в фазу III, растет с каждым годом (Moll et al., 2019; Viswanathan et al., 2021). Чтобы получить терапевтически значимое количество МСК, необходимо адаптировать их к условиям *in vitro* и размножить. Микроокружение может оказать огромное влияние на свойства клеток. Стандартные условия их культивирования требуют наличия среды ДМЕМ с низким содержанием глюкозы (1 г/л), которую дополняют 10% сыворотки крови плодов коров (СКПК или FBS в англоязычной литературе) (Zuk et al., 2002; Тепляшин и др., 2005).

Ростовые среды на основе СКПК представляют потенциальную угрозу заражения клеток патогенами, такими как микоплазмы,

вирусы и прионы; последние из перечисленных могут быть источником распространения трансмиссивной губчатой энцефалопатии. Сыворотка крови животных – самый нестабильный компонент питательной среды вследствие ее изменчивости от партии к партии (сохраняются проблемы, касающиеся ее сбора), а также ожидаемой нехватки в будущем, когда клеточная терапия будет использоваться более интенсивно. В качестве замены СКПК в среде для культивирования МСК человека, рассматривается лизат тромбоцитов (Gottipamula et al., 2013). Продемонстрировано, что добавление его в среду увеличивает пролиферацию МСК человека по сравнению со средой, которая содержит СКПК, и не влияет на экспрессию генов поверхностных антигенов клеток (Jung et al., 2012; Kinzschbach, Bieback, 2013), кроме HLA-DR (Dam et al., 2021). С точки зрения варибельности состава лизата тромбоцитов от партии к партии, возможного загрязнения патогенами, а также вероятности нехватки поставок в будущем, эта добавка имеет те же недостатки, что и сыворотка крови животных. Многие работники по-прежнему выращивают МСК в среде с добавлением СКПК. Международное общество клеточной терапии (ISCT) недавно обратилось к этому вопросу, стремясь к достижению соглашения по поводу заменителей сыворотки и бессывороточных сред (БС) для клеточной терапии (Karnieli et al., 2017).

Поиск условий культивирования, свободных от ксенобелков, для снижения вероятности возникновения иммунных реакций на чужеродные белки и передачи инфекционных заболеваний, позволил разработать для МСК человека подходящее микроокружение без сыворотки крови животных (Gottipamula et al., 2013; Bhat et al., 2021). Эти среды, например, StemPro<sup>®</sup>MSC SFM XenoFree (Thermo FS, США), StemMACS<sup>™</sup> MSC Expansion Media Kit XF (Miltenyi Biotec, Германия), CellCor<sup>™</sup>CD<sup>MSC</sup> (XCELL, Республика Корея) и другие содержат очищенные или рекомбинантные белки и синтетические пептиды. БС были разработаны для размножения МСК человека и изучены в такой же степени, как и среды на основе лизата тромбоцитов. Было продемонстрировано, что МСК человека пролиферируют в таких условиях и сохраняют способность к дифференцировке

при индукции, однако имеются также сообщения об индуцированном старении клеток *in vitro* (Lee et al., 2022). Анализ данных, приведенных в вышеперечисленных источниках научной литературы по использованию БС для МСК человека, носят противоречивый характер. БС могут отличаться от партии к партии, их состав недоступен исследователям, что усложняет поиск наиболее подходящей среды для размножения МСК с целью создания клеточного продукта и их клинического применения. В соответствии с рекомендациями, опубликованными ISCT (Karnieli et al., 2017), крайне важно оценить влияние конкретных условий бессывороточного культивирования на конкретный тип МСК, предназначенных для клеточной терапии. В идеале переход на БС должен быть осуществлен на ранней стадии таких исследований, чтобы можно было изучить эффективность и механизм ее действия.

Опубликованные исследования по пригодности БС в основном сосредоточены на культивировании МСК(КМ) и МСК(ЖТ) человека. Бессывороточная культура МСК крупных животных рассматривалась лишь в очень небольшом количестве исследований (Naskou et al., 2018; Hagen et al., 2022; Pilgrim et al., 2022). Аутологичные модели животных часто используются при трансляционной разработке терапии МСК для медицины человека, при этом было бы желательно работать с МСК, культивируемыми в сравнимых условиях культивирования, которые предназначены для оценки конечного клеточного продукта. Более того, клеточная терапия разрабатывается не только для медицины, но и для ветеринарии, что требует адекватных производственных процессов и одобрения регулирующих органов (Borjesson, Pegoni, 2011). Поскольку клеточные продукты на основе МСК все чаще используются для лечения собак и лошадей (Victorova, Savchenkova, 2020; Platonova et al., 2021), производство этих клеток для клинического применения требует совершенствования систем культивирования для удовлетворения потребностей в их большом количестве и удалении ксенобелков.

Следует отметить, что в настоящее время имеется недостаточно данных по созданию БС для поддержания МСК животных. У лошадей МСК выделяют из разных источников тканей (Vidal et al., 2012; Коровина и др., 2015). Их

функциональные свойства в значительной степени охарактеризованы (Коровина и др., 2017; de Schauwer et al., 2011), и накапливаются данные об успешном применении их в клеточной терапии лечения ортопедических заболеваний лошадей (Govoni, 2015; Jammes et al., 2023, Petrova, Vachkova 2023). В связи с этим поведение МСК лошадей в бессывороточных условиях культивирования представляет интерес.

Цель данного исследования заключалась в оценке коммерчески доступной БС MesenCult (STEMCELL Technologies, США) для культивирования МСК(ЖТ) лошадей.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клетки и их культивирование.** В работе использовали клетки с фенотипом, подобным МСК, полученные из ЖТ здоровых лошадей в возрасте  $5 \pm 2.5$  лет, которые были охарактеризованы, заморожены на 2–3 пассажах культивирования и хранились в криобанке Лаборатории стволовых клеток ФНЦ Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии РАН (Москва). Одну ампулу клеток размораживали в один культуральный флакон с площадью роста  $25 \text{ см}^2$  и после образования клеточного монослоя пересевали в два одинаковых флакона в соотношении 1:2 (0-й пассаж). Клетки 1-го флакона культивировали в обычных условиях (контроль), т. е. в среде Игла в модификации Дюльбекко (ДМЕМ; “ПанЭко”, Россия), которая содержала 1 г/л глюкозы, 10% СКПК (INTL KANG, Китай) и однократный раствор заменимых аминокислот (Gibco, Invitrogene, Life Technologies, США) без антибиотиков. Клетки 2-го флакона культивировали в БС MesenCult human (STEMCELL Technologies, США), как рекомендовано производителем. Среда MesenCult представляет собой стандартизованную базальную среду, в которую вносят дополнительно добавку MesenCult, стимулирующую размножение МСК человека *in vitro*.

Для культивирования клеток использовали стандартные культуральные флаконы с площадью посева  $25 \text{ см}^2$  (SPL, Корея). Клетки пассировали в соотношении 1:5. Плотность клеток при пассировании составляла  $5 \cdot 10^3$  клеток на  $1 \text{ см}^2$ . Для отделения клеток от дна флакона при пассировании их обрабатывали

0.4%-ным раствором Версена (“ПанЭко”, Россия), а затем 0.25%-ным раствором трипсина (“ПанЭко”, Россия). Культивирование проводили в стандартных условиях при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в увлажненной атмосфере, меняя среду два раза в неделю. Клетки культивировали до 10-го пассажа включительно.

**Оценка свойств МСК(ЖТ) в культуре.** МСК оценивали по морфологии, адгезии ко дну культурального пластика, скорости и качеству формируемого клеточного монослоя, способности клеток к размножению.

**Морфологический анализ клеток,** растущих в разных средах, проводили на 4-е сут после посева, на 4-м и 10-м пассажах в окрашенных препаратах (краситель “Гимза”, “ПанЭко”, Россия) визуальным с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения AxioVision Rel. 4.8. (<http://www.zeiss.com>)

**Скорость формирования монослоя** клеточных популяций, посеянных в одной и той же концентрации, оценивали по динамике изменения количества клеток, вплоть до момента образования ими 100%-ного монослоя.

**Продолжительность клеточного цикла** в исследуемых МСК определяли на основании данных о времени удвоения числа клеток. Долю клеток в фазе G<sub>0</sub> не учитывали. Среднее время удвоения числа клеток рассчитывали по формуле  $t_d = t / \log_2(N_t / N_0)$ , где  $t_d$  – время удвоения числа клеток,  $t$  – время между начальным и конечным подсчетом клеток,  $N_0$  и  $N_t$  – число клеток в начале и конце эксперимента соответственно.

**Митотический индекс** для каждой популяции клеток рассчитывали в фазе логарифмического роста как отношение числа митозов к общему числу подсчитанных клеток, умноженное на 1000 (в ‰).

**Способность клонообразования** анализировали на 10-м пассаже культивирования клеток в разных средах. Для этого МСК пассировали при плотности  $1 \cdot 10^3$  в культуральные флаконы (25 см<sup>2</sup>). Эффективность клонообразования рассчитывали в процентах, как отношение числа сформированных клонов к общему числу посеянных клеток.

**Кариотипический анализ МСК(ЖТ) лошади.** Митоз МСК в логарифмической фазе роста блокировали 100-кратным раствором колхицина

(“Биолог”, Россия) в конечной концентрации 0.1 мкг/мл в течение 4 ч. Клетки снимали с субстрата как описано выше, осаждали высокоскоростным центрифугированием (500 g, 10 мин), затем проводили гипотоническую обработку смесью 0.075 М раствора KCl и 1%-ного раствора цитрата натрия. Клетки фиксировали (трижды) смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3:1) с последовательным их осаждением высокоскоростным центрифугированием (500 g, 10 мин). Клетки раскапывали на предметное стекло и окрашивали 1%-ным раствором Гимза для количественного кариотипического анализа. Для каждой группы МСК(ЖТ) лошади на 10-м пассаже оценивали не менее 20 метафазных пластинок.

**Иммуноцитохимический анализ.** Наличие поверхностных антигенов (АГ) на МСК(ЖТ) анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на цитометре Epics Elite Coulter (США). Для этого клетки на 10-м пассаже после культивирования в разных средах (стандартная и БС) снимали с субстрата 0.25%-ным раствором трипсина, считали, отмывали и аликвоты по  $2 \cdot 10^5$  клеток инкубировали с мышинными антителами против антигенов человека: CD31, CD34, CD90 (Becton Dickinson, США), в разведении 1:30 (PBS, дополненный 2% СКПК) при 4°C в течение 45 мин в темноте. В качестве вторых использовали анти-мышинные IgG, меченые FITC той же фирмы. Присутствие каждого антигена оценивали по результатам трех экспериментов.

**Индукция адипо-, остео- и хондрогенной дифференцировок МСК(ЖТ).** Способность МСК к дифференцировке в трех направлениях *in vitro* изучали с использованием наборов для дифференцировки StemPro® (Gibco by Life Technologies, США). Клетки на 4-м и 10-м пассажах переносили в 24-луночные планшеты при плотности  $1 \cdot 10^4$  кл./см<sup>2</sup>. По достижении 70–80%-ного монослоя питательную среду удаляли и добавляли соответствующую индукционную, которую меняли каждые 3–4 сут. Эффективность дифференцировки оценивали на 21 сут культивирования. Клетки фиксировали метанолом, охлажденным до –20°C (Mason Fine Chemicals, США) в течение 30 мин, и окрашивали специфическими красителями. Липидные включения в цитоплазме клеток при адипогенной дифференцировке выявляли

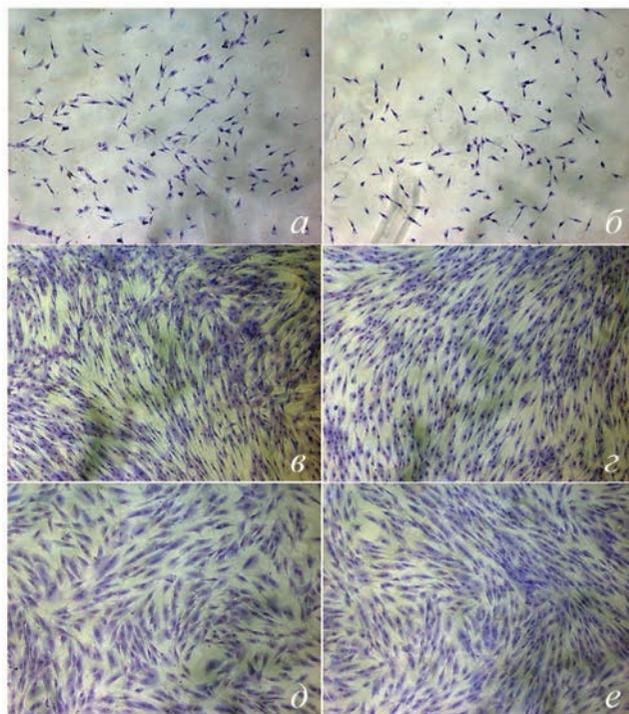
визуально под микроскопом. Эффективность остеогенной дифференцировки анализировали по окраске карбонатов и фосфатов кальция методом серебрения по Ван Косса с помощью набора (Bio-Optica, Италия). Дифференцировку в хондрогенном направлении в монослой выявляли окрашиванием полисахаридов и муцинов альциановым синим (“БиоВитрум”, Россия), в сочетании с гематоксилином Гарриса (“Лаб-поинт”, Россия).

**Статистический анализ.** Все эксперименты повторяли трижды. Полученные результаты представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений. Статистические сравнения между экспериментальными группами проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности  $P < 0.01$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Морфологический анализ.** Морфологические различия между МСК(ЖТ) лошади на 4-е сут после посева в разные экспериментальные группы (стандартные условия культивирования (ДМЕМ с 10% СКПК) и БС MesenCult для МСК человека) не были обнаружены. Клеточные популяции представлены узкими веретенообразными клетками с фибробластоподобной морфологией (рис. 1а, б), которые имели овальное или круглое ядро, расположенное в центре, с 2–4 ядрышками и однородную незернистую цитоплазму. В условиях короткого (4 пассажа) и более длительного культивирования (10 пассажей) в клеточной популяции, находящейся в БС, изменений морфологии клеток не наблюдали (рис. 1г, е) по сравнению с контрольной группой (рис. 1в, д) соответственно.

**Ростовые характеристики.** В стандартных условиях культивирования на ранних пассажах среднее время удвоения популяции МСК(ЖТ) лошади составляло  $46 \pm 0.01$  ч, митотический индекс — 34%, а в среде MesenCult эти показатели составляли  $48 \pm 0.03$  и 33% соответственно. К 10-му пассажу эти показатели менялись незначительно. Так, время удвоения в стандартных условиях было  $48 \pm 0.07$  с митотическим индексом 33%, а в среде БС  $46 \pm 0.01$  и 33% соответственно. По скорости роста МСК в двух экспериментальных группах не



**Рис. 1.** Морфология МСК(ЖТ) лошади, культивируемых в обычной среде (а, в, д) и БС MesenCult (б, з, е) на 4-е сут после посева (а, б) и на пассажах 4 (в, з) и 10 (д, е). Увел: об. 10×, ок. 10×.

различалась между собой ни в одном временном интервале их размножения ( $P \leq 0.01$ ). При посеве клеток в плотности  $2 \cdot 10^3$  на  $\text{cm}^2$  они формировали 100%-ный монослой в обеих группах через  $8 \pm 0.001$  сут культивирования.

Одной из характеристик МСК животных является способность их при низкой плотности посева образовывать клоны. Результаты наших исследований показали, что эффективность клонирования МСК(ЖТ) не зависела от способа их культивирования в среде ДМЕМ с СКПК или в среде MesenCult и составляла  $89 \pm 0.1\%$  и  $87 \pm 0.01\%$  соответственно.

**Кариотипический анализ.** В табл. 1 представлены результаты кариотипического анализа, выполненные на 4-м и 10-м пассажах культивирования МСК в стандартных условиях (контроль) и БС MesenCult соответственно. Количественный анализ хромосом показал, что МСК(ЖТ) лошади, культивируемые в среде с сывороткой крови и без нее, сохраняли диплоидный набор хромосом. Анеуплоидия, полиплоидия и случайные потери числа хромосом не были обнаружены.

**Таблица 1.** Кариотипический анализ МСК(ЖТ) лошади на ранних и поздних пассажах культивирования в разных условиях

Среда культивирования	№ пассажа	Метафазные пластинки (число)	Метафазы/число клеток	Анеуплоидия (%)	Полипloidия, %	Случайные потери (число хромосом)	Кариотип (число хромосом, %)
DMEM + +10% СКПК	4	20	34/1000	0	0	0	64, XX (100)
	10	29	33/1000	0	0	0	64, XX (100)
BC MesenCult	4	21	33/1000	0	0	0	64, XX (100)
	10	20	36/1200	0	0	0	64, XX (100)

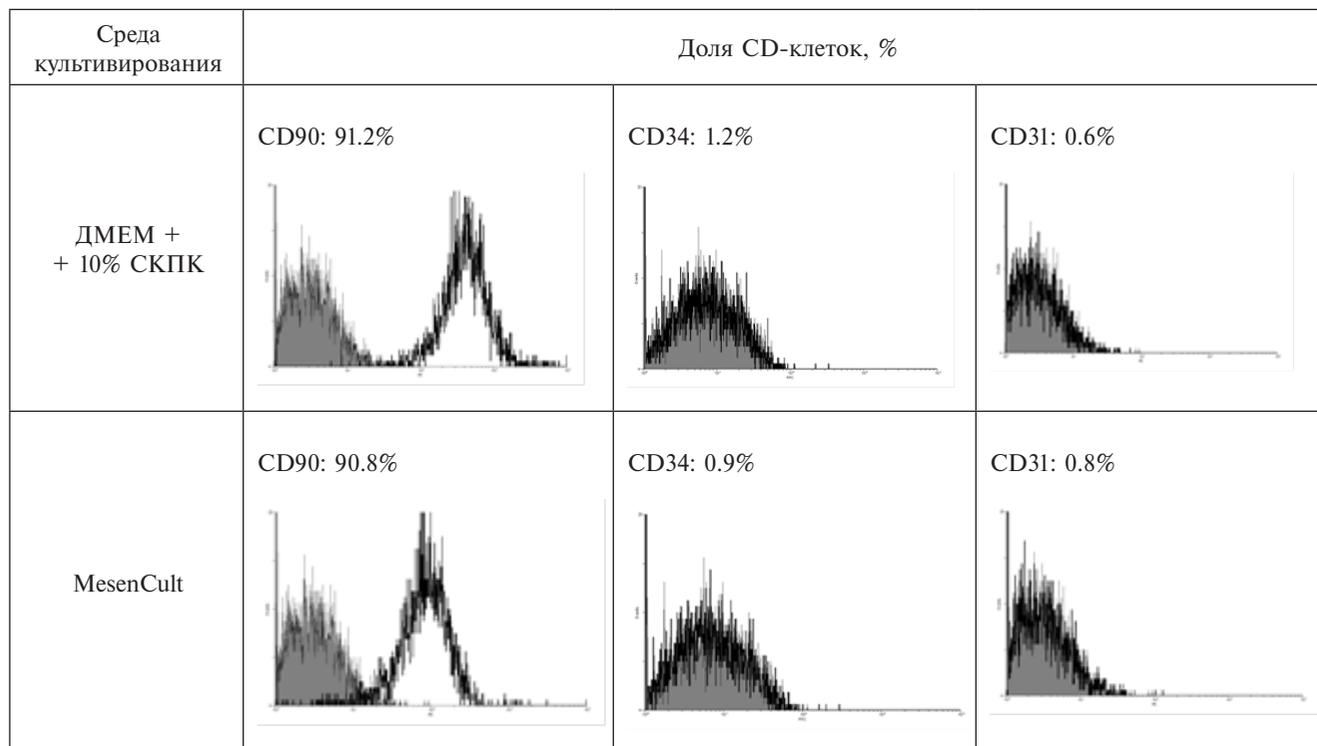
**Иммунофенотипирование.** При связывании с соответствующими мечеными антителами МСК лошади окрашиваются на CD44, CD90, CD105 и не окрашиваются на CD31, CD34 и CD45. Ранее мы показали, что мышинные антитела против антигенов человека обладают специфичностью при выявлении экспрессии генов некоторых поверхностных антигенов (CD31, CD34, CD90) на МСК, выделенных из пуповинной крови (ПК) лошади (Коровина и др., 2017). Мы использовали мышинные антитела против антигенов человека, основываясь на результатах работы, в которой было проанализировано 379 мышинных антител против кластера молекул дифференцировки человека на межвидовую кросс-реактивность с лейкоцитами лошади и показана возможность их использования (Ibrahim et al., 2007). В связи с этим, не имея специфичных антител против антигенов лошади, мы окрашивали МСК(ЖТ), культивируемые в разных условиях на 10-м пассаже, антителами против тех же антигенов, что и МСК(ПК) лошади.

Как видно из результатов, представленных на рис. 2, МСК(ЖТ) лошади не окрашивались на CD34 (сиаломуцин) и CD31 (PECAM), которые выявляются на поверхности гемопоэтических стволовых и эндотелиальных клеток соответственно. Количество клеток с фенотипом CD90<sup>+</sup> в условиях бессывороточного культивирования было сопоставимо с контролем и не менялось. Результаты показывают, что статистически значимых различий экспрессии одного из маркеров фенотипа МСК (CD90) не обнаружено ( $P \leq 0.01$ ). Ранее другими авторами (Shubert et al., 2018) было показано, что при культивировании МСК лошадей в BC (среде MACX) на 3-м

пассаже доля клеток положительно окрашенных на CD29 и CD90 варьировала от 60.3 до 99.3% и от 5.21 до 36.7% соответственно. Клетки, культивируемые в DMEM, показали более стабильную популяцию с фенотипом CD90<sup>+</sup> (86.2–99.5%).

**Прогениторные свойства МСК(ЖТ) лошади.** Из-за отсутствия панели специфичных антител против антигенов лошади в настоящих экспериментах оценивали влияние условий культивирования в присутствии и отсутствии СКПК на функциональные свойства МСК, а именно формировать при индукции клетки жировой, костной и хрящевой тканей. На 21-е сут культивирования МСК в среде, содержащей индукторы, которые направляют дифференцировку в направлении жировой ткани, наблюдали формирование адипоцитов с липидными везикулами как в клетках, культивируемых в стандартных условиях, так и в BC MesenCult (рис. 3а, б). При индукции МСК(ЖТ) в остеогенном направлении на 21-е сут окраска методом серебрения по Косса выявила наличие солей кальция в межклеточном пространстве в обеих группах, которые окрашивались в черный цвет (рис. 3в, г), а при индукции в хондрогенном направлении в это же время отмечали формирование клеточных пучков, которые окрашивались альциановым синим в синий цвет (рис. 3д, е). Таким образом, МСК(ЖТ) лошади *in vitro* сохраняли свои прогениторные свойства при индукции к дифференцировке независимо от способа их культивирования в течение 10 пассажей.

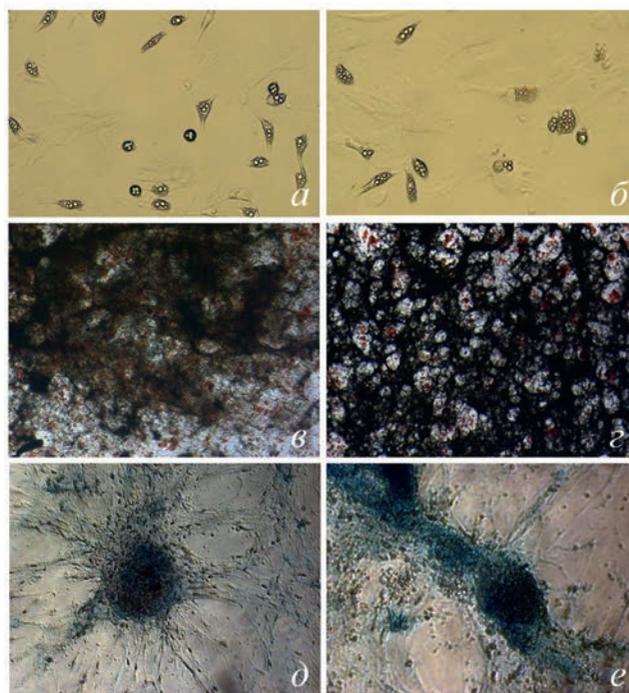
Результаты наших экспериментов показали, что МСК(ЖТ) лошади могут быть размножены в коммерчески доступной среде



**Рис. 2.** Гистограммы проточной цитометрии с использованием специфических антител, демонстрирующие количество клеток, несущих антигены CD31, CD34, CD90. Серым цветом выделены гистограммы, соответствующие контролю окрашиванию клеток IgG, меченными FITC; белым – гистограммы, соответствующие окрашиванию специфическими АТ, меченными FITC.

MesenCult, не содержащей СКПК, которая предназначена для культивирования МСК человека ([www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)). МСК сохраняли единообразную морфологию, характерную для этого типа клеток, на протяжении 10 пассажей и экспрессию гена поверхностного антигена CD90, сопоставимую с контрольной группой ( $P \leq 0.01$ ), а также при индукции были способны к дифференцировке в адипо-, остео- и хондрогенном направлениях.

В настоящее время сообщений о результатах, демонстрирующих возможность использования такой среды для поддержания клеток с фенотипом МСК других видов животных недостаточно. Высказывается предположение, что требования к условиям культивирования в БС являются видоспецифичными (Schubert et al., 2018). Это указывает на необходимость оптимизации БС для МСК соответствующих видов животных. Так, имеются данные о поддержании без ксенобелков МСК(ЖТ) собак и лошадей, которые не теряют свои прогениторные свойства (Clark et al., 2016). Однако удаление СКПК из систем культивирования МСК собак и лошадей



**Рис. 3.** Способность МСК(ЖТ) лошади формировать клетки жировой (а, б), костной (в, г) и хрящевой (д, е) тканей при индукции к дифференцировке после культивирования в течение 10 пассажей в стандартной среде и БС. Увел.: об. 20×, ок. 10×.

привело к снижению пролиферации этих клеток и изменению их иммуномодулирующих свойств *in vitro*. МСК лошади секретируют значительно меньше простагландина 2 (PGE<sub>2</sub>) и утрачивали способность ингибировать секрецию интерферона  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) активированными Т-лимфоцитами, в то время как у МСК(ЖТ) собак такого влияния не выявлено (Clark et al., 2016). Требуется дополнительные исследования для перехода к условиям размножения МСК животных в БС. Следует отметить, что в большинстве исследований на МСК животных, включая человека, не всегда проводился анализ влияния той или иной БС на экспрессию генов поверхностных антигенов, подтверждающих иммунофенотип МСК. Прогениторные свойства МСК после бессывороточного культивирования также оценивали в разной степени и эти данные тоже носят противоречивый характер (Lee et al., 2022; Chen et al., 2023).

В связи с этим предпринимаются попытки с помощью подбора комбинаций факторов роста разработать свою БС, способную поддерживать пролиферацию и клонообразующую способность МСК определенного вида *in vitro*. В результате такого подбора была создана БС, пригодная для культивирования МСК(ЖТ) собак (Devireddy et al., 2019), в которой характеристики роста клеток были сопоставимы с характеристиками, полученными в стандартной среде ДМЕМ, содержащей 10% СКПК. Кроме того, наличие поверхностных белков на клеточной поверхности и прогениторный потенциал МСК(ЖТ) собак в БС и в стандартных условиях также были схожими. Однако коммерческая БС, разработанная для культивирования МСК человека, не способствовала росту МСК(ЖТ) собак. В этой работе (Devireddy et al., 2019), продемонстрировано, что требования к факторам роста для выделения и размножения МСК(ЖТ) собак отличались от требований, предъявляемых к росту МСК(ЖТ) человека. Например, bFGF и TGF- $\beta$ 1 способствуют росту МСК(ЖТ) человека в культурах с БС. bFGF также поддерживает рост МСК(ЖТ) собак, в то время как TGF- $\beta$ 1 негативно влияет на эти клетки и снижает клеточную пролиферацию.

Анализ научных данных, полученных другими коллективами, показал, что условия бессывороточного культивирования МСК интенсивно изучаются применительно к чело-

веку (Gottiparmula et al., 2013; Oikonomopoulos et al., 2015; Bui et al., 2021) лошади и собаке (Pilgrim et al., 2022). При этом используются БС, большинство из которых коммерчески доступны, поэтому их составы не раскрыты и не могут сравниваться. Расшифровка компонентов БС все еще редко встречается в литературе. Осложняет оценку перспективности использования этих сред неоднородность клеточных популяций МСК из-за отсутствия стандартных методов их выделения различными группами, что уменьшает возможность сопоставлять результаты. Кроме того, существенным сдерживающим фактором является как отсутствие специфических антител против антигенов лошади, так и отсутствие гена-маркера, экспрессия которого была бы специфична именно для этих клеток.

Таким образом, результаты проведенных нами исследований показывают, что размножение МСК лошади в БС MesenCult, предназначенной для культивирования МСК человека, возможно, так как клетки хорошо к ней адаптируются и сохраняют свойства, характерные для них при культивировании в среде ДМЕМ с СКПК: морфологию, скорость роста, время удвоения и митотический индекс, клонообразующие способности, диплоидный набор хромосом, высокую долю клеток с фенотипом CD90 и низкое с фенотипом CD31, CD34, способности к дифференцировке в адипо-, остео- и хондородогенном направлениях. МСК(ЖТ) лошади демонстрировали стабильные характеристики после культивирования в течение 10 пассажей в БС, что обеспечивает многообещающую основу для их дальнейшего использования. Наши результаты подчеркивают важность контроля качества, включая функциональные анализы, всех отдельных образцов МСК, которые будут использоваться в доклинических исследованиях или ветеринарной терапии.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансировалась за счет средств бюджета ФНЦ — Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН (тема FGUG-2022-0010). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют исследования человека или животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор работы заявляет, что у нее нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Коровина Д.Г., Юров К.П., Алексеенкова С.В., Савченкова Е.А., Савченкова И.П.* 2017. Характеристика мультипотентных мезенхимных стволовых клеток, выделенных из пуповинной крови лошадей. *Росс. Сельскохозяй. наука.* № 2. С. 51. (*Korovina D.G., Yurov K.P., Alexeenkova S.V., Savchenkova E.A., Savchenkova I.P.* 2017. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from equine umbilical cord blood. *Russian Agricultural Sci.* V. 43. P. 262). <https://doi.org/10.3103/S1068367417030090>
- Коровина Д.Г., Юров К.П., Волкова И.М., Алексеенкова С.В., Васильева С.А., Савченкова Е.А., Савченкова И.П.* 2015. Пуповинная кровь лошадей как источник мультипотентных мезенхимных стволовых клеток. *Коневодство и конный спорт.* № 6. С. 31. (*Korovina D.G., Yurov K.P., Volkova I.M., Alexeenkova S.V., Vasilyeva S.A., Savchenkova E.A., Savchenkova I.P.* 2015. Equine umbilical cord blood as a source of multipotent mesenchymal stem cells. *Horse breeding and equestrian sport.* No. 6. P. 31).
- Паюшина О. В., Цомартова Д.А., Черешнева Е.В., Иванова М.Ю., Ломановская Т.А., Павлова М.С., Кузнецов С.Л.* 2023. Активация эндогенных мезенхимных стромальных клеток как подход к регенерации тканей. *Цитология.* Т. 65. № 2. С. 119–130. (*Payushina O. V., Tsomartova D.A., Cheresheva Ye.V., Ivanova M. u., Lomanovskaya T.A., Pavlova M.S., Kuznetsov S.L.* 2023. Activation of endogenous mesenchymal stromal cells as an approach to tissue regeneration. *Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya).* V. 17. No. 4. P. 328.) <https://doi.org/10.1134/S1990519X23040065>
- Тепляшин А.С., Коржикова С.В., Шарифуллина С.З., Чупикова Н.И., Ростовская М.С., Савченкова И.П.* 2005. Характеристика мезенхимных стволовых клеток человека, выделенных из костного мозга и жировой ткани. *Цитология.* Т. 47. № 2. С. 130 (*Tepliashin A.S., Korzhikova S.V., Sharifullina S.Z., Chupikova N.I., Rostovskaia M.S., Savchenkova I.P.* 2005. Characteristics of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Tsitologiya.* V. 47. № 2. P.130.)
- Andrzejewska A., Lukomska B., Janowski M.* 2019. Mesenchymal stem cells: from roots to boost. *Stem Cells.* V. 37. P. 855. <https://doi.org/10.1002/stem.3016>
- Bhat S., Viswanathan P., Chandanala S., Prasanna S.J., Seetharam R.N.* 2021. Expansion and characterization of bone marrow derived human mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Sci. Rep.* V. 11. P. 3403. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83088-1>
- Bianco P., Robey P.G., Simmons P.J.* 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* V. 2. P. 313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.03.002>
- Borjesson D.L., Peroni J.F.* 2011. The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. *Clinics Lab. Med.* V. 31. P. 109. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.12.001>
- Caplan A.I.* 2017. Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem Cells Transl. Med.* V. 6. P. 1445. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
- Bui H.T.H., Nguyen L.T., Than U.T.T.* 2021. Influences of xeno-free media on mesenchymal stem cell expansion for clinical application. *Tiss. Eng. Regen. Med.* V. 18. P.15. <https://doi.org/10.1007/s13770-020-00306-z>
- Chen C., Hou X., Jing F., Wang T., Feng L., Kang Y.J.* 2023. Alteration of ranscriptomic profile and antiseptic efficacy of adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells under different culture conditions. *Stem Cells Dev.* V. 32. P. 75. <https://doi.org/10.1089/scd.2022.0238>
- Clark K.C., Kol A., Shahbenderian S., Granick J.L., Walker N.J., Borjesson D.L.* 2016. Canine and equine mesenchymal stem cells grown in serum free media have altered immunophenotype. *Stem Cell Rev. Rep.* V.12 P. 245. <https://doi.org/10.1007/s12015-015-9638-0>
- Dam P.T.M., Hoang V.T., Bui H.T.H., Hang L.M., Hoang D.M., Nguyen H.P., Lien H.T., Tran H.T.T., Nguyen X.H., Nguyen T.L.* 2021. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells exhibit high HLA-DR levels and altered cellular characteristics under a xeno-free and serum-free condition. *Stem Cell Rev. Rep.* V. 17. P. 2291. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10242-7>
- De Schauwer C., Meyer E., Van de Walle G.R., Van Soom A.* 2011. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenol.* V. 75. P. 1431. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.008>

- Devireddy L.R., Myers M., Screven R., Liu Z., Boxer L.* 2019. A serum-free medium formulation efficiently supports isolation and propagation of canine adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *PLoS One*. V. 14: e0210250.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210250>
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj, Horwitz E.* 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. V. 8. P. 315.  
<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Gottipamula S., Muttigi M.S., Kolkundkar U., Seetharam R.N.* 2013. Serum-free media for the production of human mesenchymal stromal cells: a review. *Cell Prolif.* V.46. P.608.  
<https://doi.org/10.1111/cpr.12063>
- Govoni K.E.* 2015. Horse species symposium: use of mesenchymal stem cells in fracture repair in horses. *J. Anim. Sci.* V. 93. P. 871.  
<https://doi.org/10.2527/jas.2014-8516>
- Hagen A., Niebert S., Brandt V.P., Holland H., Melzer M., Wehrend A., Burk J.* 2022. Functional properties of equine adipose-derived mesenchymal stromal cells cultured with equine platelet lysate. *Front. Vet. Sci.* V. 9: 890302.  
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.890302>
- Han Y., Yang J., Fang J., Zhou Y., Candi E., Wang J., Hua D., Shao C., Shi Y.* 2022. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal Transduct. Target Ther.* V. 7. P. 92.  
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-00932-0>
- Huang Y.C., Lai L.C.* 2019. The potential roles of stem cell-derived extracellular vesicles as a therapeutic tool. *Ann. Transl. Med.* V. 7. P. 693.  
<https://doi.org/10.21037/atm.2019.11.66>
- Ibrahim S., Saunders K., Kydd J.H., Lunn D.P., Steinbach F.* 2007. Screening of anti-human leukocyte monoclonal antibodies for reactivity with equine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* V. 119. P. 63.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.06.034>
- Jammes M., Contentin R., Cassé F., Galéra P.* 2023. Equine osteoarthritis: strategies to enhance mesenchymal stromal cell-based acellular therapies. *Front. Vet. Sci.* V. 10:1115774.  
<https://doi.org/10.389/fvets.2023.1115774>
- Jones B.J., McTaggart S.J.* 2008. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp. Hematol.* V. 36. P. 733.  
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.03.006>
- Jung S., Panchalingam K.M., Rosenberg L., Behie L.A.* 2012. *Ex vivo* expansion of human mesenchymal stem cells in defined serum-free media. *Stem Cells Int.* 123030.  
<https://doi.org/10.1155/2012/123030>
- Karnieli O., Friedner O.M., Allickson J.G., Zhang N., Jung S., Fiorentini D., Abraham E., Eaker S.S., Yong T.K., Chan A., Griffiths S., Wehn A.K., Oh S., Karnieli O.* 2017. A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies. *Cytotherapy* V.19. P. 155.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.11.011>
- Kinzebach S., Bieback K.* 2013. Expansion of mesenchymal stem/stromal cells under xenogenic-free culture conditions. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* V. 129. P. 33.  
[https://doi.org/10.1007/10\\_2012\\_134](https://doi.org/10.1007/10_2012_134)
- Lee J.Y., Kang M.H., Jang J.E., Lee J.E., Yang Y., Choi J.Y., Kang H.S., Lee U., Choung J.W., Jung H., Yoon Y.C., Jung K.H., Hong S.S., Yi E.C., Park S.G.* 2022. Comparative analysis of mesenchymal stem cells cultivated in serum free media. *Sci. Rep.* V.12. P. 8620.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-12467-z>
- Menard C., Dulong J., Roulois D., Hebraud B., Verdier L., Pangault C., Sibut V., Bezier I., Bescher N., Monvoisin C., Gadelorge M., Bertheuil N., Flécher E., Casteilla L., Collas P. et al.* 2020. Integrated transcriptomic, phenotypic, and functional study reveals tissue-specific immune properties of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. V. 38. P. 146.  
<https://doi.org/10.1002/stem.3077>
- Moll G., Ankrum J.A., Kamhieh-Milz J., Bieback K., Ringden O., Volk H.D., Geissler S., Reinke P.* 2019. Intravascular mesenchymal stromal/stem cell therapy product diversification: time for new clinical guidelines. *Trends Mol. Med.* V. 25. P. 149.  
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.12.006>
- Naskou M.C., Sumner S.M., Chocallo A., Kemelmakher H., Thoresen M., Copland I., Galipeau J., Peroni J.F.* 2018. Platelet lysate as a novel serum-free media supplement for the culture of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* V. 9. P. 75.  
<https://doi.org/10.1186/s13287-018-0823-3>
- Oikonomopoulos A., van Deen W.K., Manansala A.R., Lacey P.N., Tomakili T.A., Ziman A., Hommes D.W.* 2015. Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: The effects of animal/xeno-free media. *Sci Rep* V. 5. P. 16570. doi: 10.1038/srep16570

- Petrova V., Vachkova E.* 2023. Outlook of adipose-derived stem cells: challenges to their clinical application in horses. *Vet. Sci.* V.10. P. 348.  
<https://doi.org/10.3390/vetsci10050348>.
- Pilgrim C.R., McCahill K.A., Rops J.G., Dufour J.M., Russell K.A., Koch T.G.* 2022. A review of fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stromal cells and potential alternatives for veterinary medicine. *Front. Vet. Sci.* V. 9: 859025.  
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.859025>.
- Platonova S.A., Viktorova E.V., Korovina D.G., Savchenkova I.P.* 2021. Equine tendinopathy therapy using mesenchymal stem cells. In: *KnE Life Scie/DonAgro: Int. Res. Conference on Challenges and Advances in Farming, Food Manufacturing, Agricultural Research and Education.* Dubai. UAE. P. 533.  
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/677/4/042069>
- Schubert S., Brehm W., Hillmann A., Burk J.* 2018. Serum-free human MSC medium supports consistency in human but not in equine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cell culture. *Cytometry A.* V. 93. P. 60.  
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.23240>
- Vidal M.A., Walker N.J., Napoli E., Borjesson D.L.* 2012. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem Cells Dev.* V. 21. P. 273.  
<https://doi.org/10.1089/scd.2010.0589>
- Viktorova E.V., Savchenkova I.P.* 2020. Multipotent mesenchymal stem cells in clinical veterinary practice. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* III Int. Sci. Conference: AGRITECH-III-2020: Agribusiness, Environ. Eng. Biotechnol. Krasnoyarsk Sci. Technol. City Hall of the Russian Union of Sci. and Eng. Associations. P. 72072.  
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/315/4/042038>
- Viswanathan S., Ciccocioppo R., Galipeau J., Krampera M., Le Blanc K., Martin I., Moniz K., Nolte J., Phinney D.G., Shi Y., Szczepiorkowski Z.M., Tarte K., Weiss D.J., Ashford P.* 2021. Consensus International Council for Commonality in Blood Banking Automation-International Society for Cell and Gene Therapy statement on standard nomenclature abbreviations for the tissue of origin of mesenchymal stromal cells. *Cytherapy.* V. 12. P. 1060.  
[ηττπσ://doi.org/10.1016/φ.φχψτ.2021.04.009](https://doi.org/10.1016/j.phχψτ.2021.04.009)
- Wang L.-T., Ting C.-H., Yen M.L., Liu K.-J., Sytwu H.-K., Wu K.K., Yen B.L.* 2016. Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials. *J. Biomed. Sci.* V. 23. P. 76.  
<https://doi.org/10.1186/s12929-016-0289-5>
- Watanabe Y., Tsuchiya A., Terai S.* 2021. The development of mesenchymal stem cell therapy in the present, and the perspective of cell-free therapy in the future. *Clin. Mol. Hepatol.* V. 27. P. 70.  
<https://doi.org/10.3350/cmh.2020.0194>
- Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H.* 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* V. 3. P. 4279.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>

## THE CULTURE OF EQUINE ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL CELLS IN SERUM-FREE MEDIA

I. P. Savchenkova\*

*Federal Science Center Skryabin and Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary RAS, 24/1,  
Ryazanskii pr., Moscow, 109428, Russia*

*\* E-mail: s-ip@mail.ru*

Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) isolated from equine adipose tissue (AT) represent a promising material for the creation of bioveterinary products for the prevention and treatment of many diseases. The production of these cells for clinical use requires improved serum-free culture conditions. The microenvironment can influence the properties of MSCs. It is believed that the requirements for culture conditions without animal blood serum are species specific. The purpose of this study was to evaluate the commercially available serum-free media (SFM) MesenCult (STEMCELL Technologies, USA), created for human MSCs, for the cultivation of equine MSC(AT). One part of the cells was propagated for 10 passages in the standard DMEM medium with a low glucose content (1 g/l) and 10% fetal bovine serum (FBS), and the second in SFM. The results show that the propagation of equine MSCs in MesenCult serum free, intended for the cultivation of human MSCs, is possible, since the cells adapt well to it and retain properties characteristic of cells that are cultured in DMEM with FBS: morphology, growth rate, doubling time and mitotic index, clone-forming abilities, diploid set of chromosomes, a large number of cells with the CD90 phenotype (90.8%) and low with the CD31 (0.8%), CD34 (0.9%) phenotype, as well as the potency for induction of differentiation into adipo-, osteo- and chondrogenic directions. Equine MSC(AT) showed stable characteristics after being cultured for 10 passages in SFM, providing a promising basis for their further use. Our results demonstrate that MesenCult media may be an alternative for serum-free culture of equine MSC(AT) for expansion in preclinical studies.

*Keywords:* mesenchymal stem/stromal cells, horse, adipose tissue, cultivation, MesenCult serum-free medium

УДК 57.085.23

## ВЛИЯНИЕ НАНОКЛАСТЕРНОГО ПОЛИОКСОМЕТАЛЛАТА $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МАКРОФАГОВ В КУЛЬТУРЕ

© 2024 г. С. А. Титова<sup>1, \*</sup>, М. О. Тонкушина<sup>1</sup>, К. В. Гржегоржевский<sup>1</sup>,  
И. Г. Данилова<sup>1, 2</sup>, В. А. Поздина<sup>2</sup>, М. В. Улитко<sup>1</sup>, А. А. Остроушко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уральский федеральный университет им. Первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, 620002, Россия

<sup>2</sup> Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, 620049, Россия

\* E-mail: svetattitova12021998@gmail.com

Поступила в редакцию 20.03.2024

После доработки 30.04.2024

Принята к публикации 13.05.2024

Цель данной работы — оценка влияния нанокластерного полиоксометаллата  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ , перспективного в качестве основы для средств адресной доставки лекарств в организме, на морфологию, фенотип, функциональную активность перитонеальных и альвеолярных макрофагов. Показано, что  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  не токсичен для перитонеальных и альвеолярных макрофагов, не оказывает значимого влияния на морфологию клеток и на активность  $\alpha$ -нафтилацетатэстеразы. Введение  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  способствует снижению фагоцитарной активности и числа CD163<sup>+</sup>-макрофагов в культуре, стимулирует поляризацию макрофагов в направлении фенотипа M1.

**Ключевые слова:** макрофаги, нанокластер, полиоксометаллаты, клеточные культуры

**Принятые сокращения:** ПД — продукты деструкции; ПОМ — полиоксометаллат; ФЧ — фагоцитарное число; ЦХИ — цитохимический индекс; ЯЦО — ядерно-цитоплазматическое отношение.

**DOI:** 10.31857/S0041377124040053 **EDN:** QCQFVM

Макрофаги представляют собой пластичные и гетерогенные иммунные клетки (Taylor et al., 2005). Они присутствуют практически во всех тканях, участвуют в распознавании, фагоцитозе и деградации клеточного мусора и патогенов (Rogler, 2017). Они играют важную роль в презентации антигенов Т-клеткам, а также в индукции экспрессии костимулирующих молекул на других типах антигенпрезентирующих клеток, что инициирует адаптивный иммунный ответ (Jackson, 2016). Кроме того, макрофаги задействованы в инициации воспаления путем высвобождения цитокинов и хемокинов, которые, в свою очередь, привлекают другие иммунные клетки к очагам воспаления (Duan, 2016).

В зависимости от того, какие цитокины, факторы роста, эффекторные молекулы секретируют макрофаги, их традиционно подразделяют на классически и альтернативно активированные (M1 и M2 соответственно). Именно пластичность макрофагов,

способность менять фенотип и функциональную активность в зависимости от характера микроокружения делает эти клетки чрезвычайно привлекательными при разработке лекарственных средств.

Макрофаги играют решающую роль в распознавании, обработке и клиренсе чужеродных частиц, в том числе наночастиц (Dobrovolskaia et al., 2007). Между тем наночастицы могут направлять макрофаги к различным поляризационным состояниям в качестве стимула микроокружения (Lucarelli et al., 2004; Bartneck et al., 2012; Laskar et al., 2013). Перепрограммирование макрофагов с фенотипа M1 на фенотип M2 может быть использовано для лечения хронических воспалительных заболеваний (Liu et al., 2014). Фенотипический сдвиг макрофагов M2 в сторону подтипа M1 полезен на ранних фазах воспаления и иммунотерапии рака (Su et al., 2015).

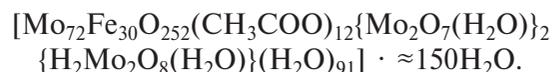
Адресная доставка лекарственных препаратов с использованием наночастиц для повышения

безопасности и терапевтической эффективности инкапсулированных лекарственных средств относится к одному из интенсивно развивающихся направлений нанотехнологии (Saruthers et al., 2007; Dutta, 2007). Более глубокое понимание влияния наночастиц на поляризацию макрофагов имеет важное значение для модуляции биологических эффектов *in vivo* и разработки методов лечения, основанных на использовании наночастиц.

Соединения, известные как нанокластерные полиоксометаллаты с кеплератной структурой (ПОМ) впервые были синтезированы под руководством Мюллера (Müller et al., 1998, 1999). Представители этого класса привлекают внимание высокосимметричной структурой молекул сферической формы и размерами порядка нескольких нанометров. ПОМ обладают рядом интересных свойств, которые делают их перспективными для использования в качестве наночастиц для адресной доставки лекарств (Ostroushko et al., 2021). Нанокластерные, а также более простые ПОМ обладают собственной биологической активностью (Yamase, 2013; Vijelic et al., 2019). Многие ПОМ содержат молибден в двух степенях окисления (+5 и +6); присутствие пентавалентного молибдена обуславливает их токсическое действие. ПОМ  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ , содержащий молибден только в высшей степени окисления ( $Mo^{+6}$ ), представляется нам наиболее перспективным представителем данного класса соединений в качестве основы средства адресной доставки. Обладая размером молекулы 2.5 нм, растворимый в воде,  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  способен разлагаться в средах организма на более простые соединения молибдена и железа (Остроушко и др., 2011), которые в дальнейшем включаются в естественные для организма процессы метаболизма.

$\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  состоит из кислородных полимеров молибдена и железа, стабилизированных ацетатными и водными лигандами, имеет внутреннюю полость (Müller et al., 1999) и способен связывать лекарственные препараты, флуоресцентные метки, биосовместимые полимеры, белки (Grzhegorzhevskii et al., 2023; Ostroushko et al., 2018; Tonkushina et al., 2022) и осуществлять движение под действием слабых электрических полей, в частности, при чрезкожном ионофорезе (Ostroushko et al., 2021). Ранее нами было продемонстрировано

продолжительное высвобождение противоопухолевого лекарственного препарата из комплекса с  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  в эксперименте, моделирующем высвобождение препарата в крови (Tonkushina et al., 2022). Формула соединения:



Однако исследований действия этого ПОМ на культуру макрофагов, а также возможности их перепрограммирования при действии ПОМ ранее не проводили.

Цель настоящей работы заключалась в оценке влияния  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  на культуру макрофагов, а также изучение возможности поляризации клеток при действии этого ПОМ. Оценивали влияние  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  на морфологию, жизнеспособность, фагоцитарную активность и активность  $\alpha$ -нафтилацетатэстеразы (специфического фермента моноцитов/макрофагов), а также на фенотип перитонеальных и альвеолярных макрофагов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

ПОМ кеплератного типа  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  для проведения исследований был синтезирован с использованием отработанной двухстадийной методики (Müller et al., 1998, 1999). При культивировании клеток с  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  его вводили в дозе 100 мкл (водного раствора в концентрации 2.0 г/л) на 900 мкл питательной среды. Доза была отработана в предыдущих исследованиях (Остроушко и др., 2018). Так как  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  в питательной среде постепенно разрушает на более простые молибден и железосодержащие ионы, использовали и продукты разрушения ПОМ (ПД) в качестве образцов сравнения для выявления влияния непосредственно нанокластерной структуры  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ . ПД получали кипячением раствора  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  в концентрации 2.0 г/л в течение 3 ч и также вводили в дозе 100 мкл раствора на 900 мкл питательной среды.  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  устойчив до температуры  $\sim 70^\circ C$ , и кипячение водного раствора позволяет гарантировать его разрушение до более простых ионов молибдена и железа.

**Животные.** В работе использовали популяции макрофагов различной тканевой принадлежности (альвеолярные и перитонеальные),

полученные из самцов крыс трехмесячного возраста породы Wistar. Условия содержания и обращение с используемыми в эксперименте животными соответствовали рекомендациям международных этических комитетов (директива Совета ЕС 2010/63/EU).

**Выделение и культивирование макрофагов.** Для выделения перитонеальных макрофагов вводили внутривентриально 5 мл ледяного раствора Хэнкса, содержащего 100 ЕД пенициллина и 100 мкг стрептомицина на 1 мл (Li et al., 2012). Выполняли легкий массаж брюшной полости, а затем осторожно собирали жидкость. Полученную перитонеальную жидкость центрифугировали при 250 g в течение 10 мин. Клетки промывали раствором Хэнкса и повторно центрифугировали. Надосадочную жидкость сливали, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл полной питательной среды и разливали по 500 мкл на покровные стекла, уложенные в 6-луночный планшет, и оставляли для прикрепления в течение 60 мин в инкубаторе при 37°С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха.

Для приготовления полной питательной среды использовали культуральную среду RPMI-1640 (90% от общего объема) (“Биолот”, Россия), эмбриональную телячью сыворотку FBS (“Биолот”, Россия) (10% от общего объема среды), и гентамицин в концентрации 10 мкг/мл.

Альвеолярные макрофаги получали из бронхоальвеолярной жидкости методом альвеолярного лаважа теплым раствором Хэнкса в объеме 3–4 мл, подогретым до температуры тела (36–37°С) (Wiggins, 1991). Полученную лаважную жидкость легких центрифугировали при 250 g в течение 10 мин. Клетки промывали раствором Хэнкса и центрифугировали. Надосадочную жидкость сливали, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл полной питательной среды и разливали по 500 мкл на покровные стекла, уложенные в 6-луночный планшет и оставляли для прикрепления в течение 60 мин в инкубаторе при 37°С, 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха.

За это время макрофаги прикреплялись к культуральной поверхности. По истечении 1 ч среду с не прикрепившимися клетками сливали, лунки промывали раствором Хэнкса, после чего вновь заливали нужный объем питательной культуральной среды. Далее клетки культивировали при 37°С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха.

**Определение фенотипических маркеров макрофагов.** Фенотип полученных клеток оценивали методом иммуноцитохимического окрашивания. В качестве фенотипического маркера использовали маркер F4/80, который позволяет определить дифференцировку клеток в макрофаги (McKnight et al., 1996; Dos Anjos Casado, 2017; Khazen et al., 2005). По маркеру CD163 определяли дифференцировку макрофагов в противовоспалительный фенотип M2 (Schaer et al., 2006; Шарафутдинова и др., 2014). При связывании моноклонального антитела к CD163 с соответствующим гликопротеином клеток наблюдается диффузное окрашивание мембран и цитоплазмы макрофагов M2 (Hu et al., 2017). Кроме того, этот маркер представляет собой скавенджер-рецептор, повышенная экспрессия которого связана с активацией эндотоза (Onofre et al., 2009; Etzerodt et al., 2013). Исследование проводили через 24 ч после культивирования макрофагов с {Mo<sub>72</sub>Fe<sub>30</sub>} или ПД в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Для идентификации вышеперечисленных маркеров применяли непрямой пероксидазный метод окрашивания. Процедура окрашивания одинакова для всех идентифицируемых антигенов.

Покровные стекла фиксировали в 10%-ном формалине. После высушивания их подвергали депарафинизации, дегидратации и промывке в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем Tween 20 (PanReac AppliChem GmbH, Германия), pH 7.6. Фиксация в формалине может приводить к изменению трехмерной структуры белков. При этом может происходить модификация антигенных эпитопов и изменение электростатического взаимодействия, что приводит к невозможности взаимодействия эпитопа антигена с паратопом антитела. Поэтому, до нанесения первичных антител проводили демаскировку эпитопов протеазами.

Для минимизации фонового окрашивания проводили блокировку активности эндогенной пероксидазы путем нанесения на срезы 3%-ного раствора пероксида водорода, последующей промывки и нанесения на 30 мин протеинового блока на основе бычьего сывороточного альбумина.

Следующий этап включал инкубацию с первичными антителами в течение 60 мин при 37°С. Несвязавшиеся реагенты отмывали в буфере PBS + Tween 20 (3 раза по 5 мин)

и после проводили инкубацию с вторичными антителами в течение 60 мин при 37°С, затем повторяли промывку в то же буфере.

Для визуализации антигенреактивных клеток использовали хромогенный субстрат 3,3-диаминобензидин (ДАВ) в забуференном растворе. ДАВ-позитивные клетки идентифицировали по коричневому окрашиванию. После окрашивания покровные стекла промывали в дистиллированной воде 5 мин, окрашивали гематоксилином и промывали в водопроводной воде 5 мин. На стеклах подсчитывали общее число клеток и число клеток, положительно окрашенных соответствующим антителом.

**Влияние ПОМ.** Полученные культуры перитонеальных и альвеолярных макрофагов делили на три группы: нестимулированные (контроль), стимулированные макрофаги, к которым через 24 ч культивирования в CO<sub>2</sub>-инкубаторе добавляли {Mo<sub>72</sub>Fe<sub>30</sub>} или ПД и продолжали культивировать еще 24 ч.

**Оценка жизнеспособности макрофагов.** Жизнеспособность оценивали через сутки после добавления {Mo<sub>72</sub>Fe<sub>30</sub>} или ПД. Старую среду сливали и промывали клетки 2 раза PBS Дюльбекко (DPBS, “ПанЭко”, Россия), pH 7.0–7.1, осмолярность 300 ± 20 мосмоль/кг. Культуры клеток переводили в суспензию путем инкубации в смеси 0.25%-го раствора трипсина с раствором Версена (1:1 при 37°С) в течение 10 мин при 37°С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Далее добавляли питательную среду и повторно суспендировали клетки, аккуратно пипетируя их. Затем клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливали, клетки ресуспендировали в DPBS комнатной температуры, чтобы смыть остатки клеточного мусора и белков. Затем этап с центрифугированием и промывкой в DPBS повторяли еще раз.

Далее клетки окрашивали раствором трипанового синего (100 мкл 0.4%-ного трипанового синего на 100 мкл полученной клеточной суспензии). Инкубировали смесь в течение 3 мин при комнатной температуре (Strober, 2015). Считали окрашенные (нежизнеспособные) и неокрашенные (живые) клетки.

Жизнеспособность клеток оценивали согласно международному стандарту ISO 10993-5 и определяли, как отношение числа

жизнеспособных клеток аликвоты к общему числу клеток на 1 мл аликвоты. Оценивали среднее значение жизнеспособности по трем параллельным измерениям.

**Морфометрическая характеристика макрофагов.** В качестве морфометрических показателей определяли площадь клетки и ядра в мкм<sup>2</sup>, а также ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Визуализацию осуществляли с помощью оптического микроскопа Olympus BX-51 (Япония), оснащенного флуоресцентным модулем LED ADF FL-LED-BGUV (ADF, Китай) и подключенной к нему монохроматической камерой ADF FLM07 (ADF, Китай) с охладителем Пельтье. Для обработки изображений использовали программное обеспечение камеры ADF Image Capture (<http://adfmicroscopy.com/>).

**Ферментативная активность.** В группу ферментов, гидролизующих эфиры карбоновых кислот, входят неспецифические эстеразы (ЕС 3.1.1). Ферментативную (секреторную) активность макрофагов оценивали, окрашивая их на неспецифическую α-нафтилацетатэстеразу, характерную для них и их идентификации (Ennist et al., 1983), и определяли цитохимический индекс (ЦХИ) (Наyhое et al., 1980). Как и другие неспецифические эстеразы, α-нафтилацетатэстераза катализирует реакцию гидролиза производных нафтилацетата (Wang et al., 2021) и, кроме того, участвует в детоксикации эндотоксинов и ксенобиотиков (Terriere, 1984; Zvereva et al., 2003). Для выявления ее активности макрофаги фиксировали в формалине в течение 5 мин. Затем инкубировали при комнатной температуре 30 мин в рабочем растворе, состоящем из 10 мг α-нафтилацетата, растворенного в 1 мл ацетона, 50 мл фосфатного буфера (pH 7.4) и 50 мг прочного синего. Затем клетки промывали в дистиллированной воде 2–3 мин. Докрашивали ядра гематоксилином Карацци (“Диахим-ЦитоСтейн-ГК”; “АБРИС+”, Россия) в течение 5 мин. α-Нафтилацетатэстераза ускоряет гидролизное расщепление α-нафтилацетата до уксусной кислоты и α-нафтола, соединение которого с диазониевой солью образует красно-коричневое окрашивание, нерастворимое в воде.

Подсчет макрофагов проводили под микроскопом ZEISS Primo Star (ZEISS, Германия) с помощью компьютерной программы ToupView 3.7 (<http://toupTek.com/product/>

showproduct.php?lang=en&id=103). Активность фермента выявляли по коричнево-черным гранулам в цитоплазме клеток.

Степень активности неспецифической эстеразы оценивали по описанной методике (Hayhoe et al., 1980). Подсчет результатов проводили, используя принцип Астальди (Astaldi et al., 1952; Astaldi et al., 1957). Клетки делили на 3 группы по активности эстеразы: 1-я – площадь, занимаемая гранулами не более 1/3 площади ядра; 2-я – площадь, занимаемая гранулами более 1/3 площади ядра, но не более площади всего ядра; 3-я – площадь, занимаемая гранулами более площади ядра. Степень эстеразной активности определяли по формуле:

$$ЦХИ = \frac{B \times 1 + C \times 2 + D \times 3}{N},$$

где  $B$  – число клеток с активностью 1;  $C$  – с активностью 2;  $D$  – с активностью 3;  $N$  – общее число посчитанных клеток.

Полученные показатели ЦХИ сравнивали с референсными значениями: для макрофагов ЦХИ в норме составляет 0.94–0.98 (Кост, 1975; Dhingra et al., 1982).

**Фагоцитарная активность.** Использовали частицы латекса (10%-ная полистирольная суспензия) диаметром 1.5 мкм (“ПанЭко”, США). Макрофаги делили на три группы: контрольную и 2 опытные – с  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  и с ПД и культивировали в течение 24 ч. Далее вносили 10 мкл суспензии частиц латекса на 500 мкл полной питательной среды в 6-луночные планшеты (примерно от 350 частиц на 1 клетку). Затем альвеолярные и перитонеальные макрофаги инкубировали с частицами латекса течение 1 ч при 37°С в  $CO_2$ -инкубаторе. По окончании питательную среду удаляли и макрофаги окрашивали по Романовскому. Подсчет числа поглощенных частиц латекса осуществляли с помощью светового микроскопа, используя компьютерную программу ADF (Китай, <http://adfmicroscopy.com/>). Определяли фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число частиц, поглощенных одним макрофагом (Sharma et al., 2014).

Полученные данные анализировали с помощью программы STATISTICA.10 и Microsoft Excel. Вычисляли среднее арифметическое значение, ошибку среднего (SE) и стандартное отклонение ( $\sigma$ ). Использовали непараметрический критерий Манна–Уитни для определения

значимости разницы в опытных группах по сравнению с контролем. Различия считали достоверными при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Жизнеспособность макрофагов.** В контрольной группе жизнеспособность перитонеальных и альвеолярных макрофагов по трем параллельным измерениям составила  $94.7 \pm 3.9$  и  $93.2 \pm 3.8\%$  соответственно. При культивировании клеток с  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  или с ПД в течение 24 часов статистически значимых различий показателей жизнеспособности не было (табл. 1).

**Морфологическая и морфометрическая характеристика макрофагов.** Морфометрический анализ перитонеальных макрофагов позволил выявить следующие закономерности: перитонеальные макрофаги контрольной группы представлены клетками округлой формы с округлым или бобовидным ядром, расположенным на периферии, что свидетельствует

**Таблица 1.** Влияние  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  и продуктов его деструкции (ПД) на жизнеспособность и морфометрические характеристики макрофагов

Макрофаги	Контроль	ПОМ	ПД
Жизнеспособность, %			
Перитонеальные	$94.7 \pm 3.9$	$94.1 \pm 4.4$	$93.1 \pm 3.8$
Альвеолярные	$93.2 \pm 3.8$	$94.2 \pm 2.6$	$94.6 \pm 3.4$
Площадь клетки, мкм <sup>2</sup>			
Перитонеальные	$285.3 \pm 7.1$	$307.3 \pm 8.2$	$281.7 \pm 3.6$
Альвеолярные	$246.8 \pm 8.3$	$260.7 \pm 6.0$	$241.6 \pm 6.9$
Площадь ядра, мкм <sup>2</sup>			
Перитонеальные	$74.8 \pm 4.3$	$73.7 \pm 5.7$	$71.2 \pm 2.6$
Альвеолярные	$246.8 \pm 8.3$	$260.7 \pm 6.0$	$241.6 \pm 6.9$
ЯЦО			
Перитонеальные	$0.35 \pm 0.02$	$0.32 \pm 0.01$	$0.34 \pm 0.01$
Альвеолярные	$0.45 \pm 0.01$	$0.47 \pm 0.02$	$0.52 \pm 0.01$
ЦХИ, усл. ед.			
Перитонеальные	$0.93 \pm 0.02$	$0.88 \pm 0.07$	$0.92 \pm 0.05$
Альвеолярные	$0.98 \pm 0.02$	$0.98 \pm 0.02$	$0.95 \pm 0.03$
ФЧ, усл. ед.			
Перитонеальные	$72.9 \pm 3.9$	$55.9^* \pm 4.1$	$65.8 \pm 2.0$
Альвеолярные	$70.8 \pm 4.5$	$45.6^* \pm 3.6$	$42.0^* \pm 3.4$

Примечание к табл. 1 и 2. Показаны средние значения и их ошибки.

\* – Различие с контролем достоверно при  $P < 0.05$ .

о нормальной морфологии изучаемых клеточных культур. При культивировании перитонеальных макрофагов с  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  или с ПД в течение 24 часов изменения формы клеток и ядер не наблюдали.

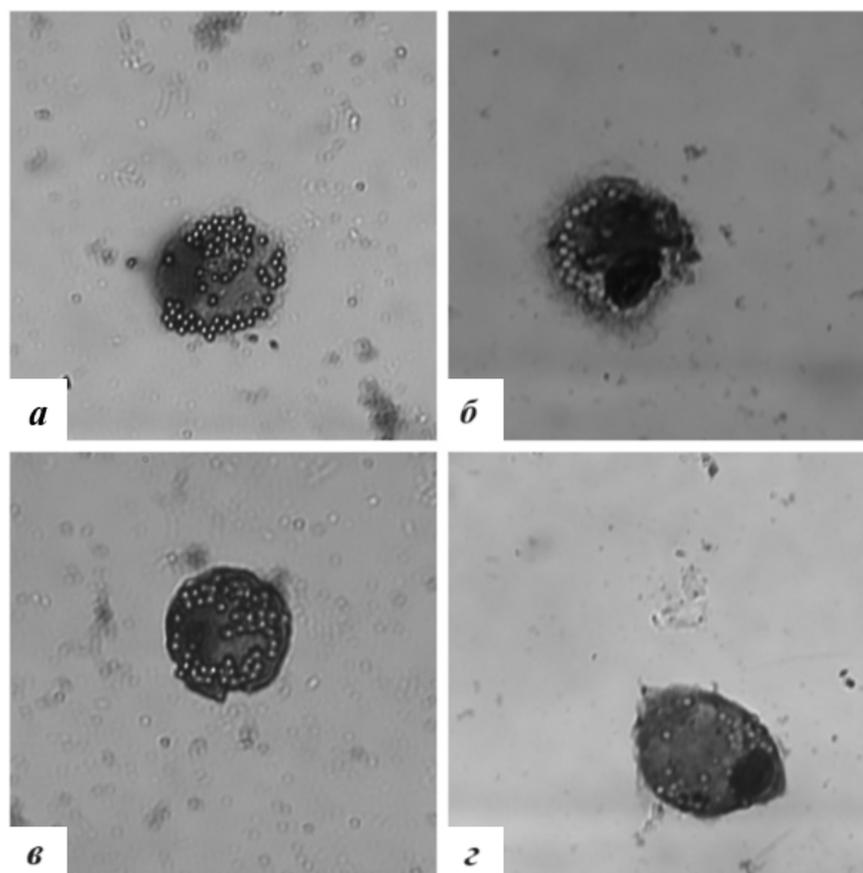
Статистически значимых различий морфометрических показателей между контрольной группой и группой макрофагов с ПД или с  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  обнаружено не было (табл. 1). Однако отмечали тенденцию к увеличению площади клеток при культивировании их с  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ . Статистически значимых различий площадей ядер и величин ЯЦО при культивировании с  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  или ПД нет (табл. 1). Не наблюдали и изменения формы клеток и ядер.

**Активность неспецифической эстеразы.** Показатели ЦХИ  $\alpha$ -нафтилацетатэстеразы перитонеальных и альвеолярных макрофагов находятся в пределах референсных значений и согласуются с данными литературы (Кост, 1975; Dhingra et al., 1982). В контрольной группе ЦХИ составил  $0.93 \pm 0.02$  и  $0.98 \pm 0.02$  для перитонеальных и альвеолярных макрофагов

соответственно. Статистически значимых отличий от ЦХИ клеток, культивируемых с ПД или  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  в течение суток не обнаружено (см. табл. 1).

Таким образом, как  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ , так и ПД не влияют на активность  $\alpha$ -нафтилацетатэстеразы. Следовательно, можно предположить, что процесс детоксикации эндотоксинов и ксенобиотиков (Terriere, 1984; Zvereva et al., 2003), осуществляемый макрофагами благодаря наличию в клетках неспецифических эстераз (в том числе  $\alpha$ -нафтилацетатэстеразы) не нарушается при их взаимодействии с ПОМ.

**Фагоцитарная активность.** У перитонеальных и альвеолярных макрофагов контрольной группы значение ФЧ (фагоцитирование латексных частиц) составило соответственно  $72.9 \pm 3.9$  и  $70.8 \pm 4.5$ . В группах макрофагов обоих видов, культивируемых с  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  в течение 24 часов, ФЧ значительно уменьшилось. Разница фагоцитарной активности показана на рис. 1. При культивировании с ПД (в течение суток)



**Рис. 1.** Фагоцитоз латексных частиц перитонеальными (а, б) и альвеолярными (в, г) макрофагами. а, в – в контроле; б, г – после действия  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ .

статистически значимых различий не наблюдали (табл. 1).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о снижении фагоцитарной активности макрофагов при их культивировании с  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ . Можно предположить, что снижение фагоцитоза обусловлено поляризацией макрофагов с последующей сменой фенотипа. Макрофаги разных фенотипов отличаются друг от друга функциональной активностью, в том числе и фагоцитарной. Имеются данные о том, что макрофаги M2 активнее фагоцитируют латексные шарики, чем M1, которые иммунологически ориентированы на захват бактерий и вирусов (Stangel et al., 2000; Yunna et al., 2020).

#### Фенотипические маркеры макрофагов.

Принадлежность полученных клеток к популяции резидентных тканевых макрофагов оценивали по экспрессии специфического маркера F4/80 (является частью семейства EGF-TM7).

Клетки F4/80<sup>+</sup> перитонеальных и альвеолярных макрофагов показаны на рисунках 2б и 3б, клетки F4/80<sup>-</sup> – на рис. 2а и 3а соответственно. Маркер CD163 определяет дифференцировку макрофагов в противовоспалительный фенотип M2 (Шарафутдинова и др., 2014; Schaer et al., 2006). Перитонеальные макрофаги CD16<sup>-</sup> и CD163<sup>+</sup> продемонстрированы на рис. 2в и 2г, альвеолярные – на рис. 3в и 3г.

Выделенные в первичную культуру перитонеальные макрофаги контрольной группы по своему составу содержали  $84.02 \pm 3.8\%$  положительно окрашенных на F4/80 клеток, что свидетельствует о высокой чистоте выделенных культур. Доля макрофагов CD163<sup>+</sup> (маркер M2 макрофагов) среди клеток, выделенных в первичную культуру, составила  $47.06 \pm 4.4\%$  для контрольной группы. Культивирование перитонеальных макрофагов с  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  или с ПД в течение суток не изменило долю F4/80<sup>+</sup>-клеток (табл. 2). Однако доля CD163<sup>+</sup>-макрофа-

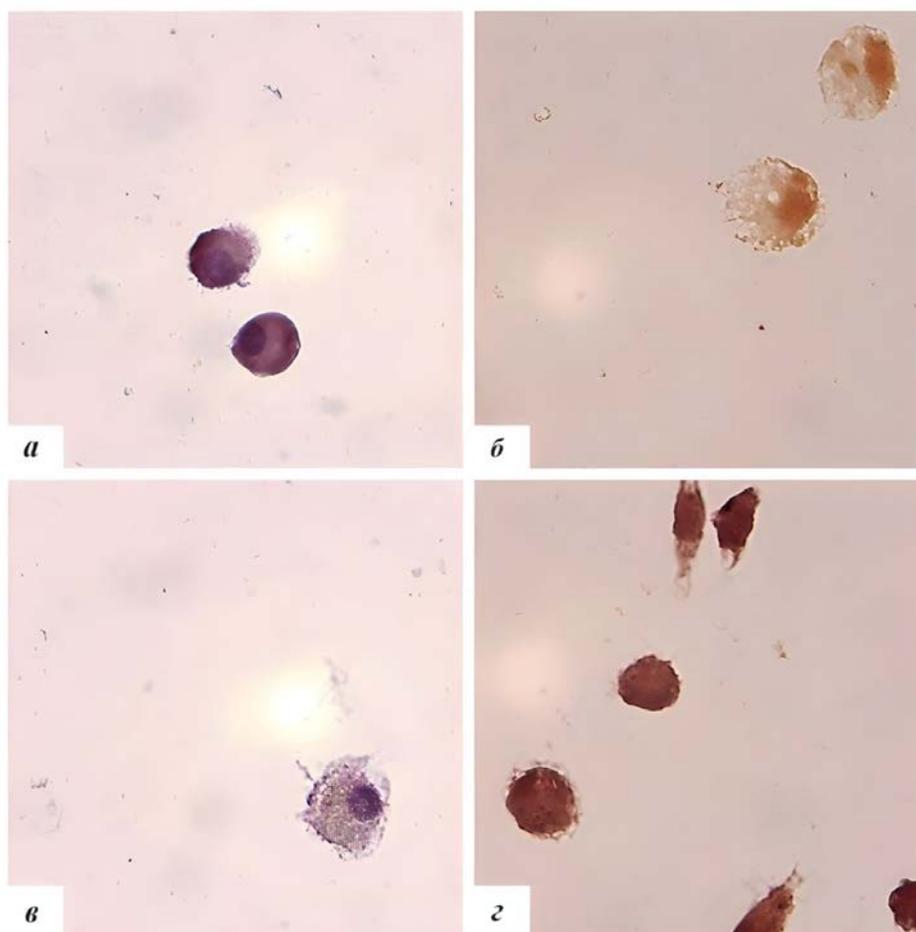


Рис. 2. Фенотипическое окрашивание перитонеальных макрофагов. а – F4/80<sup>-</sup>-клетки, б – F4/80<sup>+</sup>-клетки, в – CD163<sup>-</sup>-клетки, г – CD163<sup>+</sup>-клетки.

гов снизилась в группе клеток, культивируемых с  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ .

В первичной культуре альвеолярные макрофаги контрольной группы содержали  $85.55 \pm 5.7\%$  F4/80<sup>+</sup>-клеток и  $49.91 \pm 5.2\%$  CD163<sup>+</sup>-клеток. Действие  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  или ПД в течение 24 часов не изменило долю F4/80<sup>+</sup>-клеток (табл. 2), но снижалась доля CD163<sup>+</sup>-макрофагов и перитонеальных, и альвеолярных в случае действия и  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ , и ПД (табл. 2). Для перитонеальных макрофагов это может свидетельствовать об уменьшении доли макрофагов M2 в культуре.

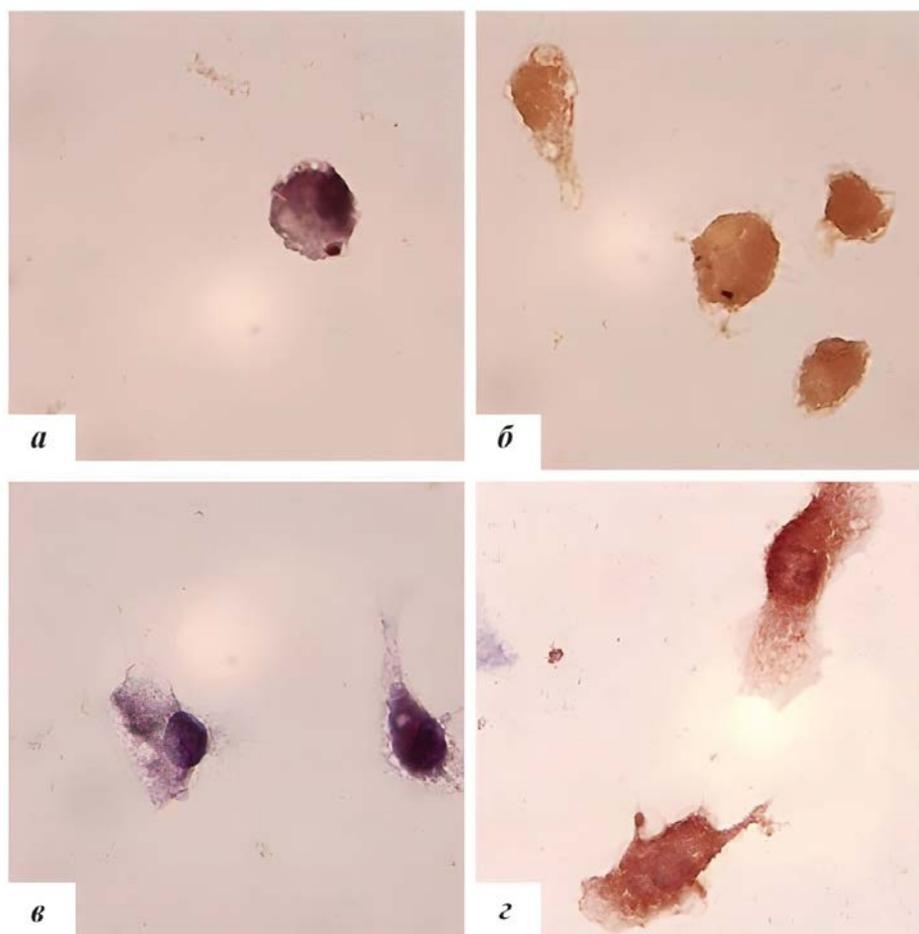
Снижение доли CD163<sup>+</sup>-клеток в культуре альвеолярных макрофагов при инкубировании с ПД может объясняться тем, что альвеолярные макрофаги характеризуются высокой чувствительностью к железу, могут приобретать как связанное с трансферрином железо, высвобождаемое альвеолярными эпителиальными клетками, так и вдыхаемое железо

**Таблица 2.** Влияние  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  и продуктов его деструкции на фенотипические маркеры макрофагов

Макрофаги	Контроль	ПОМ	ПД
Доля F4/80 <sup>+</sup> -клеток, %			
Перитонеальные	84.0 ± 3.8	85.0 ± 3.5	86.5 ± 5.2
Альвеолярные	85.5 ± 5.7	91.6 ± 2.5	87.8 ± 2.1
Доля CD163 <sup>+</sup> -клеток, %			
Перитонеальные	47.1 ± 4.4	32.7 ± 1.9*	43.5 ± 2.3
Альвеолярные	49.9 ± 5.2	33.4 ± 2.5*	37.9 ± 3.5*

Примечание. См. табл. 1.

в результате воздействия окружающей среды (например, дыма и загрязнения воздуха) (Nollan et al., 1990; Corhay et al., 2000). Снижение доли макрофагов M2 может указывать на возможную поляризацию макрофагов в провоспалительный фенотип M1. Эти данные согласуются со снижением фагоцитарной активности, поскольку CD163 представляет собой скавенджер-рецептор, повышенная экспрессия



**Рис. 3.** Фенотипическое окрашивание альвеолярных макрофагов: *a* – F4/80<sup>-</sup>-клетки, *б* – F4/80<sup>+</sup>-клетки, *в* – CD163<sup>-</sup>-клетки, *г* – CD163<sup>+</sup>-клетки.

которого связана с эндоцитозом (Onofre et al., 2009; Etzerodt et al., 2013). Соответственно, уменьшение экспрессии данного рецептора на поверхности мембраны клетки способствует переходу макрофага от противовоспалительного фенотипа M2, который наиболее активно поглощает частицы латекса за счет эндоцитоза (фагоцитоза) к провоспалительному M1 (Stangel et al., 2000; Yunna et al., 2020).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты настоящей работы показали, что  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  и его ПД не оказывают значимого влияния на жизнеспособность перитонеальных и альвеолярных макрофагов, не приводят к значимому изменению морфологических показателей клетки и активности неспецифической эстеразы ( $\alpha$ -нафтилацетатэстеразы), важного компонента системы детоксикации клетки. Таким образом, не обнаружено токсического действия ПОМ на культуры перитонеальных и альвеолярных макрофагов.

В ходе исследования отмечено снижение фагоцитарной активности макрофагов в экспериментальных группах. Мы предположили, что это может быть связано с изменением фенотипа макрофагов, поэтому провели иммуноцитохимическое окрашивание клеток на маркер CD163. Полученные данные продемонстрировали снижение доли CD163<sup>+</sup>-клеток в присутствии  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ , что согласуется с результатами оценки фагоцитарной активности. В литературе имеются сведения о том, что фагоцитоз именно M2-макрофагов более эффективен по отношению к латексным шарикам и частицам зимозана по сравнению с фенотипом M1 (Martinez et al., 2008; Stangel et al., 2000). Стоит отметить также, что поскольку CD163 представляет собой скавенджер-рецептор, связанный с эндоцитозом (Onofre et al., 2009; Etzerodt et al., 2013), уменьшение его экспрессии на поверхности мембраны способствует переходу макрофага от противовоспалительного фенотипа M2, который наиболее активно поглощает частицы латекса за счет эндоцитоза (фагоцитоза) к провоспалительному M1 (Stangel et al., 2000; Yunna et al., 2020).

Полученные данные о влиянии  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  на поляризацию макрофагов в провоспалительный фенотип M1 делает его еще более перспективным

объектом исследования в области онкологии. Кроме того, изучение влияния наночастиц на поляризацию макрофагов, становится важным звеном в понимании механизма действия данных соединений на клетку.

В настоящее время есть примеры изменения поляризации макрофагов с помощью железосодержащих наночастиц. Например, суперпарамагнитные наночастицы оксида железа (SPION), покрытые полиэтиленгликолем, индуцируют поляризацию M1, характеризующуюся заметной апрегуляцией типичных генов, связанных с M1, таких как CD80, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (Mulens-Arias et al., 2015). Поскольку макрофаги вносят вклад в опухолевое иммунное микроокружение, их взаимодействие с наночастицами оксида железа может определять тераностический результат и представлять важный инструмент для перепрограммирования фенотипа опухолеассоциированных макрофагов (Mulens-Arias et al., 2021).

В настоящее время необходим поиск стратегий, способных усилить действие существующих лекарств за счет разработки новых терапевтических подходов. Лекарственные препараты могут быть конъюгированы с наночастицами с целью повышения их фармакологического действия или придания им новых специфических свойств. Например, лечение только доксорубицином снижало секрецию макрофагами ФНО- $\alpha$  – важного цитокина, который активирует специфические рецепторы, определяющие раковую клетку, блокирует дальнейшее деление клетки и способствует ее гибели (Reichel et al., 2019). Аналогичным образом ФНО- $\alpha$  воздействует на клетки, инфицированные вирусами и другими патогенами. Наночастицы оксида цинка незначительно увеличивали секрецию ФНО- $\alpha$  макрофагами. В отличие от предыдущих групп, комплекс ZnO-доксорубицин значительно увеличивал секрецию ФНО- $\alpha$  макрофагами, а также секрецию IL-6 – еще одного важного провоспалительного цитокина (Reichel et al., 2019). Макрофаги, обработанные ZnO-доксорубицином, демонстрировали повышенную экспрессию CD80, CD86 и MHCII по сравнению с наночастицами оксида цинка или свободным доксорубицином (Reichel et al., 2019).

Как показали исследования, проведенные в последние десятилетия, ПОМ обладают

перспективной биологической активностью, в том числе противоопухолевой и противoinфекционной благодаря своей особой структуре и свойствам (Wang, 2022). Их высокая биосовместимость, структурная стабильность и модифицируемость предоставляют широкие возможности для исследований в области диагностики и лечения рака.

Иммунотерапия антигенпрезентирующими клетками инициирует мощный Т-клеточный ответ при онкологических, вирусных и инфекционных заболеваниях (Masson et al., 2008; Gardner et al., 2020). Использование аутологичных макрофагальных вакцин в клинических испытаниях представляет собой индивидуальную форму клеточной терапии, требующей генерации макрофагов типа М2 или М1 в зависимости от вида и тяжести заболевания.

Таким образом, исследуемый нами ПОМ  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  может представлять большой интерес для биомедицины и онкологии. Предполагаемая способность обеспечивать поляризацию макрофагов делает его интересным объектом для онкологических исследований. Мы показали, что исследованный ПОМ  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  эффективно поляризуют макрофаги в направлении фенотипа М1. В дальнейшем мы планируем использовать ПОМ для стимуляции образования М1-макрофагов и возможного использования полученной культуры в экспериментальных моделях ряда онкологических и воспалительных заболеваний.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования ИИФ УрО РАН.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет при финансовой поддержке в рамках государственного задания по науке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 123031300049-8), а также в рамках госзадания Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН (№ 122020900136-4) и Программы развития Уральского федерального университета имени первого Президента России

Б.Н. Ельцина в соответствии с программой стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Протоколы с использованием животных были одобрены одобрены этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН, протокол № 07/19 от 18.12.2019.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Губарев Ю.А., Лебедева Н.Ш., Тонкушина М.О., Гагарин И.Д., Голуб А.Я., Остроушко А.А. 2021. Взаимодействие нанокластерного железосодержащего полиоксометаллата с доxorубицином. Физико-химические аспекты изучения кластеров, наноструктур и наноматериалов. № 13. С. 841. (Gubarev Yu.A., Lebedeva N.Sh., Tonkushina M.O., Gagarin I.D., Golub A.Yu., Ostroushko A.A. 2021. Interaction of iron-containing nanocluster polyoxometalate with doxorubicin. Phys. Chem. Aspects of the Study of clusters, Nanostruct. Nanomat. (Russ.) № 13. P. 841.)
- Кост Е.А. 1975. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. Москва: Медицина. (Cost E.A. 1975. Handbook of clinical laboratory research methods. Moscow: Medicine.)
- Остроушко А.А., Тонкушина М.О. 2015. Деструкция нанокластерных полиоксометаллатов на основе молибдена в водных растворах. Журн. физической химии. Т. 89. № 3. С. 440. (Ostroushko A.A., Tokushima M.O. 2015. Destruction of molybdenum nanocluster polyoxometallates in aqueous solutions. Russian J. Phys. Chem. A. V. 89. P. 443).
- Остроушко А.А., Тонкушина М.О., Мартынова Н.А. 2010. Особенности явлений массы и электропереноса в системах, содержащих нанокластерные полиоксометаллаты молибдена со структурой фуллерена. Журн. физ. химии. Т. 84. № 6. С. 1135. (Ostroushko A.A., Tonkushina M.O., Martynova N.A. 2010. Mass and charge transfer in systems containing nanocluster molybdenum polyox-

- ometallates with a fullerene structure. Russ. J. Phys. Chem. V. 84. P. 1022.)
- Остроушко А.А., Сенников М.Ю., Тонкушина М.О.* 2009. Взаимодействие полиоксометаллата Mo132 с поливиниловым спиртом. Журн. неорганической химии. Т. 84. № 4. С. 666. (*Ostroushko A.A., Sennikov M.Y., Tonkushina M.O.* 2009. Interaction of polyoxometalate Mo132 with poly(vinyl alcohol). Russ. J. Inorg. Chem. V. 54. P. 611.)
- Остроушко А.А., Гетте И.Ф., Медведева С.Ю., Тонкушина М.О., Данилова И.Г., Прокофьева А.В., Морозова М.В.* 2011. Оценка безопасности железо-молибденовых нанокластерных полиоксометаллатов, предназначенных для адресной доставки лекарственных веществ. Вестник уральской медицинской академической науки. Т. 34. № 2. С. 107. (*Ostroushko A.A., Gette I.F., Medvedeva S.Yu., Tonkushina M.O., Danilova I.G., Prokofiev A.V., Morozova M.V.* 2011. Safety assessment of iron-molybdenum nanocluster polyoxometallates intended for targeted drug delivery. Bulletin of the Ural Medical Academic Science. Vol. 34. No. 2. P. 557.)
- Остроушко А.А., Гетте И.Ф., Данилова И.Г., Медведева С.Ю., Тонкушина М.О., Прокофьева А.В.* 2011. Исследование хронической токсичности молибденовых и железо-молибденовых нанокластерных полиоксометаллатов. Уральский мед. ж. Т. 89. № 11. С. 75. (*Ostroushko A.A., Gette I.F., Danilova I.G., Medvedeva S.Yu., Tonkushina M.O., Prokofiev A.V.* 2011. Investigation of the chronic toxicity of molybdenum and iron-molybdenum nanocluster polyoxometallates. Ural Med. Univ. V. 89. No. 11. P. 75.)
- Остроушко А.А., Улитко М.В., Тонкушина М.О., Зубарев И.В., Медведева С.Ю., Данилова И.Г., Губаева О.В., Гагарин И.Д., Гетте И.Ф.* 2018. Влияние нанокластерных молибденсодержащих полиоксометаллатов на морфофункциональное состояние фибробластов в культуре. Российские нанотехнологии. Т. 13. № 1-2. С. 3. (*Ostroushko A.A., Ulitko M.V., Tonkushina M.O. et al.* 2018. Influence of Nanocluster Molybdenum Polyoxometallates on the Morphofunctional State of Fibroblasts in Culture. Nanotechnol Russia. V. 13. P. 1.)
- Шарафутдинова Л.А., Горшкова Е.Н., Садртдинова И.И., Хисматуллина З. Р., Башкатов С.А.* 2014. Оценка морфологических параметров нейтрофильных гранулоцитов методом атомно-силовой микроскопии после воздействия фуллерена C60. Биомедицина. № 3. С. 49. (*Sharafutdinova E.N., Gorshkova I.I., Sadrtinova Z.R., Khismatulina S.A.* 2014. Evaluation of the morphological parameters of neutrophilic granulocytes by atomic force microscopy after exposure to fullerene C60. Biomed. (Russ.) V. 3. P. 49.)
- Akatsuka S., Yamashita Y., Ohara H., Liu Y-T, Izumiya M., Abe K.* 2012. Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomic alterations observed in human cancer. PloS One. V. 7: e43403.
- Astaldi G., Bernardelli E., Rondanelli E.* 1952. Behavior of glycogen in surviving leukocytes. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. V. 28. P. 286.
- Astaldi G., Verga L.* 1957. The glycogen content of the cells of lymphatic leukaemia. Acta Haematol. V. 17. P. 129.
- Bartneck M., Ritz T., Keul H.A., Wambach M., Bornemann J., Gbureck U., Ehling J., Lammers T., Heymann F., Gassler N., Lüdde T., Trautwein C., Groll J., Tacke F.* 2012. Peptide-functionalized gold nanorods increase liver injury in hepatitis. ACS nano. V. 6. P. 8767.
- Bijelic A., Aureliano M., Rompel A.* 2019. Polyoxometalates as potential next-generation metallodrugs in the combat against cancer. Angewandte Chemie Int. Ed. V. 58. P. 2980.
- Caruthers S.D., Wickline S.A., Lanza G.M.* 2007. Nanotechnological applications in medicine. Curr. Opin. Biotechnol. V. 18. P. 26.
- Corhay J.L., Weber G., Bury T., Mariz S., Roelandts I., Radermecker M.F.* 1992. Iron content in human alveolar macrophages. Eur. Respir. J. V. 5. P. 804.
- Dhingra V.K., Gupta R.K., & Sadana J.R.* 1982. Demonstration of acid alpha naphthyl acetate esterase activity in bovine lymphocytes and monocytes or macrophages. Res. Veterinary Sci. V. 33. P. 26.
- Dobrovolskaia M.A., McNeil S. E.* 2007. Immunological properties of engineered nanomaterials. Nature Nanotechnol. V. 2. P. 469.
- Dos Anjos Cassado A.* 2017. F4/80 as a major macrophage marker: the case of the peritoneum and spleen. Results Problems Cell Diff. V. 62. P. 161.
- Duan L., Mukherjee E.* 2016. Janeway's Immunobiol. 9th Ed. Yale J. Biol. Med. V. 89. P. 424.
- Dutta R.C.* 2007. Drug carriers in pharmaceutical design: promises and progress. Curr. Pharm. Des. V. 13. P. 76.
- Ennist D.L., Jones K.H.* 1983. Rapid method for identification of macrophages in suspension by acid alpha-naphthyl acetate esterase activity. J. Histochem. Cytochem. V. 31. P. 960.
- Etzerodt A., Moestrup S.K.* 2013. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. Antioxid. Redox Signal. V. 18. P. 2352.
- Giovanni M., Yue J., Zhang L., Xie J., Ong C.N., Leong D.T.* 2015. Pro-inflammatory responses of RAW264.7 macrophages when treated with ultralow concentrations of silver, titanium dioxide, and zinc oxide nanoparticles. J. Hazard. Materials. V. 297. P. 146.
- Grzhegorzhevskii K., Tonkushina M., Gushchin P., Gagarin I., Ermoshin A., Belova K., Prokofyeva A. Ostroushko A., Novikov A.* 2023. Association of kepler-

- ate-type polyoxometalate  $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$  with tetracycline: nature of binding sites and antimicrobial action. *Inorganics*. V. 11. P. 9.
- Grzhegorzhevskii K.V., Zelenovskiy P.S., Koryakova O.V., Ostroushko A.A. 2019. Thermal destruction of giant polyoxometalate nanoclusters: a vibrational spectroscopy study. *Inorg. Chimica Acta*. V. 489. P. 287.
- Hayhoe F.G.J., Quaglino D. 1980. Haematological cytochemistry. Edinburgh, N.Y.: Churchill Livingstone. P. 336.
- Holian A., Scheule R.K. 1990. Alveolar macrophage biology. *Hosp. Pract.* V. 25. P. 53.
- Hu J. M., Liu K., Liu J. H., Jiang X. L., Wang X. L., Chen Y. Z., Li S. G., Zou H., Pang L. J., Liu C. X., Cui X. B., Yang L., Zhao J., Shen X. H., Jiang J. F., Liang W. H., Yuan X. L., Li F. 2017. CD163 as a marker of M2 macrophage, contribute to predict aggressiveness and prognosis of Kazakh esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. V. 8. P. 21526.
- Jackson J. 2016. In situ tissue regeneration: host cell recruitment and biomaterial design. In: Lee S.J., Atala A., Yoo J. (Eds.). 2016. *Immunology: Host responses to biomaterials*. Elsevier/Acad. Press. P. 35.
- Khazen W., M'bika J.P., Tomkiewicz C., Benelli C., Chany C., Achour A., & Forest C. 2005. Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS Letters*, V. 579. P. 5631.
- Laskar A., Eilertsen J., Li W., Yuan X. M. 2013. SPION primes THP1 derived M2 macrophages towards M1-like macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 441. P. 737.
- Li Y., Yang Y., Guo T. 2023. Heme oxygenase-1 determines the cell fate of ferroptotic death of alveolar macrophages in COPD. *Front. Immunol.* V. 14: 1162087.
- Liu Y., Chen Z., Gu N., Wang J. 2011. Effects of DMSA-coated  $Fe_3O_4$  magnetic nanoparticles on global gene expression of mouse macrophage RAW264.7 cells. *Toxicol. Lett.* V. 205. P. 130.
- Liu Y.C., Zou X.B., Chai Y.F., Yao Y.M. 2014. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int. J. Biol. Sci.* V. 10. P. 520.
- Li Z., Zhao Z.J., Zhu X.Q., et al. 2012. Differences in iNOS and arginase expression and activity in the macrophages of rats are responsible for the resistance against *T. gondii* infection. *PLoS One*. V. 7: e35834.
- Lucarelli M., Gatti A. M., Savarino G., Quattroni P., Martinelli L., Monari E., Boraschi, D. 2004. Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles. *Eur. Cytokine Network*. V. 15. P. 339.
- Martinez F.O., Sica A., Mantovani A. 2008. Macrophage activation and polarization, *Front. Biosci.* V. 13. P. 453.
- Martinez F.O. 2011. Regulators of macrophage activation. *Eur. J. Immuno.* V. 41. P. 1531.
- McKnight A.J., Macfarlane A.J., Dri P., Turley L., Willis A.C., Gordon S. 1996. Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family. *J. Biol. Chem.* V. 271. P. 486.
- Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A. M. 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* V. 164. P. 6166.
- Mulens-Arias V., Rojas J.M., Pérez-Yagüe S., Morales M.P., Barber D.F. 2015. Polyethylenimine-coated SPIONs trigger macrophage activation through TLR-4 signaling and ROS production and modulate podosome dynamics. *Biomaterials*. V. 52. P. 494.
- Mulens-Arias V., Rojas J.M., Barber D.F. 2021. The use of iron oxide nanoparticles to reprogram macrophage responses and the immunological tumor microenvironment. *Front. Immunol.* V. 12: 693709.
- Müller A., Krickemeyer E., Bögge H., Schidtmann M., Peters F. 1998. Organizational forms of matter: an inorganic superfullerene and keplerate based on molybdenum oxide. *Angew Chem. Int.* V. 37. P. 3360.
- Müller A., Sarkar S., Nazir Shah S.Q., Bögge H., Schidtmann M., Sarkar Shatarupa, Kögerler P., Hauptfleisch B., Trautwein A.X., Schünemann V. 1999. Archimedian synthesis and magic numbers: «sizing» giant molybdenum – oxide based molecular spheres of the keplerate type. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* V. 38. P. 3238.
- Onofre G., Kolácková M., Jankovicová K., Krejsek J. 2009. Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. V. 52. P. 57.
- Ostroushko A.A., Gagarin, I.D., Tonkushina, M.O. 2018. Association of spherical porous nanocluster keplerate-type polyoxometalate  $Mo_{72}Fe_{30}$  with biologically active substances. *J. Clust. Sci.* V. 29. P. 111.
- Ostroushko A.A., Grzhegorzhevskii K.V., Medvedeva S.Y. 2021. Physicochemical and biochemical properties of the keplerate-type nanocluster polyoxomolybdates as promising components for biomedical use. *Nanosystems: Phys. Chem. Mathem.* V. 12. P. 81.
- Reichel D., Tripathi M., Perez J.M. 2019. Biological effects of nanoparticles on macrophage polarization in the tumor microenvironment. *Nanotheranostics*. V. 3. P. 66.
- Rogler G. 2017. Immune cells: monocytes and macrophages. In: Baumgart D.C. (Ed.) 2017. *Crohn's disease and ulcerative colitis: from epidemiology and immunobiology to a rational diagnostic and therapeutic approach*: Springer. P. 119.
- Schaer D.J., Schaer C.A., Buehler P.W., Boykins R.A., Schoedon G., Alayash A.I., Schaffner A. 2006. CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood*. V. 107. P. 373.

- Sharma L., Wu W., Dholakiya S.L. 2014. Assessment of phagocytic activity of cultured macrophages using fluorescence microscopy and flow cytometry. *Metods Mol. Biol.* V. 1172. P. 137.
- Stangel M., Joly E., Scolding N. J., Compston D.A.S. 2000. Normal polyclonal immunoglobulins ('IVIg') inhibit microglial phagocytosis in vitro. *J. Neuroimmunol.* V. 106. P. 137.
- Strober W. 2015. Trypan blue exclusion test of cell viability. *CP Immunol.* V. 111. P. A3. B. 1.
- Su L., Zhang W., Wu X., Zhang Y., Chen X., Liu G., Chen G., Jiang M. 2015. Glycocalyx-mimicking nanoparticles for stimulation and polarization of macrophages via specific interactions. *Small.* V. 11. P. 4191.
- Taylor P. R., Martinez-Pomares L., Stacey M., Lin H. H., Brown G. D., Gordon S. 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *Ann. Rev. Immunol.* V. 23. P. 901.
- Terriere L.C. 1984. Induction of detoxication enzymes in insects. *Ann. Rev. Entomol.* V. 29. P. 71.
- Tian F., Cui D., Schwarz H., Estrada G.G., Kobayashi H. 2006. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human *fi* broblasts. *Toxicol. In Vitro.* V. 20. P. 1202.
- Tonkushina M.O., Grzhegorzhevskii K.V., Ermoshin A.A., Tugbaeva A.S., Kim G.A., Taniya O.S., Gagarin I.D., Ostroushko A.A. 2022. The electrostatic-mediated formation of a coordination complex: the trapping and release of an antitumor drug with an anthracycline core from {Mo<sub>72</sub>Fe<sub>30</sub>} based ensembles. *Chemistry-Select.* V. 7. P. e202203684.
- Wang K, Feng B, Yang Y. 2021. Dual-factor synergistically activated ES IPT-based probe: differential fluorescence signals to simultaneously detect  $\alpha$ -naphthyl acetate and acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase. *Anal. Chem.* V. 93. P. 14471.
- Wang X., Wei S., Zhao C. 2022. Promising application of polyoxometalates in the treatment of cancer, infectious diseases and Alzheimer's disease. *J. Biol. Inorg. Chem.* V. 27. P. 405.
- Wiggins D. 1991. Bronchoalveolar lavage. *Methods and application. Pulmonology.* V. 3. P. 43.
- Wolf-Grosse S., Mollnes T. E., Ali S., Stenvik J., Nilsen A.M. 2018. Iron Oxide nanoparticles enhance toll-like receptor-induced cytokines in a particle size- and actin-dependent manner in human blood. *Nanomed.* V. 13. P. 1773.
- Yamase T. 2013. Polyoxometalates active against tumors, viruses, and bacteria. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* V. 54. P. 65.
- Yunna C., Mengru H., Lei W., Weidong C. 2020. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur. J. Pharmacol.* V. 877: 173090.
- Zvereva E., Serebrov V., Glupov V., Dubovskiy I. 2003. Activity and heavy metal resistance of non-specific esterases in leaf beetle *Chrysomela lapponica* from polluted and unpolluted habitats. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* V. 35. P. 383.

## EFFECT OF NANOCUSTER POLYOXOMETALATE {Mo<sub>72</sub>Fe<sub>30</sub>} ON MORPHOFUNCTIONAL STATE OF MACROPHAGES IN CULTURES

S. A. Titova<sup>a</sup> \*, M. O. Tonkushina<sup>a</sup>, K. V. Grzhegorzhevskii<sup>a</sup>, I. G. Danilova<sup>a, b</sup>, V. A. Pozdina<sup>b</sup>, M. V. Ulitko<sup>a</sup>, A. A. Ostroushko<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, 620002, Russia

<sup>b</sup> Institute of Immunology and Physiology, Urals Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620049, Russia

\* E-mail: svetattitova12021998@gmail.com

The aim of this work was to study the effect of nanocluster polyoxometalate {Mo<sub>72</sub>Fe<sub>30</sub>} on the macrophage link of the immune system. In vitro studies of polyoxometalate on macrophage cultures allowed us to evaluate the reaction of immune system cells (in particular, peritoneal and alveolar macrophages) to nanoparticles. The analysis of the obtained data allowed to establish that {Mo<sub>72</sub>Fe<sub>30</sub>} is not toxic for peritoneal and alveolar macrophages, has no significant effect on the morphology of cells, as well as on the activity of  $\alpha$ -naphthylacetate esterase. However, it significantly reduces phagocytic activity when cells are cultured with POM, which may indicate possible polarisation of macrophages. The obtained results confirm the possibility of using {Mo<sub>72</sub>Fe<sub>30</sub>} in the field of biomedicine.

**Keywords:** macrophages, nanoclusters, polyoxometalates, cell cultures

УДК 576.08:575.164

## РАЗРАБОТКА *IN VITRO* МОДЕЛИ ДИСФЕРЛИНОПАТИИ ПОСРЕДСТВОМ CRISPR/CAS-ОПОСРЕДОВАННОЙ АКТИВАЦИИ ГЕНА *DYSF*

© 2024 г. И. А. Яковлев<sup>1, 2, \*</sup>, Я. С. Слесаренко<sup>2</sup>, И. Г. Старостина<sup>3</sup>,  
А. А. Шаймарданова<sup>3</sup>, В. В. Соловьева<sup>3</sup>, П. А. Бобровский<sup>4</sup>, Е. Н. Графская<sup>4</sup>, Л. Д. Беликова<sup>4</sup>,  
С. Н. Бардаков<sup>1</sup>, А. А. Ризванов<sup>3, 6</sup>, А. А. Исаев<sup>1</sup>, Р. В. Деев<sup>1, 2, 5</sup>

<sup>1</sup> ПАО “Артген биотех”, Москва, 119333, Россия

<sup>2</sup> ООО “Генотаргет”, Инновационный центр “Сколково”, Москва, 121614, Россия

<sup>3</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008, Россия

<sup>4</sup> Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю. М. Лопухина ФМБА России, Москва, 119435, Россия

<sup>5</sup> Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына, Москва, 117418, Россия

<sup>6</sup> Отделение медицинских и биологических наук, АН Республики Татарстан, Казань, 420111, Россия

\* E-mail: mail@genotarget.com

Поступила в редакцию 11.10.2023

После доработки 15.05.2024

Принята к публикации 21.05.2024

Для разработки методов генной терапии и геномного редактирования при моногенных заболеваниях необходимы клеточные модели из тканей человека, полученных малоинвазивными методами, позволяющие провести скрининг и выбрать наиболее эффективный подход по восстановлению синтеза целевого белка. В работе применена система транскрипционной активации CRISPR/dCas9-SAM, обеспечивающая экспрессию гена *DYSF* в клетках линии НЕК293Т, а также в фибробластах десны пациента с дисферлинопатией (с гомозиготной мутацией с.2779delG (Ala927LeufsX21)). После активации гена *DYSF* удалось детектировать его функциональные продукты (мРНК гена и белок) в транскрипционно активированных (ТА) клетках НЕК293Т (НЕК293Т\_ТА) и мРНК в фибробластах. Активация транскрипции интересующего гена в фибробластах и клеточной линии НЕК293Т\_ТА может быть использована для *in vitro* оценки эффективности геномного редактирования и генной терапии дисферлинопатии. Активируя ген, участвующий в развитии той или иной патологии, можно впоследствии использовать системы редактирования генома, а также конструкции для генной терапии. Это позволит более точно изучать вклад различных мутаций в патогенез заболевания и разрабатывать этиотропное лечение.

**Ключевые слова:** миодистрофии, дисферлинопатия, дисферлин, геномное редактирование, транскрипционная активация, модели заболеваний, CRISPR/dCas9, фибробласты

**Принятые сокращения:** ТА – транскрипционная активация; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ); ПКМД – поясно-конечностная мышечная дистрофия

**DOI:** 10.31857/S0041377124040064 **EDN:** QCPXOW

Мышечные дистрофии являются первичным поражением мышечной ткани, которое развивается непрерывно-прогрессирующе, приводя к инвалидности в трудоспособном возрасте, а при некоторых нозологических формах и к смерти в детском и подростковом возрастах. Общая распространенность мышечных дистрофий составляет 4:100 000 (Salari et al., 2022), наиболее часто встречающиеся – миодистрофия Дюшенна (3:100 000 общего населе-

ния и 20:100 000 живых новорожденных мальчиков) (Crisafulli et al., 2020) и группа поясно-конечностных мышечных дистрофий (от 1:14500 до 1:123 000) (Umakhanova et al., 2017; Liu et al., 2019). Миодистрофии вызваны мутациями в генах, кодирующих белки, вовлеченные в гистогенез и функционирование скелетной мышечной ткани. Этиотропного лечения этих заболеваний не существует (Деев и др., 2014).

Дисферлин относится к подгруппе ферлинов семейства белков, состоящих из  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительных доменов С2, которые участвуют в слипании везикул, транспортировке и восстановлении мембран (Lek et al., 2012). Мутации в гене *DYSF* способствуют развитию нескольких типов мышечных дистрофий: дистальной миопатии, поясно-конечностной мышечной дистрофии R2 (ПКМД R2) и миопатии Миоши. Это дегенеративные заболевания скелетных мышц, которые обычно появляются в подростковом возрасте и в конечном итоге приводят к потере мышечной массы и мобильности (Bouchard et al., 2023).

Аутосомно-рецессивная мутация с.2779delG связана с делецией гуанина в позиции 927 экзона 26 в гене *DYSF*. Это вызывает сдвиг рамки считывания и образуется преждевременный стоп-кодон (p.Ala927LeufsX21). В результате синтезируется либо нефункциональный белок, либо происходит нонсенс-опосредованный распад мРНК (Leshinsky-Silver et al., 2007; Khaiboullina et al., 2017; Исаев и др., 2023).

В настоящее время этиотропного лечения ПКМД R2 не существует. В качестве наиболее оптимального терапевтического подхода миодистрофий научное сообщество рассматривает методы генной терапии, позволяющие вносить изменения в генетический материал клетки (ДНК или РНК) (Яковлев и др., 2016; Chamberlain et al., 2017). Для разработки и оценки работоспособности такой стратегии необходимы модели *in vitro*, с помощью которых можно провести скрининг технологий (редактирования ДНК, РНК, доставки терапевтических молекул различными векторами) и выбрать наиболее точные и эффективные возможности для восстановления синтеза целевого белка. Для этого используют линии НЕК293, HeLa, Caco-2 и другие. Такие модели обладают рядом характеристик, важных для исследований: простота культивирования, быстрая скорость деления, высокая эффективность трансфекции и продукции белка (Thomas et al., 2005).

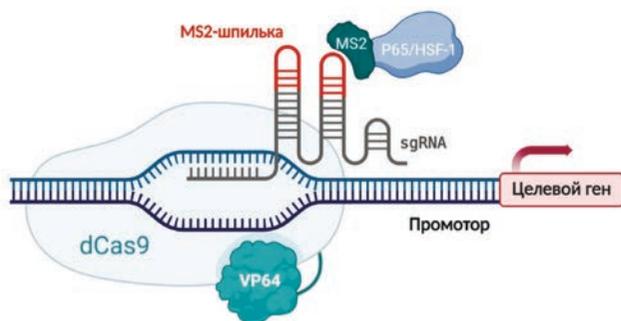
Однако этого недостаточно для детальной проверки генетических конструкций. Чтобы иметь полное представление о возможностях терапевтических агентов, направленно воздействующих на конкретные участки ДНК или РНК, исследователи работают с пациент-специфичными клетками. Для исследований

в области наследственных заболеваний мышечной ткани могут применяться:

- миобласты от здоровых доноров и пациентов с дисферлинопатией (Mamchaoui et al., 2011);
- индуцированные плюрипотентные стволовые клетки с последующей миогенной дифференцировкой (Ulman et al., 2021; Bruge et al., 2022);
- искусственные миобласты, полученные в результате лентивирусной трансдукции MyoD фибробластов (Kabadi et al., 2015; Rossi et al., 2023);
- клетки, в которых с помощью системы CRISPR/dCas9-SAM активирована транскрипция интересующего гена (Jiang et al., 2019; Heidersbach et al., 2023; Jensen et al., 2021).

В связи с низкой распространенностью орфанных заболеваний и, в частности, миодистрофий, а также многообразием мутаций и форм заболеваний (Illarionov et al., 1996; Argov et al., 2000; Urtizberea et al., 2008), забор биоптата для выделения первичных миобластов в условиях лаборатории зачастую весьма затруднителен. Для решения проблемы получения биоматериала мы создали клеточную тест-систему (модель заболевания) из имеющихся клеточных линий с помощью TA-системы CRISPR/dCas9-SAM (версии CRISPR/Cas9 технологии с инактивированным нуклеазным доменом Cas9) и дополнительными компонентами активации SAM (synergistic activation mediator). С помощью направляющей РНК (sgRNA) SAM целенаправленно рекрутирует комбинации белков MS2-P65-HSF1 к области целевого промотора и за счет этого включает транскрипцию интересующего гена (рис. 1) (Hunt et al., 2021).

CRISPR/dCas9-SAM состоит из: 1) гибрида инактивированной нуклеазы dCas9 и белка VP64, 2) гидовой РНК (sgRNA) с двумя РНК-аптамерами MS2 и 3) вспомогательного белка активации MS2-P65-HSF1. Доставка комплекса осуществляется трансдукцией трех отдельных лентивирусных частиц, содержащих каждый из компонентов. Внутри клетки комплекс из sgRNA-MS2 и dCas9-VP64 рекрутирует комбинацию белков MS2-P65-HSF1 к области целевого промотора и таким образом обеспечивает его активацию и начало трансляции белка (Konermann et al., 2015).



**Рис. 1.** Система транскрипционной активации CRISPR/Cas9-SAM.

В качестве клеточной модели для включения транскрипции гена мы выбрали линию HEK293T, в которой, согласно данным (The human protein atlas; <https://www.proteinatlas.org>), эндогенный дисферлин не обнаруживается, исследуемый белок не продуцируется, и его детекция возможна только после активации, что подтверждено различными исследованиями (Старостина и др., 2012; Tominaga et al., 2021). Мы также использовали фибробласты пациента с дисферлинопатией [с.2779delG (Ala927LeufsX21)] (далее – DYSF-нокаутные фиброласты) (Khaiboullina et al., 2017; Исаев и др., 2023).

Цель работы заключалась в получении транскрипционно активированных (ТА) клеток HEK293T (HEK293T\_TA) и мутантных фибробластов из десны пациента с последующим их использованием в качестве *in vitro* модели для генной терапии. В работе мы успешно применили систему CRISPR/dCas9-SAM и обеспечили включение гена *DYSF*. В полученных клетках HEK293T\_TA детектировали мРНК гена *DYSF* и белок дисферлин; мРНК *DYSF* также была обнаружена в фибробластах после ТА. Это дает нам возможность использовать их для более глубокой оценки эффективности терапевтических конструкций.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клетки и их культивирование.** Фибробласты десны пациента с мутацией с.2779delG (Ala927LeufsX21) в 26-м экзоне гена дисферлина были выделены из биоптата экплантационным методом по стандартному протоколу (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8071911/>). Биоптаты десны пациента были получены в ходе операции, с предварительным получением

информированного согласия пациента (Zorin et al., 2017).

В работе использовали клеточные линии HEK293T (ATCC, США), C2C12 (ATCC, США) и миобласты человека без дисферлинопатии (получены из ЦКП “Биобанк” Медико-генетического научного центра им. академика Н.П. Бочкова, Москва). Клетки культивировали в среде DMEM (“ПанЭко”, Россия), содержащей фетальную бычью сыворотку (FBS; Gibco, США) в количестве 10% (фибробласты), 5% (HEK293T) или 15% (миообласты), 1мМ глутамина (“ПанЭко”, Россия), 50 ед./мл пенициллин–стрептомицина (“ПанЭко”, Россия) в пластиковых культуральных чашках без дополнительного покрытия в CO<sup>2</sup>-инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub>, 37° С и влажности 80%. Среду меняли каждые 72 ч. Как только клетки достигали желаемой конfluence, их промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS; “ПанЭко”, Россия), а затем пассировали с использованием 0.25%-ного раствора трипсина (“ПанЭко”, Россия). Клетки инкубировали в течение 5 минут для нарушения межклеточных контактов и отделения от культурального пластика. После этого инактивировали трипсин эквивалентным объемом среды. Клетки собирали, промывая культуральную чашку потоком среды, переносили в пробирку емкостью 15 мл и центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли и клетки ресуспендировали в культуральной среде. Затем необходимое количество клеточной суспензии высевали на культуральный пластик.

Для криоконсервации клетки, снятые с чашки, ресуспендировали в FBS и переносили в криопробирку. К суспензии по каплям добавляли равный объем смеси FBS и 20% ДМСО (“ПанЭко”, Россия) и замораживали при –70° С. На следующий день замороженные клетки переносили в жидкий азот для длительного хранения.

**Проточная цитометрия.** Антигенные свойства фибробластов человека анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на приборе FACS Aria III (BD Bioscience, США) согласно инструкции производителя (BD Bioscience, США) с использованием набора антител Stemflow™ hMSC Analysis Kit (BD Bioscience, США) к CD73, CD90, CD105 и коктейль антител к CD11b, CD19, CD34, CD45, HLA-

DR, контроли для проведения компенсации и изотипические контроли.

Охарактеризованные клетки были иммортализованы посредством нокаута гена *p53*. Нокаут осуществляли трансдукцией лентивируса, собранного с помощью плазмиды pLVUHshp53 (#11653; Addgene plasmid, Patrick Aebischer, <http://n2t.net/addgene:11653>; RRID:Addgene\_11653), содержащей зеленый флуоресцирующий белок (gfp) (Szulc et al., 2006). Для получения чистой популяции клеток, несущих LVUHshp53-gfp, клетки сортировали с помощью проточного цитофлуориметра-сортера BD FACS Aria III (BD Bioscience, США).

**Вестерн-блот-анализ.** Электрофорез проводили по методу Лэммли с использованием 6%-ного концентрирующего и 10%-ного разделяющего полиакриламидных гелей. Разделение белков осуществляли при силе тока 30 мА на один гель в трис-глициновом электродном буфере (BioRad, США). Электрофорез останавливали после достижения фронтом бромфенолового синего конца геля.

Далее проводили электроперенос белков из полиакриламидного геля на PVDF-мембрану (BioRad, США), предварительно активированную 96%-ным этанолом в течение 1 мин при силе тока 0.8 мА/см<sup>2</sup> с использованием прибора для полусухого переноса TE77XP (Serva, Германия). PVDF-мембраны инкубировали в блокирующем буфере с первичными поликлональными антителами к белку *p53* (ab131442; Abcam, Великобритания; разведение 1:200) в течение ночи при 4°С. Для приготовления отмывочного раствора использовали PBS, содержащий 0.1% Tween 20 (Sigma, США). Отмывку от несвязавшихся первичных антител проводили 3 раза в течение 10 минут при комнатной температуре и перемешивании на шейкере. Затем мембраны инкубировали при комнатной температуре в течение часа со вторичными поликлональными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (ab154; Sigma, США; разведение 1:2000).

Для оценки наработки белка DYSF использовали первичные поликлональные антитела к дисферлину в блокирующем буфере (ab15108; Abcam, Великобритания; разведение 1:200) и вторичными поликлональными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (ab154; Sigma, США; разведение 1:2000). Для

нормализации данных использовали β-актин (8227; Abcam, Великобритания).

Визуализацию иммунного преципитата проводили с помощью хромогенного субстрата Peroxidase substrate solution (Vector Laboratories, США). Реакцию останавливали отмывкой PVDF-мембраны в дистиллированной воде. Мембраны высушивали на фильтровальной бумаге, оцифровывали на сканере ChemiDoc (BioRad, США). Денситометрию осуществляли с помощью стандартной программы ImageJ.

**Сборка лентивирусных конструкций.** В ходе работы использовали плазмидные конструкции: оболочечную плазмиду для лентивирусов pCMV-VSV-G (Lab. Bob Weinberg; #8454, Addgene plasmid: <http://n2t.net/addgene:8454>; RRID:Addgene\_8454) (Stewart et al., 2003), упаковочную лентивирусную плазмиду psPAX2 (Lab. Didier Trono, #12260, Addgene plasmid: <http://n2t.net/addgene:12260>; RRID:Addgene\_12260), векторные плазмиды lenti MS2-P65-HSF1\_Hygro (Feng Zhang; #61426, Addgene plasmid: <http://n2t.net/addgene:61426>; RRID:Addgene\_61426), lenti dCAS-VP64\_Blast (Feng Zhang, #61425A, Addgene plasmid: <http://n2t.net/addgene:61425>; RRID:Addgene\_61425), lenti sgRNA(MS2)\_zeo backbone (gRNA\_1, gRNA\_4) (Feng Zhang, #61427, Addgene plasmid: <http://n2t.net/addgene:61427>; RRID:Addgene\_61427) (Konermann et al., 2015), pLVUHshp53 (Patrick Aebischer & Didier Trono, #11653, Addgene plasmid: <http://n2t.net/addgene:11653>; RRID:Addgene\_11653) (Szulc et al., 2006). Для получения рекомбинантного репликационно-дефектного лентивируса проводили котрансфекцию пакующей клеточной линии HEK293A тремя плазмидами (оболочечной, упаковочной и векторной), согласно стандартному протоколу (Salmon et al., 2006).

**Оптимизация концентраций антибиотиков.** Для определения концентрации антибиотиков максимального ингибирования клеток (IC100) проводили MTS-тест по стандартному протоколу (Arab-Bafrani et al., 2016). Количество жизнеспособных клеток оценивали путем измерения флуоресценции образовавшегося формазана (CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent, Promega, США) на микропланшетном спектрофотометре Tecan Infinite M200 Pro (Tecan Group Ltd., Швейцария) при длине волны 490 нм. MTS-тест проводили в соответствии

с инструкцией производителя (Promega™ CellTiter 96™ AQueous one solution cell proliferation assay, США). Для селекции использовали антибиотики бластицидин (10 мг/мл; Invivogen, США), гигромицин (50 мг/мл; Invivogen, США), зеоцин (100 мг/мл; Invivogen, США). Для выбора концентрации, при которой происходит гибель всех клеток использовали разведения, согласно протоколам производителя: бластицидин: 2–15 мкг/мл, гигромицин: 50–250 мкг/мл, зеоцин: 100–500 мкг/мл. Замену среды с антибиотиком производили каждые 3–4 сут. После этого выбирали концентрацию, при которой происходит гибель клеток в течение 1–2 нед.

**Транскрипционная активация.** ТА-система CRISPR/dCas9-SAM состоит из гибрида инактивированной нуклеазы dCas9 и белка VP64, гидовой РНК (sgRNA) с двумя РНК-аптамерами MS2 и вспомогательного белка активации MS2-P65-HSF1. Доставка комплекса осуществлена трансдукцией трех отдельных лентивирусных частиц, содержащих каждый из компонентов. Внутри клетки комплекс sgRNA–MS2 и dCas9–VP64 рекрутирует комбинацию белков MS2–P65–HSF1 к области целевого промотора и таким образом обеспечивают его включение и начало трансляции целевого белка (Konermann et al., 2015).

Для специфичной работы системы была использована коммерчески доступная гидовая РНК, нацеленная на первые 200 п.н. выше сайта начала транскрипции (TSS) гена *DYSF* (GenScript, США). Итоговая последовательность sgRNA1 (CGCCGCGGGCAGGGCGGATC) клонирована в gRNA-экспрессионный вектор pLenti\_sgRNA(MS2)\_зо.

Фибробласты с мутацией в 26-м экзоне гена *DYSF*, нокаутные по гену *p53* (HF-mut26-p53) и фибробласты с мутацией в 26 экзоне гена *DYSF* без нокаута гена *p53* (HF-mut26) рассеивали в 6-луночный культуральный планшет по 30 000 клеток на 1 лунку. Смешивали 250 мкл концентрированного вируса (множественность заражения –5 MOI/кл.) с 750 мкл среды альфа-МЕМ (“ПанЭко”, Россия) и 4 мкл протамина сульфата (5 мг/мл; Sigma, США). Через 6 ч меняли среду в лунках на свежую по 2 мл на лунку. Лентивирус dCAS-VP64 имеет селективный маркер – устойчивость к антибиотику бластицидину. В качестве контроля для селекции использовали интактные клетки HF-mut26-p53, контро-

лем эффективности трансдукции служили HF-mut26. Селекцию начинали через 5 сут после трансдукции. Через 3 нед. выжившие клетки со вставкой лентивируса с dCAS-VP64 пересевали в культуральный флакон T25 и растили до образования монослоя. Затем часть клеток замораживали и хранили при –80°С, а часть сеяли для трансдукции следующим фактором. Таким образом, получили клеточную линию HF-mut26-p53 + dCAS-VP64.

Аналогично проводили трансдукцию фибробластов HF-mut26-p53 и HF-mut26 лентивирусом, кодирующим транскрипционный фактор MS2-P65 HSF1, который имеет маркер для селекции – устойчивость к гигромицину. Далее иммортализованные клетки HF-mut26+dCAS-VP64+MS2-P65\_HSF1 трансдуцировали лентивирусом, кодирующим гидовую РНК sgRNA(MS2). Проводили селекцию с помощью антибиотика зеоцина. Получили клеточную линию иммортализованных дисферлин-дефицитных фибробластов десны пациента с дисферлинопатией, с ТА-геном дисферлина HF-mut26-p53+dCAS-VP64+MS2-P65\_HSF1+sgRNA(MS2) (далее – HF-mut26-p53\_TA).

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ).** Осадок фибробластов собирали с помощью центрифугирования при 500 g в течение 5 мин. Общую РНК выделяли с использованием реагента TRIzol (Invitrogen, США) по методике, рекомендованной производителем. Количественную ПЦР проводили на амплификаторе CFX96 Touch (BioRad, США) в объеме 20 мкл с применением готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS (“Евроген”, Россия) и 5 пмоль каждого праймера. Режим амплификации: 1 цикл 94°С – 180 с; 40 циклов 95°С – 15 с; 60°С – 15 с; 72°С – 15 с. Кривая плавления: 62–94°С с шагом 0.5°С – 15 с. В качестве матрицы выступала кДНК, полученная в ходе ОТ. Праймеры для *DYSF* человека (и клеток C2C12): прямой CGTGATGGATGACAAGAGTGA (CATGGTGATGACAAGAGCGA); и обратный CGATGGCATAGGGATCAGAAA (CGATGGCGTAGGGATCAGAGA).

Количество кДНК, соответствующей транскриптам целевых и референсных генов определяли по разности порогового цикла реакции (Ct) для каждого образца. В качестве референсного гена был выбран ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*GAPDH*). Для

количественного анализа экспрессии генов использовали метод  $\Delta\Delta C_t$ . На первом этапе проводили нормализацию данных, используя усредненные значения  $C_t$  референсного гена *GAPDH* и рассчитывали значения  $\Delta C_t$ , путем вычитания значения  $C_t$  референсного гена из значения  $C_t$  исследуемого гена. Далее рассчитывали значения  $\Delta\Delta C_t$ , вычитая значения  $\Delta C_t$  контрольного образца из значения  $\Delta C_t$  экспериментального образца.

В качестве положительных контролей использовали миобласты человека без дисферлинопатии и клеточную линию C2C12. Экспрессия *DYSF* в C2C12 была описана в ранних проведенных исследованиях (Belanto et al., 2010; Defour et al., 2014). Отрицательным контролем при анализе клеток HEK293T\_TA служили клетки HEK293T, в которых ген *DYSF* не был активирован.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel. Достоверность различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента (двухвыборочный). Различия считали достоверными при  $P < 0.05$ .

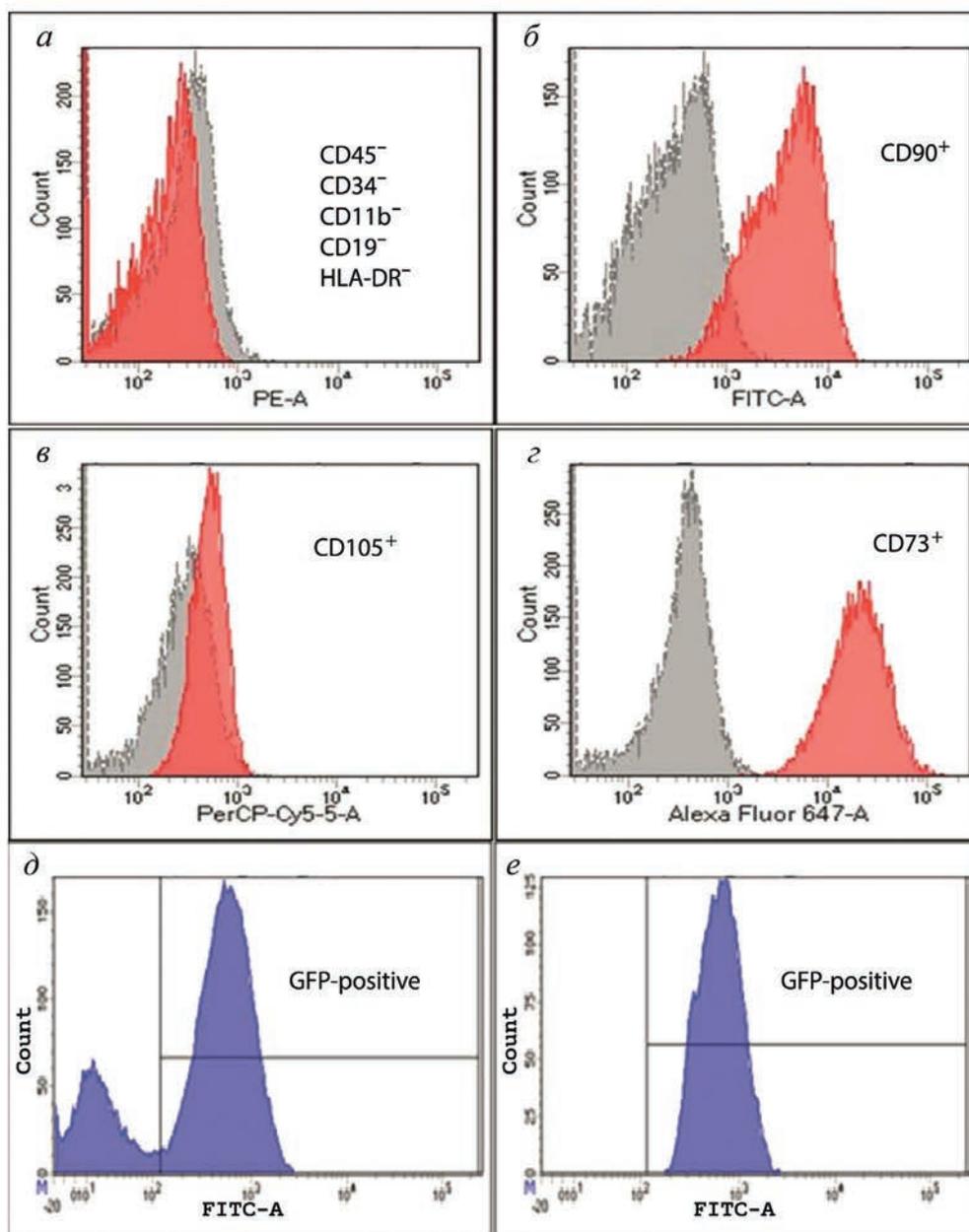
Использованные реактивы: набор антител Stemflow™ hMSC Analysis Kit (BD, США), плазмида pLVUHshp53 (#11653; Addgene plasmid, Patrick Aebischer & Didier Trono); оболочечная плазмида для лентивирусов pCMV-VSV-G (#8454; Addgene plasmid, Bob Weinberg); упаковочная лентивирусная плазмида psPAX2 (#12260; Addgene plasmid, Didier Trono); векторные плазмиды lenti MS2-P65-HSF1\_Hygro (#61426), lenti dCAS-VP64\_Blast (#61425) и lenti sgRNA(MS2)\_zeo backbone (gRNA\_1, gRNA\_4) (#61427; Addgene plasmid, Feng Zhang); последовательность sgRNA1 CGCCGCGGGCAGGGCGGATC (GenScript, США), бластицидин, гигромицин, зеоцин и TRIzol (Invitrogen, США); qPCRmix-HS (Евроген, Россия), поликлональные антитела кролика к белку p53 (#ab131442), дисферлину (#ab15108) и  $\beta$ -актину (#8227) (Abcam, Великобритания); вторичные поликлональные антитела козы к иммуноглобулину G кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (#A6154; Sigma, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Типирование фибробластов и получение иммортализованной культуры. Иммунофенотипирование показало специфичность клеток, выделенных из биоптата десны по поверхностным мезенхимным маркерам (мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и фибробластов). Проведена характеристика выделенной популяции первичных фибробластов (рис. 2a–e). Для иммортализации нативные фибробласты генетически модифицировали рекомбинантным лентивирусом (pLVUHshp53), кодирующим короткими шпилечными РНК (кшРНК) к нуклеотидной последовательности РНК *p53*. Далее с помощью проточного цитофлуориметра-сортера получали чистую популяцию клеток, несущих LVUHshp53-gfp.

Для проверки успешного нокаута *p53* проведен анализ с помощью вестерн-блоттинга (рис. 3). В качестве контрольных клеток использовали немодифицированные фибробласты десны, полученные от пациента (см. раздел “Материал и методика”), и детектировали продукт, соответствующий по молекулярной массе белку p53 (53 кДа).

**Активация транскрипции гена *DYSF* в фибробластах и клетках HEK293.** Детекция продуктов экспрессии гена. Гидовая РНК (GenScript, США) для специфичной работы системы SAM (sgRNA1 – CGCCGCGGGCAGGGCGGATC) нацелена на первые 200 п.н. выше сайта начала транскрипции –(TSS) гена *DYSF* и лигирована в gRNA-экспрессионный вектор (pLenti\_sgRNA(MS2)\_zeo). Далее для осуществления TA гена *DYSF* лентивирусами, кодирующими SAM-gRNA1, dCas9-VP64, MS2-P65-HSF1 были трансдуцированы фибробласты из десны пациента с дисферлинопатией и клетки HEK293T. После этого проводили селекцию клеток антибиотиками: фибробластов – гигромицином (в концентрации 200 мкг/мл), зеоцином (225 мкг/мл) и бластицидином (10 мкг/мл); клеток HEK293T – гигромицином (150 мкг/мл), зеоцином (200 мкг/мл) и бластицидином (7.5 мкг/мл). После селекции получили клетки, в которых прошла генетическая модификация вирусами и, соответственно, TA целевого гена.

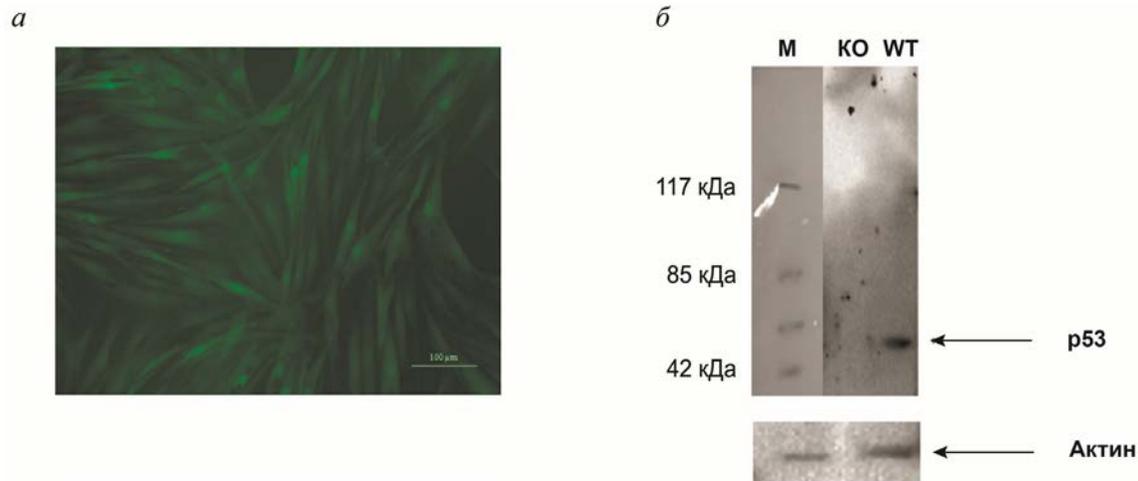


**Рис. 2.** Распределение фибробластов, выделенных из десны пациента с дисферлинопатией, по поверхностным маркерам (иммунофенотипирование). По вертикали – число клеток; по горизонтали – интенсивность свечения зонда, связанного с соответствующим антителом. *a* – Клетки, негативные по маркерам CD45, CD34, CD11b, CD19 и HLA-DR; *b* – клетки CD90<sup>+</sup> (94.4%), *c* – клетки CD105<sup>+</sup> (90.5%), *d* – клетки CD73<sup>+</sup> (91.5%); *e*, *f* – гистограмма распределения клеточной популяции по интенсивности флуоресцентного сигнала GFP соответственно до и после сортировки. Проточная цитометрия.

**Детекция мРНК и белка, кодируемого геном *DYSF*.** Методом ОТ-ПЦР было показано, что после активации гена *DYSF* в фибробластах экспрессируется мРНК этого гена (рис. 4а). В качестве положительного контроля использовали миобласты человека (НМб) без мутации в гене *DYSF*, полученные по ранее описанной методике (Був и др., 2020); в качестве отрицательного контроля – фибробласты

с мутацией в 26 экзоне гена *DYSF*, которые не несут компоненты CRISPR/dCas9-SAM.

В культуре клеток HEK293T\_TA с помощью ОТ-ПЦР-анализа выявили увеличение уровня экспрессии *DYSF* при использовании праймеров к кДНК дисферлина (рис. 4б). Чтобы убедиться в том, что происходит наработка белка дисферлина, мы проводили иммуноблоттинг. По результатам реакции детектировали бэнд,



**Рис. 3.** Детекция нокаута *p53* в фибробластах. *a* – Фибробласты пациента с дисферлинопатией, трансдуцированные лентивирусом LVUHshp53-gfp.3. *б* – Вестерн-блот: КО – иммортализованные фибробласты кожи пациента с дисферлинопатией, полученные путем нокаута гена-онкосупрессора *p53* (53 кДа), WT – фибробласты кожи пациента с дисферлинопатией. М – мол. маркер.

соответствующий ожидаемому размеру белка дисферлина (рис. 4*б*). Дополнительно оценивали результаты с помощью денситометрии (рис. 4*г*).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Метод для транскрипционной активации генов с применением CRISPR/Cas был впервые описан в 2015 г. (Konermann et al., 2015) и нашел применение в создании подходов к лечению онкологических заболеваний (Liu et al., 2019), ожирения (Wang, 2020), фиброза печени (Luo et al., 2022) и других. Были разработаны индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), постоянно экспрессирующие элементы комплекса SAM–SAM-iPSC (Xiong et al., 2016) и трансгенные мыши (Hunt et al., 2021). SAM-iPSC представляют собой новый полезный инструмент для изучения генетической регуляции пролиферации и дифференцировки стволовых клеток посредством CRISPR-опосредованной активации генов. На модели мышей SAM также можно модулировать всевозможные состояния с помощью разных направляющих РНК. Такие платформы ТА-генов с CRISPR/dCas9-SAM позволяют направленно изучать патогенез заболеваний и являются удобной моделью для разработки терапии. Ключевыми аспектами и преимуществами CRISPR/dCas9-SAM являются:

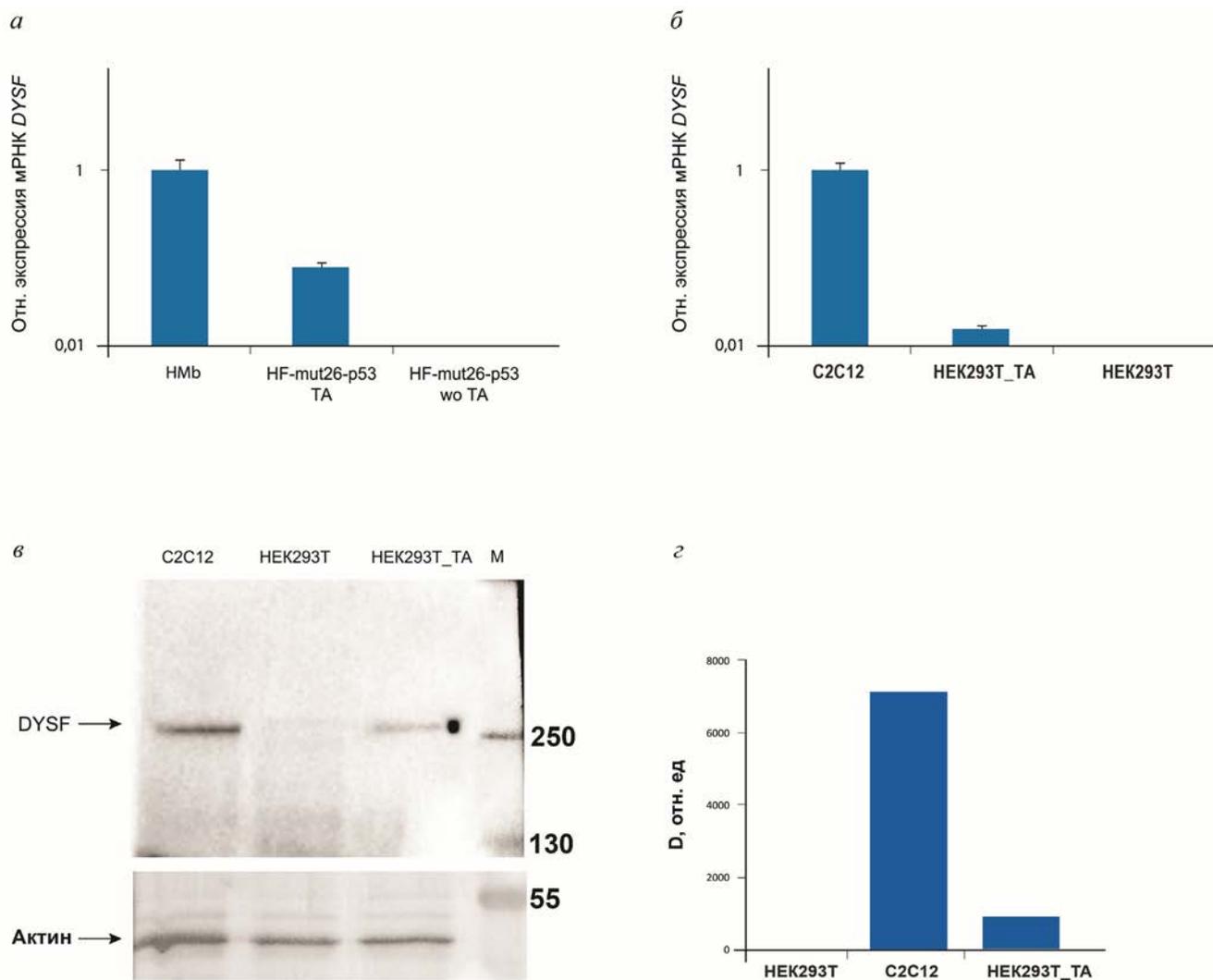
**1. Эффективность и специфичность.** Технология CRISPR/dCas9-SAM обладает высокой

специфичностью к целевому гену, что снижает вероятность случайных мутаций и влияния на другие гены, а также сравнительно высокой эффективностью (Konermann et al., 2015; Wang et al., 2016).

**2. Усиленная транскрипция.** Система активации позволяет значительно усилить транскрипцию выбранных генов, что может быть весьма полезно при изучении их функций или при разработке генной терапии (Konermann et al., 2015).

Модели *in vitro* являются отправной точкой в биологических и медицинских исследованиях. Ученые используют разные типы моделей – двумерные (2D) модели (монослойные клеточные линии) (Mamchaoui et al., 2011; Xiong et al., 2016; Bruge et al., 2022; Rossi et al., 2023), которые легко изучаются на молекулярном уровне и трехмерные (3D) модели (органойды и органы на чипах), которые имитируют функциональные свойства нативной ткани (Agrawal et al., 2017; Shin et al., 2022). Основная цель состоит в том, чтобы разработать модели, которые сокращают стоимость и время измерений и дают все необходимые объемы экспериментальных данных.

*In vitro* платформы используют уже многие десятилетия для большого числа заболеваний: остеоартрита (Johnson et al., 2016), псориаза (Jean et al., 2009), заболеваний сердца (Tumiat et al., 1994; Vunjak Novakovic et al., 2014), болезни Альцгеймера (Stoppelkamp et al., 2011), тромбозов (Zhang et al., 2017), разных видов рака



**Рис. 4.** Детекция мРНК и белка гена *DYSF* в фибробластах и HEK293T до (wo TA) и после (TA) транскрипционной активации гена *DYSF* с помощью CRISPR/dCas9 SAM. *а* – Относительная экспрессия мРНК дисферлина ( $\Delta\Delta$ CT, ОТ-ПЦР) в миобластах человека без мутации в гене *DYSF*, использованных в качестве контрольных клеток (HMb), фибробластах пациента после транскрипционной активации (TA) *DYSF* (HF-mut26-p53\_TA) и фибробластах пациента, не несущих компонент системы активации (HF-mut26-p53 wo TA). *б* – Относительная ( $\Delta\Delta$ CT) экспрессия мРНК дисферлина в клетках HEK293T до и после TA *DYSF* и клетках C2C12, которые служили положительным контролем. *в*, *з* – Соответственно вестерн-блоты с антителами к белку дисферлин и их денситограммы (D – оптическая плотность). *а*, *б*: Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

(Katt et al., 2016) и миодистрофий (Barthelemy et al., 2022; Bruge et al., 2022). Но существует сложность с получением пациент-специфичных линий из-за необходимости проведения высокоинвазивных вмешательств (например, биопсия мышечной ткани). В этом случае возможно применение ТА. Источниками для создания тест-систем в таком случае могут выступать как клетки пациента, относительно легко полученные в амбулаторных условиях (например, фибробласты кожи и десны) (Zorin et al., 2017), так и клетки, которые широко ис-

пользуются в биомедицинских исследованиях (HEK293).

Клеточные культуры, с активированными интересующими генами – это удобная и экономичная платформа для редактирования генома (использование систем редактирования генома в таких культурах позволяет моделировать различные заболевания, а также вносить мутации и изучать влияние той или иной на патогенез) и тестирования генотерапевтических конструкций. Функционирующие в мышечной ткани белки, мутации в которых становятся

причиной различных мышечных дистрофий, как правило неактивны в указанных выше видах клеток. Тогда для восстановления синтеза белка возможно применение системы активации CRISPR/dCAS9-SAM с отработкой методики по следующему пути: 1) получение клеток из биоптата пациента; 2) активация целевого гена (внесение dCAS9-SAM); 3) коррекция мутации в целевом гене (с помощью технологии CRISPR/Cas9, внесении генотерапевтических конструкций или на уровне РНК с использованием микроРНК, кшРНК и др.); 4) детекция продуктов экспрессии гена. Для клеток НЕК293, не имеющих патогенных мутаций в “мышечных” генах, можно искусственно активировать транскрипцию таких генов и затем применять методы генной инженерии для разработки терапии или изучения развития заболеваний.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе продемонстрирована концепция создания ТА-клеточных культур. Нами была успешно использована технология CRISPR/dCas9-SAM для создания *in vitro* модели дисферлинопатии с применением нокаутных фибробластов из десны пациентов с мутацией в гене *DYSF* и клеток НЕК293Т\_ТА. В культурах, несущих компоненты SAM, была активирована транскрипция *DYSF* путем внесения специфической sgRNA. В полученных клетках НЕК293Т\_ТА детектировали мРНК гена *DYSF* и белок дисферлин. мРНК гена *DYSF* была обнаружена и в фибробластах после ТА. Далее созданные тест-системы дисферлинопатии будут использованы для оценки эффективности генотерапевтических конструкций и перманентного экзон-скиппинга (пропуска экзонов).

### БЛАГОДАРНОСТИ

А. А. Ризванов, В.В. Соловьева, И.Г. Старостина и А.А. Шаймарданова благодарны за поддержку Программой стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (“Приоритет-2030”).

Авторы благодарят В.Л. Зорина и А.И. Зорину за предоставление фибробласты десны

пациента с дисферлинопатией (с гомозиготной мутацией с.2779delG (Ala927LeufsX21)).

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-1346; ООО “Генотаргет”, Инновационный центр “Сколково”).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа выполнена в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г., с поправками, внесенными в 1975 и 1983 гг.). Проведение исследований одобрено локальным этическим комитетом федерального автономного образовательного учреждения высшего образования “Казанский (Приволжский) федеральный университет” (протокол № 14 от 08.02.2019).

Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Деев Р.В., Мавликеев М.О., Бозо И.Я., Пулин А.А., Еремин И.И. 2014. Генно-клеточная терапия наследственных заболеваний мышечной системы: современное состояние вопроса. Гены и клетки. Т 9. № 4. С. 6. (Deev R.V., Mavlikeev M.O., Bozo I.Ya., Pulin A.A., Eremin I.I. 2014. Gene- and cell-based therapy of muscle system hereditary disorders: state-of-art. Genes Cells V. 9. No. 4. P. 6.)
- Исаев А.А., Бардаков С.Н., Мкртчян Л.А., Мусатова Е.В., Хмелькова Д.Н., Гусева М.В., Каймонов В.С., Яковлев И.А., Деев Р.В. 2023. Новые варианты нуклеотидных последовательностей гена *DYSF*, выявленные методом секвенирования нового поколения. Мед. генетика. Т. 22. № 6. С. 3. (Isaev A.A., Bardakov S.N., Mkrtychyan L.A., Musatova E.V., Khmelkova D.N., Guseva M.V., Kaimonov V.S., Yakovlev I.A., Deev R.V. 2023. New nucleotide sequence variants of the *DYSF* gene, identified by the next-generation sequencing. Medical Genetics. V. 22. No. 6. P. 3.)

- Старостина И.Г., Соловьева В.В., Шевченко К.Г., Деев Р.В., Исаев А.А., Ризванов А.А. 2012. с. Гены и клетки. Т.7. № 3. С. 25. (*Starostina I.G., Solovyeva V.V., Shevchenko K.G. et al.* 2012. (Formation of the recombinant adenovirus encoding codon-optimized dysferlin gene and analysis of the recombinant protein expression in cell culture *in vitro*. *Cell. Transplantat. Tiss. Eng.* V.7. No. 3. P. 25.)
- Яковлев И.А., Деев Р.В., Соловьева В.В., Ризванов А.А., Исаев А.А. 2016. Пред- и посттранскрипционная модификация генетической информации в программе лечения мышечных дистрофий. Гены и клетки. Т.11. № 2. С. 42. (*Yakovlev I.A., Deev R.V., Solovyeva V.V., Rizvanov A.A., Isaev A.A.* 2016. Pre- and posttranscriptional genetic information modification in muscular dystrophy treatment. *Genes Cells.* V. 11. No 2. P. 42.)
- Agrawal G. Aung A., Varghese S. 2017. Skeletal muscle-on-a-chip: an in vitro model. V. 17. P. 3447. <https://doi.org/10.1039/c7lc00512a>
- Arab-Bafrani Z., Shahbazi-Gahrouei D., Abbasian M., Fesharaki M. 2016. Multiple MTS assay as the alternative method to determine survival fraction of the irradiated HT-29 colon cancer cells. *J. Med. Signals Sens.* V. 6. P. 112.
- Argov Z., Sadeh M., Mazor K., Soffer D., Kahana E., Eisenberg I., Mitrani-Rosenbaum S., Richard I., Beckmann J., Keers S., Bashir R., Bushby K., Rosenmann H. 2000. Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews. Clinical and genetic features. *Brain.* V. 6. P. 1229. <https://doi.org/10.1093/brain/123.6.1229>
- Barthelemy F., Santoso J.W., Rabichow L., Jin R., Little I., Nelson S.F., McCain M.L., Miceli M.C. 2022. Modeling patient-specific muscular dystrophy phenotypes and therapeutic responses in reprogrammed myotubes engineered on micromolded gelatin hydrogels. *Front Cell Dev Biol.* V. 10: 830415. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.830415>
- Belanto J., Diaz-Perez S., Magyar C., Maxwell M., Yilmaz Y., Topp K., Boso G., Jamieson C.H., Cacalano N.A., Jamieson C.A. 2010. Dexamethasone induces dysferlin in myoblasts and enhances their myogenic differentiation. *Neuromuscul Disord.* V. 2. P. 111. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2009.12.003>
- Bouchard C., Tremblay J.P. 2023. Portrait of dysferlinopathy: diagnosis and development of therapy. *J. Clin. Med.* V. 12: 6011. <https://doi.org/10.3390/jcm12186011>
- Bruge C., Geoffroy M., Benabides M., Pellier E., Gicquel E., Dhiab J., Hoch L., Richard I., Nissan X. 2022. Skeletal muscle cells derived from induced pluripotent stem cells: a platform for limb girdle muscular dystrophies. *Biomed.* V. 10: 1428. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061428>
- Chamberlain J.R., Chamberlain J.S. 2017. Progress toward gene therapy for duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* V. 5. P. 1125. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.02.019>
- Crisafulli S., Sultana J., Fontana A., Salvo F., Messina S., Trifiro G. 2020. Global epidemiology of duchenne muscular dystrophy: an updated systematic review and meta-analysis. *Orphanet J. Rare Dis.* V. 15. P. 141. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01430-8>
- Defour A., Van der Meulen J.H., Bhat R., Bigot A., Bashir R., Nagaraju K., Jaiswal J.K. 2014. Dysferlin regulates cell membrane repair by facilitating injury-triggered acid sphingomyelinase secretion. *Cell Death Dis.* V. 5: 1306. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.272>
- Heidersbach A.J., Dorighi K.M., Gome J.A. 2023. A versatile, high-efficiency platform for CRISPR-based gene activation. *Nat. Commun.* V. 14. P. 902. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36452-w>
- Hunt C., Hartford S.A., White D., Pefanis E., Hanna T., Herman C., Wiley J., Brown H., Su Q., Xin Y., Voronin D., Nguyen H., Altarejos J., Crosby K., Haines J. et al. 2021. Tissue-specific activation of gene expression by the Synergistic Activation Mediator (SAM) CRISPRa system in mice. *Nat. Commun.* V. 12. P. 2770. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22932-4>
- Illarioshkin S.N., Ivanova-Smolenskaya I.A., Tanaka H., Vereshchagin N.V., Markova E.D., Poleshchuk V.V., Lozhnikova S.M., Sukhorukov V.S., Limborska S.A., Slominsky P.A., Bulayeva K.B., Tsuji S. 1996. Clinical and molecular analysis of a large family with three distinct phenotypes of progressive muscular dystrophy. *Brain.* V. 6. P. 1895. <https://doi.org/10.1093/brain/119.6.1895>
- Jean J., Lapointe M., Soucy J., Pouliot R. 2009. Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *J. Dermatol. Sci.* V. 53. P. 19. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2008.07.009>
- Jiang J., Sun Y., Xiao R., Wai K., Ahmad M.J., Khan F.A., Zhou H., Li Z., Zhang Y., Zhou A., Zhang S. 2019. Porcine antiviral activity is increased by CRISPRa-SAM system. *Biosci. Rep.* V. 8. <https://doi.org/10.1042/BSR20191496>
- Jensen T.I., Mikkelsen N.S., Gao Z, Føjbelteder J., Pabst G., Axelgaard E., Laustsen A., König S., Reinisch A., Bak R.O. 2021. Targeted regulation of transcription in primary cells using CRISPRa and CRISPRi. *Genome Res.* V. 3111. P. 2120. <https://doi.org/10.1101/gr.275607.121>
- Johnson C.I., Argyle D.J., Clements D.N. 2016. In vitro models for the study of osteoarthritis. *Vet. J.* V. 209. P. 40. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.07.011>
- Kabadi A.M., Thakore P.I., Vockley C.M., Ousterout D.G., Gibson T.M., Guilak F., Reddy T.E., Gersbach C.A.

2015. Enhanced MyoD-induced transdifferentiation to a myogenic lineage by fusion to a potent transactivation domain. *ACS Synth. Biol.* V. 6. P. 689.  
<https://doi.org/10.1021/sb500322u>
- Katt M.E., Placone A.L., Wong A.D., Xu Z.S., Searson P.C.* 2016. *In vitro* tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 4. P. 12.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012>
- Khaiboullina S.F., Martynova E.V., Bardakov S.N., Mavlikeev M.O., Yakovlev I.A., Isaev A.A., Deev R.V., Rizvanov A.A.* 2017. Serum cytokine profile in a patient diagnosed with dysferlinopathy. *Case Rep. Med.* V. 2017: 3615354.  
<https://doi.org/10.1155/2017/3615354>
- Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Joung J., Abudayyeh O.O., Barcena C., Hsu P.D., Habib N., Gootenberg J.S., Nishimasu H., Nureki O., Zhang F.* 2015. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature.* V. 523. P. 583.  
<https://doi.org/10.1038/nature14136>
- Lek A., Evesson F. J., Sutton R. B., North K. N., Cooper S.T.* 2012. Ferlins: regulators of vesicle fusion for auditory neurotransmission, receptor trafficking and membrane repair. *Traffic.* V. 13. P. 185.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01267.x>
- Leshinsky-Silver E., Argov Z., Rozenboim L., Cohen S., Tzofi Z., Cohen Y., Wirguin Y., Dabby R., Lev D., Sadeh M.* 2007. Dysferlinopathy in the jews of the caucasus: a frequent mutation in the dysferlin gene. *Neuromus. Disord.* V. 17. P. 950.  
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.07.010>
- Liu W., Pajusalu S., Lake N.J., Zhou G., Ioannidis N., Mittal P., Johnson N.E., Wehl C.C., Williams B.A., Albrecht D.E., Rufibach L.E., Lek M.* 2019. Estimating prevalence for limb-girdle muscular dystrophy based on public sequencing databases. *Genet. Med.* V. 21. P. 2512.  
<https://doi.org/10.1038/s41436-019-0544-8>
- Luo N., Zhong W., Li J., Zhai Z., Lu J., Dong R.* 2022. Targeted activation of HNF4 $\alpha$ /HGF1/FOXA2 reverses hepatic fibrosis via exosome-mediated delivery of CRISPR/dCas9-SAM system. *Nanomed.* V. 17. P. 1411.  
<https://doi.org/10.1021/nm-2022-0083>
- Mamchaoui K., Trollet C., Bigot A., Negroni E., Chaouch S., Wolff A., Kandalla P.K., Marie S., Di Santo J., St. Guily J.L., Muntoni F., Kim J., Philippi S., Spuler S., Levy N., et al.* 2011. Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skeletal Muscle.* V. 1. P. 34.  
<https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-34>
- Rossi R., Torelli S., Ala P., Weston W., Morgan J., Malhotra J., Muntoni F.* 2023. MyoD-induced reprogramming of human fibroblasts and urinary stem cells in vitro: protocols and their applications. *Front. Physiol.* V. 14: 1145047.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1145047>
- Salmon P., Trono D.* 2006. Production and titration of lentiviral vectors. *Curr. Protoc. Neurosci.* V. 4. U. 4.21.  
<https://doi.org/10.0.3.234/0471142301.ns0421s53>
- Salari N., Fatahi B., Valipour E., Kazeminia M., Fatahian R., Kiaei A., Shohaimi S., Mohammadi M.* 2022. Global prevalence of Duchenne and Becker muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis. *J. Orthop Surg. Res.* V. 17. P. 96.  
<https://doi.org/10.1186/s13018-022-02996-8>
- Shin M.K., Bang J.S., Lee J.E., Tran H.D., Park G., Lee D.R., Jo J.* 2022. Generation of skeletal muscle organoids from human pluripotent stem cells to model myogenesis and muscle regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. N. 5108.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23095108>
- Stoppelkamp S., Bell H.S., Palacios-Filardo J., Shewan D.A., Riedel G., Platt B.* 2011. *In vitro* modelling of Alzheimer's disease: degeneration and cell death induced by viral delivery of amyloid and Tau. *Exp Neurol.* V. 229. P. 226.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.01.018>
- Stewart S.A., Dykxhoorn D.M., Palliser D., Mizuno H., Yu E.Y., An D.S., Sabatini D.M., Chen I.S., Hahn W.C., Sharp P.A., Weinberg R.A., Novina C.D.* 2003. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA.* V. 4. P. 493.  
<https://doi.org/10.1261/rna.2192803>
- Szulc J., Wiznerowicz M., Sauvain M.O., Trono D., Aebischer P.* 2006. A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat. Methods.* V. 3. P. 10.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth846>
- Thomas P., Smart T.G.* 2005. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* V. 51. P. 187.  
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>
- Tominaga K., Tominaga N., Williams E.O., Rufibach L., Schöwel V., Spuler S., Viswanathan M., Guarente L.P.* 2021. 4-Phenylbutyrate restores localization and membrane repair to human dysferlin mutations. *iScience.* V. 25. N. 103667.  
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103667>
- Tumiati L.C., Mickle D.A.G., Weisel R.D., Williams W.G., Li R.K.* 1994. An *in vitro* model to study myocardial ischemic injury. *J. Tiss. Culture Methods.* V. 16. P. 1.  
<https://doi.org/10.1007/BF01404830>
- Ulman A., Kot M., Skrzypek K., Szweczyk B., Majka M.* 2021. Myogenic differentiation of ips cells shows different efficiency in simultaneous comparison of protocols. *Cells.* V. 10. P. 1671.  
<https://doi.org/10.3390/cells10071671>
- Umakhanova Z.R., Bardakov S.N., Mavlikeev M.O., Chernova O.N., Magomedova R.M., Akhmedova P.G.,*

- Yakovlev I.A., Dalgatov G.D., Fedotov V.P., Isaev A.A., Deev R.V.* 2017. Twenty-year clinical progression of dysferlinopathy in patients from Dagestan. *Front. Neurol.* V. 8. P. 77.  
<https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00077>
- Urtizberea J.A., Bassez G., Leturcq F., Nguyen K., Krahn M., Levy N.* 2008. Dysferlinopathies. *Neurol. India.* V. 3. P. 289.  
<https://doi.org/10.4103/0028-3886.43447>
- Vunjak Novakovic G., Eschenhagen T., Mummery C.* 2014. Myocardial tissue engineering: *in vitro* models. *Cold Spring Harb. Perspect Med.* V. 4: a014076.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014076>
- Wang H., La Russa M., Qi L.S.* 2016. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annu. Rev. Biochem.* V. 85. P. 227.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014607>
- Wang C.H., Lundh M., Fu A., Kriszt R., Huang T.L., Lynes M.D., Leiria L.O., Shamsi F., Darcy J., Greenwood B.P., Narain N.R., Tolstikov V., Smith K.L., Emanuelli B., Chang Y.T., et al.* 2020. CRISPR-engineered human brown-like adipocytes prevent diet-induced obesity and ameliorate metabolic syndrome in mice. *Sci. Transl. Med.* V. 26: eaaz8664.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz8664>
- Xiong K., Zhou Y., Hyttel P., Bolund L., Freude K.K., Luo Y.* 2016. Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) stably expressing CRISPR-based synergistic activation mediator (SAM). *Stem Cell Res.* V. 17. P. 665.  
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.10.011>
- Zhang Y.S., Oklu R., Albadawi H.* 2017. Bioengineered *in vitro* models of thrombosis: methods and techniques. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* V. 7. P. 329.  
<https://doi.org/10.21037/cdt.2017.08.08>
- Zorin V.L., Pulin A.A., Eremin I.I., Korsakov I.N., Zorina A.I., Khromova N.V., Sokova O.I., Kotenko K.V., Kopnin P.B.* 2017. Myogenic potential of human alveolar mucosa derived cells. *Cell Cycle.* V. 16. P. 545.  
<https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1284714>

## DEVELOPMENT OF AN *IN VITRO* MODEL OF DYSFERLINOPATHY VIA CRISPR/CAS-MEDIATED TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF THE *DYSF* GENE

I. A. Yakovlev<sup>a, b, \*</sup>, Y. S. Slesarenko<sup>b</sup>, I. G. Starostina<sup>c</sup>, A. A. Shaimardanova<sup>c</sup>,  
 V. V. Solovyova<sup>c</sup>, P. A. Bobrovsky<sup>d</sup>, E. N. Grafkaia<sup>d</sup>, L. D. Belikova<sup>d</sup>, S. N. Bardakov<sup>a</sup>,  
 A. A. Rizvanov<sup>c, f</sup>, A. A. Isaev<sup>a</sup>, R. V. Deev<sup>a, b, e</sup>

<sup>a</sup>Artgene Biotech, Moscow, 119333, Russia

<sup>b</sup>OOO Genotarget, Skolkovo Innovation Center, Moscow, 121205, Russia

<sup>c</sup>Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008, Russia

<sup>d</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, 119435, Russia

<sup>e</sup>Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow 117418, Russia

<sup>f</sup>Division of Medical and Biological Sciences, Tatarstan Academy of Sciences, Kazan, 420111, Russia

\*E-mail: mail@genotarget.com

Scientists need cell models from human tissues to develop methods of gene therapy and genome editing for monogenic diseases. It is preferable to use minimally invasive methods to obtain samples; these tissues can be applied for further screening in order to select the most effective approach to restore the synthesis of the target protein. We used the CRISPR/Cas9-SAM transcriptional activation system, which ensures expression of the *DYSF* gene in HEK293T cells, as well as in fibroblasts from patients with dysferlinopathy (c.2779delG (Ala927LeufsX21)). After targeted activation of *DYSF*, it was possible to detect the main gene products: mRNA and protein (HEK293T\_TA) and mRNA (fibroblasts). Transcriptionally activated dysferlin-deficient fibroblasts and HEK293 cells can be used to evaluate the *in vitro* efficacy of gene therapy for dysferlinopathies.

**Keywords:** muscular dystrophy, dysferlinopathy, dysferlin, genome editing, transcriptional activation, disease models, CRISPR/Cas9, fibroblasts

---

Свидетельство о регистрации средства массовой информации:  
№ 0110265 от 8 февраля 1993 г., выдано Министерством печати и информации Российской Федерации

---

Подписано к печати ..... г. Формат 60×88<sup>1</sup>/<sub>8</sub> Усл. печ. л. ,  
Уч.-изд. л. , . Тираж экз. Зак. Бесплатно

---

Учредитель: Российская академия наук

---

Издатель: издательство «Наука». Россия, 121099 г. Москва, Шубинский пер., 6, стр. 1

ISSN 0041-3771. Журнал «Цитология», 2024, том 66, № 4. Стр. 307–392

Индекс 39442

2024 ЦИТОЛОГИЯ

Том 66, № 4