

ФИТОГОРМОНЫ ОКАЗЫВАЮТ ВЛИЯНИЕ НА ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ СТАТУС ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА ПУТЁМ АКТИВАЦИИ UPR

© 2023 Е.П. Турищева^{1*}, М.С. Вильданова¹, П.А. Вишнякова^{2,3}, Д.К. Матвеева⁴,
А.А. Саидова¹, Г.Е. Онищенко¹, Е.А. Смирнова¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: kitten-caterina@yandex.ru

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения РФ, 117997 Москва, Россия

³ Российский университет дружбы народов, 117198 Москва, Россия

⁴ ГИЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, 123007 Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.03.2023

После доработки 28.04.2023

Принята к публикации 02.05.2023

Нормализация секреторной активности и уровня дифференцировки клеток мезенхимного происхождения, в том числе фибробластов, является одной из важных биомедицинских проблем. Одним из решений этой проблемы является воздействие на сигнальный каскад «ответ на неправильно свёрнутые белки» (UPR), который активируется при дифференцировке фибробластов. В настоящем исследовании было изучено влияние фитогормонов на секреторную активность и дифференцировку культивируемых дермальных фибробластов человека. С помощью анализа уровня экспрессии генов, кодирующих маркеры UPR, в этих клетках мы установили, что фитогормон абсцизовая кислота (АБК) повышала экспрессию генов *GRP78* и *ATF4*, а фитогормон гиббереллиновая кислота (ГК) повышала экспрессию *CHOP*. Оценка секреторно-синтетической активности фибробластов показала, что АБК увеличивала уровень секреции и синтеза проколлагена I и уровень синтеза фибронектина, а также общую продукцию коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами. Кроме того, АБК стимулировала синтез маркера миофибробластов гладкомышечного актина α (α -SMA) и повышала количество миофибробластов в клеточной популяции. Напротив, ГК увеличивала уровень секреции фибронектина, но снижала уровень синтеза проколлагена I, а также общей продукции коллагеновых белков внеклеточного матрикса. Кроме того, при действии ГК снижался уровень синтеза α -SMA и количество миофибробластов в клеточной популяции. Наши результаты дают основания полагать, что фитогормоны являются модуляторами секреторно-синтетической активности фибробластов и оказывают влияние на их дифференцировочный статус.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: абсцизовая кислота, гиббереллиновая кислота, фибробласты, миофибробласты, заживление ран, фиброз, дифференцировка, гладкомышечный актин.

DOI: 10.31857/S032097252306009X, **EDN:** EFPTLN

ВВЕДЕНИЕ

Поддержание на оптимальном уровне секреторно-синтетических процессов у разных типов дифференцированных клеток важно для

нормального функционирования органов и тканей. Нарушение регуляции секреторно-синтетической активности, вызванное изменением дифференцировочного статуса клеток или изменением количества дифференцированных

Принятые сокращения: АБК – абсцизовая кислота; ГК – гиббереллиновая кислота; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; ATF4 – активирующий фактор транскрипции 4 (activating transcription factor 4); CHOP – ССААТ/белок, гомологичный энхансер-связывающему белку (ССААТ/enhancer-binding protein homologous protein); GRP78 – белок 78 кДа, регулируемый глюкозой (glucose-regulated protein 78); IRE1 – требующий инозитол белок 1 (inositol-requiring protein 1); PERK – киназа ЭПР, подобная белковой киназе RNA (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase); sXBP1 – сплайсированный X-бокс-связывающий белок 1 (spliced X-box-binding protein 1); UPR – ответ на неправильно свёрнутые белки (unfolded protein response); α -SMA – гладкомышечный актин α (α -smooth muscle actin).

* Адресат для корреспонденции.

клеток, ведёт к развитию широкого спектра патологических состояний, в том числе фиброзу, снижению регенеративного потенциала, диабету II-го типа, остеопорозу и многим другим. Так, например, избыточная дифференцировка фибробластов в миофибробласты вызывает фиброз, сопровождающийся повышенной продукцией внеклеточного матрикса, а недостаточная активность миофибробластов и/или их недостаточное количество приводит к подавлению регенеративных процессов [1–6]. Дедифференцировка β -клеток островков Лангерганса, секретирующих инсулин, является одной из причин, вызывающих диабет II-го типа [7–9], а снижение активности остеобластов в менопаузе ведёт к остеопорозу [10]. Следует отметить, что для дифференцировки многих клеток с высокой секреторной активностью, в том числе фибробластов, предшественников β -клеток и преостеобластов, необходима активация сигнального каскада, носящего название «ответ на неправильно свёрнутые белки» или UPR [2, 11–18]. При этом до настоящего времени неизвестно, является ли активация UPR индуктором дифференцировки клеток или же UPR запускается из-за повышенного синтеза секреторных белков в процессе дифференцировки [18]. Нормализация секреторной активности и уровня дифференцировки клеток, в частности за счёт воздействия на молекулярные компоненты UPR, является одной из задач терапии многих патологий [1, 7, 9, 12, 13, 18].

Биологически активные молекулы, обнаруженные в различных видах растений, давно являются объектом пристального внимания в биологии и медицине и широко используются для создания на их основе новых медицинских препаратов [19–22]. Среди них определённый интерес представляют фитогормоны – сигнальные молекулы, регулирующие рост и дифференцировку растений. Известно, что эти соединения могут оказывать влияние на секреторно-синтетическую активность и дифференцировочный статус некоторых культивируемых клеток животных, в том числе и человека. Так, например, фитогормон гиббереллиновая кислота (ГК) повышает содержание α -амилазы в мезенхимных стромальных клетках [23] и активирует UPR и дифференцировку в культивируемых нормальных и опухолевых клетках эпидермоидного происхождения [24]. Другой фитогормон, абсцизовая кислота (АБК), стимулирует секрецию инсулина β -клетками островков Лангерганса и секрецию гастроинтестинального гормона энтероэндокринными клетками [25, 26]. Кроме того, было показано,

что АБК в микромолярных концентрациях нормализует аномально повышенную секреторную активность, вызывая снижение отложения коллагена у фибробластов, полученных от больных системным склерозом [27]. Согласно данным этих же авторов, АБК не влияет на секреторную активность фибробластов, полученных от здоровых доноров. Однако низкие концентрации и короткая продолжительность воздействия (24 ч) не позволяют сделать однозначные выводы о характере влияния АБК на данный тип клеток, так как анализ изменения секреторной активности фибробластов обычно проводится через 48 и более часов инкубации с исследуемыми агентами [2, 13, 28]. Кроме этого, авторы исследования не определяли изменение содержания в популяции миофибробластов, для которых характерна повышенная секреторно-синтетическая активность [1, 16]. Поэтому мы полагаем, что влияние АБК на секреторную активность и дифференцировочный статус фибробластов требует более глубокого изучения.

Таким образом, есть основания полагать, что фитогормоны влияют на секреторно-синтетическую систему и дифференцировочный статус некоторых типов культивируемых клеток, в том числе соединительнотканного происхождения (фибробластов, мезенхимных стромальных клеток), но существующие данные носят фрагментарный характер и нуждаются в верификации. В связи с этим целью нашего исследования было изучить влияние АБК и ГК на секреторно-синтетическую активность и признаки дифференцировки культивируемых дермальных фибробластов человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование дермальных фибробластов человека. Дермальные фибробласты человека (линия HdFb (d75)), полученные из Уникальной научной установки «Коллекция клеточных культур» Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, культивировали в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки телёнка (FBS; «HyClone», США), 2 мМ L-глутамин («ПанЭко») и коммерческую смесь антибиотиков пенициллина и стрептомицина (5 мл смеси на 450 мл среды) («ПанЭко») в стандартных условиях (37 °С, 5% CO₂). Согласно паспорту клеточной линии HdFb (d75), использованной в настоящем исследовании, время удвоения популяции составляло 24 ч. Клетки пассировали смесью растворов трипсина («ПанЭко»)

и Версена («ПанЭко») в соотношении 3/7. При проведении экспериментов клетки 5–8 пассажей высаживали в чашки Петри ($d = 60$ мм) и 24-луночные планшеты в концентрации 50 000 клеток/мл или в чашки Петри ($d = 35$ мм) с покровными стёклами в концентрации 40 000 клеток/мл и культивировали в течение 24 ч. Затем в культуральную среду добавляли стоковые спиртовые растворы АБК (189 мМ) и ГК (500 мМ) («Merck», США) до конечной концентрации 2 мМ. Время культивирования с фитогормонами составляло 24 ч, 48 ч или 7 суток. Клетки достигали конфлюэнтного монослоя через 5–6 суток после посадки. Для контрольных точек вместо фитогормонов в культуральную среду добавляли соответствующий объём 96%-ного этилового спирта.

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

Вестерн-блоттинг. Клетки лизировали в однократном лизирующем буфере, содержащем 150 мМ NaCl («ПанЭко»), 0,1% Triton X-100, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% додецилсульфат натрия, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и коктейль ингибиторов протеаз (все составляющие – «Merck»). Затем в лизат добавляли буфер Лэммли («Bio-Rad», США), содержащий β-меркаптоэтанол («Merck»), инкубировали лизат при 65 °С в течение 5 мин и дополнительно денатурировали в течение 2 мин при –20 °С. Белки разделяли с помощью вертикального электрофореза, используя 8%-ные или 10%-ные полиакриламидные гели. Полусухой перенос белков на ПВДФ-мембрану («Bio-Rad») осуществляли с помощью Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini LF PVDF TransferKit («Bio-Rad Laboratories», США). Затем ПВДФ-мембрану инкубировали в 5%-ном обезжиренном молоке, разведённом Tris-буфером (TBS; «Bio-Rad»), содержащем 0,1% Tween («Bio-Rad»), в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее мембрану инкубировали с первичными антителами к GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), проколлагену I, фибронектину и α-SMA (гладкомышечный актин α) («Abcam») в течение ночи при +4 °С и затем со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена («Bio-Rad»), 1 ч при комнатной

температуре. Для выявления белков использовали Novex™ ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit («Thermo Fisher Scientific», США) и систему визуализации ChemiDoc™ («Bio-Rad»). Оптическую плотность белковых полос определяли с помощью ImageLab Software («Bio-Rad»). Полученные значения для целевых белков нормировали на GAPDH.

Колориметрический полуколичественный анализ общей продукции коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса. Дermalьные фибробласты высаживали в 24-луночные планшеты («Corning», США) и после добавления фитогормонов культивировали в течение 7 суток. Следует отметить, что схемы экспериментов с длительным (8 суток и более) культивированием клеток, продуцирующих внеклеточный матрикс, являются общепринятыми [29–33]. Далее клетки промывали тёплым PBS (pH 7,2–7,4) («ПанЭко»), фиксировали насыщенным раствором пикриновой кислоты («Merck») в течение 30 мин, промывали дистиллированной водой и окрашивали 0,1%-ным Sirius Red F3BA («Merck») или 0,1%-ным Fast Green FCF («Merck») в течение 30 мин при комнатной температуре на ротационном шейкере для выявления коллагеновых и неколлагеновых белков соответственно. Для приготовления 0,1%-ных растворов красителей сухие Sirius Red и Fast Green растворяли в насыщенной пикриновой кислоте. В качестве контроля использовали раствор насыщенной пикриновой кислоты, не содержащий красителей. После окрашивания клетки промывали дистиллированной водой и фотографировали на инвертированном микроскопе Eclipse Ti-U («Nikon», Япония; объектив – Nikon Plan Fluor 10×/0.30). Затем красители, связавшиеся с белками внеклеточного матрикса, растворяли в смеси 0,1% NaOH и ледяного абсолютного метанола (1/1). Оптическую плотность полученного элюата анализировали с помощью микропланшетного ридера Microplate Reader PR2100 («Bio-Rad») при 550 нм (Sirius Red) и 620 нм (Fast Green). Для нормирования полученных значений оптической плотности на количество клеток проводили окрашивание 0,5%-ным Crystal Violet («Merck»), разведённом на абсолютном метаноле, в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем краситель отмывали дистиллированной водой, и клетки фотографировали на микроскопе Eclipse Ti-U. Далее связавшийся краситель растворяли в 96%-ном этаноле, и оптическую плотность полученного элюата анализировали с помощью микропланшетного ридера Microplate Reader PR2100 при 550 нм.

Последовательности праймеров, использованных в работе

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

Иммуноцитохимический анализ. Клетки фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида («MP Biochemical», Франция), разведённым в PBS, и пермеабилizировали с помощью 0,5%-ного раствора Triton X-100 («Serva», Германия). Для выявления α -SMA использовали первичные мышинные моноклональные антитела к α -SMA («Merck») и вторичные моноклональные антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 («Thermo Fisher Scientific»). Ядра визуализировали с помощью DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола) («Merck»); препараты заключали в Mowiol («Hoechst», Германия). Съёмку препаратов проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M («Carl Zeiss», Германия; объектив – 63× PlanApo NA 1.40 Oil), снабжённого чёрно-белой цифровой камерой Zeiss AxioCam 202 mono («Carl Zeiss») и программным обеспечением Zeiss ZEN 3.3 (blue edition) («Microscope Software», Германия). Полученные изображения анализировали с помощью программы Fiji (National Institutes of Health, США).

Количественная ПЦР в реальном времени. ПЦР проводили по описанной ранее схеме [24], используя праймеры («Синтол», Россия) к генам *GRP78*, *ATF4*, *CHOP*; к сплайсированной форме мРНК *XBP1* (*sXBP1*), *HPRT*, а также к *GAPDH* и *YWHAZ*. Последовательности используемых праймеров указаны в таблице. *HPRT*, *GAPDH* и *YWHAZ* использовали в качестве референсных генов. ПЦР для каждого образца проводили в трёх технических повторах. Результаты ПЦР анализировали по методике Vandesompele et al. [34].

Статистический анализ проводили в программе RStudio 1.4.1717 (R 4.1.1). Для проверки

достоверности различий между контрольными и экспериментальными значениями использовали непараметрический двусторонний U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ уровня экспрессии генов, кодирующих маркеры UPR. С помощью ПЦР мы провели оценку уровня экспрессии маркеров UPR – *GRP78* (белок 78 кДа, регулируемый глюкозой), *ATF4* (активирующий фактор транскрипции 4), *sXBP1* (сплайсированный X-box-связывающий белок 1) и *CHOP* (ССААТ/белок, гомологичный энхансер-связывающему белку) – после воздействия 2 мМ АБК и ГК в течение 24 ч (рис. 1). Срок инкубации с фитогормонами и их концентрации были выбраны на основе полученных нами ранее данных об активации UPR через 24 ч воздействия 2 мМ ГК в нормальных и опухолевых клетках эпидермоидного происхождения и данных об изменении морфо-функционального состояния секреторно-синтетической системы дермальных фибробластов через 24 ч воздействия 2 мМ АБК и ГК [24, 35]. Оказалось, что при действии АБК в дермальных фибробластах повышалась экспрессия генов *GRP78* и *ATF4* в 2,7 и 1,7 раза соответственно (рис. 1, а и в). При этом АБК не оказывала значимого влияния на количество *sXBP1* и уровень экспрессии *CHOP* (рис. 1, д и ж). Напротив, ГК оказывала влияние на уровень экспрессии только *CHOP*, повышая его в 2,9 раза (рис. 1, б, г, е и з). Таким образом, АБК и ГК активировали экспрессию генов, кодирующих маркеры UPR в дермаль-

ных фибробластах, при этом паттерны их активности у АБК и ГК различались.

Оценка уровня секреции проколлагена I и фибронектина. В соединительной ткани наиболее распространёнными компонентами внеклеточного матрикса, синтезируемыми фибробластами, являются проколлаген I и фибронектин [36, 37]. В связи с этим с помощью ИФА мы провели оценку уровня секреции проколлагена I и фибронектина дермальными фибробластами после воздействия фитогормонов. Мы предположили, что изменение секреторной активности клеток может происходить позже, чем активация UPR, поэтому проанализировали уровень секреции проколлагена I и фибронектина через 24 и 48 ч культивирования фибробластов с АБК и ГК (рис. 2). Как видно из рис. 2 (а–з), АБК и ГК не вызывали изменений в уровне секреции проколлагена I и фибронектина через 24 ч воздействия. Однако культивирование с АБК в течение 48 ч приводило к повышению уровня секреции проколлагена I на 6,1% (рис. 2, д) и не влияло на уровень секреции фибронектина (рис. 2, ж). Культивирование с ГК в течение 48 ч приводило к повышению уровня секреции фибронектина на 7,2% (рис. 2, з) и не влияло на уровень секреции проколлагена I (рис. 2, е). Таким образом, АБК и ГК оказывали влияние на секреторную активность дермальных фибробластов, причём АБК стимулировала секрецию проколлагена I, а ГК стимулировала секрецию фибронектина.

В связи с тем, что воздействие АБК и ГК на секреторную активность фибробластов проявлялось через 48 ч, этот срок был выбран для дальнейшей оценки влияния фитогормонов на дермальные фибробласты.

Оценка уровня синтеза проколлагена I и фибронектина. Повышение уровня секреции проколлагена I и фибронектина может свидетельствовать о повышении уровня синтеза этих белков. Поэтому с помощью вестерн-блоттинга мы провели оценку уровня синтеза проколлагена I и фибронектина после 48 ч инкубации фибробластов с АБК и ГК (рис. 3). Оказалось, что АБК увеличивала уровень синтеза проколлагена I и фибронектина в 29,4 раза (рис. 3, а) и в 1,6 раза (рис. 3, в) соответственно. При этом ГК снижала уровень синтеза проколлагена I в 1,6 раза (рис. 3, б), а также снижала уровень синтеза фибронектина (рис. 3, г), но статистически недостоверно. Таким образом, в дермальных фибробластах АБК вызывала повышение уровня синтеза белков внеклеточного матрикса – проколлагена I и фибронектина, а ГК достоверно индуцировала снижение уровня синтеза только проколлагена I.

Оценка общей продукции коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса. Во внеклеточном матриксе, формируемом фибробластами, проколлаген I и фибронектин являются преобладающими коллагеновыми и неколлагеновыми белками соответственно [37]. Для оценки влияния АБК и ГК на общую продукцию коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами был проведён полуколичественный анализ (рис. 4). Срок инкубации с фитогормонами в данном эксперименте составлял 7 суток, что позволило детектировать перичеллюлярное накопление анализируемых белков, а также их внутриклеточные формы. Коллагеновые и неколлагеновые белки матрикса выявлялись с помощью гистологических красителей Sirius Red и Fast Green соответственно. Красители, связавшиеся с коллагеновыми и неколлагеновыми белками внеклеточного матрикса, элюировали, и затем анализировали оптическую плотность образцов. Для нормирования полученных значений на количество клеток использовали окрашивание гистологическим красителем Crystal Violet, оптическая плотность элюата которого пропорциональна количеству клеток [38].

После культивирования фибробластов с АБК общее содержание коллагеновых белков внеклеточного матрикса возрастало на 17,4%, а содержание неколлагеновых белков возрастало на 29,5% (рис. 4, а и б). После культивирования фибробластов с ГК содержание коллагеновых белков внеклеточного матрикса, наоборот, снижалось на 21,0% (рис. 4, в). Содержание неколлагеновых белков также снижалось, но изменение было статистически недостоверным (рис. 4, г). Полученные данные свидетельствуют о том, что общая продукция коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами при действии АБК повышалась, а при действии ГК – снижалась, но статистически достоверные данные были получены только для коллагеновых белков.

Оценка уровня синтеза α -SMA и доли миофибробластов в популяции фибробластов. Изменение секреторно-синтетической активности дермальных фибробластов, наблюдаемое при действии АБК и ГК в настоящем исследовании, может быть связано с изменением количества миофибробластов в популяции дермальных фибробластов, так как для миофибробластов характерен повышенный, по сравнению с фибробластами, уровень синтеза проколлагена I и фибронектина [1]. Основным маркером миофибробластов является

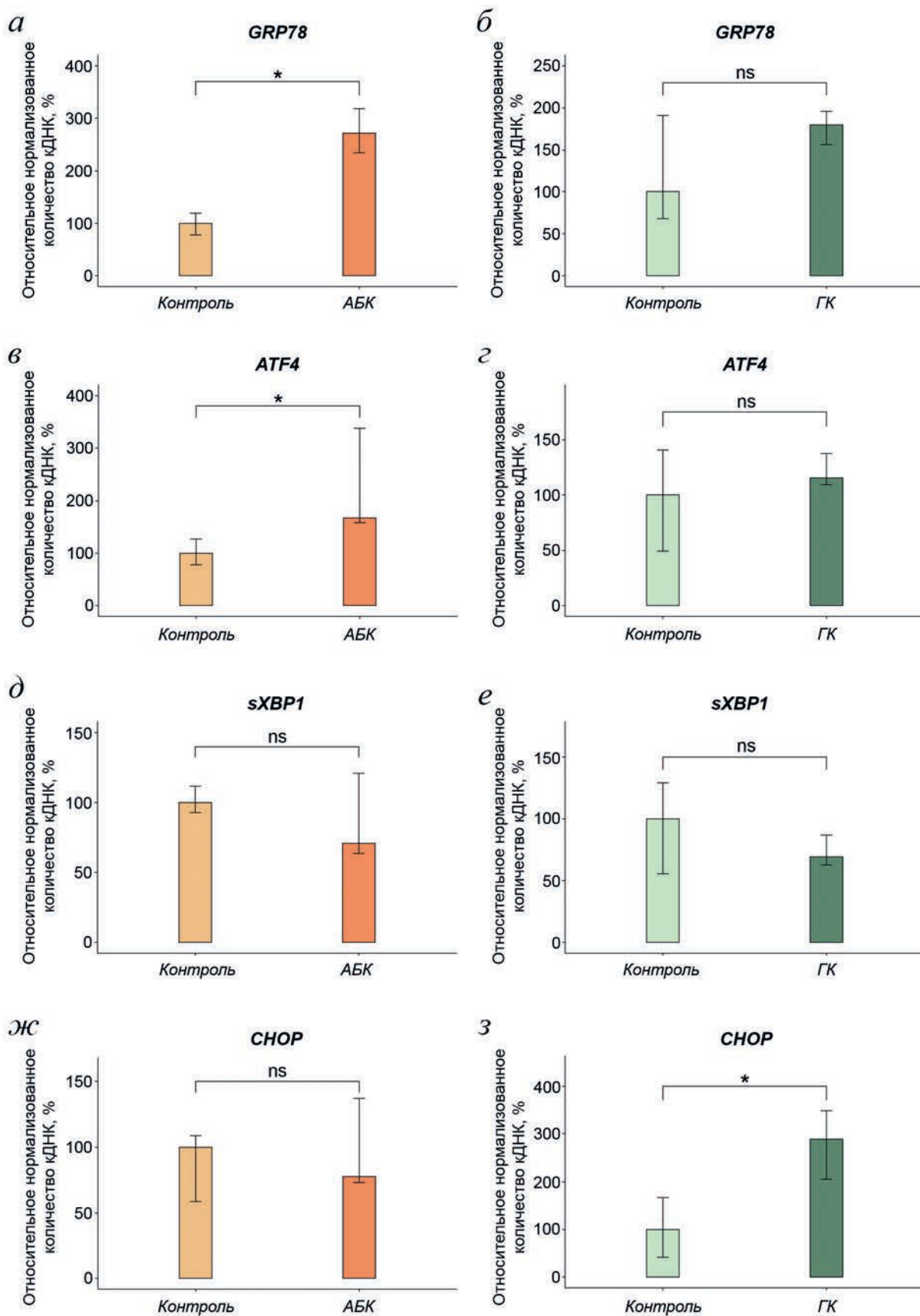


Рис. 1. Уровень экспрессии генов, кодирующих маркеры UPR *GRP78* (а и б), *ATF4* (в и г), *sXBP1* (д и е) и *CHOP* (ж и з) после 24-часового воздействия АБК и ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; ns – not significant (не значимо); * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 7 независимых экспериментов

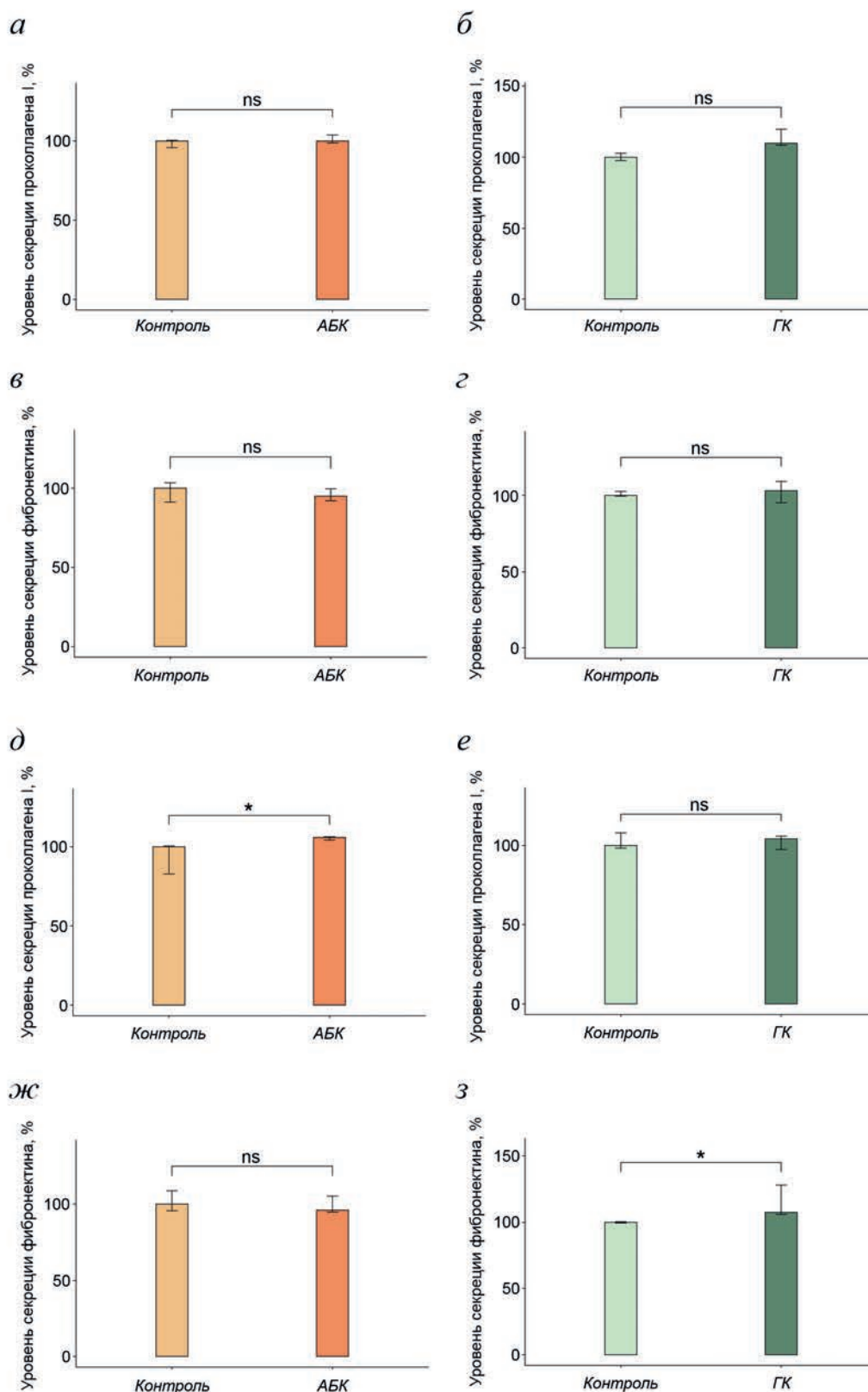


Рис. 2. Влияние АБК и ГК на уровень секреции проколлагена I и фибронектина в дермальных фибробластах. *a* – Уровень секреции проколлагена I после 24 ч воздействия АБК; *б* – уровень секреции проколлагена I после 24 ч воздействия ГК; *в* – уровень секреции фибронектина после 24 ч воздействия АБК; *г* – уровень секреции фибронектина после 24 ч воздействия ГК; *д* – уровень секреции проколлагена I после 48 ч воздействия АБК; *е* – уровень секреции проколлагена I после 48 ч воздействия ГК; *ж* – уровень секреции фибронектина после 48 ч воздействия АБК; *з* – уровень секреции фибронектина после 48 ч воздействия ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; ns – не значимо; * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 5 независимых экспериментов

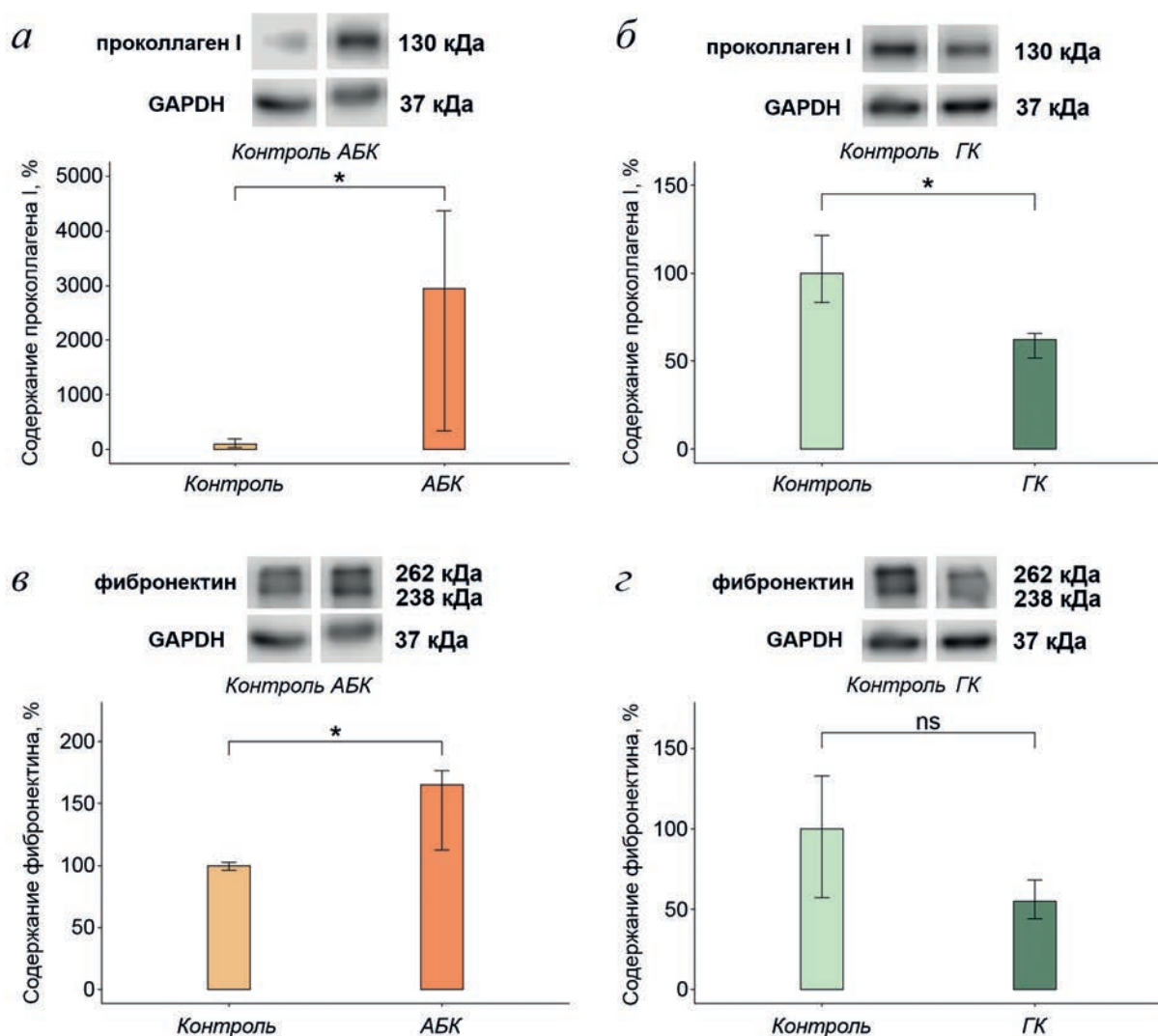


Рис. 3. Влияние 48-часовой инкубации с АБК и ГК на уровень синтеза проколлагена I и фибронектина в дермальных фибробластах. *а* – Содержание проколлагена I после воздействия АБК; *б* – содержание проколлагена I после воздействия ГК; *в* – содержание фибронектина после воздействия АБК; *г* – содержание фибронектина после воздействия ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; ns – не значимо; * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 5 независимых экспериментов

гладкомышечный актин α [2, 16, 17], поэтому была проведена оценка уровня синтеза α -SMA с помощью вестерн-блоттинга и произведён подсчёт доли миофибробластов в популяции дермальных фибробластов с помощью иммуноцитохимического выявления α -SMA после 48-часового воздействия АБК и ГК (рис. 5). Как видно из рис. 5, при действии АБК уровень синтеза α -SMA повышался на 38,5% (рис. 5, *а*), а при действии ГК – снижался на 5,4% (рис. 5, *б*). Подсчёт доли миофибробластов (клеток, содержащих α -SMA-положительные фибриллы) показал, что при действии АБК доля миофибробластов возросла в 1,5 раза (рис. 5, *в*), а при действии ГК – снижалась на 41,5% (рис. 5, *г*). Таким образом, АБК стимулировала увеличение уровня син-

теза α -SMA и количества миофибробластов в популяции дермальных фибробластов, а при действии ГК уровень синтеза α -SMA и количество миофибробластов уменьшалось.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведённые нами исследования показали, что фитогормоны АБК и ГК вызывают активацию UPR в дермальных фибробластах человека, а также оказывают влияние на их секреторно-синтетическую активность. UPR – это адаптивный ответ клетки на нарушение гомеостаза эндоплазматического ретикулаума (ЭПР), вызванное накоплением в ЭПР не свёрнутых и/или неправильно свёрнутых белков [18, 39].

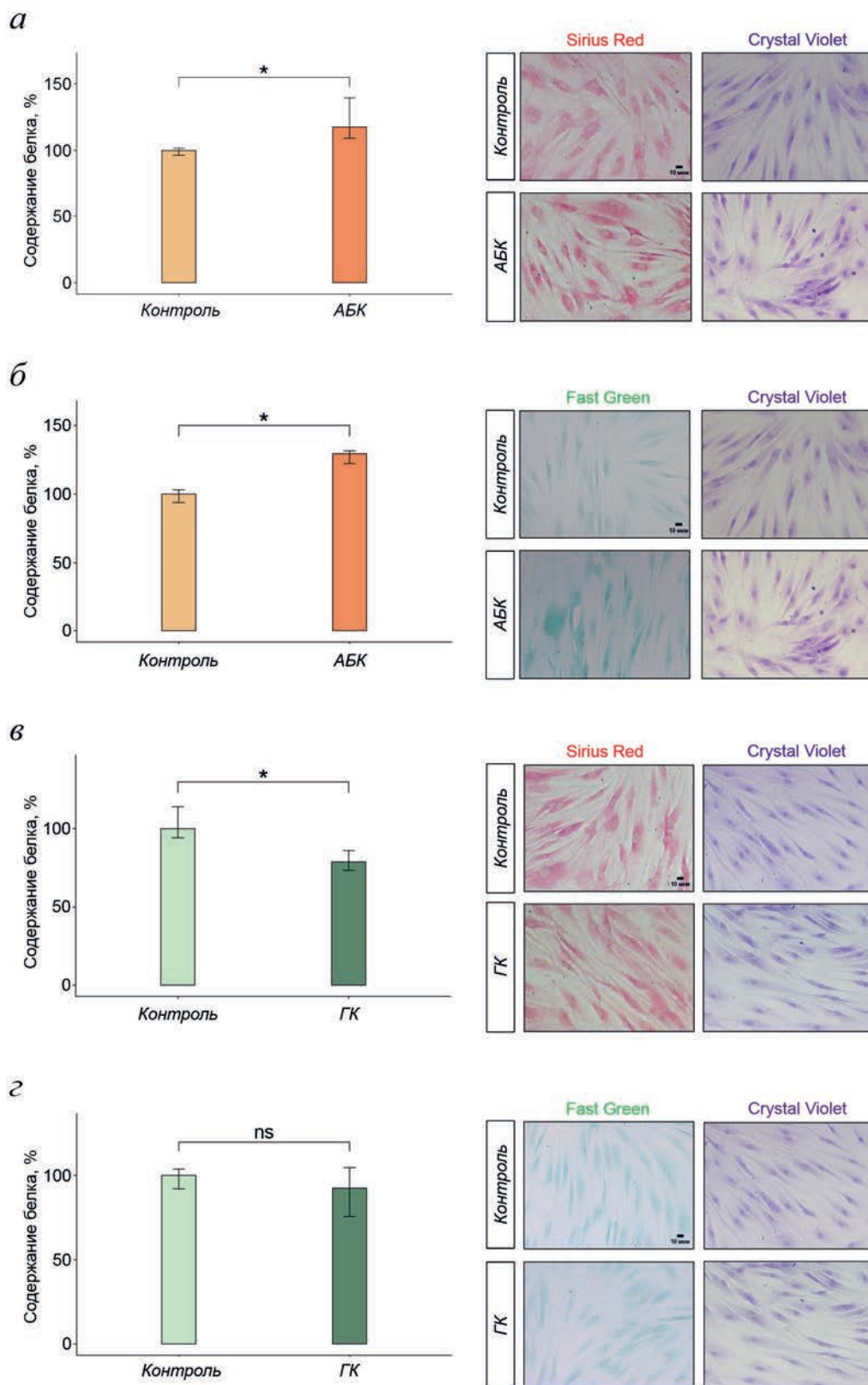


Рис. 4. Влияние 7-суточной инкубации с АБК и ГК на общую продукцию коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами. Представлены репрезентативные изображения окрашивания клеток Sirius Red (выявление коллагеновых белков матрикса), Fast Green (выявление неколлагеновых белков матрикса) и Crystal Violet (оценка количества клеток). *а* – Содержание коллагеновых белков после воздействия АБК; *б* – содержание неколлагеновых белков после воздействия АБК; *в* – содержание коллагеновых белков после воздействия ГК; *г* – содержание неколлагеновых белков после воздействия ГК. Показаны медианы и интерквартильные размахи; ns – не значимо; * $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни; 5 независимых экспериментов. Масштабный отрезок – 10 мкм

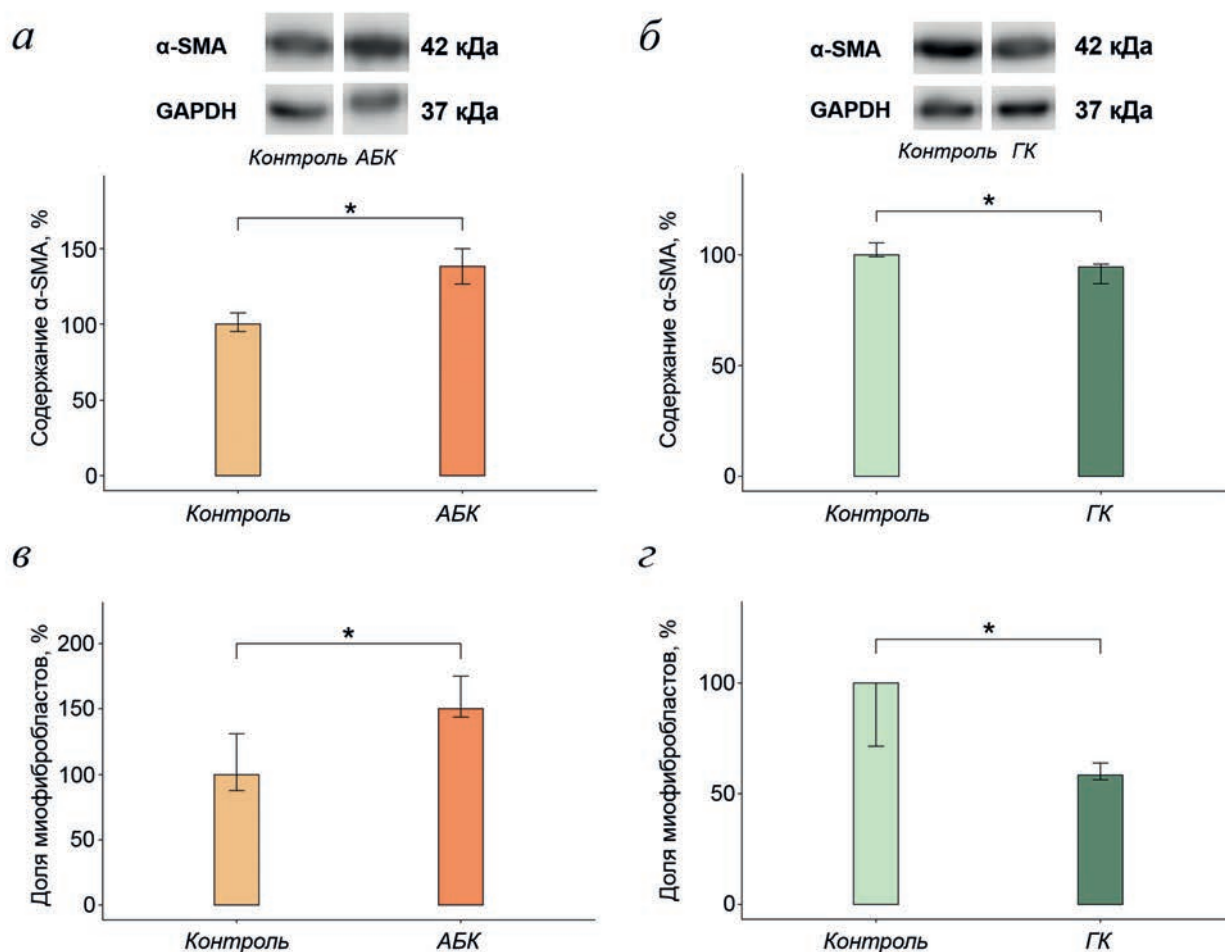


Рис. 5. Влияние 48-часовой инкубации с АБК и ГК на уровень синтеза α -SMA и долю миофибробластов в популяции дермальных фибробластов. *а* – Содержание α -SMA после воздействия АБК; *б* – содержание α -SMA после воздействия ГК; *в* – доля миофибробластов после воздействия АБК; *г* – доля миофибробластов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

Такое нарушение гомеостаза носит название «стресс ЭПР». Ранее нами было показано, что ГК вызывает активацию сигнальных путей UPR в нормальных и опухолевых клетках эпидермоидного происхождения, повышая экспрессию генов, кодирующих основные маркеры стресса ЭПР и UPR – *GRP78*, *ATF4*, *sXBP1* и *CHOP* [24]. *GRP78* – это шаперон люмена ЭПР, в отсутствие стресса ЭПР связанный с тремя трансмембранными сенсорами стресса ЭПР – IRE1 (требующий инозитол белок 1), PERK (киназа ЭПР, подобная белковой киназе RNA) и ATF6 (активирующий фактор транскрипции 6) [39]. В условиях стресса ЭПР *GRP78* отделяется от этих сенсоров, что вызывает их активацию. Каждый сенсор стресса ЭПР (IRE1, PERK и ATF6) при активации запускает свой сигнальный каскад, приводящий к активации экспрессии таких транскрипционных факторов, как *sXBP1* («s» означает «сплайсированный»),

ATF4 и *CHOP* [18, 39, 40]. Все транскрипционные факторы, активирующиеся в ходе стресса ЭПР и UPR, за исключением *CHOP*, повышают экспрессию генов белков ответа на стресс ЭПР, направленных на восстановление гомеостаза ЭПР и его свёртывающей способности. *CHOP* стимулирует стресс-опосредованную индукцию апоптоза.

В настоящем исследовании мы провели оценку уровня экспрессии *GRP78*, *ATF4*, *sXBP1* и *CHOP* при воздействии АБК и ГК на клетки соединительнотканного происхождения – дермальные фибробласты человека. Оказалось, что АБК повышает уровень экспрессии *GRP78* и *ATF4*, что свидетельствует об активации стресса ЭПР и запуске UPR. Насколько нам известно, это первые данные о способности АБК активировать стресс ЭПР и UPR в клетках человека. При этом АБК не повышала уровень экспрессии *sXBP1*. Это может быть связано с тем, что АБК не активирует или бло-

кирует сигналинг по IRE1–XBP1-пути стресса ЭПР, а также с возможной активацией этого пути на более ранних сроках воздействия, а затем снижением его активности. Отсутствие повышения экспрессии *СНОР* свидетельствует о том, что АБК не индуцирует стресс-опосредованный апоптоз, контролируемый *СНОР*, по крайней мере через 24 ч воздействия.

В свою очередь, ГК тоже вызывала активацию UPR, о чём свидетельствует повышение уровня экспрессии *СНОР*. Однако значительного изменения уровня экспрессии генов, кодирующих другие маркеры стресса ЭПР, при её воздействии не наблюдалось, что может быть связано с активацией сигнальных путей UPR на более ранних сроках воздействия ГК и последующим снижением их активности. *СНОР* считается проапоптотическим фактором, однако ранее мы показали, что ГК не вызывает значительного снижения метаболической активности, а, следовательно, и гибели дермальных фибробластов при 24-часовом воздействии [35]. По-видимому, фибробласты «справляются» со стрессом ЭПР, индуцированным ГК, без активации гибели клеток. Данные ПЦР также позволяют заключить, что обнаруженное нами ранее расширение цистерн ЭПР в дермальных фибробластах при действии ГК [35], по-видимому, вызвано активацией стресса ЭПР. Следует отметить, что в нормальных и опухолевых клетках эпидермоидного происхождения ГК вызывала повышение экспрессии генов, кодирующих все исследованные маркеры стресса ЭПР и UPR – *GRP78*, *ATF4*, *sXBP1* и *СНОР* [24], следовательно, влияние АБК и ГК на клетки разного тканевого происхождения различается.

Наши данные свидетельствуют о том, что влияние АБК и ГК на секреторно-синтетическую активность дермальных фибробластов носит противоположный характер. АБК оказывает стимулирующее действие на синтез и секрецию проколлагена I и синтез фибронектина, а также повышает общую продукцию коллагеновых и неколлагеновых белков внеклеточного матрикса дермальными фибробластами. ГК, напротив, снижает уровень синтеза проколлагена I и продукцию коллагеновых белков внеклеточного матрикса. Однако ГК стимулирует секрецию фибронектина, хотя уровень синтеза фибронектина при её воздействии не повышается, а имеет тенденцию к снижению. Это может быть связано с тем, что дермальные фибробласты отвечают на действие ГК выбросом синтезированного фибронектина, однако синтез новых молекул фибронектина ГК подавляет. Возможно, выход

фибронектина в культуральную среду обусловлен тем, что ГК оказывает влияние на секреторный путь фибронектина, который, как известно, отличается от секреторного пути проколлагена I [41]. Проколлаген I транспортируется из ЭПР в аппарат Гольджи в составе СОPII-везикул, которые формируются при участии белка TANGO1 (transport and Golgi organization protein 1). Далее в аппарате Гольджи проколлаген I сортируется в тубулярные структуры, которые направляются к плазматической мембране. Секреторный путь фибронектина до сих пор полностью не изучен [41]. Известно, что он не зависит от белков СОPII и TANGO1. Предполагается, что в транспорте фибронектина из ЭПР участвуют периостин и трансмембранный P24 транспортный белок 2 (TMED2), а далее фибронектин транспортируется к плазматической мембране при участии мультивезикулярных телец и секретуруется во внеклеточную среду в составе внеклеточных везикул [41]. Возможно, ГК ускоряет транспорт фибронектина из ЭПР или воздействует на формирование внеклеточных везикул и их слияние с плазматической мембраной.

Полученные нами данные указывают на то, что АБК и ГК прямо или косвенно влияют на синтез проколлагена I и фибронектина и, возможно, других коллагеновых и неколлагеновых белков в дермальных фибробластах. Косвенное влияние этих фитогормонов может быть обусловлено регуляцией экспрессии генов дифференцировки фибробластов в миофибробласты, так как для миофибробластов характерна повышенная секреторно-синтетическая активность, в частности повышенный уровень синтеза проколлагена I и фибронектина [1].

В литературе есть данные об уменьшении уровня синтеза и отложения коллагена I фибробластами при действии АБК [27, 42]. Однако в этих работах исследовали влияние АБК в более низких концентрациях и на фибробласты из зон фиброза. Поэтому мы полагаем, что наши данные не противоречат данным литературы, а дополняют их.

Изменение секреторно-синтетической активности дермальных фибробластов при действии АБК и ГК, установленное в нашем исследовании, может быть связано с изменением количества миофибробластов в популяции дермальных фибробластов. Действительно, проведённый нами анализ уровня синтеза основного маркера миофибробластов – α -SMA, а также подсчёт количества миофибробластов в популяции фибробластов показал, что АБК вызывает повышение уровня синтеза α -SMA

и количества миофибробластов. Эти данные коррелируют с данными о повышении секреторно-синтетической активности в популяции дермальных фибробластов при действии АБК. ГК, в свою очередь, снижала уровень синтеза α -SMA и количество миофибробластов, что коррелирует со снижением секреторно-синтетической активности в популяции дермальных фибробластов при действии этого фитогормона. В связи с этим можно заключить, что наблюдаемое при действии АБК повышение секреторно-синтетической активности фибробластов по крайней мере частично вызвано дифференцировкой фибробластов в миофибробласты. Наблюдаемое при действии ГК снижение секреторно-синтетической активности фибробластов может быть обусловлено уменьшением количества миофибробластов в популяции дермальных фибробластов. Для того чтобы выяснить, чем вызвано такое снижение количества миофибробластов при действии ГК – подавлением дифференцировки фибробластов в миофибробласты или гибелью миофибробластов, необходимо проведение дополнительных экспериментов.

Известно, что сигнальные пути UPR участвуют не только в восстановлении гомеостаза ЭПР, но и играют ключевую роль в дифференцировке клеток разного тканевого происхождения, в том числе и фибробластов [2, 13, 16–18]. Наши данные о стимуляции дифференцировки фибробластов в миофибробласты при действии АБК свидетельствуют о том, что UPR сопровождает дифференцировку, индуцированную АБК. Кроме того, это даёт основание полагать, что АБК может запускать эту дифференцировку, активируя UPR.

По данным литературы, при индукции дифференцировки фибробластов в миофибробласты с помощью трансформирующего фактора роста β (TGF- β) и 1%-ного экстракта сигаретного дыма наблюдается повышение уровня синтеза GRP78 и α XBP1, но не CHOP [13, 43]. CHOP не участвует в дифференцировке фибробластов в миофибробласты. Исследования уровня синтеза ATF4 в этих работах не проводилось, однако показано, что нокдаун гена, кодирующего PERK, мишенью которой является ATF4, подавляет дифференцировку фибробластов в миофибробласты [17]. Таким образом, полученные нами данные о повышении уровня экспрессии GRP78 и ATF4, но не CHOP при индукции дифференцировки фибробластов в миофибробласты соответствуют данным литературы. Отличия в данных по уровню экспрессии α XBP1 в литературе и нашем исследовании могут быть связаны с тем, что сигнальные пути

активации UPR при действии АБК отличаются от таковых при действии других индукторов дифференцировки.

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

Ранее нами было показано, что ГК индуцирует стресс ЭПР (UPR) и дифференцировку в нормальных и опухолевых клетках человека эпидермоидного происхождения [24]. По-видимому, влияние ГК на дифференцировочный статус клеток разного происхождения различается. В свою очередь, данные об активации стресса ЭПР параллельно с дифференцировкой при воздействии АБК в литературе отсутствуют. Было обнаружено стимулирующее влияние АБК на дифференцировку предшественников мегакариоцитов при индукции их дифференцировки стандартной дифференцировочной смесью [44], однако индукция стресса ЭПР в этом процессе не изучалась, хотя показано участие стресса ЭПР в тромбоцитопоэзе [45].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Стимулирующее влияние АБК на дифференцировку фибробластов может быть использовано при разработке препаратов для ускорения заживления ран и лечения хронических ран при диабете, сосудистых заболеваниях, тяжёлых травмах и ожогах. При этом следует обратить внимание как на возможность введения АБК в рану в составе лекарственных препаратов для стимуляции дифференцировки фибро-

бластов пациента в миофибробласты, так и на активацию дифференцировки аллогенных фибробластов *in vitro* с последующим введением полученных миофибробластов в рану [4].

До сих пор не существует клинически одобренных методов предотвращения формирования рубцов (терапии рубцов), специально разработанных для ограничения или предотвращения фиброза кожи [46]. Предлагаемые стратегии лечения включают в себя резекцию рубца или уменьшение его размера, использование методов тканевой инженерии, использование антител и лекарственной терапии, направленной, в частности, на блокирование дифференцировки фибробластов. В связи с этим на способность ГК снижать количество миофибробластов следует обратить внимание при поиске способов предотвращения и лечения фиброза и, в частности образования рубцов. Поэтому мы считаем важным детальное изучение механизмов действия разных фитогормонов на пути активации UPR, тем более что разные фитогормоны, вызывая стресс ЭПР, оказывают противоположный эффект на дифференцировочный статус разных типов клеток [24]. Особенно интересным представляется исследование потенциальной

способности ГК снижать количество миофибробластов в популяции дермальных фибробластов на моделях фиброза *in vitro* и *in vivo*.

Вклад авторов. Е.А. Смирнова – концепция и руководство работой; Е.П. Турищева, М.С. Вильданова, Д.К. Матвеева – проведение экспериментов; Е.П. Турищева, П.А. Вишнякова, А.А. Саидова – обсуждение результатов исследования; Е.П. Турищева – написание текста; Е.А. Смирнова, Г.Е. Онищенко – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 19-015-00233 и 20-315-90118) в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300098-5.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Ашниеvu Герману Альфредовичу за помощь в статистической обработке данных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Desai, V. D., Hsia, H. C., and Schwarzbauer, J. E. (2014) Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells, *PLoS One*, **9**, e86865, doi: 10.1371/journal.pone.0086865.
- Heindryckx, F., Binet, F., Ponticos, M., Rombouts, K., Lau, J., et al. (2016) Endoplasmic reticulum stress enhances fibrosis through IRE1 α -mediated degradation of miR-150 and XBP-1 splicing, *EMBO Mol. Med.*, **8**, 729-744, doi: 10.15252/emmm.201505925.
- Hinz, B. (2016) The role of myofibroblasts in wound healing, *Curr. Res. Transl. Med.*, **64**, 171-177, doi: 10.1016/j.retram.2016.09.003.
- Ko, U. H., Choi, J., Choung, J., Moon, S., and Shin, J. H. (2019) Physicochemically tuned myofibroblasts for wound healing strategy, *Sci. Rep.*, **9**, 16070, doi: 10.1038/s41598-019-52523-9.
- Las Heras, K., Igartua, M., Santos-Vizcaino, E., and Hernandez, R. M. (2020) Chronic wounds: Current status, available strategies and emerging therapeutic solutions, *J. Control. Release*, **328**, 532-550, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.09.039.
- Zou, M. L., Teng, Y. Y., Wu, J. J., Liu, S. Y., Tang, X. Y., Jia, Y., Chen, Z. H., Zhang, K. W., Sun, Z. L., Li, X., Ye, J. X., Xu, R. S., and Yuan, F. L. (2021) Fibroblasts: heterogeneous cells with potential in regenerative therapy for scarless wound healing, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 713605, doi: 10.3389/fcell.2021.713605.
- Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. V., Sussel, L., and Accili, D. (2012) Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure, *Cell*, **150**, 1223-1234, doi: 10.1016/j.cell.2012.07.029.
- Efrat, S. (2019) Beta-cell dedifferentiation in type 2 diabetes: concise review, *STEM Cells*, **37**, 1267-1272, doi: 10.1002/stem.3059.
- Lenghel, A., Gheorghita, A. M., Vacaru, A. M., and Vacaru, A.-M. (2021) What is the sweetest UPR flavor for the β -cell? That is the question, *Front. Endocrinol.*, **11**, 614123, doi: 10.3389/fendo.2020.614123.
- Eastell, R., O'Neill, T. W., Hofbauer, L. C., Langdahl, B., Reid, I. R., Gold, D. T., and Cummings, S. R. (2016) Postmenopausal osteoporosis, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **2**, 16069, doi: 10.1038/nrdp.2016.69.
- Zhang, W., Feng, D., Li, Y., Iida, K., McGrath, B., and Cavener, D. R. (2006) PERK EIF2AK3 control of pancreatic β cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis, *Cell Metab.*, **4**, 491-497, doi: 10.1016/j.cmet.2006.11.002.
- Saito, A., Ochiai, K., Kondo, S., Tsumagari, K., Murakami, T., Cavener, D. R., and Imaizumi, K. (2011) Endoplasmic reticulum stress response medi-

- ated by the PERK-eIF2-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2, *J. Biol. Chem.*, **286**, 4809-4818, doi: 10.1074/jbc.M110.152900.
13. Baek, H. A., Kim, D. S., Park, H. S., Jang, K. Y., Kang, M. J., Lee, D. G., Moon, W. S., Chae, H. J., and Chung, M. J. (2012) Involvement of endoplasmic reticulum stress in myofibroblastic differentiation of lung fibroblasts, *Am. J. Resp. Cell Mol.*, **46**, 731-739, doi: 10.1165/rcmb.2011-0121OC.
 14. Jang, W.-G., Kim, E.-J., Kim, D.-K., Ryoo, H.-M., Lee, K.-B., Kim, S. H., Choi, H. S., and Koh, J. T. (2012) BMP2 protein regulates osteocalcin expression via Runx2-mediated Atf6 gene transcription, *J. Biol. Chem.*, **287**, 905-915, doi: 10.1074/jbc.M111.253187.
 15. Chan, J. Y., Luzuriaga, J., Bensellam, M., Biden, T. J., and Laybutt, D. R. (2013) Failure of the adaptive unfolded protein response in islets of obese mice is linked with abnormalities in β -cell gene expression and progression to diabetes, *Diabetes*, **62**, 1557-1568, doi: 10.2337/db12-0701.
 16. Matsuzaki, S., Hiratsuka, T., Taniguchi, M., Shingaki, K., Kubo, T., Kiya, K., Fujiwara, T., Kanazawa, S., Kanematsu, R., Maeda, T., Takamura, H., Yamada, K., Miyoshi, K., Hosokawa, K., Tohyama, M., and Katayama, T. (2015) Physiological ER stress mediates the differentiation of fibroblasts, *PLoS One*, **10**, e0123578, doi: 10.1371/journal.pone.0123578.
 17. Chen, Y. C., Chen, B. C., Huang, H. M., Lin, S. H., and Lin, C. H. (2019) Activation of PERK in ET-1-and thrombin-induced pulmonary fibroblast differentiation: inhibitory effects of curcumin, *J. Cell. Physiol.*, **234**, 15977-15988, doi: 10.1002/jcp.28256.
 18. Turishcheva, E., Vildanova, M., Onishchenko, G., and Smirnova, E. (2022) The role of endoplasmic reticulum stress in differentiation of cells of mesenchymal origin, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 916-931, doi: 10.1134/S000629792209005X.
 19. Budovsky, A., Yarmolinsky, L., and Ben-Shabat, S. (2015) Effect of medicinal plants on wound healing, *Wound Repair Regen.*, **23**, 171-183, doi: 10.1111/wrr.12274.
 20. Alamgir, A. N. M. (2018) *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 2. Phytochemistry and Bioactive Compounds*, Springer Cham, doi: 10.1007/978-3-319-92387-1.
 21. Addis, R., Cruciani, S., Santaniello, S., Bellu, E., Sarais, G., Ventura, C., Maioli, M., and Pintore, G. (2020) Fibroblast proliferation and migration in wound healing by phytochemicals: evidence for a novel synergic outcome, *Int. J. Med. Sci.*, **17**, 1030-1042, doi: 10.7150/ijms.43986.
 22. Sharma, A., Khanna, S., Kaur, G., and Singh, I. (2021) Medicinal plants and their components for wound healing applications, *Futur. J. Pharm. Sci.*, **7**, 53, doi: 10.1186/s43094-021-00202-w.
 23. Kasamatsu, A., Iyoda, M., Usukura, K., Sakamoto, Y., Ogawara, K., Shiiba, M., Tanzawa, H., and Uzawa, K. (2012) Gibberellic acid induces α -amylase expression in adipose-derived stem cells, *Int. J. Mol. Med.*, **30**, 243-247, doi: 10.3892/ijmm.2012.1007.
 24. Vildanova, M., Vishnyakova, P., Saidova, A., Konduktorova, V., Onishchenko, G., and Smirnova, E. (2021) Gibberellic acid initiates ER stress and activation of differentiation in cultured human immortalized keratinocytes HaCaT and epidermoid carcinoma cells A431, *Pharmaceutics*, **13**, 1813, doi: 10.3390/pharmaceutics13111813.
 25. Bruzzone, S., Bodrato, N., Usai, C., Guida, L., Moreschi, I., Nano, R., Antonioli, B., Fruscione, F., Magnone, M., Scarfi, S., De Flora, A., and Zocchi, E. (2008) Abscisic acid is an endogenous stimulator of insulin release from human pancreatic islets with cyclic ADP ribose as second messenger, *J. Biol. Chem.*, **283**, 32188-32197, doi: 10.1074/jbc.M802603200.
 26. Bruzzone, S., Magnone, M., Mannino, E., Sociali, G., Sturla, L., Fresia, C., Booz, V., Emionite, L., De Flora, A., and Zocchi, E. (2015) Abscisic acid stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from L-cells and its oral administration increases plasma glucagon-like peptide-1 levels in rats, *PLoS One*, **10**, e0140588, doi: 10.1371/journal.pone.0140588.
 27. Bruzzone, S., Battaglia, F., Mannino, E., Parodi, A., Fruscione, F., Basile, G., Salis, A., Sturla, L., Negrini, S., Kalli, F., Stringara, S., Filaci, G., Zocchi, E., and Fenoglio, D. (2012) Abscisic acid ameliorates the systemic sclerosis fibroblast phenotype *in vitro*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **422**, 70-74, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.107.
 28. Zhang, W., Chen, D.-Q., Qi, F., Wang, J., Xiao, W.-Y., and Zhu, W. Z. (2010) Inhibition of calcium-calmodulin-dependent kinase ii suppresses cardiac fibroblast proliferation and extracellular matrix secretion, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **55**, 96-105, doi: 10.1097/FJC.0b013e3181c9548b.
 29. Матвеева Д. К., Андреева Е. Р., Буравкова Л. Б. (2019) Выбор оптимального протокола получения децеллюляризованного внеклеточного матрикиса мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека, *Вестн. Моск. Унив.*, **74**, 294-300.
 30. Basalova, N., Sagaradze, G., Arbatskiy, M., Evtushenko, E., Kulebyakin, K., Grigorieva, O., Akopyan, Z., Kalinina, N., and Efimenko, A. (2020) Secretome of mesenchymal stromal cells prevents myofibroblasts differentiation by transferring fibrosis-associated microRNAs within extracellular vesicles, *Cells*, **9**, 1272, doi: 10.3390/cells9051272.
 31. Zhivodernikov, I. V., Ratushnyy, A. Yu., Matveeva, D. K., and Buravkova, L. B. (2020) Extracellular matrix proteins and transcription of matrix-associated genes in mesenchymal stromal cells during modeling of the effects of microgravity, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **170**, 230-232, doi: 10.1007/s10517-020-05040-z.
 32. Grigorieva, O. A., Vigovskiy, M. A., Dyachkova, U. D., Basalova, N. A., Aleksandrushkina, N. A.,

- Kulebyakina, M. A., Zaitsev, I. L., Popov, V. S., and Efimenko, A. Y. (2021) Mechanisms of endothelial-to-mesenchymal transition induction by extracellular matrix components in pulmonary fibrosis, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **171**, 523-531, doi: 10.1007/s10517-021-05264-7.
33. Yang, M. C., O'Connor, A. J., Kalionis, B., and Heath, D. E. (2022) Improvement of mesenchymal stromal cell proliferation and differentiation via decellularized extracellular matrix on substrates with a range of surface chemistries, *Front. Med. Technol.*, **4**, 834123, doi: 10.3389/fmedt.2022.834123.
34. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.*, **3**, RESEARCH0034, doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
35. Турищева Е. П., Вильданова М. С., Поташникова Д. М., Смирнова Е. А. (2020) Различная реакция биосинтетической системы дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы человека на действии растительных гормонов, *Цитология*, **62**, 566-580, doi: 10.31857/S0041377120080088.
36. Kendall, R. T., and Feghali-Bostwick, C. A. (2014) Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators, *Front. Pharmacol.*, **5**, 123, doi: 10.3389/fphar.2014.00123.
37. Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 786-801, doi: 10.1038/nrm3904.
38. Vega-Avila, E., and Pugsley, M. K. (2011) An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells, *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, **54**, 10-14.
39. Sicari, D., Delaunay-Moisan, A., Combettes, L., Chevet, E., and Igarria, A. (2020) A guide to assessing endoplasmic reticulum homeostasis and stress in mammalian systems, *FEBS J.*, **287**, 27-42, doi: 10.1111/febs.15107.
40. Hetz, C. (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 89-102, doi: 10.1038/nrm3270.
41. Albacete-Albacete, L., Sanchez-Alvarez, M., and Del Pozo, M. A. (2021) Extracellular vesicles: an emerging mechanism governing the secretion and biological roles of tenascin-C, *Front. Immunol.*, **12**, 671485, doi: 10.3389/fimmu.2021.671485.
42. Chen, X., Ding, C., Liu, W., Liu, X., Zhao, Y., Zheng, Y., Dong, L., Khatoun, S., Hao, M., Peng, X., Zhang, Y., and Chen, H. (2021) Abscisic acid ameliorates oxidative stress, inflammation, and apoptosis in thioacetamide-induced hepatic fibrosis by regulating the NF-κB signaling pathway in mice, *Eur. J. Pharmacol.*, **891**, 173652, doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173652.
43. Song, M., Peng, H., Guo, W., Luo, M., Duan, W., Chen, P., and Zhou, Y. (2019) Cigarette smoke extract promotes human lung myofibroblast differentiation by the induction of endoplasmic reticulum stress, *Respiration*, **98**, 347-356, doi: 10.1159/000502099.
44. Huang, W., Gu, H., Zhan, Z., Wang, R., Song, L., Zhang, Y., Zhang, Y., Li, S., Li, J., Zang, Y., Li, Y., and Qian, B. (2021) The plant hormone abscisic acid stimulates megakaryocyte differentiation from human iPSCs *in vitro*, *Platelets*, **33**, 462-470, doi: 10.1080/09537104.2021.1944616.
45. Kovuru, N., Raghuvanshi, S., Sharma, D. S., Dahariya, S., Palapati, A., and Gutti, R. K. (2020) Endoplasmic reticulum stress induced apoptosis and caspase activation is mediated through mitochondria during megakaryocyte differentiation, *Mitochondrion*, **50**, 115-120, doi: 10.1016/j.mito.2019.10.009.
46. Tai, Y., Woods, E. L., Dally, J., Kong, D., Steadman, R., Moseley, R., and Midgley, A. C. (2021) Myofibroblasts: function, formation, and scope of molecular therapies for skin fibrosis, *Biomolecules*, **11**, 1095, doi: 10.3390/biom11081095.

PHYTOHORMONES AFFECT THE DIFFERENTIATION OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS VIA UPR ACTIVATION

E. P. Turishcheva^{1*}, M. S. Vildanova¹, P. A. Vishnyakova^{2,3}, D. K. Matveeva⁴,
A. A. Saidova¹, G. E. Onishchenko¹, and E. A. Smirnova¹

¹ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e mail: kitten-caterina@yandex.ru

² National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology
Named after Academician V. I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation,
117997 Moscow, Russia

³ Peoples' Friendship University of Russia, 117198 Moscow, Russia

⁴ Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, 123007 Moscow, Russia

Normalization of secretory activity and the level of differentiation of mesenchymal cells, including fibroblasts, is the important biomedical problem. One of the plausible solutions to this problem is to affect the unfolded protein response (UPR) signaling cascade, which is activated during fibroblast differentiation. In the present study, the effect of phytohormones on the secretory activity and differentiation of cultured human dermal fibroblasts was investigated. By analyzing the expression level of genes encoding UPR markers in these cells, we found that phytohormone abscisic acid (ABA) upregulated the expression of *GRP78* and *ATF4* genes, while phytohormone gibberellic acid (GA) upregulated the expression of *CHOP*. Evaluation of the biosynthetic activity of fibroblasts showed that ABA elevated the level of secretion and synthesis of procollagen I and the level of fibronectin synthesis, as well as total production of collagen and non-collagen proteins of extracellular matrix. ABA also stimulated the synthesis of smooth muscle actin α (α -SMA) and increased the number of myofibroblasts in cell population. On the contrary, GA increased the level of fibronectin secretion, but decreased the level of procollagen I synthesis, and reduced the total production of collagen proteins of extracellular matrix. Concomitantly, in these conditions we observed the decreased level of α -SMA synthesis and the number of myofibroblasts in the cell population. Our results suggest that phytohormones are the modulators of the biosynthetic activity of fibroblasts and affect their differentiation status.

Keywords: abscisic acid, gibberellic acid, fibroblasts, myofibroblasts, wound healing, fibrosis, differentiation, smooth muscle actin