

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

Лаборатория клеточной биологии

Московская школа на Юго-Западе № 1543

Изучение механизмов поглощения
(эффероцитоза) апоптотических телец,
полученных из мезенхимных стволовых клеток,
эндотелиоцитами и гепатоцитами

Софья Ильинична Ковязина

Надежда Александровна Сенютина

Научный руководитель:

к.б.н. Ирина Викторовна Холоденко

Москва 2025

Введение

Мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) представляют класс прогениторных клеток, которые способны дифференцироваться в клетки мезодермального ряда *in vitro*, включая клетки костной, хрящевой, мышечной тканей, а также ткани сухожилий и связок, жировой ткани и дермы.

Существует два типа источников МСК: взрослые МСК, которые получают из костного мозга, жировой ткани, периферической крови, пульпы зуба, печени и др.; и неонатальные МСК, получаемые из экстраэмбриональных тканей, таких как плацента, амнион, пуповина и пуповинная кровь (Naji et al., 2019). МСК не имеют специфического маркера, который мог бы использоваться для их идентификации. Поэтому *in vitro* МСК идентифицируют по определенному набору признаков:

- 1) способность адгезироваться к пластику;
- 2) экспрессия на поверхности плазматической мембраны CD44, CD73, CD90, CD105 и отсутствие экспрессии CD14, CD34 и CD45;
- 3) способность к дифференцировке в адипоциты, остециты и хондроциты (Naji et al., 2019).

Экзогенно введенные МСК оказывают выраженное терапевтическое прорегенеративное и противовоспалительное действие на различных животных моделях заболеваний, включая нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, патологии печени различной этиологии и др. В настоящее время зарегистрировано более тысячи клинических испытаний с применением МСК. Для клинического использования одобрено 12 препаратов на основе МСК (Fernández-Garza et al., 2023).

Несмотря на столь обширные доклинические и клинические исследования, механизмы терапевтического действия МСК до конца не выяснены. Возможно, этот факт значительно замедляет выход большего количества препаратов на основе МСК в клинику. Известно, что после трансплантации МСК быстро подвергаются апоптозу и элиминируются клетками хозяина (Zheng B. et al., 2016).

В большинстве работ доказано, что апоптотические МСК после трансплантации преимущественно фагоцитируются профессиональными фагоцитами, резидентными тканевыми макрофагами. Фагоцитоз апоптотических МСК приводит к изменению фенотипа и функциональных свойств фагоцитировавших их клеток, которые впоследствии оказывают иммунорегуляторные и прорегенеративные эффекты

(Блинова и др., 2024). Таким образом, проявление терапевтических эффектов МСК осуществляется клетками, которые их фагоцитировали. Однако не только профессиональные фагоциты могут поглощать апоптотические МСК, но и непрофессиональные фагоциты, включая эндотелиальные клетки, гепатоциты, кардиомиоциты и др., что также приводит к изменению свойств этих клеток (Kholodenko et al., 2022). Если в классическом варианте фагоцитоз (эффероцитоз) апоптотических телец макрофагами изучен детально, то механизмы поглощения апоптотических телец непрофессиональными фагоцитами не исследованы. Эффероцитоз – это быстрый и эффективный процесс утилизации апоптотических клеток как профессиональными, так и непрофессиональными фагоцитами. С эволюционной точки зрения эффероцитоз представляет собой древний механизм, позволявший ранним многоклеточным организмам регулировать свой рост посредством элиминации отмирающих клеток в процессе развития. У сложных многоклеточных организмов эффероцитоз критически важен для роста и развития, для разрешения воспаления и поддержания гомеостаза тканей. Эффероцитоз является частным случаем фагоцитоза – процесса интернализации и уничтожения патогенов и других чужеродных частиц (Блинова и др., 2024).

Цели и задачи:

Целью данной работы является изучение механизмов эффероцитоза апоптотических телец, полученных из МСК, гепатоцитами и эндотелиоцитами. Для достижения поставленной цели будут решены следующие задачи:

1. Получение апоптотических телец из пуповинных МСК (UC-MSC) и оценка их эффероцитоза гепатоцитами и эндотелиоцитами.
2. Выявление спектра “don’t eat me” и “eat me” молекул на поверхности апоптотических телец.
3. Анализ эффективности эффероцитоза апоптотических телец гепатоцитами и эндотелиоцитами в условиях блокирования “don’t eat me” и “eat me” сигналов соответствующими антителами с целью выявления молекул, участвующих в процессе эффероцитоза.
4. Выявление механизмов эффероцитоза, задействованных в поглощении апоптотических телец, с использованием ингибиторов отдельных путей эндоцитоза в эндотелиоцитах и гепатоцитах.

Литературный обзор

Эндоцитоз является одним из важных клеточных процессов, так как необходим для роста, выживания и питания клетки. Благодаря эндоцитозу клетка может не только регулировать уровень клеточных рецепторов на мембране, ее обновление, но и использовать эндоцитоз для поляризации и миграции клеток. Мутации, вызывающие нарушение работы путей эндоцитоза, приводят к образованию опухолей. В ходе эндоцитоза клеточная мембрана образует впячивания различных форм, которые впоследствии становятся везикулами, транспортируемыми внутрь клетки (Hinze, Boucrot, 2018).

Известны три пути эндоцитоза, различающиеся по форме и размеру поглощаемого продукта: рецептор-зависимый эндоцитоз, макропиноцитоз и фагоцитоз (рис. 1). В данной работе нас интересует последний тип – фагоцитоз, служащий для захвата макрочастиц. В ходе фагоцитоза образуются фагосомы, пузырьки из мембраны, содержащие внутри макрочастицу, которые после слияния с лизосомами внутри клетки становятся фаголизосомами (Камзолкина и др., 2015).

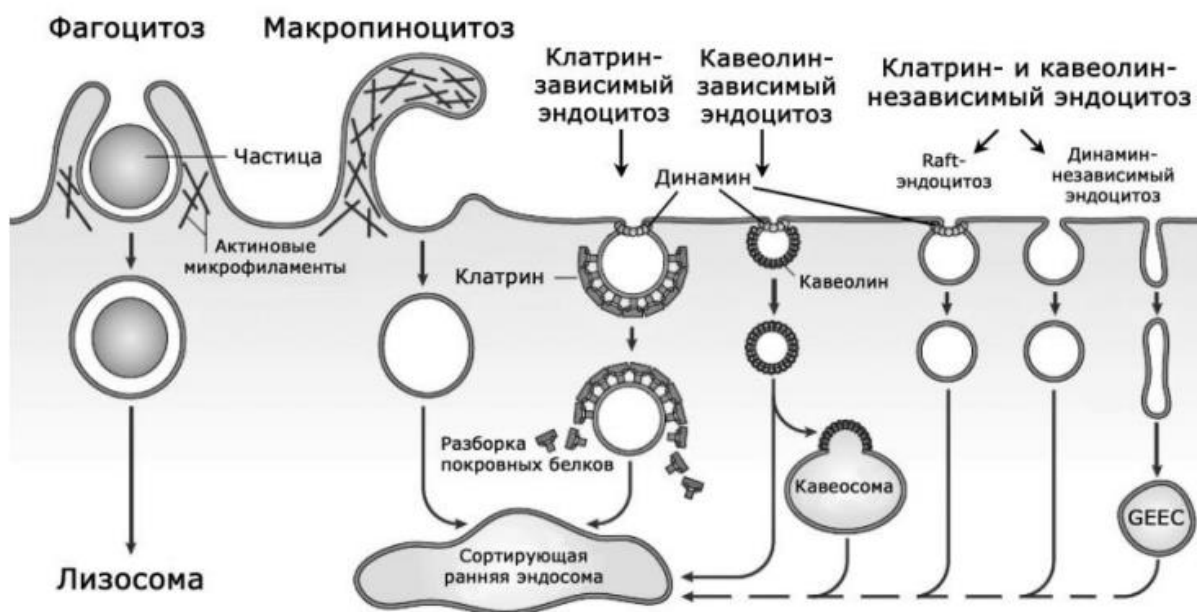


Рис. 1. Схема механизмов разных типов эндоцитоза: фагоцитоз, макропиноцитоз и рецептор-зависимый эндоцитоз, подразделяющийся на клатрин-зависимый, кавеолин-зависимый и клатрин- и кавеолин-независимый (Камзолкина и др., 2015).

Макропиноцитоз можно назвать «клеточным питьем», он нужен для захвата жидкости с частицами небольшого размера от 0,2 до 5 мкм. Макропиноцитоз используется для всасывания питательных веществ в тонком кишечнике и во многих

других клеточных процессах: рост, пролиферация клеток, а также иммунный ответ. Рецептор-зависимый эндоцитоз используется для поглощения частиц большего размера, чем при макропиноцитозе: вирусные белки, токсины, метаболиты и белки, прикрепившиеся к рецепторам на клеточной мембране (Pathak et al., 2023).

Для изучения механизмов эндоцитоза используется ингибиторный анализ, суть которого заключается в блокировке или подавлении одного из путей и оценки его вклада в общий механизм поглощения. В ингибиторном анализе могут применяться ингибиторы с узкой специфичностью, подавляющие определенную ветвь эндоцитоза, либо ингибиторы, воздействующие на широкий спектр мишеней. В своей работе мы использовали три ингибитора, подавляющие преимущественно определенные пути эндоцитоза:

- 1) Нистатин может расщеплять холестерин и, таким образом, ингибировать caveолин-опосредованный эндоцитоз и эндоцитоз, опосредованный липидными рафтами. Нистатин образует агрегаты под наружной мембраной, заключающие в себе много холестерина. В итоге агрегаты с холестерином отваливаются от мембраны, тем самым нарушая целостность липидных рафтов (Чинак, 2023);
- 2) Хлорпромазин – низкомолекулярный катионный амфифильный ингибитор, который подавляет образование клатриновых везикул (ямок), останавливая работу динамина. Это приводит к обратимой транслокации клатрина и его адаптерных белков из плазматической мембраны во внутриклеточные везикулы (Szewczyk-Roszczenko et al., 2023);
- 3) Цитохалазин D является ингибитором полимеризации актина, который нарушает механизмы эндоцитоза, включая фагоцитоз (Терпинская, 2021).

Эффероциты поглощают апоптотические тельца, возникающие в результате крайне важного клеточного процесса – апоптоза. Апоптоз – это режим программируемой клеточной смерти, в ходе которого гибель клеток определяется генетически. Апоптоз крайне важен, поскольку регулирует гомеостаз тканей в эмбриогенезе и во взрослом организме, поддерживает количество и состав клеточных популяций, а также служит механизмом защиты в ходе иммунных реакций. В отличие от некроза, который считается токсичным способом клеточной гибели, апоптоз – процесс контролируемый, к тому же способный затрагивать лишь группу клеток или вовсе отдельные клетки. И самое важное отличие апоптоза от некроза, в ходе которого содержимое цитоплазмы клетки неконтролируемо распространяется в окружающие ткани и тем самым вызывает воспаление, заключается в том, что в результате апоптоза целостность клеточной

мембраны не утрачивается, а формируются везикулы меньшего размера, нежели сама апоптотическая клетка. Эти везикулы, называемые апоптотическими тельцами, содержат в себе клеточные компоненты и имеют размер от 50 до 5000 нм (Kholodenko et al., 2022). Далее апоптотические тельца поглощаются фагоцитами и/или эффероцитами (Elmore, 2007).

Эффероцитоз начинается с распознавания эффероцитом апоптотической клетки. Это происходит с помощью особых сигналов, так называемых “find me” сигналов. Чаще всего такими сигналами служат молекулы, высвобождаемые клетками при апоптозе: АТФ, УТФ, липиды и др. Подобные сигналы – хемоаттрактанты для эффероцитов, то есть химические вещества, способствующие хемотаксису (направленному движению) эффероцитов (Блинова и др., 2024).

Помимо сигнала “find me” существуют сигналы “eat me” (фосфатидилсерин, кальрегулин) и “don’t eat me” (CD31 (cluster of differentiation), CD24, CD47, CD200, CD274 и др.), с помощью которых эффероцит решает: есть ли эту клетку или нет. Жизнеспособная клетка экспрессирует только “don’t eat me” сигналы, а вот апоптотическая одновременно экспрессирует оба типа сигналов (Блинова и др., 2024).

Одним из основных “don’t eat me” сигналов является трансмембранный гликопротеин CD47, относящийся к семейству иммуноглобулинов. В нормальной клетке CD47 локализуется в липидных рафтах плазматической мембраны. Для запуска эффероцитоза апоптотической клетке недостаточно снизить экспрессию CD47, ей нужно распределить этот гликопротеин по всей поверхности мембраны, вытащив его из липидных рафтов. Так как CD47 взаимодействует с иммунорецептором SIRPα, то при распределении молекулы по всей поверхности мембраны, вероятность связывания его с рецептором значительно уменьшается, и тем самым устраняется помеха для эффероцитоза апоптотической клетки. К тому же при распределении CD47 становятся доступными “eat me” сигналы, которые позволяют эффероциту прикрепиться к апоптотической клетке (Блинова и др., 2024).

Одним из сигналов “eat me” является липид фосфатидилсерин. В нормальных неапоптотических клетках липид находится на внутренней стороне липидного бислоя плазматической мембраны, но в процессе апоптоза с помощью механизма “flip-flop” перемещается на внешний монослой, становясь доступным для связывания с различными рецепторами на мембране фагоцита. Одним из таких рецепторов является ТИМ (T-cell immunoglobulin and mucin domain receptor), он напрямую распознает фосфатидилсерин. Иным “eat me” сигналом является кальрегулин (кальретикулин), в

норме находящийся в ЭПР и транспортирующийся на мембрану при апоптозе. Он может связываться с CD91 (рецептор на поверхности фагоцитов) и с полипептидами C1q и MBL (маннозосвязывающий лектин), с помощью которых запускается более усиленный фагоцитоз. После связывания апоптотической клетки с эффероцитом происходит ее поглощение, в котором участвуют фагосомы и ранние эндосомы, содержащие в себе мембранные белки и различные ферменты за счет произошедшего ранее слияния с везикулами из аппарата Гольджи (Блинова и др., 2024).

К настоящему моменту известно, что главным отличием эффероцитоза от фагоцитоза является поглощение апоптотических клеток/телец без вовлечения иммунного ответа. Также в отличие от фагоцитоза, осуществляемого только профессиональными фагоцитами, такими как макрофаги и другие клетки иммунной системы, к эффероцитозу способны и непрофессиональные фагоциты, например, эндотелиоциты и гепатоциты (Блинова и др., 2024). Однако в литературе нет данных о механизмах эффероцитоза, осуществляемого непрофессиональными фагоцитами. По умолчанию считается, что этот механизм должен совпадать с тем, который осуществляют профессиональные фагоциты при поглощении апоптотических телец/клеток.

Методика исследования

В ходе проведения экспериментов соблюдались правила стерильной работы с клеточными культурами. Работа в культуральном боксе всегда производилась в медицинских перчатках, которые обрабатывались 70%-ным спиртом при каждом занесении рук в ламинар. Поскольку каждая из нас проводила эксперименты на разных клеточных линиях, вся культуральная посуда (пробирки, флаконы, планшеты) подписывалась во избежание кросс-контаминации одной линии клетками другой. Чтобы не допустить загрязнения клеточных культур, а также культуральных растворов и сред бактериальной и грибковой контаминацией, в ходе работы мы постоянно меняли наконечники, серологические пипетки, избегая контактов с потенциально загрязненными и/или нестерильными поверхностями, включая поверхности ламинара, наружные поверхности культуральной посуды и сосудов со средами. Для уменьшения риска заражения клеточных культур крышечки и горлышки пробирок и флаконов обжигали, пронося их над пламенем газовой горелки.

Для решения поставленных задач мы следовали некоторым методам работы с клеточными культурами:

1. Криоконсервация клеток.

Чтобы сохранить клеточные культуры, их подвергают криоконсервации. Для этого клетки собирают в центрифужные пробирки (SPL, Южная Корея), центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 мин. Супернатант удаляют, осадок клеток (~1млн) ресуспензируют в 500 мкл раствора для заморозки, состоящего из фетальной телячьей сыворотки (FBS; 90% по объему) (Gibco, США) и ДМСО (диметилсульфоксид; 10% по объему) (ПанЭко, Россия). Суспензию клеток переносят в криопробирки и незамедлительно помещают в низкотемпературный холодильник на -80 °C. Чтобы скорость снижения температуры в криопробирках составляла 1 градус в минуту, ее помещают в специальный контейнер, заполненный изопропанолом, или в толстостенный пенопластовый штатив. Через 24 ч после полной заморозки криопробирку с клетками переносят в сосуд Дьюара, заполненный жидким азотом, температура которого составляет -196 °C. В жидком азоте клетки могут храниться десятилетиями.

2. Разморозка клеток.

Культуру клеток размораживают при +37 °C. Можно поставить криопробирку в CO₂-инкубатор, а можно разморозить, держа в руке, температура которой близка к

необходимой. Важно не держать долго культуру растаявшей, поскольку ДМСО является токсичным для клеток. Поэтому сразу после разморозки содержимое криопробирки переносят с помощью пипетки в центрифужную пробирку. Далее, используя серологическую пипетку, доливают раствор Хэнкса (ПанЭко, Россия) в 10-кратном объеме (до 4-5 мл), чтобы снизить концентрацию ДМСО, и ставят пробирку в центрифугу, зеркально расположив другую пробирку того же объема и с тем же количеством жидкости для уравнивания. Центрифугирование проводят при 1200 об/мин в течение 5 мин. В это время подготавливают культуральный флакон, площадь дна которого составляет 75 см² (SPL, Южная Корея), куда наливают 11 мл полной ростовой среды на основе ДМЕМ/F12 (ПанЭко, Россия), дополненной 10% FBS (Gibco, США), пенициллином/стрептомицином (ПанЭко, Россия), L-глутамином (ПанЭко, Россия). По окончании центрифугирования надосадочную жидкость из пробирки выливают в сливной стакан, а к оставшемуся осадку добавляют 1 мл полной среды и тщательно суспензируют. Далее суспензию клеток переносят во флакон и убирают его в СО₂-инкубатор, где поддерживается постоянная концентрация углекислого газа (5%) и сохраняется температура, равная 37 °С. На следующий после разморозки день рекомендуется произвести смену ростовой среды, чтобы избавиться от ДМСО, вышедшего из клеток.

3. Культивирование клеток (пересадка).

В работе были использованы 3 клеточных культуры: две из них – стабильные клеточные линии, EA.hy926 (гибрид соматических клеток, полученный из человеческого эндотелия и клеток A549/8, является моделью эндотелиоцитов) и Huh7 (иммортилизованная клеточная линия, полученная из клеток гепатоклеточной карциномы, является моделью гепатоцитов), и культура мезенхимных клеток, выделенных из донорского материала, пуповинные МСК (UC-MSK). Пуповинные МСК были взяты из коллекции лаборатории клеточной биологии. Клеточные линии культивировали на флаконах площадью 25 см² (SPL, Южная Корея), тогда как мезенхимные клетки – на флаконах площадью 75 см² (SPL, Южная Корея). Это обусловлено размерами клеток в адгезивном состоянии; МСК значительно крупнее. Для культивирования всех культур клеток использовали полную ростовую среду, состав которой описан в предыдущем разделе. Пересадку клеток осуществляли после достижения ими 80-90% конфлюентности, т.е. когда клетки формировали практически полный монослой.

Поскольку все использованные культуры являются адгезионными, для пересадки необходимо открепить их от подложки (дна культурального флакона). Сначала сливают имеющуюся среду, которая не содержит клеток, а далее дважды омывают дно флакона раствором Версена (ПанЭко, Россия) (по 1 мл на флакон 25 см², по 3 мл на флакон 75 см²) для максимального удаления ионов Ca²⁺, которые участвуют в адгезии клеток. После этого во флакон добавляют раствор трипсина (ПанЭко, Россия) (1 мл на флакон 25 см², 3 мл на флакон 75 см²), который расщепляет белки, участвующие в формировании адгезионных контактов, тем самым позволяя клеткам открепляться от подложки. Далее флакон помещают в CO₂-инкубатор, а по истечении нескольких минут, достаточных для открепления клеток, получившуюся суспензию переносят в центрифужную пробирку, добавляют по меньшей мере 2-кратный объем раствора Хэнкса (ПанЭко, Россия), чтобы снизить концентрацию трипсина, или равный объем FBS, чтобы нейтрализовать трипсин, и центрифугируют при условиях, описанных выше. Полученный осадок клеток суспензируют в полной ростовой среде. Количество клеток считают в камере Горяева. Для мезенхимных клеток на последующее культивирование оставляют 1/3 от полученного количества клеток, тогда как для клеточных линий – 1/6, поскольку клетки стабильных линий делятся быстрее, чем клетки первичных культур.

4. Окрашивание клеток мембранным красителем

Чтобы оценить эффективность эффероцитоза апоптотических телец, полученных из UC-MSC, эндотелиоцитами и гепатоцитами необходимо было выбрать способ, который бы позволил визуализировать данный процесс. Как нельзя лучше для этого подходят витальные флуоресцентные красители, которые формируют ковалентные связи с белками клетки и не влияют на ее жизнеспособность. При этом при делении клетки такие красители равномерно распределяются между двумя дочерними, а в случае апоптоза равномерно распределяются в апоптотические тельца. В своей работе мы использовали флуоресцентный краситель RKN26 (Lumiprobe, Россия), который окрашивает только плазматическую мембрану клетки, ковалентно связываясь с мембранными белками. Таким образом, мембрана апоптотических телец, полученных из клеток, окрашенных RKN26, также оказывалась окрашенной красителем, что позволяет их визуализировать различными флуоресцентными методами, например, с помощью проточной цитофлуориметрии. Окрашивание клеток осуществлялось до индукции апоптоза: UC-MSC инкубировали с витальным мембранным красителем

РКН26 в соответствии с инструкцией производителя (Lumiprobe, <https://ru.lumiprobe.com/k/pkh26-kit>). После окрашивания клетки отмывали в растворе Хэнкса (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% FBS (Gibco, США) и высевали в 6-луночные планшеты (SPL, Южная Корея) (1 млн клеток на лунку), инкубировали до достижения полной адгезии (24 ч) в условиях 37 °C и 5% CO₂.

5. Индукция в клетках апоптоза с помощью стауроспорина.

Для индукции апоптоза в UC-MSC использовали стауроспорин (Sigma, США) — ингибитор протеинкиназ, который является общепризнанным индуктором апоптоза. К клеткам, окрашенным РКН26, после полной их адгезии добавляли стауроспорин в концентрации 75 нМ. Инкубацию проводили в течение 24 часов в CO₂-инкубаторе. По завершении инкубации с использованием фазово-контрастной световой микроскопии оценивали эффективность прохождения апоптоза и формирования апоптотических телец. После этого осуществляли выделение апоптотических телец (описано ниже).

6. Получение апоптотических телец.

Для получения апоптотических телец использовали метод дифференциального последовательного центрифугирования. После инкубации UC-MSC со стауроспорином культуральную среду с открепившимися от подложки клетками и их фрагментами, которые, в том числе, включают апоптотические тельца, тщательно собирали и переносили в 15-мл центрифужные пробирки (SPL, Южная Корея). Первое центрифугирование проводили при 1200 об/мин (или 300 *g*) в течение 5 минут. На этом этапе в осадок выпадали крупный клеточный дебрис и клетки, находящиеся на разных стадиях апоптотической гибели, еще не фрагментированные полностью до стадии апоптотических телец. После центрифугирования надосадочную жидкость аккуратно отбирали пипеткой в пробирки типа эппендорф и проводили второе центрифугирование при 20400 *g* в течение 10 минут. На этом этапе осаждались апоптотические тельца, экзосомы и другие мелкие внеклеточные везикулы.

7. Окрашивание апоптотических телец антителами к “eat me” и “don’t eat me” сигналам.

Мы проанализировали представленность на поверхности апоптотических телец “eat me” и “don’t eat me” сигналов. Для этого использовали апоптотические тельца, полученные из UC-MSC, неокрашенных красителем РКН26. Апоптотические тельца окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами, специфичными к «eat me» сигналу CALR (кальрегулин) и к «don’t eat me» молекулам CD47, CD200 и CD274 (все

антитела фирмы BioLegend, США). Для этого тельца инкубировали с антителами (в концентрациях, рекомендуемых фирмой производителем) в течение 40-60 минут при +4°C в темноте в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (ПанЭко, Россия), дополненного 1% FBS. После этого тельца центрифугировали в течение 10 минут при 20400g, чтобы отмыть их от не связавшихся антител. Супернатант после отмывки удаляли и осадок, содержащий окрашенные специфическими антителами апоптотические тельца, ресуспензировали в 2%-ном параформальдегиде для фиксации. Экспрессию исследуемых маркеров анализировали на проточном цитофлуориметре-сортере BD FACSAriaII. В каждом образце анализировали не менее 20 тыс. событий. Обработку результатов проводили в программе FlowJo_v10.9.0.

8. Метод проточной цитофлуориметрии.

Одним из главных способов получения результатов в наших экспериментах был проточный цитофлуориметр – прибор, позволяющий изучить оптические свойства клеток (Балалаева, 2014). Мы проводили измерения на проточном цитофлуориметре BD FACSAria (рис. 2).

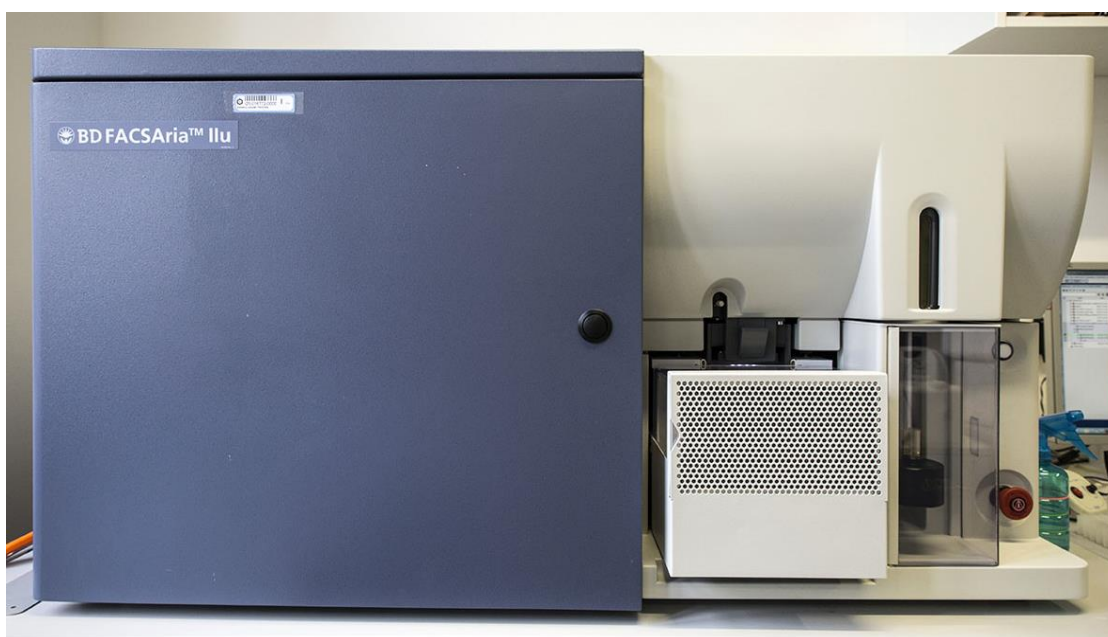


Рис. 2. Проточный цитофлуориметр BD FACS AriaII.

Главная суть работы проточного цитофлуориметра заключается в том, что внутри прибора за счет подачи воздуха под давлением одновременно с проточной жидкостью создается поток клеток, ширина которого равняется одной клетке (ширину потока можно увеличить, уменьшив давление проточной жидкости, в наших исследованиях

мы использовали 80 мкм) (рис. 3). Помимо этого, есть один или несколько лазеров, которые светят на клетки в потоке. Они же, в свою очередь, этот свет рассеивают или поглощают, далее он попадает на двучетные (дихроичные) зеркала, находящиеся в составе оптических фильтров, и отражается от них. А далее излучаемое клеткой свечение попадает на различные светофильтры, улавливающие конкретные диапазоны волн света, и на фотоумножители, находящиеся под разными углами и показывающие либо количество прошедших мимо лазера клеток (в случае детектора прямого светорассеяния – FSC; угол = 2-16°), либо приблизительную морфологию клетки (детектор бокового светорассеяния – SSC; угол = 70-105°) (Балалаева, 2014).

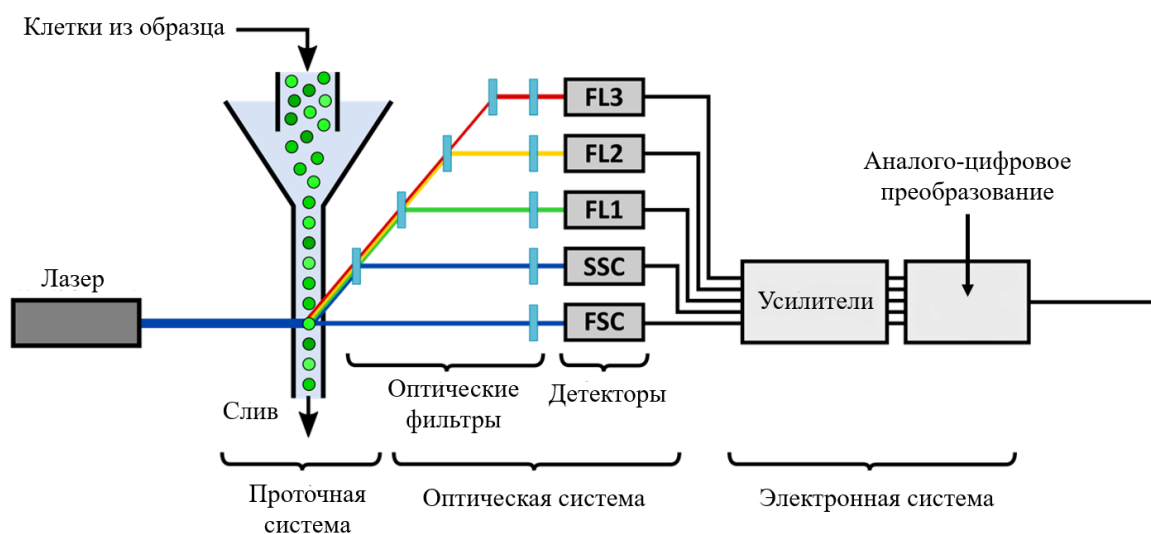


Рис. 3. Схема работы проточного цитофлуориметра. Изображение с сайта dishcuss.com с изменениями.

В нашей работе мы проводили анализ флуоресценции, показывающий интенсивность свечения клеток, в котором задействованы двучетные зеркала, светофильтры и детекторы флуоресценции (FL1, FL2, FL3), регистрирующие излучения. Далее происходит усиление полученного излучения, а после – аналого-цифровое преобразование, и полученная информация идет в компьютер.

9. Изучение механизмов эффероцитоза в присутствии антител, блокирующих “eat me” и “don’t eat me” сигналы.

Чтобы оценить вклад в эффероцитоз сигналов “eat me” (кальрегулин) и “don’t eat me” (CD200, CD274, CD47), были использованы специфические антитела, блокирующие эти сигналы (все антитела фирмы Cloud-Clone Corp., США). Сначала мы покрасили UC-MSC с помощью PKH26, далее индуцировали в них апоптоз

стауропоорином, как описано выше, получив в итоге окрашенные апоптотические тельца. В лунки 24-луночных планшетов (SPL, Южная Корея) рассаживали клетки-мишени (Huh7 и EA.hy926) по 100 тыс. клеток на лунку (табл. 1, 2), инкубировали их в течение 24 ч до полной адгезии клеток.

Апоптотические тельца собирали, как описано выше, методом дифференциального центрифугирования. Осадок апоптотических телец ресуспендировали в 500 мкл полной ростовой среды и разделяли этот объем на 5 пробирок типа эппендорф по 100 мкл в каждой. К полученным суспензиям апоптотических телец добавляли по 100 мкг/мл не меченных блокирующих антител к соответствующим “eat me” (кальрегулин) и “don’t eat me” (CD200, CD274, CD47) молекулам. Инкубировали тельца с антителами в течение 30 мин при комнатной температуре. По окончании инкубации тельца центрифугировали при 20400g в течение 10 мин, чтобы избавиться от не связавшихся антител. Надосадочную жидкость собирали пипеткой досуха, осадок ресуспендировали в полной ростовой среде и добавляли тельца в лунки с заранее рассаженными клетками-мишенями, как указано в таблицах 1 и 2. Каждая экспериментальная точка имела по три технических повтора.

Таблица 1. Схема 24-луночного планшета: контроль – клетки Huh7 без добавления апоптотических телец; apoBD – с добавлением апоптотических телец из UC-MSC, apoBD+CALR (кальрегулин) – тельца, предварительно обработанные блокирующими антителами к кальрегулину, apoBD+CD47 – тельца, предварительно обработанные блокирующими антителами к CD47, apoBD+CD274 – тельца, предварительно обработанные блокирующими антителами к CD274, apoBD+CD200 – тельца, предварительно обработанные блокирующими антителами к CD200.

Huh7 apoBD	Huh7 apoBD	Huh7 apoBD	Huh7 apoBD+ CALR	Huh7 apoBD+ CALR	Huh7 apoBD+ CALR
Huh7 apoBD+ CD47	Huh7 apoBD+ CD47	Huh7 apoBD+ CD47	Huh7 apoBD+ CD274	Huh7 apoBD+ CD274	Huh7 apoBD+ CD274
Huh7 apoBD+ CD200	Huh7 apoBD+ CD200	Huh7 apoBD+ CD200	контроль	контроль	

--	--	--	--	--	--

Таблица 2. Схема 24-луночного планшета: контроль – клетки EA.hy926 без добавления апоптотических телец; apoBD – с добавлением апоптотических телец из UC-MSC; apoBD+CALR (кальрегулин) – тельца, предварительно обработанные блокирующими антителами к кальрегулину, apoBD+CD47 – тельца, предварительно обработанные блокирующими антителами к CD47, apoBD+CD274 – тельца, предварительно обработанные блокирующими антителами к CD274, apoBD+CD200 – тельца, предварительно обработанные блокирующими антителами к CD200.

EA.hy926 apoBD	EA.hy926 apoBD	EA.hy926 apoBD	EA.hy926 apoBD+ CALR	EA.hy926 apoBD+ CALR	EA.hy926 apoBD+ CALR
EA.hy926 apoBD+ CD47	EA.hy926 apoBD+ CD47	EA.hy926 apoBD+ CD47	EA.hy926 apoBD+ CD274	EA.hy926 apoBD+ CD274	EA.hy926 apoBD+ CD274
EA.hy926 apoBD+ CD200	EA.hy926 apoBD+ CD200	EA.hy926 apoBD+ CD200	контроль	контроль	

Клетки инкубировали с апоптотическими тельцами в течение 24 ч в стандартных условиях CO₂-инкубатора. После этого клетки снимали с пластика, используя растворы трипсина и Версена, как описано выше. Суспензию клеток переносили в цитометрические пробирки, центрифугировали при 1200 об/мин в течение 5 мин. Полученный осадок ресуспензировали в 2%-ном параформальдегиде для фиксации. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре, в каждом образце анализируя не менее 10 тыс. событий.

10. Ингибиторный анализ.

Для проведения ингибиторного анализа, также как и в предыдущем эксперименте, клетки-мишени (Huh7 и EA.hy926) предварительно рассаживали в лунки 24-х луночных планшетов (SPL, Южная Корея) до полной их адгезии к пластику. Апоптотические тельца из UC-MSC, окрашенных PKH26, получали стандартным способом. В работе использовали три ингибитора (все фирмы MedChemExpress, Китай), которые подавляют разные пути эндоцитоза (описаны в разделе «Введение»).

Ранее в лаборатории клеточной биологии были определены рабочие концентрации этих ингибиторов, при которых клетки сохраняли жизнеспособность, но эффективно подавлялись соответствующие пути эндоцитоза. Рабочая концентрация нистатина для выбранных клеточных линий составляет 40 мкМ, хлорпромазина – 5 мкМ, цитохалазина D – 0,25 мкМ. Рабочие растворы ингибиторов готовились в полной ростовой среде в отдельных пробирках. Из лунок планшетов, куда были рассажены клетки-мишени, удаляли ростовую среду и в соответствующие лунки добавляли по 0,5 мл растворов ингибиторов в необходимых концентрациях (схема эксперимента показана в таблицах 3 и 4, каждая экспериментальная точка в трех технических повторях). Клетки инкубировали с ингибиторами в течение 30 мин в CO₂-инкубаторе, после этого добавляли в лунки апоптотические тельца. Инкубацию с тельцами проводили в течение 24 ч. Анализировали клетки на проточном цитофлуориметре, как описано выше.

Таблица 3. Схема 24-луночного планшета: apoBD – клетки Huh7 с добавлением только апоптотических телец; остальные лунки – клетки Huh7 с добавлением ингибиторов эндоцитоза (Nyst – нистатин, Chlorprom – хлорпромазин, CytD – цитохалазин D) и апоптотических телец из UC-MSC; контроль – клетки Huh7 без добавления апоптотических телец.

Huh7_apoBD	Huh7_apoBD	Huh7_apoBD	Huh7_Nyst	Huh7_Nyst	Huh7_Nyst
Huh7_ Chlorprom	Huh7_ Chlorprom	Huh7_ Chlorprom	Huh7_CytD	Huh7_CytD	Huh7_CytD
контроль	контроль				

Таблица 4. Схема 24-луночного планшета: apoBD – клетки EA.hy926 с добавлением только апоптотических телец из UC-MSC; остальные лунки – клетки EA.hy926 с добавлением ингибиторов эндоцитоза (Nyst – нистатин, Chlorprom – хлорпромазин, CytD – цитохалазин D) и апоптотических телец из UC-MSC; контроль – клетки EA.hy926 без добавления апоптотических телец.

EA.hy926_ apoBD	EA.hy926_ apoBD	EA.hy926_ apoBD	EA.hy926_ Nyst	EA.hy926_ Nyst	EA.hy926_ Nyst
EA.hy926_ Chlorprom	EA.hy926_ Chlorprom	EA.hy926_ Chlorprom	EA.hy926_ CytD	EA.hy926_ CytD	EA.hy926_ CytD
контроль	контроль				

В обоих экспериментах неспецифика была исключена ранее сотрудниками лаборатории. В каждом эксперименте проводился один биологический повтор, включавший в себя 3 технических повтора, поэтому для последующей статистической обработки использовался классический попарный t-тест Стьюдента. Статистическая обработка полученных данных проводилась в среде R (R Core Team, 2025), гистограммы построены с помощью библиотеки ggplot2.

Результаты и обсуждение

1. Индукция апоптоза в UC-MSC.

В ходе предварительных экспериментов, проведенных в лаборатории клеточной биологии, в качестве эффективных индукторов апоптоза МСК были выбраны стауроспорин и доксорубин, поскольку МСК оказались устойчивы к рецептор-опосредованному апоптозу, индуцированному за счет связывания специфических лигандов CD95 и TRAIL. Впоследствии для получения апоптотических телец был выбран только стауроспорин, поскольку именно при индукции стауроспорином, а не доксорубином, происходил визуализируемый с помощью световой микроскопии блэббинг плазматической мембраны и формировалось большое количество апоптотических телец (рис. 4).

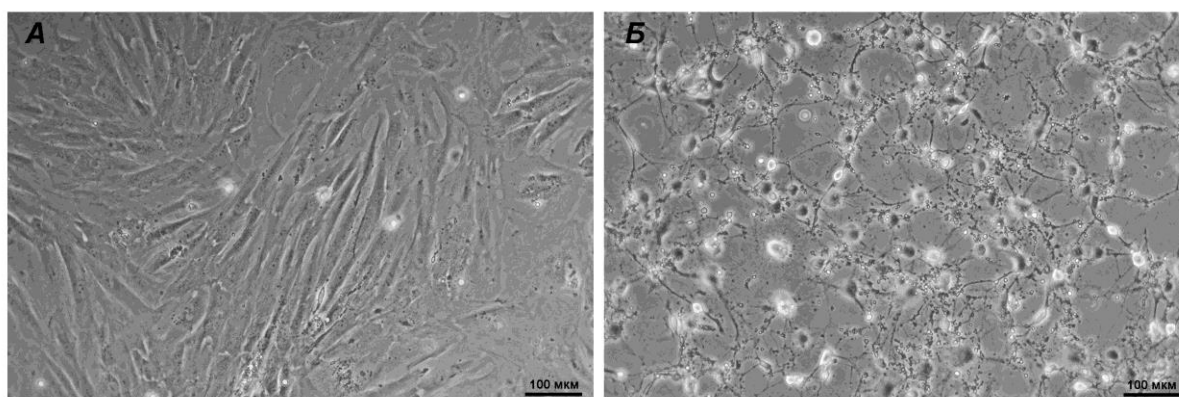


Рис. 4. Световая фазово-контрастная микроскопия UC-MSC. А – контрольные UC-MSC, клетки культивировались в стандартных условиях в полной ростовой среде (1 млн клеток на лунку 6-луночного планшета); Б – UC-MSC (1 млн клеток на лунку 6-луночного планшета) через 24 ч после инкубации со стауроспорином (75 нМ). Объектив 20X.

Через 24 ч после посадки 1 млн UC-MSC в лунку 6-луночного планшета клетки формируют плотный монослой и имеют классическую для МСК вытянутую фибробласто-подобную морфологию (рис. 4А). После добавления к UC-MSC стауроспорина клетки в значительной степени изменяют свою морфологию, начинается процесс блэббинга и формируется большое количество везикул, окруженных мембраной, которые, как было показано сотрудниками лаборатории клеточной биологии, являются апоптотическими тельцами (рис. 4Б).

Полученные таким образом апоптотические тельца далее изолировали от более крупного клеточного дебриса (мусора) за счет дифференциального центрифугирования, как описано в разделе «Методика исследования». Суть дифференциального центрифугирования заключается в том, что на первом этапе при более низких оборотах (300g или 1200 об/мин для имеющейся в лаборатории центрифуги) мы избавляемся от клеток, не ушедших в апоптоз (в культуре могут присутствовать клетки, устойчивые к стауроспорину), от клеток на ранних стадиях апоптоза (по размеру и плотности они могут соответствовать нормальным клеткам и, следовательно, осаждаются при стандартных оборотах), от крупного клеточного дебриса («обломки» или «фрагменты» клеток, которые формируются вследствие пересадки или спонтанного некроза). После первого низкоскоростного центрифугирования мы собирали надосадочную жидкость и проводили второе центрифугирование при 20400g, в результате которого в осадке оказывались апоптотические тельца и иные крупные внеклеточные везикулы. Как показали исследования, проведенные в лаборатории клеточной биологии, эта фракция содержала окруженные мембраной везикулы размером от 100 нм до 1 мкм, причем большая часть везикул попадала в гейт частиц размером, близким к 1 мкм. Из этого можно заключить, что несмотря на гетерогенность полученной фракции везикул, основную их часть составляют крупные апоптотические тельца, тогда как экзосомы, размер которых до 100 нм, составляют незначительную часть фракции.

2. Анализ эффероцитоза апоптотических телец, полученных из UC-MSC, гепатоцитами и эндотелиоцитами.

Для того, чтобы проверить способны ли эндотелиоциты (EA.hy926) и гепатоциты (Huh7) поглощать апоптотические тельца, перед индукцией апоптоза UC-MSC окрашивали витальным флуоресцентным красителем PKH26. Соответственно, при поглощении флуоресцирующих апоптотических телец должна изменяться флуоресценция поглотивших их клеток. Изменение флуоресценции оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии. В качестве контроля использовали клетки Huh7 и EA.hy926, к которым не добавляли апоптотические тельца (рис. 5).

На гистограммах (рис. 5) по оси абсцисс в логарифмической шкале изображена интенсивность флуоресценции, по оси ординат – количество клеток. Голубой пик – аутофлуоресценция клеток без добавления апоптотических телец, красный пик – флуоресценция клеток после инкубации с апоптотическими тельцами, меченными

РКН26. Краситель РКН26 имеет спектры возбуждения и испускания, схожие с таковыми флуорофора фикоэритрина (PE), поэтому флуоресценцию РКН26 визуализировали в канале фикоэритрина (PE).

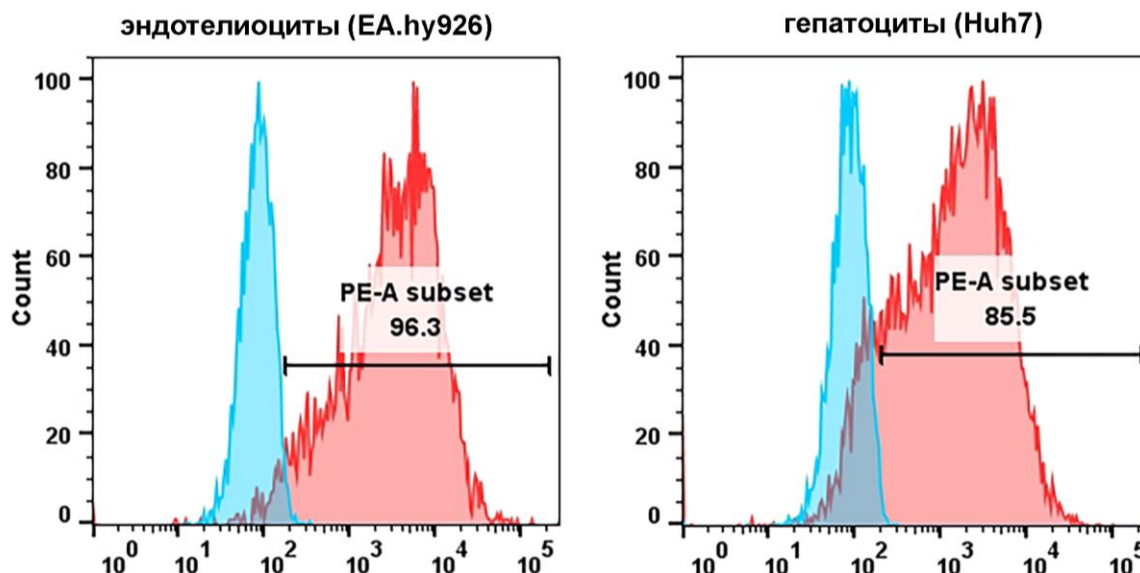


Рис. 5. Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции клеток (эндотелиоцитов (левая гистограмма) и гепатоцитов (правая гистограмма)) после поглощения апоптотических телец, полученных из UC-MSC, меченных флуоресцентным красителем РКН26.

Из данных гистограмм видно, что эндотелиоциты поглощают апоптотические тельца лучше, чем гепатоциты, учитывая, что к обеим культурам клеток было добавлено одинаковое количество апоптотических телец. Так, за 24 ч 96.3% клеток в культуре эндотелиоцитов становились позитивными по РКН26, тогда как в культуре гепатоцитов таких клеток было 85.5%. При этом в интервале интенсивности флуоресценции между 10^2 и 10^3 у эндотелиоцитов линия гистограммы менее крутая, чем у гепатоцитов, что говорит о том, что количество гепатоцитов, светящихся менее интенсивно, то есть поглотивших меньше апоптотических телец, чем при пиковой флуоресценции, больше, чем эндотелиоцитов. А значит, эффективность эффероцитоза эндотелиоцитами выше, чем эффективность эффероцитоза гепатоцитами.

3. Анализ экспрессии “eat me” и “don’t eat me” молекул на поверхности апоптотических телец, полученных из UC-MSC.

Чтобы оценить, какие из сигналов “eat me” и “don’t eat me” присутствуют на поверхности апоптотических телец, UC-MSC подвергались апоптозу, как описано в

разделе «Материалы и методы», без предварительного окрашивания клеток PKN26. Полученные апоптотические тельца окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами к соответствующим молекулам: кальрегулину (“eat me”) и CD47, CD200, CD274 (“don’t eat me”). Представленность этих молекул на поверхности апоптотических телец оценивали на проточном цитофлуориметре по изменению интенсивности флуоресценции соответствующих флуорофоров. Антитела к кальрегулину и CD274 несли в качестве флуорофора фикоэритрин (PE), антитела к CD47 и CD200 – аллофикоцианин (APC). В качестве контроля использовали неокрашенные антителами апоптотические тельца (рис.6).

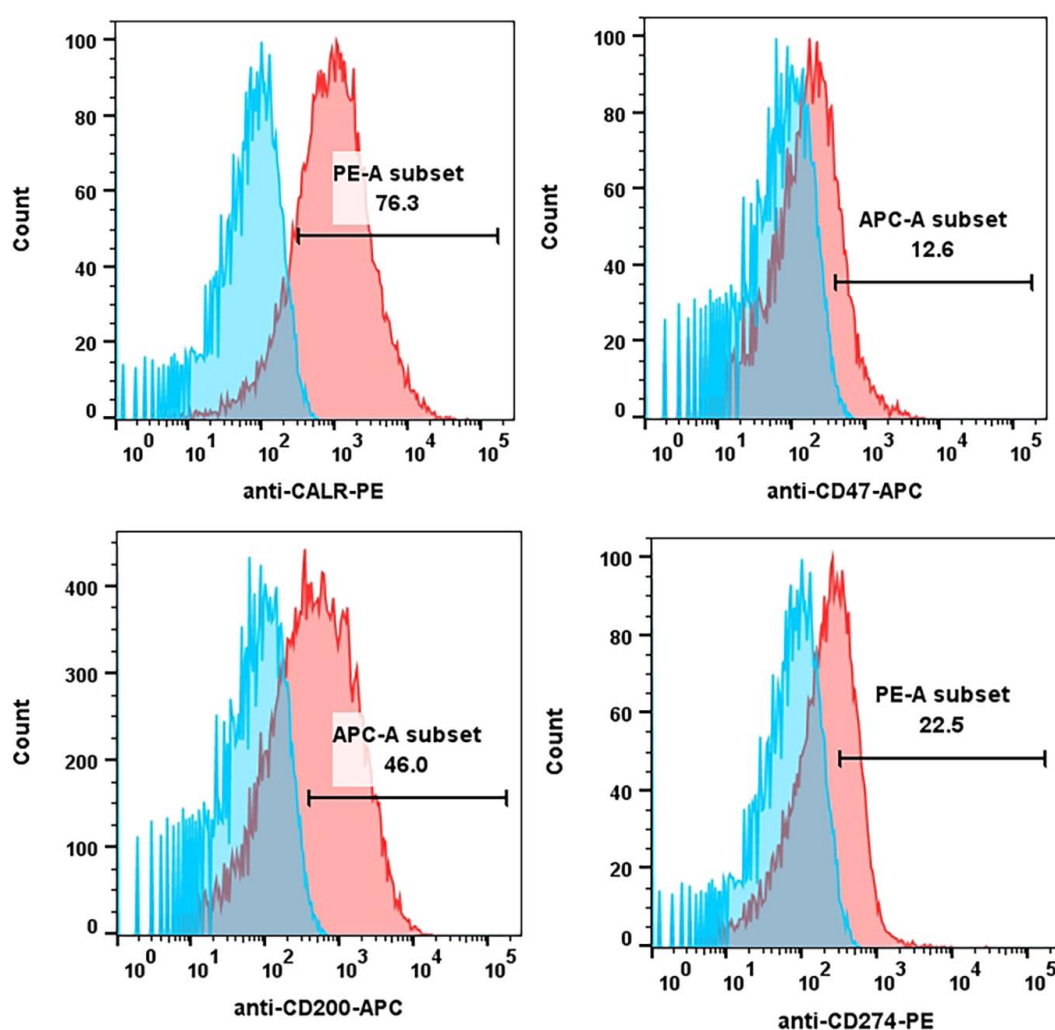


Рис. 6. Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции апоптотических телец, полученных из UC-MSC, окрашенных флуоресцентно-мечеными антителами к “eat me” и “don’t eat me” маркерам.

Полученные результаты демонстрируют, что все исследуемые маркеры в той или иной степени представлены на поверхности апоптотических телец. Этот результат служит обоснованием для проведения последующего эксперимента по блокировке выбранных нами “eat me” и “don’t eat me” сигналов. Большая часть апоптотических телец (76.3%) экспрессируют на поверхности “eat me” молекулу, кальрегулин, что согласуется с литературными данными, где показано, что при индукции апоптоза этот белок транслоцируется из ЭПР на плазматическую мембрану клеток. При этом экспрессия основного “don’t eat me” сигнала CD47 показана только на 12.6% апоптотических телец. В норме CD47 экспрессируется всеми типами клеток организма и защищает здоровые клетки от несанкционированного фагоцитоза. Уменьшение его экспрессии на апоптотических клетках/тельцах служит сигналом для индукции фагоцитоза. Менее половины апоптотических телец экспрессируют CD200 (46%) и CD274 (22.5%). CD200 и CD274 являются молекулами иммунных контрольных точек, а также “don’t eat me” молекулами, которые в норме поддерживают иммунный гомеостаз, регулируя баланс между стимулирующими и ингибирующими сигналами, которые отвечают за усиление иммунного ответа и сохранение аутоотолерантности.

Следовательно, мы показали, что на поверхности большинства апоптотических телец присутствует “eat me” маркер кальрегулин, тогда как экспрессия спектра исследованных “don’t eat me” молекул, включая CD47, CD200 и CD274, ограничена небольшой фракцией телец.

Чтобы оценить уровень экспрессии исследованных маркеров, мы посчитали относительную интенсивность флуоресценции по каждому из них. Относительная интенсивность флуоресценции (relative fluorescence intensity, RFI) является отношением значения интенсивности флуоресценции окрашенного антителами образца к значению аутофлуоресценции (флуоресценция неокрашенного образца). Полученные данные представлены в таблице 5.

Таблица 5. Значения RFI для “eat me” и “don’t eat me” сигналов на апоптотических тельцах, полученных из UC-MSC.

	кальрегулин	CD47	CD200	CD274
RFI	21.5	3.4	13.7	3.3

Рис. 7. Исследование эффероцитоза апоптотических телец, полученных из UC-MSC, эндотелиоцитами (EA.hy926) и гепатоцитами (Huh7) в присутствии антител, блокирующих “eat me” и “don’t eat me” молекулы.

Проведенный эксперимент показал не вполне ожидаемые результаты. Казалось бы, при блокировании “eat me” молекулы эффективность эффероцитоза должна была бы снизиться, тогда как при блокировании “don’t eat me” сигналов логично было бы, чтобы эффероцитоз усиливался. Однако, как показано на рисунках 8 и 9, добавление блокирующих антител приводило к снижению уровня эффероцитоза для обоих типов клеток. На гистограмме (рис. 8), демонстрирующей интенсивность флуоресценции гепатоцитов (Huh7) после их инкубации с PKH26-мечеными апоптотическими тельцами, заметно, что флуоресценция существенно уменьшилась в образцах, обработанных блокирующими антителами, по сравнению с необработанными тельцами.

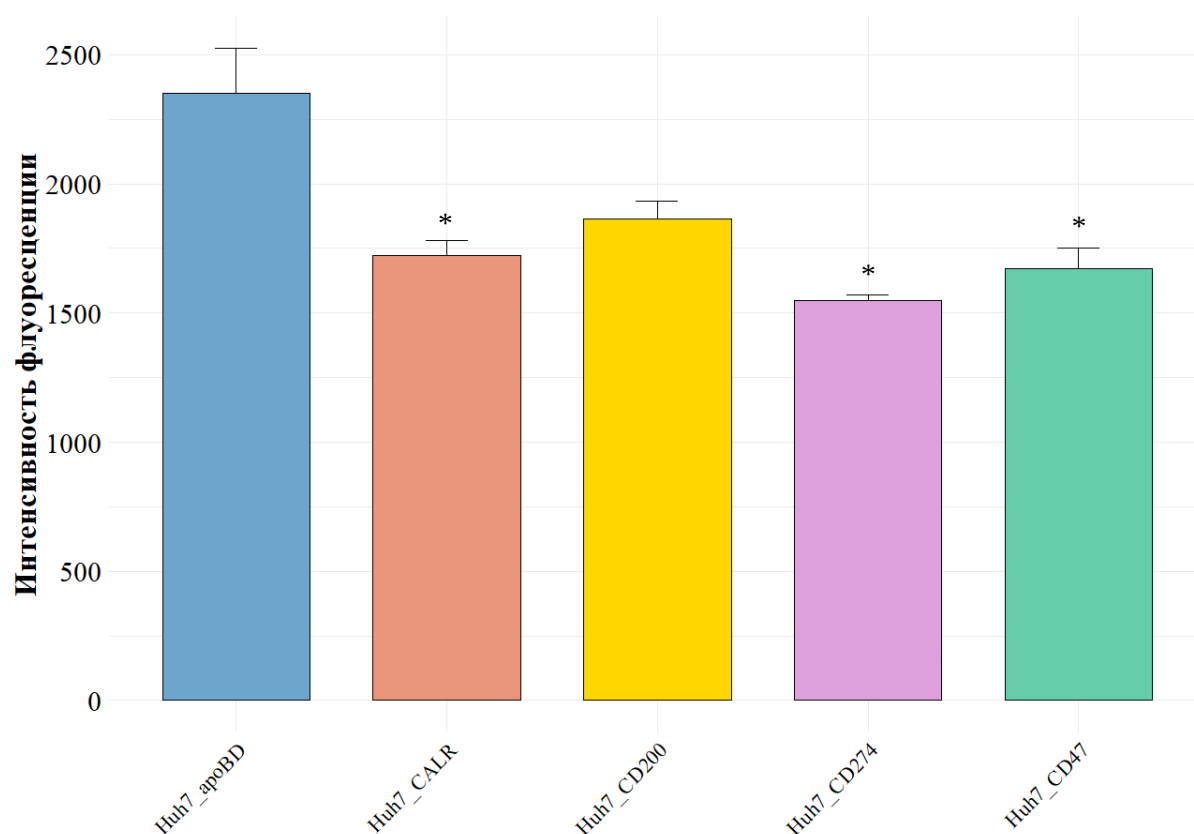


Рис. 8. Столбчатая гистограмма со стандартными ошибками, иллюстрирующая интенсивность флуоресценции гепатоцитов (Huh7) с добавлением PKH26-меченных апоптотических телец, полученных из UC-MSC, и блокирующих антител.

Похожая картина также наблюдается в случае исследования эффероцитоза апоптотических телец эндотелиоцитами (EA.hy926) (рис. 9).

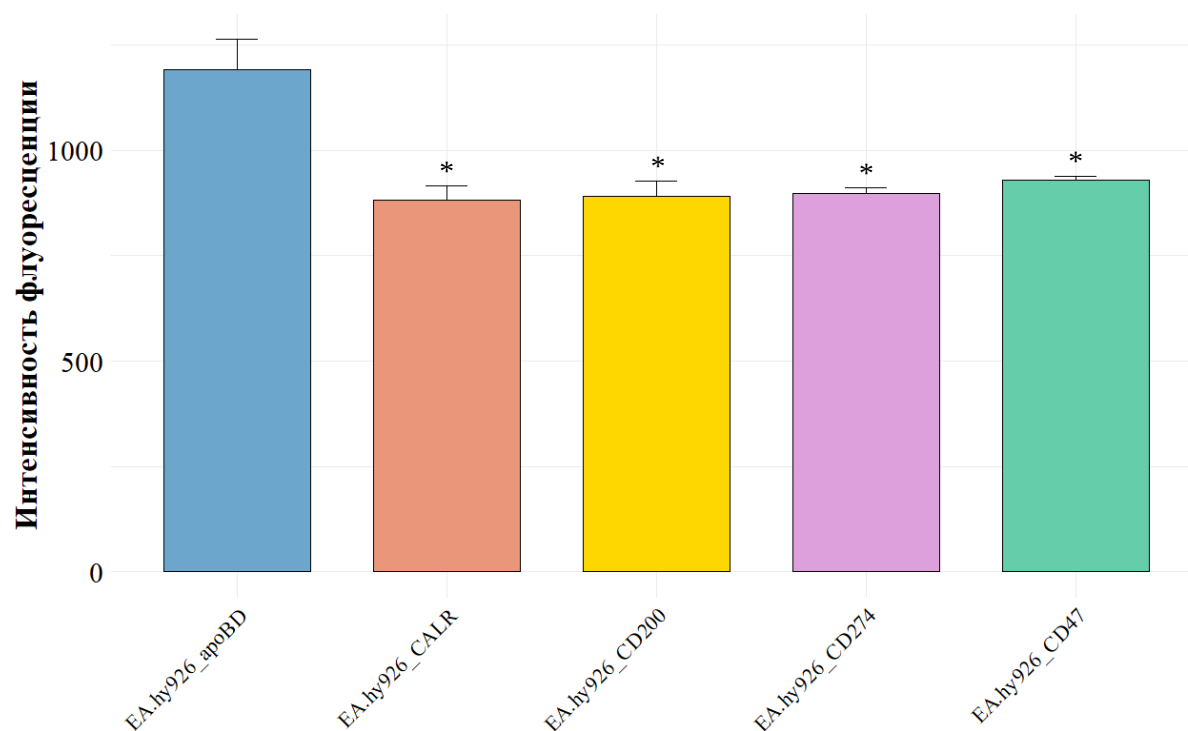


Рис. 9. Столбчатая гистограмма со стандартными ошибками, иллюстрирующая интенсивность флуоресценции эндотелиоцитов (EA.hy926) с добавлением апоптотических телец, полученных из UC-MSC, и блокирующих антител.

Обработка блокирующими антителами, независимо от типа заблокированного сигнала (“eat me” или “don’t eat me”), приводила к заметному снижению эффективности эффероцитоза апоптотических телец эндотелиоцитами.

Мы рассчитали, на сколько процентов снижается уровень эффероцитоза апоптотических телец, обработанных блокирующими антителами, клетками Nuh7 и EA.hy926, по сравнению с уровнем эффероцитоза необработанных апоптотических телец. Для этого эффероцитоз контрольных необработанных апоптотических телец, определяемый по интенсивности флуоресценции клеток, их поглотивших, был принят за 100%. Данные представлены в таблице 6.

Таблица 6. Изменение уровня эффероцитоза апоптотических телец, обработанных блокирующими антителами к “eat me” и “don’t eat me” сигналам.

Huh7_CALR	-26.7%	EA.hy926_CALR	-26.07%
Huh7_CD47	-28.9%	EA.hy926_CD47	-22.12%
Huh7_CD274	-34.19%	EA.hy926_CD274	-24.81%
Huh7_CD200	-20.76%	EA.hy926_CD200	-25.2%

Обработка антителами к кальрегулину приводила к снижению эффективности эффероцитоза на 26% для обоих типов клеток. Причем для клеточной линии эндотелиоцитов EA.hy926 это был самый высокий показатель снижения эффероцитоза по сравнению с другими блокирующими антителами. В то время как для клеточной линии гепатоцитов Huh7 самое высокое снижение уровня эффероцитоза было показано при использовании антител, блокирующих CD274 (34.9%) (табл. 6).

Чтобы оценить достоверность полученных нами результатов, мы провели статистический анализ с помощью t-теста Стьюдента (табл. 7). Значение p-value меньше 0.05 говорит о том, что полученный результат является статистически достоверным или значимым. Для всех образцов за исключением Huh7_CD200 было показано статистически значимое снижение интенсивности флуоресценции.

Таблица 7. Значения p-value при проведении t-теста Стьюдента. Сравнение было проведено между первыми столбцами гистограмм (Huh7_apoBD/EA.hy926_apoBD, рисунки 8 и 9) и остальными столбцами попарно.

Huh7_CALR	0.0115	EA.hy926_CALR	0.0088
Huh7_CD47	0.0053	EA.hy926_CD47	0.0069
Huh7_CD274	0.0027	EA.hy926_CD274	0.0078
Huh7_CD200	0.0620	EA.hy926_CD200	0.0349

Полученные нами результаты, с одной стороны, могут говорить о том, что сигналы “don’t eat me” так же важны, как и молекулы “eat me”, при поглощении эффероцитом апоптотических клеток/телец. Их роль может не быть полностью одинаковой, но если бы для эффероцитоза был важен только лишь сигнал “eat me”, то

интенсивность флуоресценции клеток, у которых ингибировали молекулы “don’t eat me” должна была значительно возрасти, но получилось наоборот. Значит, эффероцит без какого-либо действия от “don’t eat me” молекул, особенно CD274, где процент различия больше всех, не сможет эффективно поглощать апоптотические тельца. С другой стороны, подавление эффероцитоза на 20-30% может свидетельствовать о том, что в данном процессе задействованы иные механизмы, не связанные с и не зависящие от “eat me” и “don’t eat me” сигналов. Оба этих предположения требуют дальнейшего исследования.

5. Анализ эффективности эффероцитоза апоптотических телец в присутствии ингибиторов отдельных путей эндоцитоза.

Чтобы оценить вклад различных путей эндоцитоза в эффероцитоз апоптотических телец непрофессиональными фагоцитами, гепатоцитами и эндотелиоцитами, мы провели ингибиторный анализ с использованием таких ингибиторов, как нистатин, хлорпромазин и цитохалазин D (см. раздел «Введение»). Схема эксперимента представлена на рисунке 10.

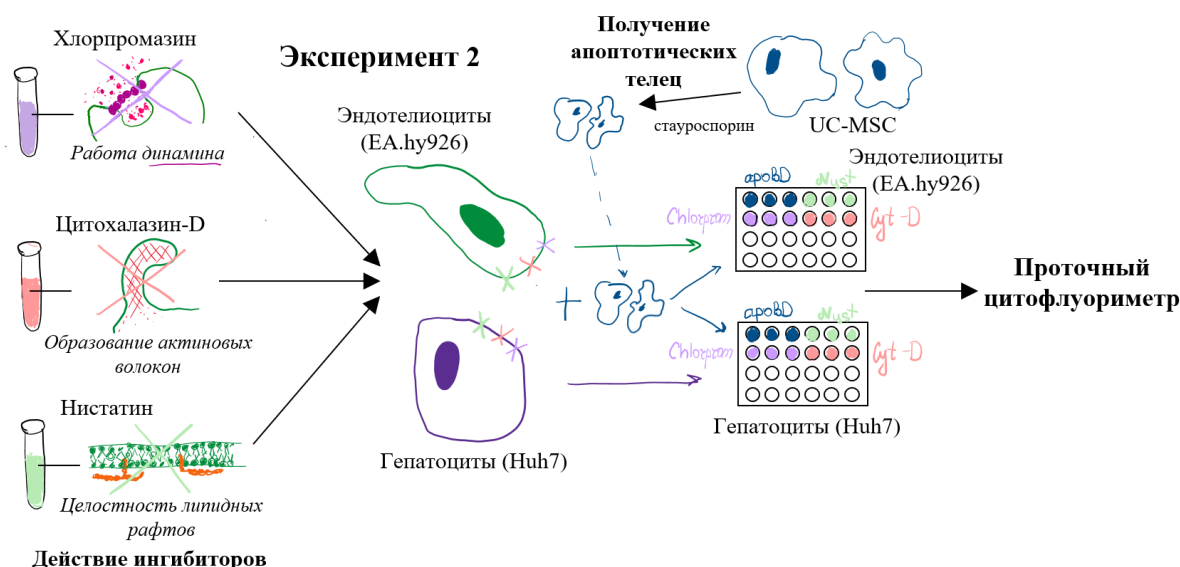


Рис. 10. Исследование механизмов эндоцитоза, задействованных в эффероцитозе апоптотических телец эндотелиоцитами и гепатоцитами, с помощью ингибиторного анализа. К образцам под названием “apobD” ингибиторы эндоцитоза не добавлялись.

В ходе ингибиторного анализа к эндотелиоцитам и гепатоцитам сначала добавляли ингибиторы разных механизмов, задействованных в эндоцитозе, а после добавляли апоптотические тельца, через 24 ч измеряли интенсивность флуоресценции

с помощью проточного цитофлуориметра. В качестве контроля для сравнения использовали гепатоциты и эндотелиоциты, необработанные ингибиторами, к которым были добавлены апоптотические тельца. Для каждого образца по значениям интенсивностей флуоресценции были построены столбчатые гистограммы со средними ошибками для каждого столбца (рис. 11, 12).

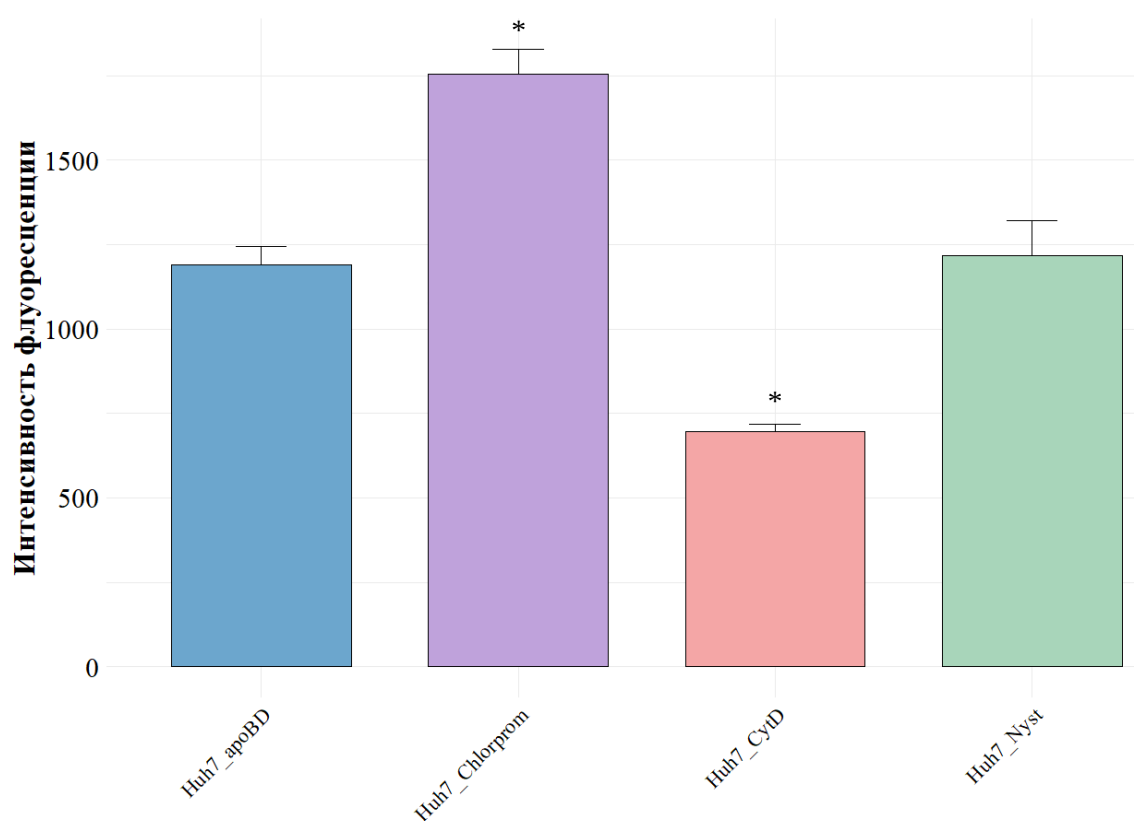


Рис. 11. Столбчатая гистограмма со стандартными ошибками, иллюстрирующая интенсивность флуоресценции гепатоцитов (Huh7) после добавления апоптотических телец, полученных из UC-MSC, и ингибиторов механизмов эндоцитоза. Chlorprom – хлорпромазин; CytD – цитохалазин D; Nyst – нистатин.

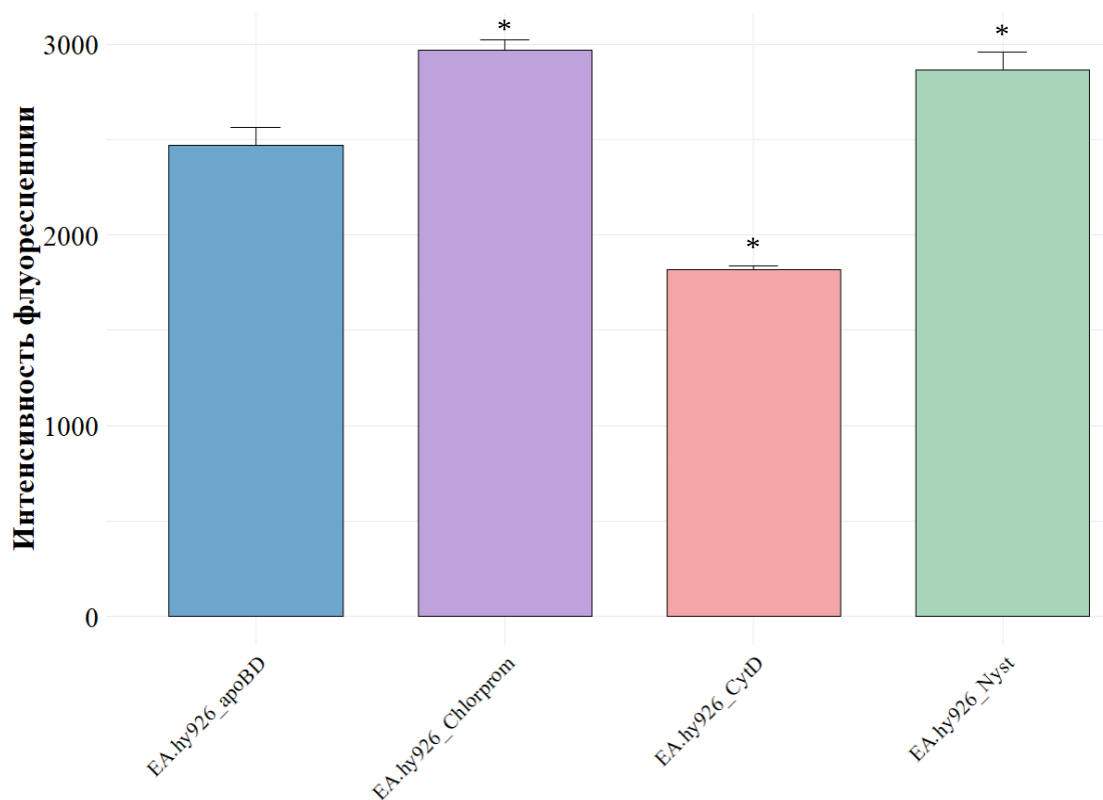


Рис. 12. Столбчатая гистограмма со стандартными ошибками, иллюстрирующая интенсивность флуоресценции эндотелиоцитов (EA.hy926) после добавления апоптотических телец, полученных из UC-MSC, и ингибиторов механизмов эндоцитоза. Chlorprom – хлорпромазин; CytD – цитохалазин D; Nyst – нистатин.

Для обоих типов клеток было показано, что только добавление цитохалазина D, ингибитора фагоцитоза, приводило к существенному снижению эффективности эффероцитоза апоптотических телец. Тогда как два других ингибитора, хлорпромазин (ингибитор клатрин-зависимого эндоцитоза) и нистатин (ингибитор кавеолин- и рафт-зависимого эндоцитоза), вызывали усиление эффероцитоза апоптотических телец, полученных из UC-MSC, гепатоцитами и эндотелиоцитами (рис. 11, 12).

Так же, как и в случае с блокирующими антителами, мы рассчитали изменение эффективности эффероцитоза в процентах, где интенсивность флуоресценции образцов клеток с добавлением апоптотических телец, но без ингибиторов, была принята за 100% (табл. 8)

Таблица 8. Изменение уровня эффероцитоза апоптотических телец после обработки клеток-мишеней ингибиторами эндоцитоза.

Huh7_Chlorprom	47.41%	EA.hy926_Chlorprom	20.24%
Huh7_CytD	-41.47%	EA.hy926_CytD	-26.48%
Huh7_Nyst	2.32%	EA.hy926_Nyst	15.91%

Таким образом, снижение уровня эффероцитоза апоптотических телец гепатоцитами после их обработки цитохалазином D составило более 40%, тогда как эффероцитоз эндотелиоцитами при тех же условиях снижался на 26%.

Для проверки достоверности полученных нами результатов мы провели t-тест Стьюдента, сравнивая клетки гепатоцитов и эндотелиоцитов, к которым добавили только апоптотические тельца (Huh7_apoBD и EA.hy926_apoBD), с клетками, предварительно обработанными ингибиторами эндоцитоза (табл. 9).

Таблица 9. Значения p-value при проведении t-теста Стьюдента. Сравнение было проведено между первыми столбцами гистограмм (Huh7_apoBD/EA.hy926_apoBD) и остальными столбцами попарно.

Huh7_Chlorprom	0.0034	EA.hy926_Chlorprom	0.0025
Huh7_CytD	0.0015	EA.hy926_CytD	0.0011
Huh7_Nyst	0.0785	EA.hy926_Nyst	0.0107

Все результаты, за исключением Huh7_Nyst ($p\text{-value} = 0.0785$; больше 0.05), являются статистически значимыми и достоверными.

Поскольку мы показали, что из выбранных нами ингибиторов только цитохалазин D подавляет эффероцитоз апоптотических телец, можно заключить, что в этом процессе задействован механизм фагоцитоза. Судя по тому, что происходило только частичное подавление эффероцитоза при добавлении цитохалазина D, нельзя исключать, что в процессе поглощения апоптотических телец непрофессиональными фагоцитами задействованы какие-то иные механизмы. Удивительным является тот факт, что два других ингибитора, хлорпромазин и нистатин, вызывали, напротив, усиление эффероцитоза апоптотических телец. В данном случае мы можем только выдвинуть предположение, почему так происходит, поскольку эта работа еще

продолжается в лаборатории клеточной биологии. Одной из гипотез является тот факт, что и хлорпромазин, и нистатин вызывают своего рода «разжижение» плазматической мембраны. Хлорпромазин за счет разрушения клатриновых пузырьков (ямок), богатых армирующими трансмембранными белками, нистатин за счет разрушения липидных рафтов, богатых холестерином. Физически мембране апоптотических телец может быть легче слиться с более «жидкой» плазматической мембраной клетки. Безусловно, эта гипотеза требует тщательного экспериментального исследования и не является результатом данной работы.

Выводы

1. Апоптотические тельца, полученные из UC-MSC, эффективно поглощаются непрофессиональными фагоцитами, гепатоцитами и эндотелиоцитами.
2. На поверхности апоптотических телец присутствуют одновременно “eat me” и “don’t eat me” молекулы. Уровень “eat me” молекулы кальрегулина выше, чем уровни “don’t eat me” молекул, включая CD47, CD200 и CD274 на поверхности апоптотических телец.
3. Блокирование как “eat me”, так и “don’t eat me” сигналов на поверхности апоптотических телец приводит к снижению уровня их эффероцитоза гепатоцитами и эндотелиоцитами. В эффероцитозе молекулы кальрегулина участвуют активнее, чем “don’t eat me” молекулы CD47, CD200 и CD274.
4. В эффероцитозе апоптотических телец непрофессиональными фагоцитами задействован механизм, характерный для макропиноцитоза и фагоцитоза: формирование актиновых волокон под клеточной мембраной.

Благодарности

Мы благодарны администрации Научно-исследовательского института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича в лице директора д.б.н., чл.-корр. РАН Е.А. Пономаренко за возможность проведения исследований на территории института.

Список литературы

1. Балалаева И.В. Проточная цитофлуориметрия. Учебно-методическое пособие. Нижегородский госуниверситет, 2014; 75 с.
2. Блинова Г.А., Ярыгин К.Н., Холоденко И.В. Эффероцитоз как один из механизмов реализации терапевтических эффектов мезенхимных стволовых клеток. Biomedical Chemistry: Research and Methods, 2024; 7 (3): e00224.
3. Камзолкина О.В., Штаер О.В., Кудрявцева О.А., Мажейка И.С. Эндоцитоз у грибов. VII всероссийская микологическая школа-конференция с международным участием «БИОТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ ГРИБОВ: МОСТЫ МЕЖДУ ЦАРСТВАМИ» Сборник докладов и тезисов, 2015; 50-66.
4. Терпинская Т.И. Экспериментальные методы регуляции пиноцитоза. Новости медико-биологических наук, 2021. 21 (4): 231-242.
5. Чинак О.А. Структура пептида RL2 и механизм его проникновения в опухолевые клетки человека. Молекулярная биология, 2023; 1.5.3: 80-82.
6. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol, 2007; 35 (4): 495-516.
7. Fernández-Garza L.E., Barrera-Barrera S.A., Barrera-Saldaña H.A. Mesenchymal Stem Cell Therapies Approved by Regulatory Agencies around the World. Pharmaceuticals (Basel), 2023; 16 (9): 1334.
8. Hinze C., Boucrot E. Endocytosis in proliferating, quiescent and terminally differentiated cells. Journal of Cell Science, 2018; 131: jcs216804.
9. Kholodenko I.V., Kholodenko R.V., Majouga A.G., Yarygin K.N. Apoptotic MSCs and MSC-Derived Apoptotic Bodies as New Therapeutic Tools. Curr Issues Mol Biol., 2022; 44 (11): 5153-5172.
10. Naji A., Eitoku M., Favier B., Deschaseaux F., Rouas-Freiss N., Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. Cell Mol Life Sci., 2019; 76 (17): 3323-3348.
11. Pathak C., Foram U. Vaidya, Bhargav N. Waghela, Pradip Kumar Jaiswara, Vishal Kumar Gupta, Ajay Kumar, Barani Kumar Rajendran, Kishu Ranjan. Insights of Endocytosis Signaling in Health and Disease. International Journal of Molecular Sciences, 2023; 2971: 24.
12. R Core Team. R Language Definition, 2025: 60.

13. Szewczyk-Roszczenko O.K., Roszczenko P., Shmakova A., Finiuk N., Holota S., Lesyk R., Bielawska A., Vassetzky Y., Bielawski K. The Chemical Inhibitors of Endocytosis: From Mechanisms to Potential Clinical Applications. *Cells*, 2023; 12 (2312): 32.
14. Zheng B., von See M.P., Yu E., Gunel B., Lu K., Vazin T., Schaffer D.V., Goodwill P.W., Conolly S.M. Quantitative Magnetic Particle Imaging Monitors the Transplantation, Biodistribution, and Clearance of Stem Cells In Vivo. *Theranostics*, 2016; 6 (3): 291-301.