

TISSUE AND ORGAN REGENERATION

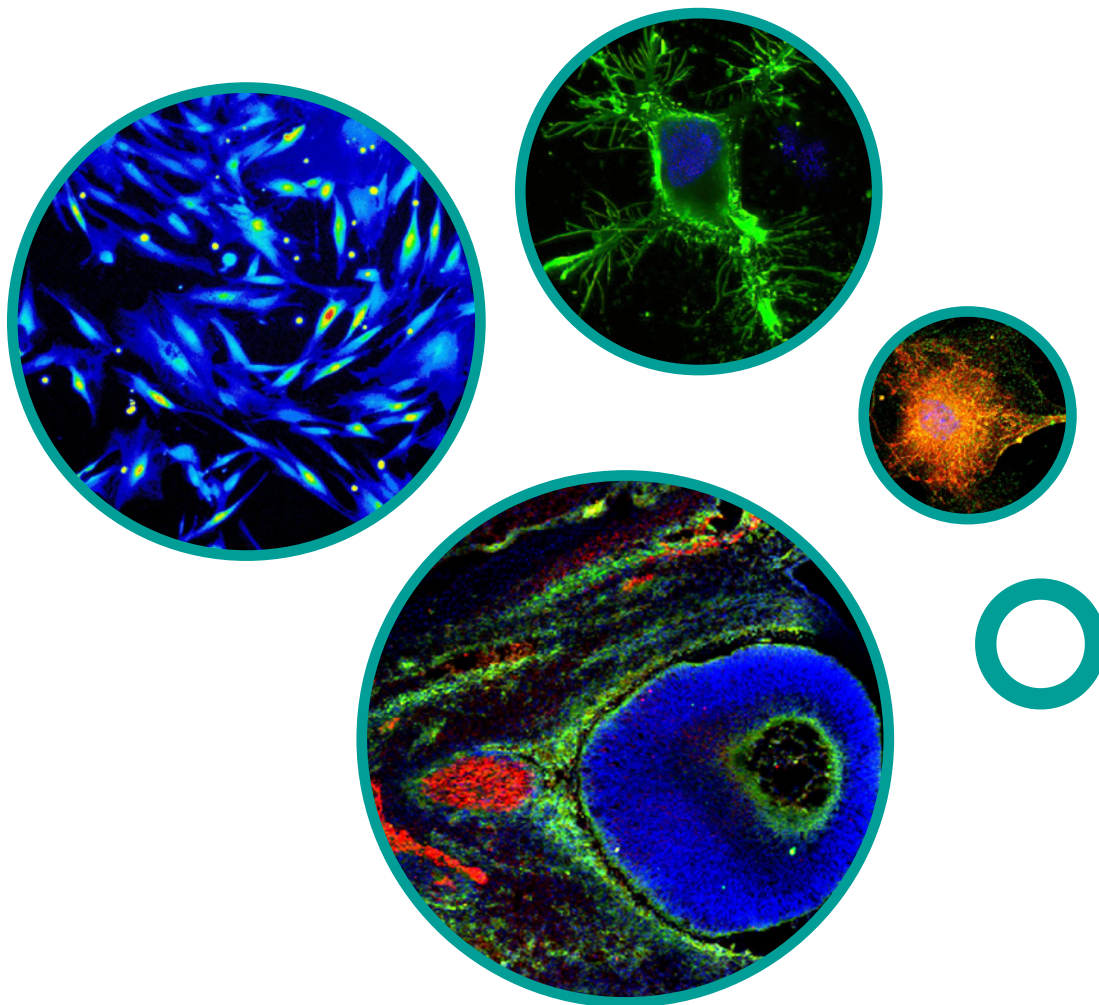
РЕГЕНЕРАЦИЯ

органов и тканей

Регенеративная биомедицина Евразии

2

Том (Vol.) 1
2023



ОБЩЕСТВО
РЕГЕНЕРАТИВНОЙ
МЕДИЦИНЫ

ISSN 2949-5938

Цели и задачи

Ключевой задачей журнала является создание площадки для освещения и диалога об основных достижениях, проблемах и задачах регенеративной биомедицины, а также обобщение современных представлений о фундаментальных механизмах регенерации тканей и органов.

Концепция журнала предусматривает всестороннее освещение вопросов, связанных с выяснением механизмов регенерации и обновления тканей, а также с возможностью разработки и практического применения подходов регенеративной биомедицины. Важным аспектом также является формирование и развитие этой отрасли науки как самостоятельного направления на стыке физиологии, клеточной биологии, биологии развития, биохимии и наук о материалах.

Главный редактор

В.А. Ткачук, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, декан Факультета фундаментальной медицины, директор Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5515-4266

Заместитель главного редактора

П.И. Макаревич, канд. мед. наук, заведующий лабораторией генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 7259-9180

Редактор выпуска

В.А. Ткачук, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, декан Факультета фундаментальной медицины, директор Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5515-4266

Редакционная коллегия

В.В. Белоусов, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, генеральный директор ФБГУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 6517-8373

Л.Б. Буравкова, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заместитель директора по научной работе ФГБУ «ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 8594-2532

Д.В. Бутнару, канд. мед. наук, доцент, проректор по международной деятельности, заместитель директора по научной работе ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2408-5133

М.В. Воронцова, канд. мед. наук, заместитель декана по науке Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 4168-6851

Е.А. Воротеляк, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, руководитель лаборатории клеточной биологии ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2310-9118

М.М. Галагудза, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 2485-4176

И.И. Еремин, канд. мед. наук, заместитель директора по научной работе ФГБУН «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 6098-7226

А.Ю. Ефименко, канд. мед. наук, заведующий лабораторией репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5110-5998

М.Н. Карагяур, канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9504-4257

М.А. Лагарькова, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, генеральный директор ФГБУ «ФНКЦ физико-химической медицины им. акад. Ю.М. Лопухина ФМБА России» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 4315-1701

М.А. Масчан, д-р мед. наук, профессор, заместитель генерального директора-директор Института молекулярной и экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия) Scopus Author ID: 562880

К.А. Рубина, д-р биол. наук, профессор РАН, руководитель лаборатории морфогенеза и репарации тканей Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9471-2511

Е.В. Семина, д-р биол. наук, заместитель руководителя по развитию и проектной деятельности ОНЦ «Институт медицины и наук о жизни» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» (Калининград, Россия) eLibrary SPIN: 4586-4001

В.И. Севастьянов, д-р мед. наук, профессор, директор АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2895-1090

Н.С. Сергеева, д-р биол. наук, профессор, заведующая отделением прогноза эффективности консервативного лечения МНИОИ имени П.А. Герцена — филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 1805-8141

О.В. Степанова, канд. биол. наук, руководитель лаборатории клеточной биологии и регенеративной медицины отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 8229-8935

А.Н. Томилин, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН, директор ФГБУН Институт цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 8079-5581

Редакционный совет

А.В. Васильев, д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. РАН, директор ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 7050-9087

В.В. Власов, д-р хим. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН» (Новосибирск, Россия) eLibrary SPIN: 6416-3640

С.В. Готье, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 5969-5749

Н.И. Дризе, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией физиологии кроветворения ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 1705-2900

С.М. Закиян, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией эпигенетики развития ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск, Россия) eLibrary SPIN: 7274-2622

А.Д. Каприн, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 1759-8101

С.А. Лукьянов, д-р биол. наук, профессор, академик РАН, Ректор ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 2920-8861

Е.В. Парфенова, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, Заместитель генерального директора — директор НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9042-7848

Г.Т. Сухих, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 9374-5710

В.П. Чехонин, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заведующий отделом медицинских нанобиотехнологий НИИ трансляционной медицины ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 8292-2807

Е.Л. Чойнзонов, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, директор НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» (Томск, Россия) eLibrary SPIN: 2240-8730

Е.В. Шляхто, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия) eLibrary SPIN: 6679-7621

К.Н. Ярыгин, д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заведующий лабораторией клеточной биологии ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» (Москва, Россия) eLibrary SPIN: 7567-1230

Периодичность	выходит 4 раза в год
Префикс	DOI https://doi.org/10.60043
ISSN	2949-5938
Свидетельство о регистрации средства массовой информации	Серия Эл № ФС77-83582 от 13 июля 2022 г. выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
Учредитель, издатель, редакция	Региональная общественная организация «Общество регенеративной медицины» (ОГРН 1187700008165)
Адрес	119991, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 27, к. 1
Телефон редакции	+7(999) 922-41-19
Сайт	https://regmed-journal.ru/
e-mail	journal@regmedru.com
Выход в свет	27 декабря 2023
Копирайт	© Региональная общественная организация «Общество регенеративной медицины», оформление
Журнал открыт для ознакомления на сайте	https://regmed-journal.ru
Цена	распространяется бесплатно
Условия распространения материалов:	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.
Редакторы-корректоры	И.С. Пигулевская, Л.А. Зелексон
Верстка	О. Храмова

Aims and scope

The key objective of the journal is to create a platform for coverage and dialogue about the main achievements, problems and tasks of regenerative biomedicine, as well as to summarize modern ideas about the fundamental mechanisms of tissue and organ regeneration.

The concept of the journal provides comprehensive coverage of issues related to elucidating the mechanisms of tissue regeneration and renewal, as well as the possibility of developing and practical application of regenerative biomedicine approaches. An important aspect is also the formation and development of this branch of science as an independent direction at the intersection of physiology, cell biology, developmental biology, biochemistry and materials sciences.

Editor-in-Chief

Vsevolod A. Tkachuk, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Dean of Faculty of medicine, Director of Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5515-4266

Deputy Editor-in-Chief

Pavel I. Makarevich, MD, PhD, Head of the Laboratory of Gene and Cell Therapy, Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 7259-9180

Editor of the Issue

Vsevolod A. Tkachuk, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Dean of Faculty of medicine, Director of Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5515-4266

Editorial board

Vsevolod V. Belousov, D.Sc., Corresponding Member of RAS, General Director of the Federal Center for Brain and Neurotechnologies FMBA of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 6517-8373

Lyudmila B. Buravkova, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Deputy Director, Institute of Medical and Biological Problems of RAS (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 8594-2532

Denis V. Butnaru, MD, PhD, Associate Professor, Vice-Rector for International Affairs, Deputy Director for Scientific Work of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Ministry of Health of Russia (Sechenov University), (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2408-5133

Maria V. Vorontsova, MD, PhD, Deputy Dean for Science, Faculty of Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 4168-6851

Ekaterina A. Vorotelyak, D.Sc., Corresponding Member of RAS, Head of the laboratory of cell biology of the Federal State Budgetary Institution Institute of Developmental Biology named after N.K. Koltsov of RAS (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2310-9118

Mikhail M. Galagudza, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Director of the Institute of Experimental Medicine of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center named after V. A. Almazov, Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 2485-4176

Ilya I. Eremin, MD, PhD, Deputy Director for Scientific Work of the Federal State Budgetary Institution Russian Scientific Center for Chemistry named after Academician B.V. Petrovsky (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 6098-7226

Anastasia Yu. Efimenko, MD, PhD, Head of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration, Institute for Regenerative Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5110-5998

Maxim N. Karagyaur, MD, PhD, Associate Professor of the Department of Biochemistry and Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9504-4257

Maria A. Lagarkova, D.Sc., Corresponding Member of RAS, Director General of the Federal State Budgetary Institution Federal Research Center for Physical and Chemical Medicine, Federal Medical and Biological Agency (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 4315-1701

Mikhail A. Maschan, MD, D.Sc., Professor, Deputy Director General, Director of the Institute of Molecular and Experimental Medicine of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) Scopus Author ID: 562880

Ksenia A. Rubina, D.Sc., Professor of RAS, Head of the Laboratory of Morphogenesis and Tissue Reparation, Faculty of Medicine, Moscow State University named after M.V. Lomonosov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9471-2511

Ekaterina V. Semina, D.Sc., Deputy Head for Development and Project Activities at the Institute of Medicine and Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University (Kaliningrad, Russia) eLibrary SPIN: 4586-4001

Viktor I. Sevastyanov, D.Sc., Professor, Director of the Institute of Biomedical Research and Technology (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2895-1090

Natalya S. Sergeeva, D.Sc., Professor, Head of the Department of Prediction of the Effectiveness of Conservative Treatment, Moscow Research Institute named after P.A. Herzen — branch of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 1805-8141

Olga V. Stepanova, PhD, Head of the Laboratory of Cell Biology and Regenerative Medicine, Department of Fundamental and Applied Neurobiology Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology named after V.P. Serbsky, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 8229-8935

Alexei N. Tomilin, D.Sc., Corresponding Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Cytology RAS (Saint Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 8079-5581

Editorial Council

Andrey V. Vasiliev, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution Institute of Developmental Biology named after N.K. Koltsov RAS (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 7050-9087

Valentin V. Vlasov, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Scientific Director of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of SB RAS (Novosibirsk, Russia) eLibrary SPIN: 6416-3640

Sergey V. Gauthier, MD, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Director of the National Medical Research Center for Transplantation and Artificial Organs named after Academician V.I. Shumakov, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 5969-5749

Nina I. Drize, D.Sc., Professor, Head of the Laboratory of Physiology of Hematopoiesis, National Medical Research Center of Hematology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 1705-2900

Suren M. Zakiyan, D.Sc., Professor, Head of the Laboratory of Developmental Epigenetics, Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS (Novosibirsk, Russia) eLibrary SPIN: 7274-2622

Andrey D. Kaprin, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Director General of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 1759-8101

Sergey A. Lukyanov, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Rector of the Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 2920-8861

Yelena V. Parfyonova, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Deputy General Director — Director of the Research Institute of Experimental Cardiology, Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Cardiology named after Academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9042-7848

Gennady T. Sukhikh, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Director of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 9374-5710

Vladimir P. Chekhonin, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Head of the Department of Medical Nanobiotechnologies, Research Institute of Translational Medicine, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 8292-2807

Evgeny L. Choinzonov, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Director of the Oncology Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia) eLibrary SPIN: 2240-8730

Evgeny V. Shlyakhto, D.Sc., Professor, Full Member of RAS, Director General of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center named after V.A. Almazov, Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia) eLibrary SPIN: 6679-7621

Konstantin N. Yarygin, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Laboratory of Cell Biology, Research Institute of Biomedical Chemistry named after V.N. Orekhovich (Moscow, Russia) eLibrary SPIN: 7567-1230

Frequency	quarterly
DOI Prefix	DOI https://doi.org/10.60043
ISSN	2949-5938
Certificate and Registry	Certificate of mass media registration series EI No. FS77-83582 dated July 13, 2022 issued by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications (Roskomnadzor)
Founder, publisher, editorial office	Regional public organization “Society of Regenerative Medicine” (OGRN 1187700008165)
Address	119991, Moscow, Lomonosovsky Prospekt, 27, building 1
Editorial phone	+7(999) 922-41-19
Website	https://regmedjournal.ru/
e-mail	journal@regmedru.com
The publication	December 27, 2023
Copyright	© Regional public organization “Society of Regenerative Medicine”, layout, 2023
Online open access:	https://regmed-journal.ru
Price	free
Distribution	The content is distributed under the Creative Common License CC BY
Editors and proofreaders	Irina S. Pigulevskaya, Lev A. Zelexon
Layout	Olga Khranova

6	ОТ РЕДАКЦИИ П.И.Макаревич	EDITORIAL Pavel I. Makarevich
7	ОБЗОРЫ И КОММЕНТАРИИ Современные подходы к созданию 2D- и 3D-клеточных моделей для изучения фиброза легких А.Е. Толстолужинская, Н.А. Басалова, А.Ю. Ефименко	REVIEWS AND COMMENTS Modern approaches to the creation of 2D and 3D cellular models for the study of lung fibrosis Anastasiya E. Tolstoluzhinskaya, Nataliya A. Basalova, Anastasiya Y. Efimenko
33	Возможности биотехнологической платформы тутового шелкопряда (<i>B. mori</i>) для регенеративной медицины Е.Н. Юматов, Е.Г. Евлагина, В.Г. Евлагин, Е.Ф. Лейнвебер, Д.В. Товпеко, С.С. Дебенюк	Possibilities of <i>Bombyx mori</i> (<i>B. mori</i>) biotechnological platform for regenerative medicine Evgeniy N. Yumatov, Elena G. Evlagina, Viktor G. Evlagin, Evdokia F. Leinweber, Dmitry V. Tovpeko, Semyon S. Debenok
55	ФОРУМ Первый клеточный продукт на основе технологий редактирования генома получил одобрение FDA США П.И. Макаревич	FORUM The first genome-edited cell product receives FDA approval Pavel I. Makarevich
60	ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ Роль <i>Plaur-miR1-5p</i> , кодируемой геном урокиназного рецептора <i>Plaur</i> , в процессах ангиогенеза П.С. Климович, А.В. Реутов, А.А. Щипова, В.Ю. Сысоева, М.С. Арбатский, К.А. Рубина, Е.В. Семина	ORIGINAL ARTICLES The role of <i>Plaur-miR1-5p</i> encoded within the urokinase receptor gene (<i>Plaur</i>) in angiogenesis Polina S. Klimovich, Artem V. Reutov, Anna A. Shchipova, Veronika Yu. Sysoeva, Mikhail S. Arbatsky, Kseniya A. Rubina, Ekaterina V. Semina
76	Постстрессорные изменения уровня мРНК <i>il-6</i> и <i>bdnf</i> в гиппокампе и крови крыс с генетически детерминированным контрастным уровнем возбудимости нервной системы Е.Ю. Маянова, С.А. Новожилова, И.Г. Шалагинова, Т.Г. Зачепило, Н.А. Дюжикова	Post-stress changes in <i>il-6</i> and <i>bdnf</i> mRNA levels in the hippocampus and blood of rats with a genetically determined contrast level of nervous system excitability Ekaterina Yu. Mayanova, Sofiya A. Novozhilova, Irina G. Shalaginova, Tatyana G. Zachepilo, Natalia A. Dyuzhikova

Глубокоуважаемые коллеги!

Первый выпуск журнала «Регенерация органов и тканей» стал значимым событием в научном ландшафте отечественной регенеративной биомедицины. Авторы, редакторы и рецензенты, приложившие усилия для его наполнения материалами, обеспечили высокий уровень и интересную тематику, получившие значимое внимание со стороны профессионального сообщества.

Одной из важных задач журнала, помимо предоставления площадки для публикации обзорных, экспериментальных и дискуссионных статей, стало объединение всех активных исследователей, занимающихся фундаментальными и практическими вопросами регенеративной медицины и биологии. В этой связи мы активно призываем всех читателей сообщать вашим коллегам о возможности подачи рукописей в журнал и приглашаем ведущих исследователей предоставлять такую возможность молодым коллегам: аспирантам, ординаторам, постдокам. Это не только разнообразит научные мнения, освещаемые в журнале, но и формирует научную репутацию исследователей, которые начинают свой путь в этой области.

Перспективы развития журнала напрямую определяются уровнем публикаций, причем как обзорных, так и оригинальных. В первом выпуске большой интерес вызвала статья акад. В.А. Ткачука¹, посвященная наиболее важным фундаментальным вопросам регенеративной биомедицины и ее связи с науками о жизни. Глубокий исторический экскурс за авторством к.м.н. Р.В. Деева² укрепил память об одном из величайших отечественных клеточных биологов — профессоре А.А. Максимове и, что немаловажно, о его последователях и учениках в России и за ее пределами.

Редакционный совет и редакционная коллегия благодарят всех рецензентов, принимающих живое и непредвзятое участие в оценке поступающих рукописей, и выражают глубокую уверенность, что в ближайшее время совместными усилиями мы повысим уровень журнала. Уже сейчас мы активно работаем над размещением его выпусков и статей в базе РИНЦ, а следующей вехой должно стать его включение в список ВАК для изданий, в которых должны быть опубликованы материалы диссертационных исследований.

В настоящем выпуске мы с радостью предоставляем слово целому ряду исследователей, развивающих разные направления регенеративной медицины и биологии — от генной терапии до тканевой инженерии, и отрадно, что ряд рукописей в этом выпуске был подан инициативно. Мы благодарим авторов за доверие к журналу и за выбор этой площадки для публикации своих статей и надеемся, что следующие выпуски будут наполняться так же активно.

С уважением,
зам. главного редактора
к.м.н.

П.И. Макаревич

¹ Ткачук В.А. Регенеративная биомедицина в биологии и медицине. Регенерация органов и тканей. 2023;1(1):7–15.

² Деев Р.В. Александр Максимов в зеркале учеников. Регенерация органов и тканей. 2023;1(1):25–41.

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-7-32>

Современные подходы к созданию 2D- и 3D-клеточных моделей для изучения фиброза легких

А.Е. Толстолужинская, Н.А. Басалова, А.Ю. Ефименко

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
119192, г. Москва, Ленинские горы, 1, Россия

Адрес для корреспонденции: tolstoluzhinskayaae@my.msu.ru

Аннотация

Фиброз легких является следствием многих воздействий, ведущих к повреждению ткани легкого и развитию последующего воспаления. Фиброз представляет собой разрастание соединительной ткани, которое может приводить к нарушению архитектоники легких и снижать их функциональность вплоть до летального исхода. При этом в настоящее время механизмы, лежащие в основе фиброгенеза, недостаточно изучены. В связи с этим задача по их изучению не теряет своей актуальности, и для ее решения требуется разработка моделей фиброза легких, способных отразить все ключевые процессы фиброгенеза. Модель *in vivo* с использованием животных обладает множественными неоспоримыми преимуществами, но при этом имеет строгие этические ограничения и не отражает всех механизмов фиброза легких, свойственных человеческому организму. При этом в исследованиях *in vitro* ученые могут позволить себе использовать биоматериалы не только животных, но и человека и на их основе строить клеточные системы — от 2D- до 3D-моделей. Моделирование фиброза легких преимущественно основано на использовании основных типов клеток, вовлеченных в развитие фиброза легких, таких как миофибробласты, фибробласты, альвеолоциты и других. Некоторые модели базируются также на специфическом фиброз-ассоциированном внеклеточном матриксе и дальнейшем изучении взаимодействия клеток как друг с другом, так и с матриксом.

Стоит учитывать, что в разных моделях отображаются естественных процессов фиброгенеза, что требует от исследовательского сообщества использования широкого круга моделей. Учитывая многофакторность патогенеза фиброза легких, важно понимать всю совокупность происходящих процессов для получения полноты реальной картины, близкой к картине *in vivo*, в связи с чем важна многокомпонентность моделей. В данном обзоре акцентировано внимание на анализе различных моделей фиброза легких *in vitro* в двумерных и трехмерных системах, отображены подходы к их созданию, ключевые различия, основные преимущества и недостатки моделей, как частные, так и общие.

Ключевые слова: фиброз легких, модели фиброза, миофибробласты, TGF- β , сфероиды, органоиды, профибротический матрикс

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Толстолужинская А.Е., Басалова Н.А., Ефименко А.Ю. Современные подходы к созданию 2D- и 3D-клеточных моделей для изучения фиброза легких. *Регенерация органов и тканей*. 2023;1(2):7–32. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-7-32>

Поступила 02.11.2023

Обработана 22.11.2023

Принята к публикации 11.12.2023

Modern approaches to the creation of 2D and 3D cellular models for the study of lung fibrosis

Anastasiya E. Tolstoluzhinskaya, Nataliya A. Basalova, Anastasiya Y. Efimenko

Lomonosov Moscow State University, Russian Federation, Moscow, Leninskie Gory, 1, 119991

Correspondence address: tolstoluzhinskayaae@my.msu.ru

Annotation

Lung fibrosis is a consequence of many influences leading to damage to lung tissue and the development of subsequent inflammation. Fibrosis is an overgrowth of connective tissue, which can lead to a violation of the architectonics of the lungs and reduce their functionality up to a fatal outcome. At the same time, the mechanisms underlying fibrogenesis are currently insufficiently studied. In this regard, the task of studying them does not lose its relevance, and its solution requires the development of models of lung fibrosis that can reflect all the key processes of fibrogenesis.

The *in vivo* model using animals has multiple undeniable advantages, but at the same time it has strict ethical limitations and does not reflect all the mechanisms of lung fibrosis inherent in the human body. At the same time, *in vitro* research, scientists can afford to use biomaterials not only of animals, but also of humans, and build cellular systems based on them — from 2D to 3D models. Modeling of pulmonary fibrosis is mainly based on the use of the main types of cells involved in the development of pulmonary fibrosis, such as myofibroblasts, fibroblasts, alveolocytes and others. Some models are also based on a specific fibrosis-associated extracellular matrix and further study of the interaction of cells with each other and with the matrix.

It should be borne in mind that different models display individual nuances of the native processes of lung fibrogenesis, which requires the research community to use a wide range of models. Taking into account the multifactorial pathogenesis of pulmonary fibrosis, it is important to understand the totality of the processes taking place in order to obtain the completeness of the real picture, close to the picture *in vivo*, and therefore the multicomponence of models is important. This review focuses on the analysis of various models of lung fibrosis *in vitro* in two-dimensional and three-dimensional systems, shows approaches to their creation, key differences, main advantages and disadvantages of models, both particular and general.

Keywords: pulmonary fibrosis, fibrosis models, myofibroblasts, TGF- β , spheroids, organoids, profibrotic matrix

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Tolstoluzhinskaya A.E., Basalova N.A., Efimenko A.Y. Modern approaches to the creation of 2D and 3D cellular models for the study of lung fibrosis. *Tissue and organ regeneration*. 2023;1(2):7–32. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-7-32>

Received 02.11.2023

Revised 22.11.2023

Accepted 11.12.2023

Список сокращений:

БСА — бычий сывороточный альбумин

ВКМ — внеклеточный матрикс

ИПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

ИФЛ — идиопатический фиброз легких

ММР — металлопротеиназа

МСК — мезенхимные стромальные клетки

ПКЛ — переживающие культуры легких

ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход

ЭндМП — эндотелиально-мезенхимальный переход

CFTR — cystic fibrosis transmembrane regulator, трансмембранный регулятор муковисцидоза

FGF — fibroblast growth factor, фактор роста фибробластов

FLIP 3D printer — Fluid-supported Liquid Interface Polymerization (FLIP) 3D printer, 3D-принтер с полимеризацией поверхности раздела фаз жидкости

FLOAT — fast hydrogel stereolithography printing, быстрая гидрогелевая стереолитографическая печать

FN1 — fibronectin 1, фибронектин 1

PDGF — platelet-derived growth factor, фактор роста тромбоцитов

TGF- β — transforming growth factor- β , трансформирующий фактор роста бета α -актин — α -гладкомышечный актин (α -smooth muscle actin, α -SMA)**Фиброз легких**

Во время физиологических процессов ранозаживления, в том числе поврежденного легкого, целостность ткани может быть восстановлена не только путем возвращения структуры ткани к исходной, но и путем формирования устойчивого рубца и переходом в фибротическое состояние ткани. Фиброз развивается как следствие воспалительных реакций, возникающих, например, при тяжелых механических повреждениях, аллергиях, инфекционных заболеваниях, в частности при поражении организма вирусными агентами, такими как SARS-CoV-2, или при ингаляционных воздействиях факторов внешней среды, включая курение или частое вдыхание пыли [1–4]. Клеточное старение (сенесценция) и накопление мутаций в некоторых генах являются факторами, повышающими риск возникновения фиброза [5–8].

При этом следует отметить, что среди нозологий человека нет заболевания, которое бы носило название «фиброз легких». Однако существует ряд заболеваний, последствием которых является развитие воспаления, поражение альвеол и, как следствие, разрастание соедини-

тельной ткани в легких (рис. 1). К таким заболеваниям относят интерстициальные болезни легких, включая идиопатический фиброз легких (ИФЛ), идиопатическую неспецифическую интерстициальную пневмонию, экзогенные аллергические и токсические альвеолиты, синдром фиброзирующего альвеолита при диффузных болезнях соединительной ткани и другие заболевания, число которых сегодня по некоторым данным уже более 200 [9]. Несмотря на то что степень тяжести и скорость развития легочного фиброза при этих заболеваниях могут быть различны, значительное количество данных указывает на сходные патофизиологические механизмы, лежащие в основе развития легочного фиброза.

Клеточным организатором процессов ремоделирования ткани при фиброзе является *миофибробласт*, который секретирует большое количество компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) и способствует его механическому сокращению путем контракции (рис. 1А) [10–12]. Факторы, выделяющиеся клетками в процессе воспаления, приводят к тому, что клетки-предшественники, в первую очередь тканеспеци-

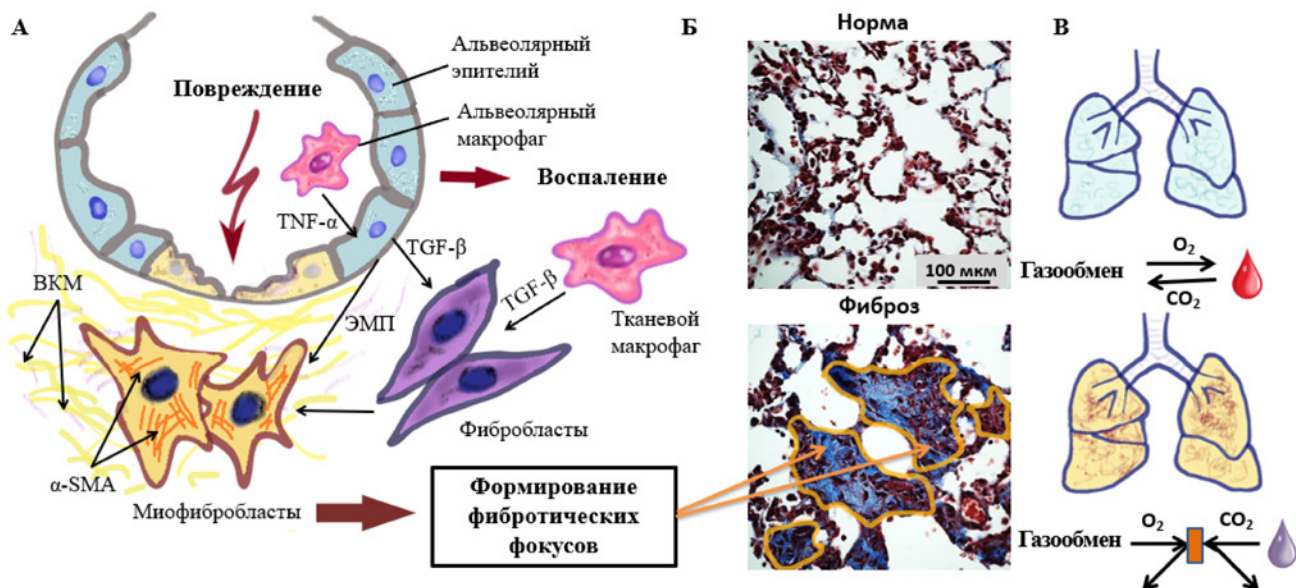


Рис. 1. Развитие фиброза легких сопровождается снижением дыхательной функции и может приводить к полной дисфункции органа и, как следствие, гибели организма: **А** — молекулярно-клеточный уровень, схема. Фиброз легких начинается с повреждения эпителия, которое провоцирует возникновение воспалительных процессов. Макрофаги, альвеолярные и тканевые, принимают непосредственное участие в запуске развития фиброза путем секреции цитокинов. TGF- β — основной профибротический фактор, приводит к дифференцировке фибробластов интерстиция легких в миофибробласты. TNF- α совместно с TGF- β способен индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) альвеолоцитов, что может приводить их также к дифференцировке в миофибробласты. Миофибробласты отличаются наличием стресс-фибрилл, состоящих из α -SMA и способствующих сокращению внеклеточного матрикса (ВКМ), а также синтезу специфических молекул ВКМ: коллагена I, III типов, EDA-фибронектина, гиалуронана и других. Это приводит к возникновению тканевых единиц фиброза — фибротических фокусов; **Б** — тканевый уровень, гистологические срезы ткани легких мышей (трихром по Массону) в норме (верх) и при индукции фиброза интратрахеальным введением блеомицина (низ). Оранжевым цветом выделены фибротические фокусы; **В** — органнй уровень, схема. В норме проявляется функция легких — осуществление газообмена. При развитии фиброза утолщенная за счет избыточного количества фибротической ткани альвеолярная стенка препятствует нормальному газообмену, что может приводить к гипоксии

фичные фибробласты, массово подвергаются дифференцировке в миофибробласты [13]. При нормально протекающей регенерации ткани многие миофибробласты подвергаются апоптозу и элиминируются на терминальных стадиях процесса [14]. В случае тяжелых или хронических повреждений выражены воспалительные процессы, которые приводят к постоянному росту числа миофибробластов, приобретающих устойчивость к апоптозу и способных к самоподдержанию своей популяции. Эти клетки приводят к разрастанию соединительной ткани, замещающей функциональную ткань органа [15, 16], и формируют *фибротические фокусы*, представляющие собой зону неправильно уложенных фиброз-ассоциированных белков матрикса (рис. 1Б) [10, 17]. В итоге альвеолярные перегородки постепенно утолщаются, вместе с чем усложняется процесс газообмена и утрачивается исходная архитектура легких [18]. Про-

цесс фиброгенеза при приобретении прогрессирующего характера может привести к полному отказу работы органа и к летальному исходу, например в связи с дыхательной недостаточностью, ишемической болезнью легких, возникновением опухолевых образований [1, 3].

Основную движущую роль в запуске фиброза ткани и дифференцировки фибробластов в миофибробласты выполняет *трансформирующий фактор роста бета* (transforming growth factor- β , TGF- β), который синтезируется иммунными клетками и самими миофибробластами [11, 19]. Таргетные гены TGF- β -сигнального пути — это ACTA2, кодирующий α -гладкомышечный актин (α -smooth muscle actin, α SMA, или α -актин), COL1A1 и COL3A1, кодирующие, соответственно, коллаген I и коллаген III типов, TGF- β R, кодирующий рецептор к TGF- β , фибронектин (FN1), продукт гена которого при фиброзе преобразуется

в сплайс-вариант EDA-фибронектин, способный стимулировать ранние этапы дифференцировки миофиibroбластов [20, 21].

Популяция миофиibroбластов при фибротических заболеваниях довольно гетерогенна [22], но все они характеризуются синтезом α -актина, формирующего в клетках стресс-фибриллы, способствующих сокращению ВКМ, способностью к синтезу ВКМ с высоким показателем модуля упругости и состоящего из EDA-фибронектина, фибрина, коллагенов I, III, VI типов, гиалуронана, а также образованием комплексов фокальных контактов, называемых фибронексусами [10, 23–26]. Предшественниками миофиibroбластов могут быть различные клетки: весомая часть из них представляет собой резидентные или мигрировавшие под влиянием промигранторных воспалительных факторов в данную область ткани фибробласты, а также циркулирующие в крови фиброциты, перicyты, мезенхимные стромальные клетки (МСК) и иные клетки [13]. Известно, что в эпителиальных клетках запускаются механизмы, приводящие к потере своего исходного фенотипа и запускающие дифференцировку клеток в мезенхимный тип. Происходит эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), в результате чего в ткани, пораженной фиброзом, возникает большое число клеток, по многим признакам схожих с миофиibroбластами [22, 27–29]. Некоторые данные свидетельствуют о возникновении миофиibroбластов из клеток эндотелия через эндотелиально-мезенхимальный переход (ЭндоМП) [8, 30, 31], хотя вклад этого процесса в пополнение пула миофиibroбластов еще полностью не подтвержден.

Таким образом, фиброз легких является острой проблемой современного общества, так как он возникает вследствие множества причин, ведет за собой сбой в регуляции внутренних процессов организма и способен привести к гибели. По этой причине исследование механизмов, лежащих в основе его патогенеза, и поиск способов восстановления легочной ткани до состояния, обеспечивающего полноценную дыхательную функцию, является очень актуальным. Для решения этих задач должны быть использованы релевантные модели, позволяющие отражать ключевые процессы, заложенные в фиброгенезе. На данный момент разработан ряд моделей фиброза легких, имеющих как свои неоспоримые преимущества, так и некоторые недостатки, обзор которых представлен ниже.

Модели фиброза

Клеточная дифференцировка при фиброзе тканей и органов активно изучается учеными, но по-прежнему многие молекулярно-клеточные механизмы этого процесса остаются невыясненными. В настоящее время процессы фиброгенеза в легких изучают преимущественно на животных и клеточных моделях, представленных в виде культивируемых в виде монослоя клеток, то есть в 2D-культуре [6, 7, 32, 33]. Это далеко не единственные модели, которыми пользуются исследователи фибротических процессов. В связи с острой актуальностью изучения патогенеза фиброза последнее время исследователи разрабатывают новые варианты моделей разных мерностей (от 2D до 3D), что дает больше возможностей для изучения различных механизмов, лежащих в основе данного процесса.

Экспериментальные модели на животных

Модели на животных являются основными для исследования физиологических механизмов, происходящих в организме при развитии фиброза легких. Хотя хронические заболевания человека трудно поддаются моделированию, животная модель передает основные физиологические этапы прогрессирования фиброза, позволяет наблюдать за процессом дифференцировки разных типов клеток в естественных для них биологических условиях, а также позволяет изучать про- или антифибротический эффект тех или иных факторов [31, 34, 35].

Среди широко используемых моделей можно выделить следующие:

- модель силикоза (асбестоза) [36–38];
- модель радиационного облучения легких [25, 39];
- блеомицин-индуцированный фиброз [40, 41];
- флюоресцеин-изотиоционат-индуцированный фиброз [42, 43].

Каждая из описанных выше моделей имеет свои преимущества и недостатки. Однако к наиболее хорошо описанным и часто применяемым моделям, соответствующим патогенезу широкого спектра фибротических заболеваний легких человека, включая идиопатический фиброз легких, можно отнести модель фиброза легких, индуцированного блеомицином.

Блеомицин — это гликопептидный антибиотик, который первоначально был выделен из бактерии *Streptomyces verticillatus* [44]. Начало

его использования в качестве агента, вызывающего фиброз легких, было основано на том факте, что развитие фиброза было одним из основных побочных эффектов применения блеомицина при лечении опухолей различного генеза у человека. Считается, что в результате воздействия блеомицина образуются хелаты ионов металлов, которые взаимодействуют с кислородом [45]. Возникают свободные радикалы, приводящие к разрывам одно- и двухцепочечной ДНК в клетках и тем самым стимулирующие программируемую клеточную гибель. Повреждения ткани в результате действия активных форм кислорода могут привести к воспалительной реакции, вызывающей легочную токсичность, активацию фибробластов и последующий фиброз [46]. Показано, что основные гистологические признаки, такие как формирование фибротических фокусов, подплевральное поражение ткани легкого, облитерация респираторного отдела легких, увеличение количества альвеолярных макрофагов, у животных, получавших блеомицин, аналогичны изменениям у пациентов с диагностированным фиброзом легких [47]. Кроме того, блеомициновая модель довольно легко выполнима в лабораторных условиях и хорошо воспроизводима [34].

В настоящее время не существует модели животных, которая могла бы полностью воспроизвести все особенности фиброза легких человека, а особенно прогрессирующий и необратимый характер такого состояния [3, 48]. Многочисленные исследования показывают, что прекращение или удаление индуцирующего фиброз агента может привести к спонтанному разрешению фиброза и возвращению ткани легкого к нормальному физиологическому состоянию с минимальными проявлениями признаков фиброза [15, 49]. К тому же стоит учесть, что интерпретация результатов осложняется тем фактом, что некоторые животные, как, например, мыши, обладают некоторыми отличиями в анатомии дыхательных путей, клеточном составе легочной ткани и иммунитете по сравнению с человеком [50]. Помимо прочего, этические соображения стимулируют замену экспериментальных моделей на животных в соответствии с концепцией 3R Рассела и Берча (reduction, refinement, replacement) [51]. Поэтому в данной статье мы сфокусируемся на моделях фиброза легких *in vitro* и подробнее рассмотрим 2D- и 3D-клеточные модели.

Ex vivo: переживающие культуры легких

Одним из перспективных направлений в моделировании фиброза легких *ex vivo* является использование переживающих культур легких (ПКЛ). Для получения ПКЛ используют легочную ткань человека или животных, заполняют данный фрагмент агарозой с низкой температурой плавления, после чего получают срезы толщиной 250–1000 мкм [52] и культивируют их *in vitro*. При таком подходе ПКЛ сохраняют исходную нативную структуру легкого: его состав и биомеханические свойства ВКМ, резидентные клетки данного участка ткани легкого, что и делает их актуальной моделью для изучения легочного фиброза и тестирования лекарств в условиях пораженной ткани.

Для изучения фибротической ткани легкого используются ткани доноров с диагностированным фиброзом легких [53] или животных с индуцированным фиброзом легких [54].

С целью исследования динамики развития фиброза с помощью ПКЛ Alsafadi с коллегами предложили использовать ПКЛ из материала, полученного от пациентов со здоровыми легкими, а затем индуцировать раннюю стадию развития патологии путем добавления профибротических факторов, включая TGF- β и TNF- α (Tumor necrosis factor α , фактор некроза опухоли). Такая стратегия приводила к увеличению экспрессии фиброз-ассоциированных генов и к отложению профибротических белков ВКМ [55].

Преимущество такой *ex vivo* модели заключается в том, что ПКЛ позволяют снизить число животных для моделирования фиброза, а также использовать легкие одного животного или пациента для получения нескольких объектов для исследований с максимально похожими свойствами. Кроме того, использование ПКЛ дает возможность работы с нативным человеческим материалом [56]. Основные лимитирующие факторы такого подхода — это необходимость в свежеполученных тканях и короткий период культивирования такой системы *in vitro* — не более 1 недели [55].

Модели in vitro

Модели *in vitro* являются хорошей альтернативой моделям *in vivo*, поскольку они позволяют в различных системах, от 2D до 3D, использовать животные и человеческие клетки

для моделирования фиброза легких и изучать их различные свойства, включая пролиферативные, миграционные, адгезивные свойства или контрактильную способность, в том числе в динамике. Использование человеческих клеток обеспечивает воспроизведение ключевых механизмов, которые заложены в дифференцировке клеток при фиброгенезе именно человеческого организма и которые сложно воспроизвести на животных моделях [57]. Для моделирования процессов фиброза *in vitro* используют различные клетки легких, участвующие в развитии фиброза, например такие, как мезенхимные, эпителиальные, эндотелиальные и иммунные клетки. Наиболее распространенным типом клеток для моделей *in vitro* являются легочные фибробласты [57, 58]. Это связано с тем, что основным типом клеток, претерпевающих дифференцировку в миофибробласты, являются резидентные фибробласты, а также из-за относительной простоты их методов выделения и культивирования [22].

Стоит отметить, что фибробласты очень зависят от адгезивных взаимодействий с микроокружением, что, в свою очередь, регулирует клеточное поведение, включая дифференцировку, пролиферацию, апоптоз и миграцию. В связи с этим на фибробласты в особенной мере влияет мерность среды, в которой они находятся в культуре *in vitro* (рис. 2) [59].

Модели *in vitro* мерности 2,5D и выше также позволяют изучать влияние ВКМ, включая целые белки или функциональные домены белков [60,

61], и изменения в модуле упругости матрикса на фенотип (мио)фибробластов [60]. К тому же появляется возможность изучать влияние на клеточную дифференцировку и активность связанных с матриксом факторов, например TGF- β , FGF (fibroblast growth factor, фактор роста фибробластов) и других [59, 62].

2D-модель фиброза

Многие механизмы, заложенные в дифференцировке клеток при фиброзе, были установлены с помощью изучения двумерных культур, которые представляют собой монослой клеток на культуральном пластике. Такие модели достаточно просты в исполнении и позволяют делать множество повторов эксперимента [57].

Один из вариантов получения модели фиброза предполагает выделение фибробластов из легких и помещение их на пластиковую культуральную посуду, жесткая поверхность которой может активировать клетки и приводить к образованию стресс-фибрилл и фокальных контактов [12, 26]. Несмотря на доказанное влияние поверхности жесткого пластика на дифференцировку стромальных клеток в миофибробласты, далеко не все клетки культуры подвергаются данной дифференцировке без дополнительных профибротических стимулов.

Чтобы исследовать механизмы активации и дифференцировки миофибробластов, 2D-культуры часто подвергаются воздействию профибротических цитокинов, например TGF- β , после

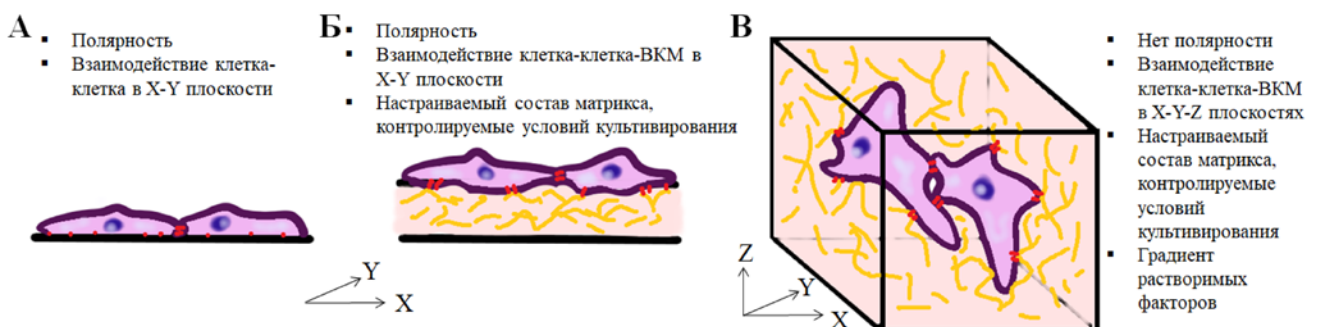


Рис. 2. Свойства клеток, например фибробластов, могут существенно отличаться в среде разной мерности: **А** – 2D-модели, представляющие собой клетки легких на культуральном пластике; **Б** – 2,5D-модели – слой внеклеточного матрикса (ВКМ) или гидрогеля с клетками на поверхности; **В** – 3D-модели, клетки в трехмерных условиях среды. Данные различия возникают в связи с разными свойствами условий культивирования, в первую очередь со свойствами и структурой ВКМ, а также влиянием различных сигналов, с которыми сталкивается клетка, в том числе адгезивными, топографическими, механическими, градиентными свойствами систем

короткого периода депривации для усиления профиброзного эффекта [11, 20, 21]. Важную роль в запуске дифференцировки клеток играет не только фактор роста TGF- β , но и иные факторы, к примеру TNF- α , который выделяется нейтрофилами и способствует ремоделированию цитоскелета клеток и изменению их механических свойств [40, 63].

Стоит отдельно отметить возможность использования культур клеток, выделенных непосредственно из биоптатов тканей пациентов или животных с фиброзом легких. Популяция выделяемых стромальных клеток уже является в значительной степени гетерогенной и содержит в себе эффекторные клетки фиброза, ответственные за его прогрессию, в частности фибробласты и миофибробласты, что дает возможность не использовать дополнительную стимуляцию для изучения различных клеточных типов [64].

В 2D-моделях также активно изучается влияние процесса старения (сенесценции) на развитие фиброза [7, 65, 66], поскольку сенесценция считается одним из важных факторов фиброза [6]. Культуры клеток подвергают радиационному облучению для индукции преждевременного старения или пассируют до стареющего фенотипа (остановка клеточного цикла, повышение экспрессии генов CDKN1A, CDKN2A, IL6 и IL8 и появление экспрессии основного маркера старения β -галактозидазы [66, 67]) с целью изучения участия сенесцентных клеток в фиброзе легкого *in vitro*. Так, было показано, что фибробласты, полученные от донора с фиброзом легких, в культуре стареют быстрее, чем фибробласты, выделенные из нормальной ткани [7], возможно, из-за большей восприимчивости к фактору TGF- β [68].

Недостатки модели

Несмотря на то что клеточная 2D-модель *in vitro* может воспроизводить основные процессы, заложенные при фиброзе, например дифференцировку клеток в миофибробласты, клетки в двумерной среде лишены типичных условий, характерных для тканей. Так, 2D-культура фибробластов приобретает некоторую полярность, которая присуща преимущественно эпителиальным клеткам, что может приводить к изменению нативных механизмов, с помощью которых опосредуется активация фибробластов с последующей их дифференцировкой. Например, было показано, что *in vitro* все три изоформы TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) стимулируют

экспрессию α -гладкомышечного актина [69, 70]. Данные сведения отличаются от результатов, полученных *in vivo*: эти изоформы играют различные роли, что в тканях животных может обуславливаться различным микроокружением клеток [71]. К тому же в трехмерном микроокружении возникает дополнительное влияние ВКМ, изменяется механика и плотность системы [59].

2,5D-модели фиброза легких

Среди *in vitro* моделей ряд ученых [33, 183–185] также выделяют промежуточную мерность — 2,5D-модели фиброза. Такие системы отличаются от 2D-культур тем, что в них клетки контактируют не напрямую с поверхностью культуральной посуды, а адгезируют к сложной высокомолекулярной поверхности, обладающей собственными специфическими физико-химическими свойствами. К 2,5D-моделям можно отнести культивирование фиброз-ассоциированных клеток на слое гидрогеля или ВКМ или сэндвич-систему, представляющую собой слой клеток между двумя слоями гидрогелей. Данные подложки позволяют создавать специфический, более нативный субстрат для клеточной адгезии, однако клетки в культуре по-прежнему сохраняют контакт со средой культивирования.

Модели на основе гидрогелей представляют собой насыщенные молекулами воды природные, то есть на основе ВКМ [72], или синтетические полимеры, на поверхности которых культивируются активированные фибробласты, миофибробласты и другие клетки легких [72, 73]. Децеллюляризованный ВКМ легких может быть представлен в виде гидрогеля после расщепления ВКМ пепсином в кислой среде. В то же время такая процедура расщепления ВКМ приводит к потере исходного показателя модуля упругости матрикса в ткани и его структуры, и для восстановления данных параметров гидрогель-ВКМ необходимо смешивать с синтетическими полимерами [74]. Более щадящий многоступенчатый способ обработки ВКМ позволяет сохранить нативные биомеханические свойства ВКМ, в том числе фиброзной ткани: лиофилизация децеллюляризированной ткани, измельчение ее в порошок с последующей солубилизацией и желированием [75].

Наиболее популярными вариантами в такой системе, а также в 3D-системе подобного рода (см. главу «3D-модели») являются синтетические

гидрогели на основе полиакриламида из-за легко изменяемого параметра упругости, который можно настроить, регулируя относительные концентрации акриламида и бисакриламида [76]. Гидрогели, изготовленные из смеси полиакриламида и коллагена I типа наиболее изучены как система 2,5D- и 3D-культивирования для моделирования легочного фиброза, поскольку коллаген I типа является преобладающим типом коллагена в ВКМ, обнаруживаемом в фибротических фокусах [77]. Так, в полиакриламидных гелях, богатых коллагеном I типа, исследовано влияние показателя модуля упругости субстрата различной величины и влияние фактора TGF- β на дифференцировку фибробластов и их способность к миграции. По мере увеличения жесткости гидрогеля, то есть увеличения модуля упругости, и под влиянием TGF- β увеличивалось число дифференцированных миофибробластов с повышением экспрессии α -гладкомышечного актина и с образованием стресс-фибрилл [76, 78], а также способность клеток к миграции с соответствующим повышением экспрессии фактора PDGF [79]. Аналогичным образом активируется сигнальный путь FAK/Akt [80], который способствует отложению коллагена I типа и ингибированию матриксной металлопротеиназы MMP-1, и транскрипционный комплекс c-Fos и c-Jun, приводящий к увеличению синтеза α 6-интегрина, опосредующего инвазию миофибробластов и дальнейшее развитие фиброза легких [81].

Сэндвич-система культивирования представляет собой два слоя гидрогеля с разными значениями модуля упругости и расположенными между ними фибробластами/миофибробластами. Так, например, гидрогели в сэндвич-системе могут представлять собой полиакриламиды с различными модулями упругости с добавлением различных необходимых для роста клеток веществ (БСА, факторов роста и др.) и белков ВКМ. Такая система обеспечивает клеткам возможность адгезировать к обоим слоям гидрогелей, что исключает возникновение неспецифичной полярности [82].

Как уже говорилось выше, системы 2,5D обеспечивают более естественные условия для культивирования эффекторных клеток фиброза, так как поверхность пластиковой культуральной посуды покрывается компонентами, характерными для ткани здорового или фибротического легкого. Возникают более тесные взаимодействия меж-

ду клетками и ВКМ по сравнению с системами 2D. Однако в некоторых вариантах 2,5D-моделей остается возможность для возникновения полярности клеток и отсутствует градиент растворимости различных факторов, что имеет место *in vivo*. Из всех вышеперечисленных моделей только сэндвич-система позволяет создать условия для снижения возникновения полярности, но сами клетки, как и в остальных 2,5D-системах, не имеют возможности взаимодействовать друг с другом во всех плоскостях [60].

3D-модели фиброза легких

Трехмерные модели *in vitro* лучше всего воспроизводят микроокружение ткани легкого *in vivo* по сравнению с 2D- и 2,5D-моделями благодаря объемной структуре системы. Подобно моделям 2,5D здесь также могут имитироваться жесткость, то есть модуль упругости, и структура нативного матрикса и воспроизводиться соответствующие взаимодействия клеток с ВКМ. Помимо этого возникает вариативность клеток во взаимодействии друг с другом в связи с возникновением клеточной 3D-системы контактов. Кроме того, клетки, культивируемые в 3D-моделях, подвергаются воздействию градиентов растворимых факторов роста, аналогично условиям *in vivo* [59, 62].

Децеллюляризованные матриксы

Для большего приближения микроокружения культивируемых *in vitro* клеток к фибротическим условиям легких *in vivo* используют децеллюляризованную ткань легкого [26, 83, 84]. На данный момент существует множество детергентов для удаления клеточных компонентов, таких как Triton X-100 [75, 85–87], SDS (Sodium Dodecyl Sulfat, например 1% водный раствор) [88], бензоназная эндонуклеаза [89], дезоксихолат натрия [90, 91]. Одним из наиболее перспективных считается цвиттерионный детергент (3-((3-холомидопропил) диметиламмоний)-1-пропансульфонат, CHAPS), который обеспечивает минимальную потерю белков ВКМ, таких как эластин, коллаген и ламинины [92–94]. Чтобы удалить иммуногенную для других клеток остаточную ДНК в матриксе, фрагмент ткани инкубируют, например, в NaCl [75] и/или в растворе с ДНКазой [86]. Для стерилизации образцов используется слабый раствор надуксусной кислоты [93, 95] с этанолом или антибиотик [89].

Такая децеллюляризованная фибротическая легочная ткань человека позволяет исследовать

профибротические фенотипы фибробластов, активация которых вызвана патологически модифицированным ВКМ [96], или изучать влияние фибротического ВКМ легкого на активность и транскриптом культивируемых в нем первичных клеток легких [85].

Недостатком такой 3D-модели может являться то, что различные методы децеллюляризации и продолжительность воздействия реагентов протокола могут влиять на исходный состав матрикса, приводить к потере белков ВКМ и вымывать факторы роста, связанные с матриксом, например TGF- β , что делает сравнение и интерпретацию полученных результатов затруднительными.

Гидрогели 3D

Еще один вариант создания модели фиброза легких *in vitro* — это использование гидрогелей для воссоздания 3D-среды культивирования эффекторных клеток фиброза. Для моделирования фиброзных заболеваний используют гидрогели, аналогичные по составу тем, что используются в 2,5D-системах. Отличие гидрогелевых 3D-моделей от 2,5D заключается в том, что структура геля позволяет клеткам находиться не на поверхности геля, а в его толще [97, 98]. Это делает возможным контакт клеток между собой и со средой со всеми ее составляющими во всех плоскостях, что в итоге приводит к образованию сети из клеток [99]. Такую модель удобно использовать в том числе для оценки активации клеток через степень сжатия ими гидрогеля [98]: дифференцировка клеток в миофибробласты приводит к реорганизации цитоскелета и к возникновению контрактирующих сил, действующих на гидрогель и сжимающих его [60, 78].

Было проведено исследование влияния TGF- β на дифференцировку миофибробластов, в котором использовалась 3D-модель на основе гидрогеля из ВКМ с добавлением сшитого полиэтиленгликоля диакрилата, модифицированного желатиной (5%) и синтетической гиалуроновой кислоты. Такая модель сравнивалась с аналогичной моделью, но в 2,5D-системе, а также в 2D-культуре фибробластов. После обработки TGF- β (от 0,1 до 20 нг/мл) выяснилась, во-первых, что оптимальная концентрация TGF- β для дифференцировки клеток в миофибробласты составляет 5–10 нг/мл во всех моделях, а во-вторых, что в 3D-системе в отличие от 2,5D

значительно снижается экспрессия α -актина в присутствии гиалуроновой кислоты, а также снижается экспрессия коллагена I, III и фибронектина, но повышается активность металлопротеиназ 1-го и 2-го типа [72].

В 3D-системе коллагенового гидрогеля было показано, что фибронектин имеет важное значение для кластеризации клеток, которая происходит как во время гомеостаза, так и при фиброзе с образованием фибротических фокусов. На данной модели было показано, что это динамичный процесс, который зависит от баланса между сокращающимися ВКМ (мио)фибробластами и мигрирующими от сайта уплотнения фибробластами [100]. Оказалось, что для разрушения кластера клеток и деградации фибронектинового матрикса, характерного для фиброза, нужна в первую очередь MMP-2, а также промиграционные стимулы, например PDGF или сыворотка, которые позволяют клеткам мигрировать из фокуса [101].

С использованием 3D гидрогелевой системы был имитирован *in vitro* фиброз, вызываемый диоксидом кремния (SiO_2). В коллагеновом гидрогеле культивировали первичные фибробласты легких человека, на которые воздействовали молекулами SiO_2 . При этом, как наблюдалось в исследованиях, SiO_2 способствует увеличению миграции фибробластов через действие хемотаксического белка-1 моноцитов хемокина/цитокина MCP-1, который регулирует воспалительные процессы и имеет решающее значение в запуске фиброза [102, 103].

Помимо прочего, гидрогели, совместимые с 3D-культивированием клеток, являются основой для получения моделей легкого и легочного фиброза путем биопринтинга (см. главу «3D-биопечать»). Гидрогели природного или синтетического состава могут быть использованы как среда, в которую помещаются клетки при печати тканевой структуры, то есть так называемые биочернила [32, 104].

Одним из существенных ограничений использования гидрогелей в моделировании 3D является сложность длительного культивирования клеток из-за контракции и деградации гидрогеля в процессе культивирования. Природные гидрогели на основе ВКМ механически сложно настраиваемы из-за предварительной подготовки матрикса, что требует добавления

синтетических компонентов. Поэтому некоторые исследователи считают, что гидрогели не являются подходящими моделями *in vitro* для изучения клеточных взаимодействий [105]. Также, несмотря на возможное близкое сходство по клеточному и матричному составу, 3D-система на основе гидрогеля не может полностью имитировать фибротические условия ткани *in vivo*.

Клеточные сфероиды

Сфероиды легких представляют собой клетки легких взрослого организма, культивируемые в виде самособираемых сфероидальных агрегатов с использованием низкоадгезивных поверхностей [106, 107]. Кластеризации клеток в сфероиды способствуют в первую очередь адгезионные взаимодействия между клетками, а также взаимодействие фрагментов ВКМ, конкретнее фибронектина и его клеточного рецептора — интегрина $\alpha 5 \beta 1$ [108]. Кроме того, экзогенный фибронектин может способствовать уплотнению клеточных сфероидов, а его вклад в модуль упругости матрикса может приводить к дифференцировке клеток в миофибробласты [85, 109].

В настоящее время сфероиды как подходящий альтернативный вариант для исследования дифференцировки клеток и иных механизмов фиброгенеза используют в моделировании фибротических тканей легких или взаимодействия отдельных клеточных культур, отражающих основные механизмы фиброза [106]. Модель фиброза легких на основе сфероидов может представлять собой агрегаты из фибробластов или миофибробластов легких человека, что позволяет исследовать поведение клеток и их дифференцировку в 3D-мерности, аналогичной *in vivo*. Для получения сфероидов используют метод «висячей капли» или посуду с низкоадгезивным покрытием. В первом методе капли суспензии клеток располагают на крышку 96-луночного планшета или используют коммерческие системы культивирования висячих капель [110–113]. Второй метод получения сфероидов предполагает использование субстратов с низкоадгезивными, мягкими свойствами, например коллагеновый матрикс [100, 114–116], агарозу [107, 108, 117] или коммерческую посуду [109, 118, 119]. Например, используя колбы с низкоадгезивным покрытием, Cores с коллегами получали мультিকлеточные сфероиды, включающие в себя альвеолоциты II типа,

клетки эндотелия, различные стромальные клетки и другие [109]. Также существует способ использования супергидрофобных поверхностей, на которых формируется замкнутая капля, не контактирующая с данной не смачиваемой поверхностью, чтобы избежать воздействий, исходящих от контакта с ней [120–122].

При этом отмечено, что при сборке сфероидов из миофибробластов человека происходит их дедифференцировка, то есть потеря характерных для них черт, включая снижение уровня α -актина и виментина, а также низкое число пролифераций [10, 123]. По нашим предварительным данным было также показано, что миофибробласты сложнее самоорганизуются в сфероиды, в связи с чем получение сфероидов из них проблематичнее, чем, например, из фибробластов. Другой группой ученых, Granato с коллегами, было выявлено, что при сборке сфероидов из миофибробластов снижается уровень α -гладкомышечного актина и полностью исчезает экспрессия маркера пролиферации Ki-67 после 72 часов культивирования. Вероятно, миофибробласты при агрегировании в сфероид переходят во временное состояние покоя, хотя со временем такие клетки снова приобретают способность пролиферировать и могут приобрести морфологию миофибробластов под влиянием профибротических факторов [110]. В то же время в другой работе было показано, что при сборке сфероидов на низкоадгезивном коллагеновом матриксе из фибробластов человека также снижается их пролиферация, но происходит повышение экспрессии фибронектина, FGF, PDGF-A и TGF- β , характерных маркеров фиброза [114].

Интересным фактом является то, что в 2D-культуре возможна спонтанная сборка сфероидов из фибробластов легких под длительным воздействием TGF- β (10 нг/мл) [57]. Это является следствием накопления ВКМ, индуцированного TGF- β , что имитирует нарушение нормальной архитектуры ткани при фиброзе и напоминает формирующиеся *in vivo* фибротические фокусы, в том числе и по белковому составу матрикса.

Тап и его коллеги получили более сложные по клеточному составу сфероиды, объединив первичные эпителиальные клетки бронхов, фибробласты легких и микрососудистые эндотелиальные клетки легких взрослого человека для получения 3D-моделей дыхательных путей,

схожих по итоговому строению с органоидами [124]. Случайно посеянные смешанные клеточные популяции подверглись быстрой конденсации с последующей самоорганизацией в отдельные эпителиальные и эндотелиальные структуры, которые были стабильны и механически прочны до четырех недель культивирования. Такие сфероиды имитировали строение дыхательных путей *in vitro*, а добавление профибротического фактора TGF- β приводило к повышению экспрессии мезенхимных генов, вовлеченных в фиброз, причем как в фибробластах, так и в эпителиальных клетках модели [124].

Интересно, что существуют исследования, в которых использовались сфероиды клеток легких и МСК не как модели, а как терапевтические агенты для восстановления ткани легкого после воздействия на мышей блеомицином. Такие сфероиды вводились через хвостовую вену. Результаты показали, что введение сфероидов значительно ингибировало развитие блеомицин-индуцированного фиброза. При этом в некоторых работах отмечается непосредственная инфильтрация фибробластов и МСК в ткани, а в некоторых подчеркивается вклад их паракринной активности в процессе регенерации легочной ткани [109, 118, 125, 126].

Органоиды

Органоиды легких представляют собой самособирающиеся структуры из стволовых клеток (индуцированных стволовых клеток человека (ИПСК), эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), стволовых клеток легких [95]), которые в условиях *in vitro* следуют последовательным этапам дифференцировки, в чем-то аналогичным процессу формирования легких в эмбриогенезе, что приближает их к нативному взаимодействию клеток в органе [127–129]. Органоиды преимущественно получают на низкоадгезивной поверхности так же, как и сфероиды [130, 131], а для улучшения выживаемости клеток полученные структуры часто далее культивируют, например в субстрате гидрогеля или матрикеля [124, 132, 133].

Наиболее распространенная классификация органоидов легких основана на типах функциональных клеток, которые входят в их состав. Так, можно выделить органоиды дыхательных путей, содержащие клетки, присущие преимущественно проводящим путям дыхательной системы, альвеолярные органоиды,

состоящие из альвеолоцитов I и II типов, и органоиды «смешанного» состава, включающие различные типы клеток, характерные для разных отделов легких [133]. При этом клетки в органоидах выстраиваются в соответствующие слои, схожие с гистологией тканей *in vivo*, образуя при этом полости «альвеол» или ходы «дыхательных путей».

Как было сказано выше, органоиды легких получают путем направленной дифференцировки стволовых клеток, чаще всего из ИПСК. Учитывая, что в эмбриогенезе легкое происходит из клеток передней кишки, на первом этапе получения органоидов индуцируют дифференцировку ИПСК в составе 3D-сфероидов в энтодерму путем добавления характерных для данного этапа факторов (например, активина А, участников Wnt-пути при одновременном ингибировании путей BMP/TGF- β) [95, 134, 135]. Далее в систему включаются факторы, необходимые для дальнейшей дифференцировки сфероида по типу легких, приводящих к образованию альвеол или/и ветвлению аналогов дыхательных путей [95, 131, 136, 137]. В результате образуются органоиды *in vitro*, включающие многие типы клеток дыхательных путей, в том числе базальные и реснитчатые клетки, альвеолоциты и мезенхимные клетки: фибробласты, миофибробласты, которые совместно экспрессируют α -актин и PDGFA, и дифференцированные гладкие мышцы, экспрессирующие α -актин [95, 129, 131, 138, 139].

Существует также вариант формирования органоидов легких через стадию получения мезенхимной популяции клеток из ИПСК. Мезенхимные клетки обеспечивают синтез белков ВКМ и различных растворимых белков, необходимых для микроокружения, специфичного для конкретного типа клеток легких, а их взаимодействие с эпителиальными клетками имеет важное значение для нормального развития органа [140]. Путем дальнейшей направленной дифференцировки клеток в 3D-модели, например через активацию TBX4 или активина А, пути Wnt, FGF10, образуются альвеолярные структуры и эпителиальные клетки, формирующие дыхательные пути в органоидах, через мезенхимно-эпителиальный переход [140, 141].

Одна из целей применения органоидов легких — это моделирование различных заболеваний. Так, например, альвеолярные органоиды

были использованы для изучения характеристик реакций клеток на вирус гриппа А (H1N1) и инфекцию, вызванную коронавирусом (SARS-CoV-2) [140, 142]. Такие альвеолярные органоиды могут быть заражены SARS-CoV-2, вследствие чего клетки в его составе начинают проявлять провоспалительный фенотип, экспрессируя характерные цитокины и хемокины, а также активировать экспрессию генов, связанных с апоптозом, при снижении экспрессии белков сурфактанта [143]. С помощью органоидов возможно моделирование и фиброза легких, хотя на данный момент подобных работ не так много. Например, на органоидах легких было изучено воздействие твердых частиц, которые могут являться компонентами загрязненного воздуха и приводить к фиброзу [142]. Было обнаружено, что воздействие твердых частиц приводит к повышению уровня транскрипции фиброз-ассоциированных генов в органоиде, таких как α -актин, виментин, коллаген I типа и к TGF- β 1-опосредованной активации ЭМП альвеолярного эпителия органоида [142, 144].

Получать органоиды легких для изучения фиброза также позволяет использование культур клеток, несущих определенные мутации. Так, например, из первично полученной культуры фибробластов донора с синдромом Германского — Пудлака, который проявляется, помимо иных симптомов, также фиброзом легких, были получены ИПСК, а затем органоиды легких. Клетки несли мутацию в гене AP3B1, который кодирует субъединицу белка, связанного с адаптером комплекса 3 (AP-3), необходимого для лизосомальной сортировки [145, 146]. Мутация в клетках приводит к накоплению профибротического ВКМ и мезенхимных клеток с соответствующими маркерами: α -гладкомышечным актином, виментином, рецепторами к PDGF [129].

Также существуют работы по получению моделей кистозного фиброза, или муковисцидоза, на основе органоидов легких. Например, использовались ИПСК человека, в которые предварительно была внесена мутация гена CFTR, что является наиболее частой причиной возникновения муковисцидоза среди людей [135]. В работе Sachs и коллег [147] описывается подход к созданию модели дыхательных путей взрослого организма на основе различных клеток из биопсии легкого человека с мутацией в гене CFTR, культивируемых в толще гидроге-

ля из подобия растворимой формы базальной мембраны, содержащего, например, ламинин, коллаген IV, протеогликаны гепарансульфата [148]. Органоиды *in vitro* дыхательных путей при наличии мутации в гене CFTR повторяли основные признаки заболевания и отличались повышенным содержанием ВКМ [147, 149].

Недостатки моделей легких на основе сфероидов и органоидов

Ограничением органоидов, в отличие от сфероидов, является их вариативный размер и форма, что затрудняет получение воспроизводимых результатов и их интерпретацию. Данное явление связано с возможными отклонениями в процессах дифференцировки клеток и формирования ими 3D-структуры, имитирующей структуру легкого. Следует также отметить, что во всех 3D-структурах неизбежно возникает некоторый градиент распределения веществ: доступность кислорода, метаболитов и других растворимых факторов резко различаются от центра до периферии структуры [125]. Такой градиент создает различные условия культивирования для клеток в центре и по периферии. Это может приводить, например, к гибели клеток в центре структуры из-за нехватки питательных веществ, гипоксии, ограниченной возможности для некоторых молекул или комплексов проникать в центр структуры, например внеклеточных везикул. В то же время считается, что наличие градиента веществ может приближать модель к воспроизведению неоднородного градиента в некоторых тканевых доменах *in vivo*, например фибротических фокусах [150].

3D-биопечать

Относительно новой областью тканевой инженерии является 3D-биопечать, представляющая собой процесс послойного точного позиционирования биологического материала, биохимических веществ и живых клеток [151, 152]. Важным условием создания такой конструкции является совместимость материала с клетками и одновременно с процессом печати. В настоящее время обычно такими материалами являются полимеры, полученные из тканей живых организмов (альгинат, желатин, коллаген, гиалуроновая кислота) или синтетические полимеры (полиэтиленгликоль) [153].

Пока данная технология активно развивается в сфере медицины для создания искусственных тканей и органов с целью трансплантологии

или для скрининга лекарств [154, 155]. Для исследовательских целей активно используется, например, модель фиброза печени, полученная путем 3D-биопечати [104, 156, 157], но биопринтинг в настоящее время не так широко распространен для создания моделей болезней легких, включая фиброз.

Недостатком этой модели фиброза *in vitro* является сложность создания структур малого размера: при точечном нанесении проблематично создавать выступающие или полые структуры, что требует применения, например, жестких каркасов [158]. Длительность печати некоторых 3D-биопридеров может снижать качество деталей, приводить к дегидратации, низкому уровню кислорода и температурному шоку, что может снижать жизнеспособность инкапсулированных клеток, которых требуется много для печати. Хотя стоит отметить, что сейчас появляются принтеры нового поколения, позволяющие печатать с увеличенной скоростью — 3D-принтер с полимеризацией поверхности раздела фаз жидкости (FLIP) или быстрая гидрогелевая стереолитографическая печать (FLOAT) [159, 160]. Но запатентованная технология печати и сложные экспериментальные установки делают данные системы практически недоступными для широкого использования исследовательским сообществом [32].

«Фиброз-на-чипе»

Благодаря биоинженерии на основе технологий микрофлюидики были созданы модели «орган-на-чипе» («орган-на-чипе»), в том числе «легкое-на-чипе», включая модель патологии «фиброз-на-чипе» [161]. Орган-на-чипе представляет устройство, чип, с камерами и каналами, в которых выращиваются культуры клеток в регулируемых условиях, что симулирует работу отдельных органов, тканей или процессов. Данная технология позволяет проектировать межклеточные и межтканевые взаимодействия, взаимодействия между органами (например, легкие — сердце — печень), а также физиологические механизмы, характерные для легких, например дыхательные движения или имитация газообмена в альвеолах [162, 163]. В такой системе есть возможность управлять клеточной средой с высокой точностью, включая механические и биохимические сигналы, что позволяет создавать более физиологически значимые условия и изучать влияние данных факторов на фибротические процессы [164, 165].

С помощью чипов была смоделирована ткань фибротического легкого с микро- и макрососудистой архитектурой, что позволяет контролируемо изучать в том числе и васкуляризацию [162, 166, 167]. На такой васкуляризированной модели фиброза легких-на-чипе было изучено влияние инородных частиц, поступающих из «альвеол» в «легочную сосудистую сеть» и вызывающих повреждение и воспаление, что запускает фиброз [162], а также механизм действия антифибротического препарата нинтеданиба, который способствовал снижению числа сосудов вокруг фибротического фокуса, ингибировал пролиферацию фибробластов и их инвазивные свойства [167].

Неоспоримым плюсом такой модели является возможность изучения различных антифибротических или иных препаратов на наличие побочных эффектов в «нецелевых» тканях и органах. Так, на примере мультиорган-на-чипе с микрореакторами органоидов легких, печени и сердца был подтвержден негативный эффект блеомицина [168], выражающийся в существенном изменении морфологии в «сердце» и увеличения экспрессии провоспалительных молекул в «легких».

Первоначально в создании органов-на-чипах присутствовала проблема короткого срока культивирования культур/орган-на-чипов из-за замкнутости системы и отсутствия смены питательной среды. Но фиброз легкого, развитие или его реверсия, представляет собой длительный процесс. Данный недостаток легких-на-чипах компенсировали созданием активных или пассивных насосных систем для удаления продуктов метаболизма и добавления новой питательной среды [163, 169].

Легкие-на-чипе, несмотря на свою приближенность к физиологическим условиям *in vivo*, не могут пока полноценно заменить все модели. Дорогостоящая техника и сложность создания моделей-на-чипах не позволяют внедрить модели для скрининга, в том числе для высокопроизводительного экспериментального или фармацевтического анализа фиброза легких.

Заключение

На данный момент процессы, отвечающие за возникновение и прогрессию фиброза легких, полностью не изучены, хотя эта проблема является крайне актуальной. Пока не сущест-

вует эффективных методов лечения, которые позволили бы остановить прогрессию идиопатических форм или способствовать реверсии фиброза легких. Одна из главных проблем, которая возникает при его изучении, — это подбор подходящих моделей, которые могли бы отразить те или иные механизмы фиброгенеза. Данный обзор посвящен разнообразию моделей фиброза легких, их плюсам и минусам и исследовательским возможностям.

Несмотря на то что в исследованиях все чаще предпочтение отдается 2,5D- и 3D-моделям из-за их лучшей имитации условий *in vivo*, 2D-исследования по-прежнему являются надежной экспе-

риментальной основой для исследований *in vitro* с целью изучения гипотез и дальнейшего подтверждения полученных данных на моделях более высокой мерности или *in vivo*. Благодаря относительной простоте 2D-модели и возможности в контролируемых условиях наблюдать за индивидуальными клеточными реакциями на растворимые сигналы, ее активно используют наравне с другими вариантами моделирования фибротических процессов легких. Другие модели фиброза легких приносят в эксперименты иные возможности для исследования, как, например, изучение реакции клеток на молекулы матрикса и его модуль упругости, что особенно часто изучается на 2,5D-моделях (рис. 3).

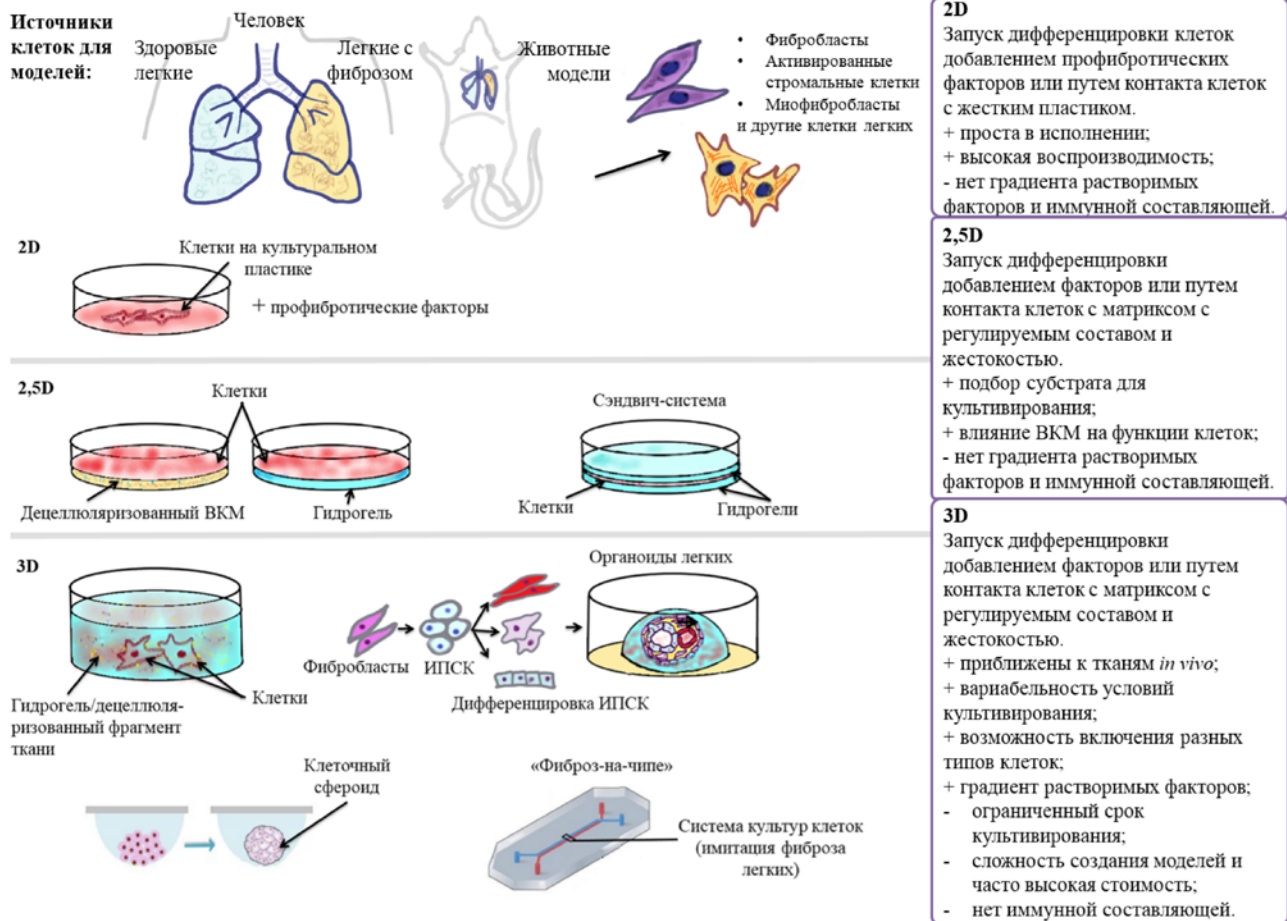


Рис. 3. Разнообразие моделей фиброза легких и основные источники материала для их получения: биоптаты, полученные из легких здорового человека или с диагностированным фиброзом, а также легкие животных, в том числе с индуцированным фиброзом. 2D-модели представляют собой клетки, культивируемые на культуральной посуде; 2,5D-модели включают в себя слой внеклеточного матрикса (ВКМ) или гидрогеля, на которых культивируются целевые клетки, участвующие в фиброзе легких, или два слоя гидрогеля, между которыми расположена культура; 3D-модели (слева направо): клетки, культивируемые в толще гидрогеля или децеллюляризованного матрикса, полученного из фрагмента ткани, сфероиды из клеток легкого, органоиды легких, полученные путем направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), «легкое-на-чипе» и модификация этой модели «фиброза-на-чипе»

Однако мерность моделей влияет не только на возможность экспериментатора исследовать те или иные свойства клеточной культуры или мультিকлеточной системы, но и на морфологию самих клеток. Клетки, культивируемые на 2D-поверхности, приобретают апикально-базальную полярность, происходит миозин-опосредованное натяжение цитоскелета и усиление фокальной адгезии, что для них не является характерным и может приводить к изменению функций [59]. Данный эффект минимизируется в 3D-системах, так как у фибробластов возникает больше интегриновых сайтов адгезии и клетки могут вытягиваться в сторону всех трех плоскостей по сравнению с 2D-системами, что также позволяет им формировать более сложные структуры [59, 82, 111, 170]. К тому же в 3D-культурах клетки остаются в состоянии пролиферативного покоя, что позволяет лучше контролировать их активацию, например путем переноса клеток из сфероидов в 2D-культуру или обработки про-фибротическими факторами роста [171].

Сложные 3D-модели фиброза легких действительно приближают исследователей к реальной картине процессов в ткани *in vivo*, но многие из них в настоящее время имеют ограниченный срок культивирования и, соответственно, наблюдения. В свою очередь, фиброз часто приобретает прогрессирующий характер, динамика которого видна в течение длительного периода времени. В связи с этим нужно работать над увеличением срока работы моделей фиброза.

Основным недостатком весомого большинства моделей фиброза легких является отсутствие компонентов иммунной системы. Это отдаляет модели от физиологических процессов *in vivo*, то есть от реальной совокупности механизмов, в которых важнейшую роль играют компоненты иммунной системы. Этот недостаток в том числе не позволяет с высокой степенью надежности проводить скрининги перспективных антифибротических лекарственных препаратов и оценивать потенциальные риски их воздействия на организм. Изучение иммунных клеток является обязательной частью изучения фиброза, развитие которого происходит чаще всего как следствие воспаления [172, 173]. Внесение иммунного компонента в систему — то, к чему надо стремиться при моделировании фиброгенеза. Сегодня для изучения иммунологической компоненты преимущественно используют модели *in vivo* на животных или, например, анализируют отдельные популяции иммунных клеток, выделенных из биопсий больных фибро-

зом легких доноров или бронхоальвеолярного лаважа [174–177]. Ряд исследований проводится и на моделях *in vitro* [178–180]: изучение влияния секрета иммунных клеток на дифференцировку (мио)фибробластов в 2D-культурах [181] или, наоборот, влияние секрета фибротических клеток на активность клеток иммунитета [38]. Используют также со-культивирование фибробластов с лейкоцитами, макрофагами, нейтрофилами и другими клетками иммунитета, потенциально задействованными в развитии фиброза легких или его подавлении [182]. Предпринимаются единичные попытки создания более сложных моделей фиброза легких с иммунной составляющей. Например, получение альвеолярных органоидов, в которых демонстрируются критические патологические признаки легочного фиброза (воспаление, накопление коллагена), а некоторые клетки проявляют фенотипическое и функциональное сходство с макрофагами человека [56].

Воспалительные процессы, приводящие к фиброзу легких, это сложные сети передаваемых сигналов от клетки к клетке, которые имеют меняющийся во времени характер, что сильно усложняет построение корректных моделей. Но учеными предпринимаются попытки по созданию многокомпонентных моделей, направленных в том числе на изучение иммунной составляющей фиброгенеза.

Изучение фиброза легких — важная, но непростая задача, которая требует внимательного и тщательного подхода. В каждой из вышеперечисленных моделей нам удалось обозначить недостатки, но также назвать неоспоримые преимущества, благодаря которым исследователи часто обращаются к данным моделям. Учитывая, что фиброз легких — это многокомпонентный процесс со сложно регулируемые клеточными и молекулярными составляющими, обойтись одной моделью для изучения всех заложенных в нем механизмов будет недостаточно, но их совокупность может позволить подойти к следующим открытиям и, возможно, открыть методы остановки прогрессии или даже реверсии фиброза легких.

Благодарности: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-00198, <https://rscf.ru/project/23-15-00198/>

Acknowledgments: This study was supported by the Russian Science Foundation, grant № 23-15-00198, <https://rscf.ru/project/23-15-00198/>

Литература

1. Чучалин АГ, Авдеев СН, Айсанов ЗР и др. Клинические рекомендации Диагностика и лечение идиопатического легочного фиброза Федеральные клинические рекомендации. Пульмонология. 2016;26(4):399–419.
2. Kolahian S, Fernandez IE, Eickelberg O, Hartl D. Immune Mechanisms in Pulmonary Fibrosis. Translational Review. 2016;55(3):309–322.
3. Henderson NC, Rieder F, Wynn TA. Fibrosis: from mechanisms to medicines. Nature. 2020;587(7835):555–566.
4. George PM, Wells AU, Jenkins RG. Pulmonary fibrosis and COVID-19: the potential role for antifibrotic therapy. Lancet Respir Med . 2020;8(8):807–815.
5. Ovadya Y, Krizhanovsky V. Senescent cells: SASPected drivers of age-related pathologies. Biogerontology. 2014;15(6):627–642.
6. Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. Nat Commun. 2017;8:14532. DOI: 10.1038/ncomms14532
7. Yanai H, Shteinberg A, Porat Z, Budovsky A, Braiman A, Zeische R, et al. Cellular senescence-like features of lung fibroblasts derived from idiopathic pulmonary fibrosis patients. Aging (Albany NY). 2015;7(9):664–672.
8. Grigor'eva OA, Vigovskiy MA, D'yachkova UD, Basalova NA, Aleksandrushkina NA, Novoseleetskaya ES, et al. Induction mechanisms of endothelial-to-mesenchymal transition by components of the extracellular matrix in pulmonary fibrosis. Cell Technol Biol Med. 2021;2:97–106.
9. Капустина ВА, Овчаренко СИ. Эволюция классификации интерстициальных заболеваний легких. Что нового дает пересмотр классификации 2012. Пульмонология. 2013;3(15):33–35.
10. Herrera J, Forster C, Pengo T, Montero A, Swift J, Schwartz MA, et al. Registration of the extracellular matrix components constituting the fibroblastic focus in idiopathic pulmonary fibrosis. JCI Insight. 2019;4(1):e125185. DOI: 10.1172/jci.insight.125185
11. Hinz B. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. J Invest Dermatol. 2007;127(3):526–537.
12. Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. Exp Cell Res. 1999;250(2):273–283.
13. El Agha E, Kramann R, Schneider RK, Li X, Seeger W, Humphreys BD, et al. Mesenchymal Stem Cells in Fibrotic Disease. Cell Stem Cell. Cell Press. 2017;21:166–177.
14. Rivka C. Stone, Irena Pastar, Nkemcho Ojeh VC. Epithelial-Mesenchymal Transition in Tissue Repair and Fibrosis. Cell Tissue Res. 2016;365(3):495–506.
15. Chua F, Gauldie J, Laurent GJ. Pulmonary Fibrosis. 2012;33(1):9–13.
16. Richeldi L, Collard HR, Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis. Lancet. 2017;389(10082):1941–1952.
17. Herrera J, Henke CA, Bitterman PB. Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis. J Clin Invest. 2018;128(1):45–53.
18. Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch JP, Martinez FJ. Mechanisms of pulmonary fibrosis. Annu Rev Med. 2004;55:395–417.
19. Hu HH, Chen DQ, Wang YN, Feng YL, Cao G, Vaziri ND, et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis. Chem Biol Interact. 2018;292:76–83.
20. Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, et al. The Fibronectin Domain ED-A Is Crucial for Myofibroblastic Phenotype Induction by Transforming Growth Factor- β 1. J Cell Biol. 1998;142(3):873–881.
21. Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. Exp Cell Res. 2000;257(1):180–189.
22. Xie T, Wang Y, Deng N, Huang G, Taghavifar F, Geng Y, et al. Single-Cell Deconvolution of Fibroblast Heterogeneity in Mouse Pulmonary Fibrosis. Cell Rep. 2018;22(13):3625–3640.

23. Eyden BP. Brief review of the fibronexus and its significance for myofibroblastic differentiation and tumor diagnosis. *Ultrastruct Pathol.* 1993;17(6):611–622.
24. Guo DC, Papke CL, Tran-Fadulu V, Regalado ES, Avidan N, Johnson RJ, et al. Mutations in Smooth Muscle Alpha-Actin (ACTA2) Cause Coronary Artery Disease, Stroke, and Moyamoya Disease, Along with Thoracic Aortic Disease. *Am J Hum Genet.* 2009;84(5):617–627.
25. Cella L, D'Avino V, Palma G, Conson M, Liuzzi R, Picardi M, et al. Modeling the risk of radiation-induced lung fibrosis: Irradiated heart tissue is as important as irradiated lung. *Radiother Oncol.* 2015;117(1):36–43.
26. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):349–363.
27. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1776–1784.
28. Kletukhina S, Neustroeva O, James V, Rizvanov A, Gomzikova M. Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Epithelial–Mesenchymal Transition. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19):4813. DOI: 10.3390/ijms20194813
29. Deng CC, Hu YF, Zhu DH, Cheng Q, Gu JJ, Feng QL, et al. Single-cell RNA-seq reveals fibroblast heterogeneity and increased mesenchymal fibroblasts in human fibrotic skin diseases. *Nat Commun.* 2021;12:3709. DOI: 10.1038/s41467-021-24110-y
30. Eapen MS, Lu W, Gaikwad AV, Bhattarai P, Chia C, Hardikar A, et al. Endothelial to mesenchymal transition: a precursor to post-COVID-19 interstitial pulmonary fibrosis and vascular obliteration? *Eur Respir J.* 2020;56:2003167. DOI: 10.1183/13993003.03167-2020
31. Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, Matsuo M, Nakashima H, Kawabe T, et al. Endothelial–Mesenchymal Transition in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;43(2):161–172.
32. van Grunsven LA. 3D in vitro models of liver fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2017;121:133–146.
33. Sundarakrishnan A, Chen Y, Black LD, Aldridge BB, Kaplan DL. Engineered cell and tissue models of pulmonary fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;129:78–94.
34. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(3):362–382.
35. Jinta T, Miyazaki Y, Kishi M, Akashi T, Takemura T, Inase N, et al. The pathogenesis of chronic hypersensitivity pneumonitis in common with idiopathic pulmonary fibrosis: expression of apoptotic markers. *Am J Clin Pathol.* 2010;134(4):613–620.
36. Barnes H, Goh NSL, Leong TL, Hoy R. Silica-associated lung disease: An old-world exposure in modern industries. *Respirology.* 2019;24(12):1165–1175.
37. Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(12):1507–1516.
38. Gregory AD, Kliment CR, Metz HE, Kim K-H, Kargl J, Agostini BA, et al. Neutrophil elastase promotes myofibroblast differentiation in lung fibrosis. *J Leukoc Biol.* 2015;98(2):143–152.
39. Jin H, Yoo Y, Kim Y, Kim Y, Cho J, Lee YS. Radiation-Induced Lung Fibrosis: Preclinical Animal Models and Therapeutic Strategies. *Cancers (Basel).* 2020;12(6):1–24.
40. Shao S, Qu Z, Liang Y, Xu Y, Zhou D, Li D, et al. Iguratimod decreases bleomycin-induced pulmonary fibrosis in association with inhibition of TNF- α in mice. *Int Immunopharmacol.* 2021;99(June):107936. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107936
41. Qian W, Cai X, Qian Q, Zhang W, Wang D. Astragaloside IV modulates TGF- β 1-dependent epithelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Cell Mol Med.* 2018;22(9):4354–4365.
42. Kolodtsick JE, Toews GB, Jakubzick C, Hogaboam C, Moore TA, McKenzie A, et al. Protection from Fluorescein Isothiocyanate-Induced Fibrosis in IL-13-Deficient, but Not IL-4-Deficient, Mice Results from Impaired Collagen Synthesis by Fibroblasts. *J Immunol.* 2004;172(7):4068–4076.
43. Christensen PJ, Goodman RE, Pastoriza L, Moore B, Toews GB. Induction of Lung Fibrosis in the Mouse by Intratracheal Instillation of Fluorescein Isothiocyanate Is Not T-Cell-Dependent. *Am J Pathol.* 1999;155(5):1773–1779.

44. Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Bleomycin D, Coli E. Studies on bleomycin. *Cancer*. 1967;20(5):891–895.
45. Claussen CA, Long EC. Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin. *Chem Rev*. 1999;99(9):2797–2816.
46. Hecht SM. Bleomycin: New Perspectives on the Mechanism of Action. *J Nat Prod*. 2000;63(1):158–168.
47. Usuki J, Fukuda Y. Evolution of three patterns of intra-alveolar fibrosis produced by bleomycin in rats. *Pathol Int*. 1995;45(8):552–564.
48. Barkauskas CE, Noble PW. Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 7. New insights into the cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol — Cell Physiol*. 2014;306(11):987–996.
49. Chung MP, Monick MM, Hamzeh NY, Butler NS, Powers LS, Hunninghake GW. Role of Repeated Lung Injury and Genetic Background in Bleomycin-Induced Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;29(3):375–380.
50. Bérubé K, Prytherch Z, Job C, Hughes T. Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models. *Toxicology*. 2010;278(3):311–318.
51. Lam AP, Flozak AS, Russell S, Wei J, Jain M, Mutlu GM, et al. Nuclear β -Catenin Is Increased in Systemic Sclerosis Pulmonary Fibrosis and Promotes Lung Fibroblast Migration and Proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45(5):915.
52. Yanagihara T, Chong SG, Vierhout M, Hirota JA, Ask K, Kolb M. Current models of pulmonary fibrosis for future drug discovery efforts. *Expert Opin Drug Discov*. 2020;15(8):931–941.
53. Uhl FE, Vierkotten S, Wagner DE, Burgstaller G, Costa R, Koch I, et al. Preclinical validation and imaging of Wnt-induced repair in human 3D lung tissue cultures. *Eur Respir J*. 2015;46(4):1150–1566.
54. Hansen NUB, Karsdal MA, Brockbank S, Cruwys S, Rønnow S, Leeming DJ. Tissue turnover of collagen type I, III and elastin is elevated in the PCLS model of IPF and can be restored back to vehicle levels using a phosphodiesterase inhibitor. *Respir Res*. 2016;17(1):76. DOI: 10.1186/s12931-016-0394-8
55. Alsafadi HN, Staab-Weijnitz CA, Lehmann M, Lindner M, Peschel B, Königshoff M, et al. An ex vivo model to induce early fibrosis-like changes in human precision-cut lung slices. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2017;312(6):L896–L902.
56. Rasaei R, Tyagi A, Rasaei S, Lee SJ, Yang SR, Kim KS, et al. Human pluripotent stem cell-derived macrophages and macrophage-derived exosomes: therapeutic potential in pulmonary fibrosis. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):433. DOI: 10.1186/s13287-022-03136-z
57. Xu Q, Norman JT, Shrivastav S, Lucio-Cazana J, Kopp JB. In vitro models of TGF- β -induced fibrosis suitable for high-throughput screening of antifibrotic agents. *Am J Physiol — Ren Physiol*. 2007;293(2):631–640.
58. Cahill EF, Kennelly H, Carty F, Mahon BP, English K. Hepatocyte Growth Factor Is Required for Mesenchymal Stromal Cell Protection Against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(10):1307–1318.
59. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*. 2012;125:3015–3024.
60. Smithmyer ME, Sawicki LA, Kloxin AM. Hydrogel scaffolds as in vitro models to study fibroblast activation in wound healing and disease. *Biomaterials Science*. 2014;2:634–650.
61. Novoseletskaya ES, Grigorieva OA, Efimenko AY, Kalinina NI. Extracellular Matrix in the Regulation of Stem Cell Differentiation. *Biochem*. 2019;84(3):232–240.
62. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(3):211–224.
63. Wang Q, Chiang ET, Lim M, Lai J, Rogers R, Janmey PA, et al. Changes in the biomechanical properties of neutrophils and endothelial cells during adhesion. *Blood*. 2001;97(3):660–668.
64. Coward WR, Feghali-Bostwick CA, Jenkins G, Knox AJ, Pang L. A central role for G9a and EZH2 in the epigenetic silencing of cyclooxygenase-2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *FASEB J*. 2014;28(7):3183–3196.
65. Sundar IK, Rashid K, Gerloff J, Li D, Rahman I. Genetic ablation of p16 INK4a does not protect against cellular senescence in mouse models of chronic obstructive pulmonary disease/emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018;59(2):189–199.

66. Hohmann MS, Habel DM, Coelho AL, Verri WA, Hogaboam CM. Quercetin enhances ligand-induced apoptosis in senescent idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts and reduces lung fibrosis in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2019;60(1):28–40.
67. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008;6(12):2853–2868.
68. Huang WT, Akhter H, Jiang C, MacEwen M, Ding Q, Antony V, et al. Plasminogen activator inhibitor 1, fibroblast apoptosis resistance, and aging-related susceptibility to lung fibrosis. *Exp Gerontol.* 2015;61:62–75.
69. Serini G, Gabbiani G. Modulation of α -smooth muscle actin expression in fibroblasts by transforming growth factor- β isoforms: An in vivo and in vitro study. *Wound Repair Regen.* 1996;4(2):278–287.
70. Massagué J, Andres J, Attisano L, Cheifetz S, López-Casillas F, Ohtsuki M, et al. TGF- β receptors. *Mol Reprod Dev.* 1992;32(2):99–104.
71. Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol.* 1994;124(4):401–404.
72. Chen X, Thibeault SL. Response of fibroblasts to transforming growth factor- β 1 on two-dimensional and in three-dimensional hyaluronan hydrogels. *Tissue Eng — Part A.* 2012;18(23–24):2528–2538.
73. Arora PD, Narani N, McCulloch CAG. The Compliance of Collagen Gels Regulates Transforming Growth Factor- β Induction of α -Smooth Muscle Actin in Fibroblasts. *Am J Pathol.* 1999;154(3):871–882.
74. Pouliot RA, Link PA, Mikhael NS, Schneck MB, Valentine MS, Kamga Gninzeke FJ, et al. Development and characterization of a naturally derived lung extracellular matrix hydrogel. *J Biomed Mater Res — Part A.* 2016;104(8):1922–1935.
75. Price AP, England KA, Matson AM, Blazar BR, Panoskaltsis-Mortari A. Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung: The matrix reloaded. *Tissue Eng — Part A.* 2010;16(8):2581–2591.
76. Tse JR, Engler AJ. Preparation of Hydrogel Substrates with Tunable Mechanical Properties. *Curr Protoc Cell Biol.* 2010;Chapter 10:10.16. DOI: 10.1002/0471143030.cb1016s47
77. Grinnell F, Petroll WM. Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:335–361.
78. Arora PD, Narani N, McCulloch CAG. The Compliance of Collagen Gels Regulates Transforming Growth Factor- β Induction of α -Smooth Muscle Actin in Fibroblasts. *Am J Pathol.* 1999;154(3):871–882.
79. Asano S, Ito S, Takahashi K, Furuya K, Kondo M, Sokabe M, et al. Matrix stiffness regulates migration of human lung fibroblasts. *Physiol Rep.* 2017;5(9):e13281. DOI: 10.14814/phy2.13281
80. Giménez A, Duch P, Puig M, Gabasa M, Xaubet A, Alcaraz J. Dysregulated Collagen Homeostasis by Matrix Stiffening and TGF- β 1 in Fibroblasts from Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients: Role of FAK/Akt. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11):2431. DOI: 10.3390/ijms18112431
81. Chen H, Qu J, Huang X, Kurundkar A, Zhu L, Yang N, et al. Mechanosensing by the α 6-integrin confers an invasive fibroblast phenotype and mediates lung fibrosis. *Nat Commun.* 2016;7:12564. DOI: 10.1038/ncomms12564
82. Beningo KA, Wang Y li. Double-Hydrogel Substrate as a Model System for Three-Dimensional Cell Culture. *Methods Mol Biol.* 2007;370:203–211.
83. Olsen AL, Bloomer SA, Chan EP, Gaça MDA, Georges PC, Sackey B, et al. Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation. *Am J Physiol — Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(1):G110–G118.
84. Li CX, Talele NP, Boo S, Koehler A, Knee-Walden E, Balestrini JL, et al. MicroRNA-21 preserves the fibrotic mechanical memory of mesenchymal stem cells. *Nat Mater.* 2017;16(3):379–389.
85. Parker MW, Rossi D, Peterson M, Smith K, Sikstrom K, White ES, et al. Fibrotic extracellular matrix activates a profibrotic positive feedback loop. *J Clin Invest.* 2014;124(4):1622–1635.

86. Booth AJ, Hadley R, Cornett AM, Dreffs AA, Matthes SA, Tsui JL, et al. Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Nov 1;186(9):866–876.
87. Vasse GF, Van Os L, De Jager M, Jonker MR, Borghuis T, Van Den Toorn LT, et al. Adipose Stromal Cell-Secretome Counteracts Profibrotic Signals From IPF Lung Matrices. *Front Pharmacol*. 2021;12:669037. DOI: 10.3389/fphar.2021.669037
88. Petersen TH, Calle EA, Colehour MB, Niklason LE. Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds. *Cells Tissues Organs*. 2012;195(3):222–231.
89. Hill RC, Calle EA, Dzieciatkowska M, Niklason LE, Hansen KC. Quantification of extracellular matrix proteins from a rat lung scaffold to provide a molecular readout for tissue engineering. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14(4):961–973.
90. Narciso M, Ulldemolins A, Júnior C, Otero J, Navajas D, Farré R, et al. Novel Decellularization Method for Tissue Slices. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:832178. DOI: 10.3389/fbioe.2022.832178
91. G. Xiong, T. J. Flynn, J. Chen, C. Trinkle, R. Xu B. Development of an ex vivo breast cancer lung colonization model utilizing decellularized lung matrix. *Integr Biol*. 2015;7(12):1518–1525.
92. O'Neill JD, Anfang R, Anandappa A, Costa J, Javidfar J, Wobma HM, et al. Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. In: *Annals of Thoracic Surgery*. 2013;96(3):1046–1056.
93. Calle EA, Petersen TH, Niklason LE. Procedure for lung engineering. *J Vis Exp*. 2011;49:2651. DOI: 10.3791/2651
94. Sava P, Ramanathan A, Dobronyi A, Peng X, Sun H, Ledesma-Mendoza A, et al. Human pericytes adopt myofibroblast properties in the microenvironment of the IPF lung. *JCI Insight*. 2017;2(24):e96352. DOI: 10.1172/jci.insight.96352
95. Dye BR, Hill DR, Ferguson MA, Tsai YH, Nagy MS, Dyal R, et al. In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *Elife*. 2015;4:e05098. DOI: 10.7554/Elife.05098
96. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater*. 2009;5(1):1–13.
97. Chao J, Dai X, Peña T, Doyle DA, Guenther TM, Carlson MA. MCP1 regulates fibroblast migration in 3D collagen matrices downstream of MAP kinases and NF- κ B. *J Invest Dermatol*. 2015;135(12):2944–2954.
98. Yamanishi C, Parigoris E, Takayama S. Kinetic Analysis of Label-Free Microscale Collagen Gel Contraction Using Machine Learning-Aided Image Analysis. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:582602. DOI: 10.3389/fbioe.2020.582602
99. Grinnell F, Ho CH, Tamariz E, Lee DJ, Skuta G. Dendritic Fibroblasts in Three-dimensional Collagen Matrices. *Mol Biol Cell*. 2003;14(2):384–395.
100. Rhee S, Ho CH, Grinnell F. Promigratory and Procontractile Growth Factor Environments Differentially Regulate Cell Morphogenesis. *Exp Cell Res*. 2010;316(2):232–244.
101. Da Rocha-Azevedo B, Ho CH, Grinnell F. PDGF-stimulated dispersal of cell clusters and disruption of fibronectin matrix on three-dimensional collagen matrices requires matrix metalloproteinase-2. *Mol Biol Cell*. 2015;26(6):1098–1105.
102. Liu X, Fang S, Liu H, Wang X, Dai X, Yin Q, et al. Role of human pulmonary fibroblast-derived MCP-1 in cell activation and migration in experimental silicosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015;288(2):152–160.
103. Liu H, Dai X, Cheng Y, Fang S, Zhang Y, Wang X, et al. MCP1 mediates silica-induced cell migration in human pulmonary fibroblasts. *Am J Physiol — Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310(2):L121–132.
104. Dey M, Ozbolat IT. 3D bioprinting of cells, tissues and organs. *Sci Rep*. 2020;10(1):14023. DOI: 10.1038/s41598-020-70086-y
105. Vazquez-Armendariz AI, Barroso MM, El Agha E, Herold S. 3D In Vitro Models: Novel Insights into Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathophysiology and Drug Screening. *Cells*. 2022;11(9):1526. DOI: 10.3390/cells11091526
106. Figtree GA, Bubb KJ, Tang O, Kizana E, Gentile C. Vascularized Cardiac Spheroids as Novel 3D in vitro Models to Study Cardiac Fibrosis. *Cells Tissues Organs*. 2017;204(3–4):191–198.

107. Dwek M, Schumacher U. *Metastasis Research Protocols Second Edition Methods in Molecular Biology*. New York: Springer Science + Business Media, 2014. 250 p.
108. Salmenperä P, Kankuri E, Bizik J, Sirén V, Virtanen I, Takahashi S, et al. Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin–integrin interaction. *Exp Cell Res*. 2008;314(19):3444–3452.
109. Cores J, Hensley MT, Kinlaw K, Rikard SM, Dinh PU, Paudel D, et al. Safety and Efficacy of Allogeneic Lung Spheroid Cells in a Mismatched Rat Model of Pulmonary Fibrosis. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(10):1905–1916.
110. Granato G, Ruocco MR, Iaccarino A, Masone S, Cali G, Avagliano A, et al. Generation and analysis of spheroids from human primary skin myofibroblasts: An experimental system to study myofibroblasts deactivation. *Cell Death Discov*. 2017;3:17038. DOI: 10.1038/cddiscovery.2017.38
111. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp*. 2011;(51):2720. DOI: 10.3791/2720
112. Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):6225. DOI: 10.3390/ijms21176225
113. Kosheleva N V., Efremov YM, Shavkuta BS, Zurina IM, Zhang D, Zhang Y, et al. Cell spheroid fusion: beyond liquid drops model. *Sci Rep*. 2020;10:12614. DOI: 10.1038/s41598-020-69540-8
114. Morimoto K, Kunii S. Latent nature of collagen in promoting three-dimensional adherent spheroid formation of fibroblasts. *Materialia*. 2019;8:100450. DOI: 10.1016/j.mtla.2019.100450
115. da Rocha-Azevedo B, Grinnell F. Fibroblast morphogenesis on 3D collagen matrices: The balance between cell clustering and cell migration. *Exp Cell Res*. 2013;319(16):2440–2446.
116. Menezes GC, Miron-Mendoza M, Ho CH, Jiang H, Grinnell F. Oncogenic Ras-transformed human fibroblasts exhibit differential changes in contraction and migration in 3D collagen matrices. *Exp Cell Res*. 2008;314(16):3081–3091.
117. Frongia C, Lorenzo C, Gianni F, Prevost GP, Ducommun B, Lobjois V, et al. 3D imaging of the response to CDC25 inhibition in multicellular spheroids. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(23):2230–2236.
118. Henry E. Adult Lung Spheroid Cells Contain Progenitor Cells and Mediate Regeneration in Rodents With Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(11):1265–1274.
119. Dinh PUC, Cores J, Hensley MT, Vandergriff AC, Tang J, Allen TA, et al. Derivation of therapeutic lung spheroid cells from minimally invasive transbronchial pulmonary biopsies. *Respir Res*. 2017;18(1):132. DOI: 10.1186/s12931-017-0611-0
120. Ferrari M, Cirisano F, Morán MC. Super Liquid-repellent Surfaces and 3D Spheroids Growth. *Front Biosci*. 2022;27(5):144. DOI: 10.31083/j.fbl2705144
121. Cirisano F, Ferrari M. Sustainable Materials for Liquid Repellent Coatings. *Coatings*. 2021;11(12):1508. DOI: 10.3390/coatings11121508
122. Neto AI, Correia CR, Oliveira MB, Rial-Hermida MI, Alvarez-Lorenzo C, Reis RL, et al. A novel hanging spherical drop system for the generation of cellular spheroids and high throughput combinatorial drug screening. *Biomater Sci*. 2015;3(4):581–585.
123. Liu F, Lagares D, Choi KM, Stopfer L, Marinković A, Vrbanc V, et al. Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *Am J Physiol — Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(4):L344–L357.
124. Tan Q, Choi K, Sicard D, Tschumperlin D. Human airway organoid engineering as a step toward lung regeneration and disease modeling. *Biomaterials*. 2017;113:118–132.
125. Cesarz Z, Tamama K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:9176357. DOI: 10.1155/2016/9176357
126. Dinh PUC, Paudel D, Brochu H, Popowski KD, Gracieux MC, Cores J, et al. Inhalation of lung spheroid cell secretome and exosomes promotes lung repair in pulmonary fibrosis. *Nat Commun*. 2020;11:1064. DOI: 10.1038/s41467-020-14344-7
127. McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, Sinagoga KL, Schumacher M, Rockich BE, et al. Modeling human development and disease in pluripotent stem cell-derived gastric organoids. *Nature*. 2014;516(7531):400–404.

128. Wells JM, Spence JR. Primer Series: How to make an intestine. *Development*. 2014;141(4):752–760.
129. Korogi Y, Gotoh S, Ikeo S, Yamamoto Y, Sone N, Tamai K, et al. In Vitro Disease Modeling of Hermansky-Pudlak Syndrome Type 2 Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Alveolar Organoids. *Stem Cell Reports*. 2019;12(3):431–440.
130. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(31):12771–12775. DOI: 10.1073/pnas.0906850106
131. Miller AJ, Dye BR, Ferrer-Torres D, Hill DR, Overeem AW, Shea LD, et al. Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro. *Nat Protoc*. 2019;14(2):518–540.
132. Willemse J, van der Laan LJW, de Jonge J, Verstegen MMA. Design by Nature: Emerging Applications of Native Liver Extracellular Matrix for Cholangiocyte Organoid-Based Regenerative Medicine. *Bioengineering*. 2022;9(3):110. DOI: 10.3390/bioengineering9030110
133. Demchenko A, Lavrov A, Smirnikhina S. Lung organoids: current strategies for generation and transplantation. *Cell Tissue Res*. 2022;390(3):317–333.
134. Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*. 2011;470(7332):105–109.
135. Wong AP, Bear CE, Chin S, Pasceri P, Thompson TO, Huan LJ, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein. *Nat Biotechnol*. 2012;30(9):876–882.
136. Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G, Hogan BLM. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development*. 1997;124(1):53–63.
137. Yuan T, Volckaert T, Chanda D, Thannickal VJ, De Langhe SP. Fgf10 Signaling in Lung Development, Homeostasis, Disease, and Repair After Injury. *Front Genet*. 2018;9:418. DOI: 10.3389/fgene.2018.00418
138. Fernandez RJ, Gardner ZJG, Slovik KJ, Liberti DC, Estep KN, Yang W, et al. GSK3 inhibition rescues growth and telomere dysfunction in dyskeratosis congenita iPSC-derived type II alveolar epithelial cells. *Elife*. 2022;11:e64430. DOI: 10.7554/eLife.64430
139. Chen L, Acciani T, Le Cras T, Lutzko C, Perl AKT. Dynamic Regulation of Platelet-Derived Growth Factor Receptor α Expression in Alveolar Fibroblasts during Realveolarization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;47(4):517–527.
140. Tamai K, Sakai K, Yamaki H, Moriguchi K, Igura K, Maehana S, et al. iPSC-derived mesenchymal cells that support alveolar organoid development. *Cell Reports Methods*. 2022;2(10):100314. DOI: 10.1016/j.crmeth.2022.100314
141. Alber AB, Marquez HA, Ma L, Kwong G, Thapa BR, Villacorta-Martin C, et al. Directed differentiation of mouse pluripotent stem cells into functional lung-specific mesenchyme. *bioRxiv*. 2022;13;14(1):3488. DOI: 10.1038/s41467-023-39099-9
142. Kim JH, Kim J, Kim WJ, Choi YH, Yang SR, Hong SH. Diesel Particulate Matter 2.5 Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Upregulation of SARS-CoV-2 Receptor during Human Pluripotent Stem Cell-Derived Alveolar Organoid Development. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(22):8410. DOI: 10.3390/ijerph17228410
143. Katsura H, Sontake V, Tata A, Kobayashi Y, Edwards CE, Heaton BE, et al. Human Lung Stem Cell-Based Alveolospheres Provide Insights into SARS-CoV-2-Mediated Interferon Responses and Pneumocyte Dysfunction. *Cell Stem Cell*. 2020;27(6):890–904.e8.
144. Lee H, Hwang-Bo H, Ji SY, Kim MY, Kim SY, Park C, et al. Diesel particulate matter2.5 promotes epithelial-mesenchymal transition of human retinal pigment epithelial cells via generation of reactive oxygen species. *Environ Pollut*. 2020;262:114301. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114301
145. Huizing M, Scher CD, Strovel E, Fitzpatrick DL, Hartnell LM, Anikster Y, et al. Nonsense mutations in ADTB3A cause complete deficiency of the β 3A subunit of adaptor complex-3 and severe Hermansky-Pudlak syndrome type 2. *Pediatr Res*. 2002;51(2):150–158.
146. Matsuyuki K, Ide M, Houjou K, Shima S, Tanaka S, Watanabe Y, et al. Novel AP3B1 mutations in a Hermansky-Pudlak syndrome type2 with neonatal interstitial lung disease. *Pediatr Allergy Immunol*. 2022;33(2):4–7.

147. Sachs N, Papaspyropoulos A, Ommen DDZ, Heo I, Böttinger L, Klay D, et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J.* 2019;38(4):e100300. DOI: 10.15252/embj.2018100300
148. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*. 2010;10(9):1886–1890.
149. Kondrateva E, Panchuk I, Demchenko A, Grigorieva O, Zheglo D, Voronina E, et al. Generation of induced pluripotent stem cell line (RCMGi008-A) from human skin fibroblasts of a cystic fibrosis patient with compound heterozygous F508del/CFTRdele2.3 mutations in CFTR gene. *Stem Cell Res.* 2022;63:102854. DOI: 10.1016/j.scr.2022.102854
150. Cool CD, Groshong SD, Rai PR, Henson PM, Stewart JS, Brown KK. Fibroblast Foci Are Not Discrete Sites of Lung Injury or Repair: The Fibroblast Reticulum. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(6):654–658.
151. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):773–785.
152. Oakley F, Gee LM, Sheerin NS, Borthwick LA. Implementation of pre-clinical methodologies to study fibrosis and test anti-fibrotic therapy. Vol. 49, *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd. 2019;49:95–101.
153. Parikh MT. Unleashing bioprinting technology through patent intelligence. *Drug Discov Today.* 2021;26(6):1547–1555.
154. Mirza AA, Robinson TE, Gifford K, Guo HH. 3D Printing and the Cystic Fibrosis Lung. *J Cyst Fibros.* 2019;18(2):278–279.
155. Nof E, Artzy-Schnirman A, Bhardwaj S, Sabatan H, Waisman D, Hochwald O, et al. Ventilation-induced epithelial injury drives biological onset of lung trauma in vitro and is mitigated with prophylactic anti-inflammatory therapeutics. *Bioeng Transl Med.* 2022;7(2):e10271. DOI: 10.1002/btm2.10271
156. Lee H, Kim J, Choi Y, Cho DW. Application of Gelatin Bioinks and Cell-Printing Technology to Enhance Cell Delivery Capability for 3D Liver Fibrosis-on-a-Chip Development. *ACS Biomater Sci Eng.* 2020;6(4):2469–2477.
157. Cuvellier M, Ezan F, Oliveira H, Rose S, Fricain JC, Langouët S, et al. 3D culture of HepaRG cells in GelMa and its application to bioprinting of a multicellular hepatic model. *Biomaterials.* 2021;269:120611. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120611
158. Grigoryan B, Paulsen SJ, Corbett DC, Sazer DW, Fortin CL, Zaita AJ, et al. Multivascular networks and functional intravascular topologies within biocompatible hydrogels. *Science.* 2019;364(6439):458–464.
159. Beh CW, Yew DS, Chai RJ, Chin SY, Seow Y, Hoon SS. A fluid-supported 3D hydrogel bioprinting method. *Biomaterials.* 2021;276:121034. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121034.
160. Anandakrishnan N, Ye H, Guo Z, Chen Z, Mentkowski KI, Lang JK, et al. Fast Stereolithography Printing of Large-Scale Biocompatible Hydrogel Models. *Adv Healthc Mater.* 2021;10(10):e2002103. DOI: 10.1002/adhm.202002103
161. Bennet TJ, Randhawa A, Hua J, Cheung KC. Airway-On-A-Chip: Designs and Applications for Lung Repair and Disease. *Cells.* 2021;10(7):1602. DOI: 10.3390/cells10071602
162. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Yuan Hsin H, Ingber DE. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science.* 2010;328(5986):1662–1668.
163. Stucki JD, Hobi N, Galimov A, Stucki AO, Schneider-Daum N, Lehr CM, et al. Medium throughput breathing human primary cell alveolus-on-chip model. *Sci Rep.* 2018;8(1):14359. DOI: 10.1038/s41598-018-32523-x
164. Felder M, Trueeb B, Stucki AO, Borcard S, Stucki JD, Schnyder B, et al. Impaired wound healing of alveolar lung epithelial cells in a breathing lung-on-a-chip. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:3. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00003
165. Sengupta A, Roldan N, Kiener M, Froment L, Raggi G, Imler T, et al. A New Immortalized Human Alveolar Epithelial Cell Model to Study Lung Injury and Toxicity on a Breathing Lung-On-Chip System. *Front Toxicol.* 2022;4:840606. DOI: 10.3389/ftox.2022.840606

166. Akinbote A, Beltran-Sastre V, Cherubini M, Visone R, Hajal C, Cobanoglu D, et al. Classical and Non-classical Fibrosis Phenotypes Are Revealed by Lung and Cardiac Like Microvascular Tissues On-Chip. *Front Physiol.* 2021;12:735915. DOI: 10.3389/fphys.2021.735915
167. Zeinali S, Bichsel CA, Hobi N, Funke M, Marti TM, Schmid RA, et al. Human microvasculature-on-a chip: anti-neovasculogenetic effect of nintedanib in vitro. *Angiogenesis.* 2018;21(4):861–871.
168. Skardal A, Murphy SV, Devarasetty M, Mead I, Kang HW, Seol YJ, et al. Multi-tissue interactions in an integrated three-tissue organ-on-a-chip platform. *Sci Rep.* 2017;7(1):8837. DOI: 10.1038/s41598-017-08879-x
169. Walker GM, Beebe DJ. A passive pumping method for microfluidic devices. *Lab Chip.* 2002;2(3):131–134.
170. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.* 2001;294(5547):1708–1712.
171. Kunz-Schughart LA, Wenninger S, Neumeier T, Seidl P, Knuechel R. Three-dimensional tissue structure affects sensitivity of fibroblasts to TGF- β 1. *Am J Physiol — Cell Physiol.* 2002;284(153-1):209–219.
172. Desai O, Winkler J, Minasyan M, Herzog EL. The role of immune and inflammatory cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Front Med.* 2018;5:43. DOI: 10.3389/fmed.2018.00043
173. Wynn TA, Vannella KM, Diseases I. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis Thomas. 2017;44(3):450–462.
174. Kinder BW, Brown KK, Schwarz MI, Ix JH, Kervitsky A, King TE. Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2008;133(1):226–232.
175. Kotsianidis I, Nakou E, Bouchliou I, Tzouvelekis A, Spanoudakis E, Steiropoulos P, et al. Global impairment of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(12):1121–1130.
176. Urata Y, Nishimura Y, Hirase T, Yokoyama M. Sphingosine 1-phosphate induces alpha-smooth muscle actin expression in lung fibroblasts via Rho-kinase. *Kobe J Med Sci.* 2005;51(1-2):17–27.
177. Yu YRA, Hotten DF, Malakhau Y, Volker E, Ghio AJ, Noble PW, et al. Flow cytometric analysis of myeloid cells in human blood, bronchoalveolar lavage, and lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;54(1):13–24.
178. Lv J, Xiong Y, Li W, Yang W, He R, Alerts E. BLT1 Mediates Bleomycin-Induced Lung Fibrosis Independently of Neutrophils and CD4 + T Cells. *J Immunol.* 2017;198(4):1673–1684.
179. Mansouri N, Willis GR, Fernandez-Gonzalez A, Reis M, Nassiri S, Alex Mitsialis S, et al. Mesenchymal stromal cell exosomes prevent and revert experimental pulmonary fibrosis through modulation of monocyte phenotypes. *JCI Insight.* 2019;4(21):e128060. DOI: 10.1172/jci.insight.128060
180. McDonough JE, Ahangari F, Li Q, Jain S, Verleden SE, Maya JH, et al. Transcriptional regulatory model of fibrosis progression in the human lung. *JCI Insight.* 2019;4(22):131597. DOI: 10.1172/jci.insight.131597
181. Yanan L, Jing B, Yangyang B, Ulrike E, Peigang W, Kun S, et al. S100A4+ Macrophages Are Necessary for Pulmonary Fibrosis by Activating Lung Fibroblasts. *Front Immunol.* 2018;9:1776. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01776
182. Celada LJ, Kropski JA, Herazo-maya JD, Luo W, Abad AT, Chioma OS, et al. PD-1 up-regulation on CD4+ T cells promotes pulmonary fibrosis through STAT3-mediated IL-17A and TGF- β 1 production. *Sci Transl Med.* 2018;10(460):eaar8356. DOI: 10.1126/scitranslmed.aar8356
183. Mark-Phillip P, Sabrina, AC., Prashanth A. A Novel 2.5D Culture Platform to Investigate the Role of Stiffness Gradients on Adhesion-Independent Cell Migration. *PLoS One.* 2014;9(10):e110453. DOI: 10.1371/journal.pone.0110453
184. Miyakawa M, Konno T, Kohno T, Kikuchi S, et al. Increase in epithelial permeability and cell metabolism by high mobility group box 1, inflammatory cytokines and tpen in CACO-2 cells as a novel model of inflammatory bowel disease. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;20(22):8434. DOI: 10.3390/ijms21228434
185. Toyjanova J, Flores-Cortez E, Reichner JS, Franck C, et al. Matrix confinement plays a pivotal role in regulating neutrophil-generated tractions, speed, and integrin utilization. *J Biol Chem.* 2015; 6(6):3752–3763.

Толстолужинская А.Е., Басалова Н.А., Ефименко А.Ю.

Современные подходы к созданию 2D- и 3D-клеточных моделей для изучения фиброза легких

Об авторах

Толстолужинская Анастасия Евгеньевна — лаборант-исследователь лаборатории репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова; лаборант-исследователь НИЛ генных и клеточных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Басалова Наталия Андреевна — к.б.н., м.н.с. лаборатории репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова; м.н.с. НИЛ генных и клеточных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Ефименко Анастасия Юрьевна — к.м.н., заведующий лабораторией репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова; доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

Authors

Anastasiya E. Tolstoluzhinskaya— research laboratory assistant at the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration of the Institute for Regenerative Medicine of the Medical Scientific and Educational Center of Lomonosov Moscow State University; a research laboratory assistant at the Institute of Gene and Cell Technologies of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Nataliya A. Basalova— Ph.D. of Biological Sciences, junior research assistant of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration of the Institute for Regenerative Medicine of the Medical Scientific and Educational Center of Lomonosov Moscow State University; junior research assistant of the Research Institute of Gene and Cellular Technologies of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Anastasiya Y. Efimenko— M.D., Ph.D., head of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration of the Institute for Regenerative Medicine of the Medical Research and Educational Center of Lomonosov Moscow State University; Associate Professor of the Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University.

УДК 606: 677.37

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-33-54>

Возможности биотехнологической платформы тутового шелкопряда (*B. mori*) для регенеративной медицины

Е.Н. Юматов^{1,2}, Е.Г. Евлагина², В.Г. Евлагин², Е.Ф. Лейнвебер², Д.В. Товпеко³, С.С. Дебенек³

¹ Индивидуальный предприниматель Юматов Е.Н., г. Самара, Россия

² Научно-исследовательская станция шелководства — филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр», Ставропольский край, г. Железноводск, Россия

³ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова», г. Санкт-Петербург, Россия

Адрес для корреспонденции: trast1207@mail.ru

Аннотация

Регенеративная медицина, стремящаяся изменить современную медицинскую практику путем устранения коренных причин болезней и расстройств, включает генную терапию, клеточную терапию и продукты тканевой инженерии, предназначенные для увеличения, восстановления, замены или регенерации органов, тканей, клеток, генов и метаболических процессов в организме. Биоматериалы — один из ключевых компонентов регенеративной медицины, на которых базируются успешные стратегии.

Представлен обзор биотехнологических методов, применяемых на этапах восходящего (USP) и нисходящего (DSP) процессов с использованием тутового шелкопряда (*B. mori*), направленных на улучшение качественных характеристик и получение новых видов биоматериалов для удовлетворения потребностей регенеративной медицины и биомедицины. Разнообразие биотехнологических решений, позволяющих получить широкий спектр биоматериалов: производные оболочки кокона — фиброин, серицин и их композиты, рекомбинантные производные, антимикробные пептиды, модифицированные трансгенные шелковые волокна, трансгенные волокна, содержащие факторы роста и пептиды и др., — в совокупности представляет уникальный базис для создания биоиндустриальной платформы на основе тутового шелкопряда.

Ключевые слова: тутовый шелкопряд, биоматериалы, рекомбинантные белки, антимикробные пептиды, фиброин, серицин, трансгенные шелковые волокна, биотехнологическая платформа

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Юматов Е.Н., Евлагина Е.Г., Евлагин В.Г., Лейнвебер Е.Ф., Товпеко Д.В., Дебенек С.С. Возможности биотехнологической платформы тутового шелкопряда (*B. mori*) для регенеративной медицины. *Регенерация органов и тканей*. 2023;1(2):33–54. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-33-54>

Поступила 11.12.2023

Обработана 19.12.2023

Принята к публикации 26.12.2023

Possibilities of *Bombyx mori* (*B. mori*) biotechnological platform for regenerative medicine

Evgeniy N. Yumatov^{1, 2}, Elena G. Evlagina, Viktor G. Evlagin², Evdokia F. Leinweber²,
Dmitry V. Tovpeko³, Semyon S. Debenok³

¹ Individual entrepreneur, Samara, Russia

² Sericulture Research Station — branch of the North Caucasus Federal Scientific Agrarian Center, Stavropol Region, Zheleznovodsk, Russia

³ Research Department (medical and biological research) of the Research Center of the Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russia

Correspondence address: trast1207@mail.ru

Abstract

Regenerative medicine aims at changing modern medicine practice by eliminating core reasons of diseases and disorders. Regenerative medicine includes gene therapy, cell therapy and products of tissue engineering that are destined for augmentation, regeneration or replacement of organs, tissues, genes and metabolic processes in the organism. Biomaterials are amongst key components of regenerative medicine on which successful strategies are based.

The review of biotechnological methods implemented in the USP and DSP stages with the use of *B. mori* was made. The methods analysed are aimed at improving quality characteristics and obtaining new kinds of biomaterials to meet the needs of regenerative medicine and biomedicine. The diversity of biotechnological solutions that allow to gain a wide spectrum of biomaterials (incl. derivatives of cocoon shell such as fibroin, sericin and their composites; recombinant derivatives; antimicrobial peptides; modified transgenic silk fibres; transgenic fibres that contain growth factors and peptides; etc.) is a unique basis for the bioindustrial platform on the *B. mori* basis.

Keywords: silkworm, biomaterials, recombinant proteins, antimicrobial peptides, fibroin, sericin, transgenic silk fibers, biotechnological platform

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Yumatov E.N., Evlagina E.G., Evlagin V.G., Leinweber E.F., Tovpeko D.V., Debenok S.S. Opportunities of the silkworm (*B. mori*) biotechnological platform for regenerative medicine. *Tissue and organ regeneration*. 2023;1(2):33–54. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-33-54>

Received 11.12.2023

Revised 19.12.2023

Accepted 26.12.2023

1. Введение

В качестве биополимера, одобренного FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США), шелк рассматривается для широкого спектра применений, в том числе как многообещающий материал в регенеративной медицине, благодаря своей повышенной био/цитосовместимости, химической стабильности, механическим свойствам, технологичности, возможности контролируемого биоразложения, универсальности функционализации. Шелк как в кристалличе-

ской структуре, так и в аморфном состоянии, демонстрируя уникальные физические и биологические свойства, способствует миграции клеток, дифференциации, росту и взаимодействию белков с поверхностью. Возможность производить современные медицинские инструменты, такие как пленки, волокна, гидрогели, трехмерные пористые каркасы, нетканые каркасы, частицы или композиционные материалы, из необработанного водного раствора подчеркивает универсальность фиброина шелка (SF). Такие устройства способны удовлетворить самые разнообразные

потребности тканей; следовательно, они представляют собой инновационное клиническое решение для лечения костей/хрящей, сердечно-сосудистой системы, регенерации нервной, кожной и поджелудочной тканей, а также для многих других биомедицинских применений [1–3].

Издание Elsevier, учитывая значение шелка для тканевой инженерии и регенеративной медицины, представило уже второе издание — обязательный справочник, в котором всесторонне освещаются биоматериалы на его основе и их использование в биомедицине [4].

Биосовместимость и иммунологический ответ протеинов шелка (в основном фиброина) исследованы A. Thurber и соавт. еще в 2015 году. Представляя обзор биологических реакций на протеины шелка, они отмечали, что использование шелка в качестве биоматериала, помимо его роли шовного материала, изучается уже более десяти лет и благодаря обширным характеристикам *in vitro*, а в последнее время и исследованиям *in vivo* потенциально может стать стандартным клиническим лечением для многочисленных применений [5]. В отношении второго протеина шелка — серицина некоторое время существовало алогичное мнение о его спорной биобезопасности, но это недоразумение относительно серицина, якобы вызывающего неблагоприятные биологические реакции, было прояснено путем тщательного анализа соответствующей литературы и экспериментальной демонстрации того, что серицин вызывает легкие воспалительные реакции, незначительную аллергенность и низкую иммуногенность *in vivo*. Серицин является биобезопасным как природный биоматериал [6]. В последующих исследованиях было подтверждено, что серицин является биосовместимым материалом, не вызывающим тяжелых иммунных реакций, и является многообещающим устойчивым биоматериалом для биомедицинских и фармацевтических применений [7, 8].

Помимо биоматериалов, получаемых из оболочки кокона, тутовый шелкопряд используется в качестве продуцента рекомбинантных производных биоматериалов. Многие рекомбинантные белки были успешно получены в личинках или куколках тутового шелкопряда и использованы в академических и промышленных целях. Биотехнология шелкопряда представляет собой инновационный и простой подход к достижению высоких уровней экспрессии белка и явля-

ется очень многообещающей платформенной технологией в области наук о жизни [9].

Как представленные выше обзоры, так и обзоры, посвященные использованию фиброина шелка как функционального материала для доставки лекарств и генов [10], созданию гибкой электроники на основе фиброина [11], и многие другие великолепные статьи российских и зарубежных исследователей концентрируются на методах переработки оболочки кокона для получения фиброина и серицина шелка, и последующего преобразования, преобразовании в различные формы: гидрогели, губки, пленки, микро- и наносферы, аэрогели и др. и сферах применения производных продуктов, полученных на этапе DSP, то есть продуктов из готового сырья — оболочки кокона тутового шелкопряда в основном в части биополимеров. Биотехнологические возможности, позволяющие улучшать качественные характеристики сырья и получать другие биоматериалы на этапе USP, такие как рекомбинантные производные, материалы с улучшенными качественными характеристиками, менее освещены или представлены как отдельные публикации.

Таким образом, мы предпринимаем попытку представить краткий комплексный обзор исследовательских данных о совокупности основных биотехнологических решений с использованием тутового шелкопряда, которые позволяют, используя подходы снизу вверх в процессе выращивания тутового шелкопряда (восходящий процесс) и подходы сверху вниз, применяемые при переработке полученного сырья (нисходящий процесс), получить широкий спектр биоматериалов, необходимых для решения задач регенеративной медицины и биомедицины. Учитывая многообразие вариантов последующих преобразований в различные формы конечных продуктов и широкого спектра композиционных материалов в нисходящем процессе, уже показанное существующими многочисленными актуальными публикациями, представляемый обзор ограничивается описанием биотехнологических решений восходящего процесса и базовыми формами: фиброина, серицина, композитов фиброина и серицина, в нисходящем процессе.

2. Биотехнологии и биоматериалы этапа USP

В данном разделе освещены методы снизу вверх, реализуемые с целью улучшения качественных характеристик протеинов шелка и продуцирования рекомбинантных продуктов.

2.1. Молекулярная инженерия *B. mori*

Молекулярная инженерия *B. mori*, основанная на методах транзientной экспрессии, или стабильной трансформации зародышевой линии, позволяет получать различные биоматериалы.

Каждая система экспрессии, используемая для получения рекомбинантных производных, имеет свои преимущества и ограничения, на основании которых ее можно рассматривать или отвергать для производства конкретного белка. Поэтому очень важно изучить потенциал и ограничения нескольких систем экспрессии, чтобы выбрать подходящую для производства конкретного белка в промышленном масштабе. Критерии оптимизации системы экспрессии оцениваются по нескольким факторам, таким как продуктивность, эффективность, физиологические характеристики, общая стоимость, безопасность, удобство и условия последующей обработки [12].

Среди доступных систем экспрессии для получения рекомбинантных белков, как отмечал Т. Kato и соавт. (2010), системы клеток насекомых популярны и широко используются для производства белков из высших эукариот, поскольку клетки насекомых имеют сходную структуру и способность к котрансляционным и посттрансляционным модификациям, как и клетки млекопитающих, включая гликозилирование, фосфорилирование и процессинг белков. Клеточные системы насекомых включают систему экспрессии бакуловируса и стабильно трансформированную клеточную систему. В системе экспрессии бакуловируса для продукции белка можно использовать не только культивируемые клетки, но также личинки и куколки насекомых [9].

Сравнительную эффективность различных систем экспрессии, в рамках данной работы возможно частично продемонстрировать, представив данные по выходу конечного продукта. Так, например, при сравнении систем экспрессии рекомбинантного белка в бакуловирусной системе в клетках насекомых (Sf9) и тутового шелкопряда, А Usami и соавт. (2011) отмечали, что производство шелкопряда было более эффективным: один тутовый шелкопряд производил примерно в 70 раз больше белка, чем 10^6 клеток Sf9 в 2 мл культуральной среды [13]. В исследовании, представленном S. Minagawa и соавт. (2020), производство рекомбинантного

фибриногена (rFib) в трансгенной системе тутового шелкопряда составляло 20 мг на 1 г коконов (масса одного кокона — 28,4 мг) [14], а показатель высокоуровневой экспрессии рекомбинантного фибриногена человека с использованием клеток CHO DG44 за счет оптимизации системы экспрессии и условий культивирования составил 1,3 г/л и выше [15]. Для рекомбинантного человеческого кислого фактора роста фибробластов при использовании транзientной системы экспрессии тутового шелкопряда уровни экспрессии оценивались примерно в 600–700 мкг на личинку (вес зрелой личинки находится в диапазоне ~4,3–4,9 г. — Прим. авторов) [16], а в исследованиях по крупномасштабному получению высокостабильного рекомбинантного человеческого кислого фактора роста фибробластов в штамме *Escherichia coli*, представленных В. Yu и соавт. (2021), конечный выход чистого белка в культуре составил $158,6 \pm 6,8$ мг/л [17].

2.2. Факторы роста

Системы экспрессии *B. mori* успешно используются для производства различных рекомбинантных факторов роста, роль которых для регенеративной медицины важна так же, как и роль клеток и каркаса. В регенерации искусственных тканей должна быть установлена «треугольная» (триединая) связь между клетками, матрицами и факторами роста [18]. Ранее М. Супотницкий и соавт. (2015), рассматривая основные технологические процессы, используемые при производстве биомедицинских клеточных продуктов, выделяли в том числе принципы подбора питательной среды для выращивания мезенхимальных стволовых/стромальных клеток (МСК) для терапевтического применения, которые основываются на следующих принципах [19].

1. Питательная среда должна представлять собой «коктейль» из минеральных веществ, аминокислот, витаминов и не должна включать ксеногенные материалы, например сыворотку эмбрионов крупного рогатого скота (FCS) или бычий сывороточный альбумин (BSA), так как существует риск инфицирования культивируемых клеток возбудителями инфекционных болезней животных и последующей их передачи человеку.

2. В составе питательной среды должны быть факторы, ускоряющие рост МСК без изменения их дифференцировки. Например, добавление

в среду ростового фактора тромбоцитов (PDGF) и основного фактора роста фибробластов (bFGF) позволяет сократить цикл культивирования МСК с 4–6 нед. до 2–3 нед.

3. Наличие неохарактеризованных примесей биологически активных веществ способно повлиять на дифференцировку клеток. Например, ростовой фактор тромбоцитов, полученный из лизатов тромбоцитов (PL), сдвигает направление дифференцировки МСК костного мозга в сторону формирования остеобластов. Поэтому факторы роста должны быть получены генно-инженерным путем [20].

Факторы необходимо защищать и тщательно доставлять, поскольку они чувствительны к протеолитической деградации. Из-за их нестабильности при высоких температурах и измененных физиологических условиях используются новые подходы к контролируемому высвобождению факторов роста для повышения их терапевтической эффективности [21]. В связи с этим необходимо отметить, что производные протеины шелка, например в виде гидрогеля, могут служить в том числе и для доставки различных факторов. В частности, для улучшения регенерации ткани суставного хряща была разработана полуразлагаемая гидрогелевая система SF-PEGDMA (фиброин шелка и диметакрилат полиэтиленгликоля — PEGDMA) с помощью механизма физического и фотосшивания для хондрогенеза. Система содержала наночастицы PLGA, нагруженные трансформирующим фактором роста (TGF)- β 1, стволовыми клетками пульпы зуба и основным фактором роста фибробластов (bFGF). Эта двойная система доставки способствовала жизнеспособности клеток, пролиферации и хондрогенной дифференцировке в месте дефекта с образованием хрящеподобной структуры [22].

2.3. Вакцины на основе функциональных вирусоподобных частиц

Помимо рекомбинантных факторов роста, в системах экспрессии тутового шелкопряда возможно получение вирусоподобных частиц (VLP), выступающих в качестве альтернативы вакцинам, которые не обладают способностью к репликации, не имеют вредных эффектов и не являются патогенными. VLP использовались в качестве вакцин благодаря их способности стимулировать сильные клеточные и гуморальные реакции в качестве прямых иммуноге-

нов [23]. Они аналогичным образом имитируют структуру нативных вирусов. Следовательно, они могут усиливать выработку нейтрализующих антител против вирусов, представляя собой безопасную альтернативу вакцинам с аттенуированными живыми вирусами [24].

2.4. Рекомбинантный шелк паука

Нити из паучьего шелка обладают исключительными механическими свойствами, такими как прочность, эластичность и низкая плотность, которые достигают максимальных значений по сравнению с другими волокнистыми материалами. Эти свойства делают их привлекательными для разработки инновационных материалов для медицинской или технической продукции, а также косметики. Однако при выращивании пауков не удается достичь больших объемов шелка из-за каннибалистического поведения этих животных. Чтобы получить белки паучьего шелка (спидроины) в больших масштабах, предпринимаются попытки рекомбинантного производства в различных системах экспрессии, таких как растения, бактерии, дрожжи, насекомые, тутовые шелкопряды, клетки млекопитающих и животные [25]. Значимым событием в этом контексте и в области молекулярной инженерии тутового шелкопряда является фундаментальная работа в области получения высокопрочных цельных волокон паучьего шелка с использованием трансгенных тутовых шелкопрядов. J. Mi и соавт. (2023) применили редактирование генов с помощью технологии редактирования генов (CRISPR/Cas9), чтобы успешно синтезировать цельные полиамидные волокна паучьего шелка из трансгенных тутовых шелкопрядов [26].

2.5. Другие значимые рекомбинантные биоматериалы

К категории данных материалов возможно отнести биоматериалы, также получаемые с помощью методов молекулярной инженерии, такие как рекомбинантные человеческие: фибриноген (rFib), лактоферрин (hLF), фибронектин (rhFN), рекомбинантные белки E-selectin, проколлаген III типа, коллаген I и II типа, а также бифункциональные и модифицированные шелковые материалы, в том числе материалы с включенными синтетическими аминокислотами и волокна шелка, обогащенные антимикробными пептидами. Сводные данные по рекомбинантным и другим производным продуктам представлены в таблице 1.

Таблица 1. Биоматериалы, полученные с использованием методов молекулярной инженерии *B. mori*

Производные биоматериалы	Характеристики и преимущества
Факторы роста, получаемые с помощью методов транзientной (вирусной) экспрессии	
Костный морфогенетический белок-2 (rhBMP-2) [27]	Является широко используемым фактором роста при регенерации костей благодаря его высокой активности и способности индуцировать остеогенную дифференцировку остеобластов и предшественников остеобластов [28]
Кислый фактор роста фибробластов (aFGF) [29]	Играет важную роль в восстановлении повреждений и ремоделировании взрослых тканей в дополнение к эмбриональному развитию и регуляции метаболического гомеостаза [30]
Основной фактор роста фибробластов (bFGF) [29, 31]	Обычно используется для регенерации тканей и в качестве важного компонента в культуральных средах для поддержания индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS) клеток и эмбриональных стволовых (ES) клеток в недифференцированном состоянии [31]
Двойной фактор роста стволовых клеток (rdhSCF) [32]	Способствует выживанию, пролиферации и дифференцировке гемопоэтических клеток [32]
Морфогенетический белок 4 кости человека (BMP4) [33]	Представляют собой цитокины с сильной способностью к образованию новой костной ткани [34]
Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (hGM-CSF) [35]	Широко используемый в качестве терапевтического средства, направленного на нейтропению, у онкологических больных, проходящих химиотерапию, а также у пациентов со СПИДом или после трансплантации костного мозга [35]
Факторы роста, получаемые с помощью стабильной трансформации зародышевой линии (трансгенные шелкопряды)	
Кислый фактор роста фибробластов (haFGF) [36]	Действует как сильный митоген, стимулируя пролиферацию многих типов клеток мезодермального, энтодермального и нейроэктодермального происхождения, и, соответственно, считается, что он играет важную роль в регуляции ангиогенеза и неоваскуляризации во время развития и заживления ран [37]
Фактор роста фибробластов-7 (FGF-7) [38]	Индуктировал пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов в 3D-культуре, способствуя образованию многослойного эпидермиса, экспрессирующего белки-маркеры положительной дифференцировки [38]
Эпидермальный фактор роста (hEGF) [39]	Может существенно способствовать пролиферации эмбриональных клеток, клеток кожи, эндотелиальных клеток и фибробластов, привлекает все большее внимание в области лечения язв и заживления кожных ран [40]
Нейротрофический фактор (нейротрофин-4 – NT-4) [41]	Играет важную роль в поддержании выживания нервных клеток, регуляции дифференцировки и апоптоза нейронов и содействии восстановлению повреждений нервов [41]
Фактор роста тромбоцитов человека (PDGF) [42]	Анализ биологической активности показали, что очищенный рекомбинантный PDGF-BB способен значительно стимулировать рост, пролиферацию и миграцию клеток линии эмбриональных фибробластов мыши (NIH/3T3). Является основным терапевтическим белком, пользующимся большим спросом в клинических условиях (в качестве эффективного митогена и ранозаживляющего агента) [42]
Другие значимые рекомбинантные биоматериалы	
Рекомбинантный фибриноген (rFib) [43]	Фибриноген из крови человека используется в качестве основного компонента коагулянтов, в том числе хирургических тканевых герметиков. Ожидается, что разработка рекомбинантного человеческого фибриногена (rFib) устранил риски инфекций, передающихся через кровь [43]
Рекомбинантный лактоферрин (hLF) [44]	Множественный биофункциональный белок, регулирующий иммунный ответ и, таким образом, имеющий большие перспективы для облегчения иммуносупрессии, вызванной химиотерапией [44]

Продолжение таблицы 1

Производные биоматериалы	Характеристики и преимущества
Рекомбинантные белки E-selectin [45]	Играют ключевую роль в обеспечении взаимодействий, участвующих в клеточной адгезии и миграции, а также в основных процессах, таких как иммунные реакции, метастазирование и трансплантация [45]
Рекомбинантные фибронектины человека: фибронектин Neosilk®, плазма, и фибронектин Neosilk®, клеточный [46]	Является важным белком внеклеточного матрикса и широко используется в качестве каркаса для клеточной культуры, но коммерчески доступные фибронектины обычно получают из крови, что несет в себе риск заражения патогенами и изменчивости от партии к партии [46]
Рекомбинантный проколлаген III типа [47], рекомбинантный коллаген типа II [48], рекомбинантный коллаген типа I [49]	Рекомбинантные коллагены потенциально могут быть использованы в качестве белковозаместительной терапии у пациентов, страдающих генетическими нарушениями, вызванными мутациями в генах коллагена [50]
Вакцины на основе функциональных вирусоподобных частиц	
Рекомбинантная белковая вакцина VP1 норовируса человека, а также белок S коронавируса SARS-2 [51]	Рекомбинантные белковые вакцины с использованием тутового шелкопряда, который имеет преимущество в производстве таких трудноэкспрессируемых вакцинных антигенов, особенно вирусоподобных частиц [51]
Поверхностный белок Plasmodium vivax ookinete (Pvs25) [52]	Кандидат на вакцину, блокирующую передачу вируса (TBV) малярии [52]
Вакцина против гриппа на основе VLP (продуцирование в куколках шелкопряда <i>Eri</i> *) [53]	Вакцина HA VLP против птичьего гриппа (подтип H5) [53]
Вакцина против гриппа на основе VLP (продуцирование в куколках шелкопряда <i>Eri</i> [54]	Продемонстрировала успешную широкую защитную активность против вируса гриппа A [54]
Бифункциональные шелковые материалы	
Бифункциональный шелк, полученный путем совместной экспрессии генов основного фактора роста фибробластов человека (FGF2) и трансформирующего фактора роста-β1 (TGF_β1) у тутового шелкопряда [55]	Улучшенная клеточная пролиферация и противовоспалительная активность [55]
Оболочки кокона с включенным фактором роста фибробластов-7 (FGF-7) [56]	Требуют простых процессов при переработке (лиофилизация и распыление). Успешно использованы для индукции пролиферации и миграции кератиноцитов. Более того, FGF-7, включенный в оболочку кокона, после переработки продемонстрировал замечательную стабильность: более 70% биологической активности сохранялось после хранения в виде суспензии при 25 °C в течение 3 месяцев [56]
Модифицированные протеины шелка	
Трансгенные шелкопряды с дефицитом фиброина [57, 58]	Упрощение методов экстракции и очистки протеинов шелка. Потенциальное использование в тканевой инженерии [57, 58]
Трансгенные шелкопряды, продуцирующие коконы, состоящие исключительно из фиброина [59]	Отсутствие необходимости удаления серицина (дегумирование). Потенциальное использование во всех сферах регенеративной и биомедицины [59]
Волокно, с микросомами серицина, диспергированными в фиброиновых фибриллах [60]	Повышаются водорастворимость и устойчивость фиброин-коллоида в железистой полости шелка, кристалличность, а также улучшаются механические свойства волокон кокона, влагопоглощение и влагоотделение шелка [60]
Включение синтетических аминокислот	
Трансгенные шелкопряды, продуцирующие азидофункционализированное шелковое волокно (AzPhe или AzidoSilk) [61]	Включение синтетических аминокислот, несущих азидогруппы, придает волокнам новые функциональные возможности, таким образом позволяя создавать высокоэффективные биоматериалы, потенциально востребованные в здравоохранении и медицине [61]

Продолжение таблицы 1

Производные биоматериалы	Характеристики и преимущества
Волокна шелка, обогащенные антимикробными пептидами	
Трансгенная линия шелкопряда, способных сверхэкспрессировать антимикробные пептиды цекропина В или морицина [62]	Полученные коконы характеризовались повышенными антимикробными свойствами, а полученное шелковое волокно было способно ингибировать рост бактерий грамотрицательной <i>Escherichia coli</i> [62]. Антимикробные пептиды – основные эффекторы врожденного иммунитета [63]
Рекомбинантный шелк паука	
Высокопрочные цельные волокна паучьего шелка с использованием трансгенных шелкопряда [64]	Волокна продемонстрировали впечатляющую прочность на разрыв 1299 МПа и ударную вязкость 319 МДж/м ³ [64]

Примечание: Порода тутового шелкопряда *Eri* использовалась в силу преимущественных морфологических характеристик по отношению к японским породам тутового шелкопряда.

2.6. Модификации протеинов шелка с использованием методов, нацеленных на улучшение механических характеристик

Рассматриваемые в данном разделе методы направлены на улучшение в том числе одной из важнейших качественных характеристик биополимеров — механических свойств. Вкратце, для эффективности имплантата важны достаточные механические свойства биоматериала, который будет использоваться в тканевой инженерии. Такие факторы, как эластичность, прочность и абсорбция на границе раздела материалов и их деградация, зависят от биостабильности каркасов и имеют важное значение. В общем, биополимерные каркасы должны иметь механические свойства, соответствующие месту имплантации, и должны иметь прочность, необходимую для любой имплантации, требующей хирургической процедуры [65]. Механические характеристики каркаса зависят от материала и процесса производства, который влияет на структурные параметры, такие как геометрия, размер и форма пор [66, 67]. Свойства каркаса выбираются в соответствии с необходимым применением. Чтобы сохранить свою структурную целостность, каркасы также должны быть способны противостоять нагрузкам окружающей среды, возникающим во время эксплуатации. Кроме того, важно сбалансировать предельную прочность и соответствие окружающим тканям при построении каркасов для несущих нагрузок, например в костной тканевой инженерии. Таким образом, каркас должен иметь механические характеристики, аналогичные кости [68, 69].

Механические характеристики полимерного каркаса тесно зависят от молекулярной массы

и кристаллических свойств полимера, которые также влияют на скорость и механизм деградации [70]. D. Kochhar и соавт. (2021) представили обзор по материалобологии шелка, который обладает уникальными механическими свойствами, секвестрацией биоактивных компонентов, способностью к разложению, четко определенной архитектуре и биосовместимости, которые могут регулировать пространственно-временные биохимические и биофизические реакции [71]. Кроме того, механические свойства внеклеточной среды (ECM) тесно связаны с поведением клеток. Эти механические сигналы могут передаваться трансмембранными рецепторами, цитоскелетом или ядерным скелетом, регулируя таким образом экспрессию генов. Было показано, что эластичность матрикса участвует в выживании, пролиферации и дифференцировке клеток [72, 73]. Подходящие механические свойства ECM имеют решающее значение для гомеостаза клетки или ткани. За исключением костей, большинство тканей человека мягкие, о чем свидетельствуют значения модулей сжатия (модулей Юнга) от 1 до 200 кПа [74–76].

Хорошо известно, что многие варианты преобразований нативных форм природных биополимеров белковой природы как в процессе первичной переработки, так и на этапах последующих преобразований в различные формы влекут изменение структурных характеристик и механических характеристик. Интактная форма производных протеинов шелка при первичной переработке имеет отличные от сырья характеристики (подробнее — таблица 1. Механические свойства некоторых полимерных материалов, D. Wang и соавт., (2017)) [77].

Некоторые методы, используемые для улучшения механических характеристик протеинов шелка, представлены в таблице 2.

3. Биотехнологии и биоматериалы этапа DSP

В нисходящем процессе основные биотехнологические решения направлены: на переработку сырья — оболочку кокона, с целью получения различных форм производных продуктов; выделение и очистку рекомбинантных производных, если целевым продуктом являлись рекомбинантные белки и вирусоподобные частицы.

3.1. Методы выделения и очистки рекомбинантных белков

Исходя из места продуцирования рекомбинантных производных: в гемолимфе, жировом теле тутового шелкопряда, в оболочке кокона или в куколке, используются различные варианты экстракции и выделения. В частности (или вкратце), R. Minkner и соавт. (2020) пред-

ставили системный вариант по эффективной очистке рекомбинантного белка из гемолимфы личинок тутового шелкопряда, позиционируемый в качестве первого протокола, позволяющего масштабировать его и для промышленного использования [88]. Варианты очистки и рефолдинга для рекомбинантного haFGF, экспрессированного в коконах трансгенного шелкопряда, представлены F. Wang и соавт. (2015) [36]. Магнитные наночастицы (MNPs) были исследованы как подходящий инструмент для очистки белков из сложного матрикса жирового тела тутового шелкопряда [89]. H. Yagi и соавт. (2020), представляя метод экспрессии меченных изотопами гликопротеинов куколками тутового шелкопряда, описали в том числе и метод экспрессии и очистки рекомбинантного IgG (подробное описание — раздел 2.2) [90]. Вариант очистки вирусоподобных частиц VP1-VLP норовируса — T. Kusakabe (2023) (подробнее — раздел 2.5) [51].

Таблица 2. Модификации, направленные на улучшение механических характеристик биоматериалов протеинов шелка

Методы	Характеристики и преимущества
Методы, основанные на ограничении внешнего пространства при завивке кокона [78, 79]	Модифицированные коконы по сравнению с обычными коконами показали прочность на разрыв и модуль Юнга увеличенные на 44 и 100% соответственно. Термические и механические свойства значительно улучшаются. Имеет потенциальное применение в производстве высокоэффективных композитов и биомиметических материалов [78, 79]
Шелк сухого прядения (завивка кокона проводится при относительной влажности <4% и температуре 22 ± 2 °C) [80]	Шелковое сырье демонстрирует свойства текучести, очень похожие на свойства нативного непряженного шелка. Метод позволяет снизить уровень кристалличности β -листа в получаемом сырье, что в дальнейшем упрощает условия переработки [80]
Способ прямого кормления наночастицами металлов: Cu, Fe и TiO_2 [81, 82], серебра [82]; диоксида титана [81, 83], оксида железа [84], наночастицы: на основе углерода и графена [85]	Установлено, что SF с наночастицами Cu или Fe обладают значительно лучшими механическими свойствами, а основная структура SF хорошо сохраняется [81]. Поглощение наночастиц диоксида титана (TiO_2) шелкопрядами позволяет получить модифицированный шелк с улучшенной прочностью на разрыв и удлинением при разрыве [83]. По сравнению с обычным SF полученный MSF (магнитные шелковые волокна фиброина) обладает не только ожидаемыми магнитными свойствами, но также повышенной термической стабильностью и механическими свойствами [84]. Спектроскопическое исследование показало, что добавки наночастиц препятствуют конформационному переходу фиброина шелка от случайного клубка и α -спирали к β -листу, что может способствовать увеличению модулей удлинения при разрыве и прочности [85]
Сверхпрочный флуоресцентный шелк, полученный путем кормления <i>B. mori</i> углеродными наноточками (CND) [86]	Прочность на разрыв и удлинение флуоресцентного шелка CNDs-1,25 достигали $521,9 \pm 82,7$ МПа и $19,2 \pm 4,3\%$ соответственно, что значительно выше, чем у обычного шелка, и сравнимо с шелками, модифицированными путем последующей обработки. Потенциально полезны в биовизуализации и других приложениях [86]
Метод кормления наночастицами жидкого металла, покрытыми альгинатом [87]	Шелк, обладающий высокой способностью к растяжению, продемонстрировал выдающиеся механические свойства по сравнению с обычным шелком благодаря прочности на разрыв 814 МПа и удлинению при разрыве до 70% — это самый высокий показатель, зарегистрированный на сегодняшний день. Метод позволит расширить производство многофункционального шелка [87]

3.2. Технологические методы и биоматериалы из оболочки кокона

3.2.1. Фиброин (SF)

Н. Yamada и соавт. (2001), анализируя молекулярную массу солубилизованного фиброина, установили, что фиброин разрушается при наматывании, дегумировании (удаление серицина) и растворении шелковых нитей. На основании этих исследований ими был предложен протокол получения солубилизованного протеина, сохраняющего свой нативный молекулярный размер, ключевым пунктом которого является использование именно свежих коконов (коконы, собранные сразу после завершения прядения), а не сухих или намотанных шелковых нитей [91]. Методы обработки фиброина шелка для получения шелковых биоматериалов для различных применений в виде конкретных протоколов, включающих методы извлечения и изготовления: гидрогелей, трубок, губок, композитов, волокон, микросфер и тонких пленок, были представлены D. Rockwood и соавт. в 2011 году [92]. Впоследствии новые исследовательские работы были направлены на оптимизацию и улучшение технологических параметров процесса, установление взаимосвязей между используемыми технологическими методами и качественными характеристиками производных продуктов. Замена стандартного протокола дегумирования повторными кратковременными микроволновыми обработками позволила получить неразложившийся дегумированный фиброин шелка [93]. Н. Kim и соавт. (2016) установили влияние молекулярной массы (MW) SF на физические свойства (т.е. степень набухания, модуль сдвига, прозрачность), а также клеточную адгезию гидрогелей [94]; взаимосвязь методов дегумирования и очистки фиброина шелка как ключевого этапа в протоколе приготовления SF, влияющего на целостность белка, средний размер, распределение и поверхностный заряд частиц [95]; дегумирование с использованием папаина для получения высокомолекулярного SF [96]; сравнительные исследования получения высокомолекулярного фиброина с использованием нейтральных протеаз, в котором бромелайн показал наилучшие результаты [97]; исследования фракций регенерированного фиброина шелка (RSF), установившие, что MW влияет на морфологию и механические свойства нановолокон и губок, хотя никакого влияния MW на вторичную структуру или кристалличность изготовленных материалов не наблюдалось [98]; комплексный обзор изготовления и применения регенерированных шелковых фиброиновых материалов *B. mori* [99].

Н. Kim и соавт. (2016) исследовали и установили влияние молекулярной массы (MW) SF на физические свойства: степень набухания, модуль сдвига, прозрачность, а также клеточную адгезию гидрогелей [94]. Взаимосвязь методов дегумирования и очистки фиброина шелка, как ключевого этапа в протоколе приготовления SF, влияющего на целостность белка, средний размер, распределение и поверхностный заряд частиц, была исследована G. Carissimi и соавт. (2019) [95]. Y. Feng и соавт. (2020) представили процесс дегумирования с использованием папаина для получения высокомолекулярного SF [96]. М. Aoki и соавт. (2021) исследовали фракции регенерированного фиброина шелка (RSF), установив, что MW влияет на морфологию и механические свойства нановолокон и губок, хотя никакого влияния MW на вторичную структуру или кристалличность изготовленных материалов не наблюдалось [97]. X. Liu и соавт. (2023) провели сравнительные исследования получения высокомолекулярного фиброина с использованием нейтральных протеаз, в котором бромелайн показал наилучшие результаты [98]. Комплексный обзор изготовления и применения регенерированных шелковых фиброиновых материалов *B. mori* представлен K. Wang и соавт. (2023) [99].

3.2.2. Серицин (SS)

Серицин шелка — природный белок, извлеченный из коконов тутового шелкопряда, широко изучался и использовался в биомедицинской области благодаря своей превосходной биологической активности и контролируемым химико-физическим свойствам. Серицин является биосовместимым и естественным клеточным адгезивом, обеспечивающим прикрепление, пролиферацию и дифференцировку клеток в материалах на основе серицина. Более того, его многочисленные функциональные группы из вариативного аминокислотного состава позволяют серицину химически модифицировать и сшивать (возможность сшивать это свойство биополимера, направленное на получение композитных материалов с улучшенными свойствами) с образованием универсальных конструкций, служащих альтернативными матрицами для биомедицинских применений. В последнее время серицин используется в различных типах биоматериалов для тканевой инженерии и регенеративной медицины, включая различные объемные конструкции (пленки, гидрогели, каркасы, каналы и устройства) и микронано-препараты [100].

Варианты получения и экстракции серицина шелка основаны на таких аспектах, как растворимость SS в горячих растворах, использование мыла, мочевины, ферментов, а также щелочных или кислотных веществ, или таких устройств, как автоклавы, микроволновые печи и т.п. Все они ориентированы на предотвращение деградации серицина [101]. Последующим этапом является выделение SS, осуществляемое путем фильтрации с использованием мембран, осаждения этанолом, а также сублимационной или распылительной сушки [102, 103]. Соответственно, метод экстракции имеет большое значение, так как влияет на MW полученного серицина [102, 103]. R. Bascou и соавт. (2022) представили сравнительное исследование по бесхимическим методам экстракции SS. В отличие от традиционных методов «обесклеивания» карбонатом натрия и нехимических методов (горячая вода и микроволновая печь), микроволновое рафинирование показало наилучший выход при экстракции, при котором было восстановлено 99,8% серицина [104].

3.2.3. Композиты фиброина и серицина (SF и SS)

Новый подход в биомедицинской науке предполагает получение композиционных материалов. Материалы компонентов обычно имеют ряд недостатков, в том числе механические свойства или плохая стабильность в водной среде, поскольку они набухают, а затем растворяются [105, 106]. Поэтому необходимо модифицировать материалы на основе полимеров путем добавления различных природных или синтетических полимеров [107, 108]. С целью получения биоматериалов, характеризующихся уникальными структурными и механическими свойствами, с лучшими физико-химическими свойствами, можно использовать смеси двух и более полимеров [109]. S. Grabska-Zielińska и соавт. (2021) в своем обзоре привели и обсудили методы улучшения физико-химических и биологических свойств материалов на основе шелка, представили сводные данные по широкой номенклатуре композиционных материалов: список композиционных материалов на основе фиброина шелка с природными — 8 наименований и синтетическими полимерами — 7 наименований для использования в биомедицинской области (табл. 6); трехкомпонентные смеси — 19 наименований для тканевой инженерии (табл. 7); перечень материалов на полимерной основе с наличием неорганических добавок — 6 вариантов по основным неорганическим добавкам (табл. 8) [109].

N. Johari и соавт. (2022) также классифицировали и обобщили смеси фиброина, в том числе и спироина, с двумя группами природных и синтетических полимеров, которые в основном разработаны для улучшения и модификации механических свойств и стимуляции клеточного взаимодействия, такого как прикрепление клеток и скорость пролиферации. Эти смеси разработаны для регенерации твердых и мягких тканей. Кроме того, в процессе исследовательской работы авторы выявили биомеханические закономерности, представленные в заключении: механические свойства, такие как прочность, модуль упругости и удлинение, корректируются так, чтобы имитировать нативный внеклеточный матрикс; кристалличность фиброина является основным фактором, определяющим механические свойства полимера, и изменяется в зависимости от смешивания; если компонент смешивания взаимодействует с фиброином посредством водородных или ковалентных связей, он может индуцировать структуру β -листа и повысить механические свойства до оптимального уровня; с другой стороны, уменьшение содержания фиброина снижает прочность из-за уменьшения части β -листа; в природных полимерах по мере снижения гидрофобности смеси молекулы воды действуют как пластификатор и снижают ударную вязкость [110].

S. Suzuki и соавт. (2019) — одни из первых исследователей, которые изучали композиты фиброина и серицина. Они отметили, что поскольку и фиброин, и серицин обладают уникальными, а также взаимодополняющими свойствами, они имеют потенциал для различных биомедицинских применений, представив метод производства смесей фиброина и серицина за один этап путем обработки целых коконов и последующего изготовления мембран, которые были охарактеризованы и оценены как субстраты для роста фоторецепторных клеток сетчатки [111]. Исследования, проведенные позднее (табл. 3), также выявили значительное улучшение качественных характеристик композитных материалов. В частности, M. Li и соавт. (2022), используя метод отжига горячей водой для получения смесей фиброина и серицина шелка, исследовали в том числе и показатели механической прочности новых композитных пленок SF/SS, показавших значительно более высокие результаты в сравнении с чистой пленкой SF (подробнее — табл. S2, дополнительные материалы) [112].

Таблица 3. Композиты фиброина и серицина (SF и SS), получаемые при первичной переработке

Методы	Характеристики и преимущества
Метод производства смесей фиброина и серицина за один этап путем обработки целых коконов шелкопряда (последующая форма – мембрана) [111]	Смешанные мембраны механически прочнее фиброиновых мембран и приводят к значительному усилению пролиферации клеток. Метод, разработанный в этом исследовании, обеспечивает мембраны на основе шелка с улучшенными характеристиками для применения в тканевой инженерии [111]
Метод переработки целых коконов непосредственно для изготовления новых белковых композитов SS-SF (формы: пленки, губки, монолиты) [113]	Успешное изготовление белковых композитов SS-SF, эффективно сокращающее процесс изготовления материала и сохраняющее нативные свойства белков шелка. Продемонстрирована биосовместимость и низкая иммуногенность этих белковых композитных материалов [113]
Методы: раздельной и одновременной экстракции SF и SS, последующее изготовление гидрогелей [114]	Лиофилизированный композитный гидрогель, образованный SF и SS, можно использовать для улучшения заживления ран при низком иммунном ответе и др. [114]
Метод с использованием обжига кипящей водой для получения смесей фиброина и серицина шелка за один этап путем обработки целых коконов шелка (форма – пленка) [112]	Разработанные композитные пленки SF/SS имеют улучшенные механические свойства. Композитные пленки SF/SS эффективно регулируют зарождение, рост и агрегацию НАр-подобных минералов, а присутствие SS ускоряет раннюю минерализацию материалов на основе SF. Эти композитные пленки могут стать перспективными биоматериалами для восстановления и регенерации надкостницы. [112]

Таким образом, в контексте вышесказанного композитные материалы SF и SS могут стать в ближайшей перспективе в силу своих превосходящих качественных характеристик, «самодостаточными» композитами или послужить основой для создания новых композиционных материалов с другими полимерами природного или синтетического происхождения.

4. Некоторые варианты использования биоматериалов протеинов шелка

Использование протеинов шелка в качестве заменителя фетальной бычьей сыворотки (FBS) для культуры клеток менее известно, но также важно в контексте регенеративной медицины.

Криоконсервация необходима для длительного хранения островковых клеток и повышения практичности клинической трансплантации островков. FBS с добавлением 10% диметилсульфоксида (DMSO) обычно используется в качестве среды для замораживания островковых клеток. Однако в идеале следует избегать использования FBS в культуре клеток и трансплантации. К. Ohnishi и соавт. (2012), исследуя влияние белка серицина на криоконсервированные островки крысы, выявили, что не было существенных различий между замораживающей средой, содержащей 1% серицина, и средой, содержащей 10% FBS, в отношении выживаемости островков и стимулированной секреции инсулина. После

трансплантации островки быстро устраняли гипергликемию и поддерживали нормальный гликемический контроль. Кроме того, использование 7% DMSO в качестве криопротектора с серицином показало те же результаты, что и более высокие концентрации DMSO с FBS [115].

Y. Miyamoto и соавт. (2012) протестировали жизнеспособность и адипогенный/остеогенный потенциал человеческих ASC после замораживания в криоконсервирующей среде, содержащей серицин (~30 кДа). Их экспериментальные результаты подтвердили, что криоконсервирующая среда с серицином благотворно влияет на замораживание человеческих ASC. Эту бессывороточную среду для криоконсервации возможно широко использовать в регенеративной медицине, трансплантации клеток и биологических исследованиях [116].

Y. Jo и соавт. (2019) исследовали протеина шелка с целью разработки заменителя FBS с использованием альтернатив, полученных из шелкопряда, таких как гемолимфа тутового шелкопряда, серицин шелка и фиброин шелка, которые обладают различными физиологическими эффектами и эффектами стимулирования клеток и могут производиться массово. После создания культуры клеток уровни пролиферации клеток и экспрессии генов, связанных с ростом клеток, сравнивали с уровнями контрольных клеток (клетки,

культивированные в среде с 10% FBS). Результаты показали, что экспериментальная группа, получавшая фиброин шелка, могла заменить 10% FBS [117].

5. Обсуждение

Опираясь на инновационные методы создания трансгенных тутовых шелкопрядов, разработанных в Японии, Н. Sezutsu и соавт. (2018) сообщили о создании платформы с использованием трансгенных *B. mori* для разработки фармацевтических и медицинских приложений [118]. F. Wang и соавт. (2021) отмечали, что биоактивные молекулы, такие как факторы роста и антитела, могут совместно экспрессироваться с фиброином/серицином в процессе производства тутового шелкопряда; современная

трансгенная биотехнология продемонстрировала использование тутового шелкопряда в качестве естественного биореактора для экспрессии значительных количеств рекомбинантных чужеродных белков, и, таким образом, эти усилия превратили древний шелковый материал в новый универсальный биофункциональный биоматериал [113].

Помимо интенсивных научных исследований, увеличивается темп внедрения новых продуктов на основе биоматериалов шелка для практического использования. В частности, в апреле 2023 года компания Vaxess Technologies объявила о результатах испытаний, которые показали, что составы фиброина шелка Vaxess защищают липидные наночастицы мПНК (LNPs) при высыхании

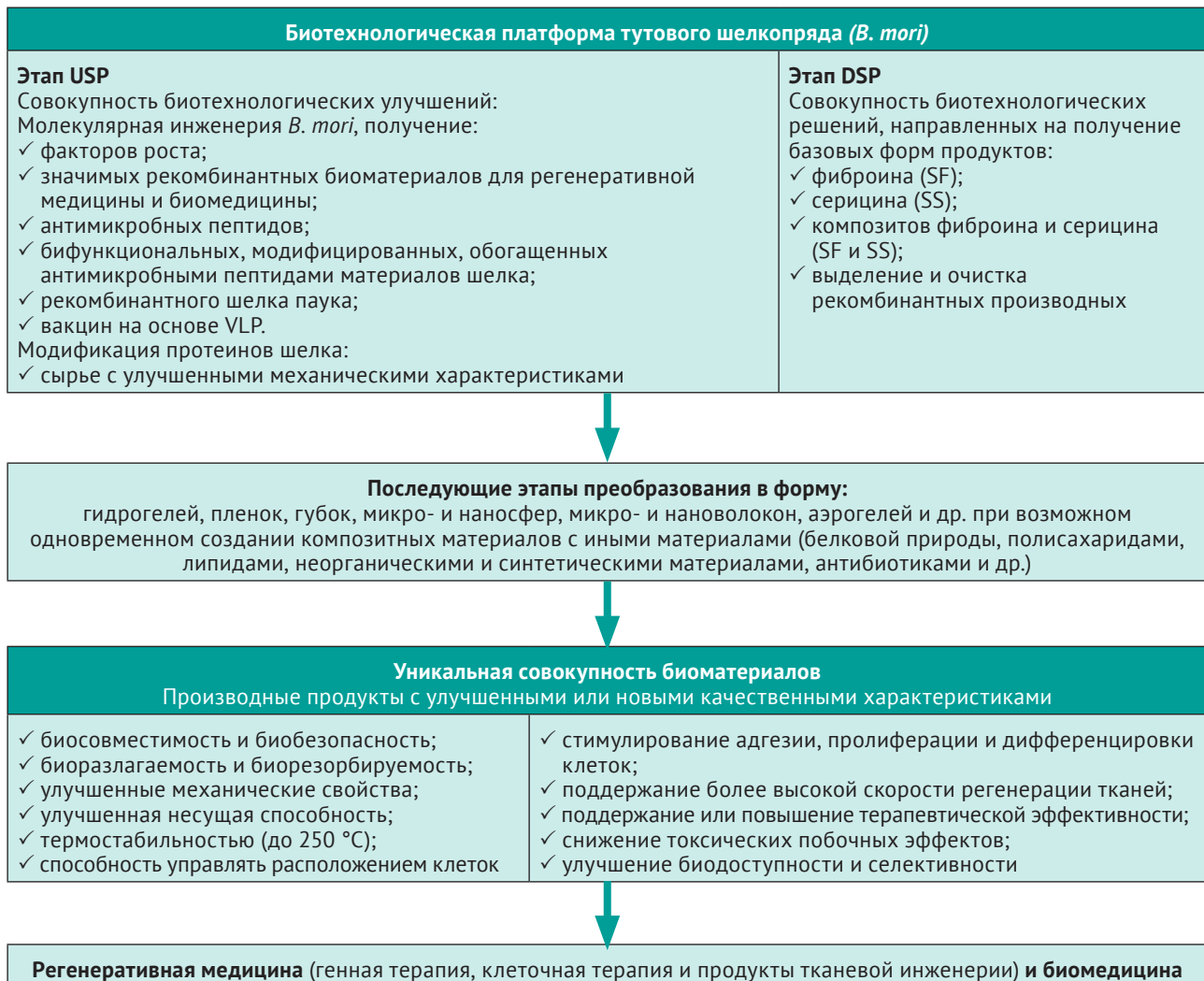


Рис. Возможности биотехнологической платформы тутового шелкопряда для регенеративной медицины и биомедицины

и сохраняют эффективность *in vivo* после хранения при 37 °C в течение двух недель. В августе 2023 года компания объявила о сотрудничестве с AstraZeneca для оценки прототипа вакцины против пандемического гриппа на основе РНК в формате пластыря [119]. В ЕС в рамках программы Horizon осуществляются проекты, направленные на изготовление глазных и коленных имплантатов нового поколения с использованием производных протеинов шелка [120].

Рассматривая в комплексе известные биотехнологические улучшения традиционного шелководства, мы видим, что их совокупность позволяет получить широкий спектр биоматериалов, таким образом, представляя собой биотехнологическую платформу (рис.). Представленные в блок-схеме базовые производные: фиброина и серицина, получаемые на основном этапе преобразования сырья, оболочки кокона тутового шелкопряда, — отнесены к данной категории исходя из возможности их лиофилизации с целью неограниченного хранения [92]. [Rockwood — повтор и др.] Лيوфилизированный SF можно повторно растворить в воде, муравьиной кислоте или 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанолем (ГФИП) в желаемой концентрации [92]. Хранение серицина в сухом состоянии и последующее путем растворения его в горячей воде (например, при 90 °C в течение 5 минут) для приготовления водного раствора серицина были исследованы Н. Lee и соавт. (2023), что подтвердило возможность его использования в биологических целях без проблем с хранением [121]. Хотя в отношении композитов SF и SS еще нет аналогичных исследований, воз-

можно с большой уверенностью, предположить достижение аналогичных результатов в хранении после лиофилизации. Кроме возможности длительного хранения лиофилизированная форма продукта позволяет произвести его беспроблемную транспортировку в любое место и последующее преобразование в необходимые конечные формы.

6. Заключение

В совокупности биотехнологических решений, направленных как на улучшение производственно-экономических показателей традиционного шелководства, так и на получение новых видов продуктов, одним из ключевых является возможность выращивания *B. mori* с использованием искусственной питательной среды (ИПС). Разработанная в РФ ИПС позволяет стабильно выращивать тутового шелкопряда в течение всего года, открывая возможности для практической реализации представленных в обзоре биотехнологий тутового шелкопряда. Таким образом, совокупность улучшений в целом представляет собой уникальную биотехнологическую платформу на основе *B. mori*, способную удовлетворить значительную часть потребностей регенеративной медицины и биомедицины в биоматериалах.

Финансирование исследования: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00247, <https://rscf.ru/project/23-26-00247/>

Funding: The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation № 23-26-00247, <https://rscf.ru/project/23-26-00247/>

Литература

1. Nguyen TP, Nguyen QV, Nguyen V-H, Le T-H, Huynh VQN, Vo D-VN, et al. Silk Fibroin-Based Biomaterials for Biomedical Applications: A Review. *Polymers (Basel)*. 2019; 11(12):1933. DOI: 10.3390/polym11121933
2. Farahani A, Zarei-Hanzaki A, Abedi HR, Daryoush S, Ragheb ZD, Mianabadi F, et al. Silk-Based Biopolymers Promise Extensive Biomedical Applications in Tissue Engineering, Drug Delivery, and BioMEMS. *J Polym Environ*. 2023; 31(11):4559–4582. DOI: 10.1007/s10924-023-02906-x
3. Giorgio G de, Matera B, Vurro D, Manfredi E, Galstyan V, Tarabella G, et al. Silk Fibroin Materials: Biomedical Applications and Perspectives. *Bioengineering*. 2024;11(2):167. DOI: 10.3390/bioengineering11020167
4. Kundu SC. *Silk-based biomaterials for tissue engineering, regenerative and precision medicine*. Second edition. Oxford: Woodhead Publishing, 2023. P. 833–872.
5. Thurber A, Omenetto F, Kaplan D. In vivo bioresponses to silk proteins. *Biomaterials*. 2015;71:145–157. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.039

6. Jiao Z, Song Y, Jin Y, Zhang C, Peng D, Chen Z, et al. In Vivo Characterizations of the Immune Properties of Sericin: An Ancient Material with Emerging Value in Biomedical Applications. *Macromol Biosci.* 2017;17(12):1–6. DOI: 10.1002/mabi.201700229
7. Silva A, Costa E, Reis S, Spencer C, Calhella R, Miguel S et al. Silk Sericin: A Promising Sustainable Biomaterial for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Polymers (Basel).* 2022;14(22):4931. DOI: 10.3390/polym14224931
8. Rahimpour S, Jabbari H, Yousofi H, Fathi A, Mahmoodi S, Jafarian MJ, et al. Regulatory effect of sericin protein in inflammatory pathways; A comprehensive review. *Pathol Res Pract.* 2023;243:154369. DOI: 10.1016/j.prp.2023.154369
9. Kato T, Kajikawa M, Maenaka K, Park EY. Silkworm expression system as a platform technology in life science. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2010;85(3):459–470. DOI: 10.1007/s00253-009-2267-2
10. Tomeh MA, Hadianamrei R, Zhao X. Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Drug and Gene Delivery. *Pharmaceutics.* 2019;11(10):494. DOI: 10.3390/pharmaceutics11100494
11. Wen D-L, Sun D-H, Huang P, Huang W, Su M, Wang Y, et al. Recent progress in silk fibroin-based flexible electronics. *Microsyst Nanoeng.* 2021;7(1):35. DOI: s41378-021-00261-2
12. Mukhtar H, Sahreen S, Sharif S, Ahmad H. Comparison of Host Expression Systems used for Efficient Recombinant Proteins Production. *PPASB.* 2023;60(1):5–28. DOI: 10.53560/PPASB (60-1)731
13. Usami A, Ishiyama S, Enomoto C, Okazaki H, Higuchi K, Ikeda M, et al. Comparison of recombinant protein expression in a baculovirus system in insect cells (Sf9) and silkworm. *J Biochem.* 2011;149(2):219–227. DOI: 10.1093/jb/mvq138
14. Minagawa S, Sekiguchi S, Nakaso Y, Igarashi T, Tomita M. Production of a correctly assembled fibrinogen using transgenic silkworms. *Transgenic research.* 2020;29(3):339–353. DOI: 10.1007/s11248-020-00202-1
15. Hirashima M, Imamura T, Yano K, Kawamura R, Meta A, Tokieda Y, et al. High-level expression and preparation of recombinant human fibrinogen as biopharmaceuticals. *J Biochem.* 2016;159(2):261–270. DOI: 10.1093/jb/mvv099
16. Wu X, Kamei K, Sato H, Sato SI, Takano R, Ichida M, et al. High-level expression of human acidic fibroblast growth factor and basic fibroblast growth factor in silkworm (*Bombyx mori* L.) using recombinant baculovirus. *Protein Expression and Purification.* 2001;21(1):192–200. DOI: 10.1006/prep.2000.1358
17. Yu B, Sun W, Huang Z, Sun G, Le Li, Gu J, et al. Large-Scale Preparation of Highly Stable Recombinant Human Acidic Fibroblast Growth Factor in *Escherichia coli* BL21(DE3) plysS Strain. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:641505. DOI: 10.3389/fbioe.2021.641505
18. Pramanik N, Rath T. Current Scenario of Regenerative Medicine: Role of Cell, Scaffold and Growth Factor. In: S. Haidar Z, Y. Abdurakhmonov I, Barkaoui A, editors. *Biomechanics and Functional Tissue Engineering.* InTech; 2021. DOI: 10.5772/intechopen.94906
19. Sensebé L, Gadelorge M, Fleury-Cappellesso S. Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Res. Therapy.* 2013;4:66. DOI: 10.1186/scrt217
20. Супотницкий М, Елапов А, Меркулов В, Борисевич И, Климов В, Миронов А. Основные технологические процессы, используемые при производстве биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2015;2:36–45.
21. Madappura AP, Madduri S. A comprehensive review of silk-fibroin hydrogels for cell and drug delivery applications in tissue engineering and regenerative medicine. *Comput Struct Biotechnol J.* 2023;21:4868–4886. DOI: 10.1016/j.csbj.2023.10.012
22. Fathi-Achachelouei M, Keskin D, Bat E, Vrana NE, Tezcaner A. Dual growth factor delivery using PLGA nanoparticles in silk fibroin/PEGDMA hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2020;108(5):2041–2062. DOI: 10.1002/jbm.b.34544
23. Grgacic E, Anderson D. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods.* 2006;40(1):60–65. DOI: 10.1016/j.ymeth.2006.07.018
24. Kato T, Deo V, & Park E. Functional Virus-Like Particles Production Using Silkworm and Their Application in Life Science. *Journal of Aquaculture & Research Development.* 2012;s9(01). DOI: 10.4172/2155-952X.S9-001

25. Ramezaniaghdam M, Nahdi ND, Reski R. Recombinant Spider Silk: Promises and Bottle-necks. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:835637. DOI: 10.3389/fbioe.2022.835637
26. Mi J, Zhou Y, Ma S, Zhou X, Xu S, Yang Y, et al. High-strength and ultra-tough whole spider silk fibers spun from transgenic silkworms. *Matter.* 2023;6(10):3661–3683. DOI: 10.1016/j.matt.2023.08.013
27. Ishida N, Tsujimoto M, Kanaya T, Shimamura A, Tsuruoka N, Kodama S, et al. Expression and characterization of human bone morphogenetic protein-2 in silkworm larvae infected with recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J Biochem.* 1994;115(2):279–285. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124329
28. Fung SL, Wu X, Maceren JP, Mao Y, Kohn J. In Vitro Evaluation of Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2 Bioactivity for Regenerative Medicine. *Tissue Eng Part C Methods.* 2019;25(9):553–559. DOI: 10.1089/ten.tec.2019.0156
29. Wu X, Kamei K, Sato H, Sato SI, Takano R, Ichida M, et al. High-level expression of human acidic fibroblast growth factor and basic fibroblast growth factor in silkworm (*Bombyx mori* L.) using recombinant baculovirus. *Protein Expr Purif.* 2001;21(1):192–200. DOI: 10.1006/prep.2000.1358
30. Chen K, Rao Z, Dong S, Chen Y, Wang X, Luo Y, et al. Roles of the fibroblast growth factor signal transduction system in tissue injury repair. *Burns & Trauma.* 2022;10:tkac005. DOI: 10.1093/burnst/tkac005
31. Masuda A, Xu J, Minamihata K, Kagawa G, Hamada Y, Morifuji Y, et al. Production of a biologically active human basic fibroblast growth factor using silkworm-baculovirus expression vector system. *Journal of Asia-Pacific Entomology.* 2018;21(2):716–720. DOI: 10.1016/j.aspen.2018.05.002
32. Han J, Zang Y, Lu H, Zhu J, Qin J. A novel recombinant dual human SCF expressed in and purified from silkworm, *Bombyx mori*, possesses higher bioactivity than recombinant monomeric human SCF. *Eur J Haematol.* 2004;72(4):273–279. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2004.00221.x
33. Imai S, Li Z, Iiyama K, Miyagawa Y, Toyoda M, Umezawa A, Lee J., et al. Biologically active human bone morphogenetic protein 4 fused to collagen-binding domain produced in silkworm-baculovirus expression system. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* 2013;82(2):2039–2044. DOI: 10.11416/jibs.82.2_039
34. Bessa PC, Balmayor ER, Azevedo HS, Nürnberger S, Casal M, van Griensven M, et al. Silk fibroin microparticles as carriers for delivery of human recombinant BMPs. Physical characterization and drug release. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine.* 2010;4(5):349–355. DOI: 10.1002/term.245
35. Kinoshita Y, Xu J, Masuda A, Minamihata K, Kamiya N, Mon H, et al. Expression and purification of biologically active human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) using silkworm-baculovirus expression vector system. *Protein Expr Purif.* 2019;159:69–74. DOI: 10.1016/j.pep.2019.03.010
36. Wang F, Wang R, Wang Y, Zhao P, Xia Q. Large-scale production of bioactive recombinant human acidic fibroblast growth factor in transgenic silkworm cocoons. *Sci Rep.* 2015;5:16323. DOI: 10.1038/srep16323
37. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(3):235–253. DOI: 10.1038/nrd2792
38. Maruta R, Takaki K, Yamaji Y, Sezutsu H, Mori H, Kotani E. Effects of transgenic silk materials that incorporate FGF-7 protein microcrystals on the proliferation and differentiation of human keratinocytes. *FASEB Bioadv.* 2020;2(12):734–744. DOI: 10.1096/fba.2020-00078
39. Wu M, Ruan J, Ye X, Zhao S, Tang X, Wang X, et al. P25 Gene Knockout Contributes to Human Epidermal Growth Factor Production in Transgenic Silkworms. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2709. DOI: 10.3390/ijms22052709
40. Chouhan D, Mandal BB. Silk biomaterials in wound healing and skin regeneration therapeutics: From bench to bedside. *Acta Biomater.* 2020;103:24–51. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.11.050
41. Zhang W, Li Z, Lan W, Guo H, Chen F, Wang F, et al. Bioengineered silkworm model for expressing human neurotrophin-4 with potential biomedical application. *Front Physiol.* 2022;13:1104929. DOI: 10.3389/fphys.2022.1104929

42. Chen W, Wang F, Tian C, Wang Y, Xu S, Wang R, et al. Transgenic Silk Worm-Based Silk Gland Bioreactor for Large Scale Production of Bioactive Human Platelet-Derived Growth Factor (PDGF-BB) in Silk Cocoons. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(9):2533 DOI: 10.3390/ijms19092533
43. Minagawa S, Sekiguchi S, Nakaso Y, Igarashi T, Tomita M. Production of a correctly assembled fibrinogen using transgenic silkworms. *Transgenic Res*. 2020;29(3):339–353. DOI: 10.1007/s11248-020-00202-1
44. Xu S, Tan H, Yang Q, Wang R, Tian C, Ji Y, et al. Fabrication of a Silk Sericin Hydrogel System Delivering Human Lactoferrin Using Genetically Engineered Silk with Improved Bioavailability to Alleviate Chemotherapy-Induced Immunosuppression. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2021;13(38):45175–45190. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsaami.1c08409>
45. Aleisa F, Sakashita K, Lee J, AbuSamra D, Al Alwan B, Nozue S, et al. Functional binding of E-selectin to its ligands is enhanced by structural features beyond its lectin domain. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;295(11):3719–3733. DOI: 10.1074/jbc.RA119.010910
46. IBL America Online Store. Fibronectin Neosilk®, Cellular. 2023. <https://www.ibl-america.com/fibronectin-neosilk-cellular> [Accessed Dec 14, 2023].
47. Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, et al. Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat Biotechnol*. 2003;21(1):52–56. DOI: 10.1038/nbt771.
48. Qi Q, Yao L, Liang Z, Yan D, Li Z, Huang Y et al. Production of human type II collagen using an efficient baculovirus-silkworm multigene expression system. *Mol Genet Genomics*. 2016;291(6):2189–2198. DOI: 10.1007/s00438-016-1251-7
49. Protein Production Business using Transgenic Silkworms | Immuno-Biological Laboratories Co.,Ltd. | IBL. 2023. <https://www.ibl-japan.co.jp/en/business/silkworm> [Accessed Dec 14, 2023].
50. Fertala A. Three Decades of Research on Recombinant Collagens: Reinventing the Wheel or Developing New Biomedical Products? *Bioengineering*. 2020;7(4):155. DOI: 10.3390/bioengineering7040155
51. Kusakabe T. Production of antiviral vaccine antigens using a silkworm-baculovirus expression system. *J Pharmacol Sci*. 2023;151(3):156–161. DOI: 10.1016/j.jphs.2023.01.002
52. Miyata T, Minamihata K, Kurihara K, Kamizuru Y, Gotanda M, Obayashi M, et al. Highly efficient protein expression of Plasmodium vivax surface antigen, Pvs25 by silkworm, *Bombyx mori* and its biochemical analysis; 2022. DOI: 10.1101/2022.03.03.482736
53. Maegawa K, Shibata T, Yamaguchi R, Hiroike K, Izzati UZ, Kuroda K, et al. Overexpression of a virus-like particle influenza vaccine in Eri silkworm pupae, using Autographa californica nuclear polyhedrosis virus and host-range expansion. *Archives of virology*. 2018;163(10):2787–2797. DOI: 10.1007/s00705-018-3941-4
54. Nerome K, Imagawa T, Sugita S, Arasaki Y, Maegawa K, Kawasaki K, et al. The potential of a universal influenza virus-like particle vaccine expressing a chimeric cytokine. *Life Sci Alliance*. 2023;6(1). DOI: 10.26508/lsa.2022015
55. Wang Y, Wang F, Xu S, Wang R, Chen W, Hou K, et al. Genetically engineered bi-functional silk material with improved cell proliferation and anti-inflammatory activity for medical application. *Acta Biomater*. 2019;86:148–157. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.12.036
56. Lian A, Yamaji Y, Kajiwaru K, Takaki K, Mori H, Liew MWO, et al. A Bioengineering Approach for the Development of Fibroblast Growth Factor-7-Functionalized Sericin Biomaterial Applicable for the Cultivation of Keratinocytes. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17): 9953. DOI: 10.3390/ijms23179953
57. Otsuki R, Yamamoto M, Matsumoto E, Iwamoto S, Sezutsu H, Suzui M, et al. Bioengineered silkworms with butterfly cytotoxin-modified silk glands produce sericin cocoons with a utility for a new biomaterial. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(26):6740–6745. DOI: 10.1073/pnas.1703449114
58. Li Y, Wei Y, Zhang G, Zhang Y. Sericin from Fibroin-Deficient Silkworms Served as a Promising Resource for Biomedicine. *Polymers (Basel)*. 2023;15(13):2941.DOI: 10.3390/polym15132941

59. Yamano M, Hirose R, Lye P, Takaki K, Maruta R, On Liew M, et al. Bioengineered Silkworm for Producing Cocoons with High Fibroin Content for Regenerated Fibroin Biomaterial-Based Applications. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13):7433. DOI: 10.3390/ijms23137433
60. Chen X, Wang Y, Wang Y, Li Q, Liang X, Wang G, et al. Ectopic expression of sericin enables efficient production of ancient silk with structural changes in silkworm. *Nat Commun.* 2022;13(1):6295. DOI: 10.1038/s41467-022-34128-5
61. Teramoto H, Iga M, Tsuboi H, Nakajima K. Characterization and Scaled-Up Production of Azido-Functionalized Silk Fiber Produced by Transgenic Silkworms with an Expanded Genetic Code. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3): 616. DOI: 10.3390/ijms20030616
62. Saviane A, Romoli O, Bozzato A, Freddi G, Cappelletti C, Rosini E, et al. Intrinsic antimicrobial properties of silk spun by genetically modified silkworm strains. *Transgenic Res.* 2018;27(1):87–101. DOI: 10.1007/s11248-018-0059-0
63. Li Z, Jiang Y, Cao G, Li J, Xue R, Gong C. Construction of transgenic silkworm spinning antibacterial silk with fluorescence. *Mol Biol Rep.* 2015;42(1):19–25. DOI: 10.1007/s11033-014-3735
64. Mi J, Zhou Y, Ma S, Zhou X, Xu S, Yang Y, et al. High-strength and ultra-tough whole spider silk fibers spun from transgenic silkworms. *Matter.* 2023;6(10):3661–3683. DOI: 10.1016/j.matt.2023.08.013
65. Reddy MSB, Ponnammam D, Choudhary R, Sadasivuni KK. A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers (Basel).* 2021;13(7):1105. DOI: 10.3390/polym13071105
66. Biopolymer-Based Formulations. Elsevier; 2020.
67. George AM, Reddy Peddireddy SP, Thakur G, Rodrigues FC. Biopolymer-based scaffolds. In: *Biopolymer-Based Formulations.* Elsevier; 2020. P. 717–749. DOI: 10.1016/B978-0-12-816897-4.00029-1
68. Chen F-M, Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science.* 2016;53:86–168. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004
69. Pilia M, Guda T, Appleford M. Development of composite scaffolds for load-bearing segmental bone defects. *BioMed Research International.* 2013;2013:458253. DOI: 10.1155/2013/458253
70. Goonoo N, Bhaw-Luximon A, Bowlin GL, Jhurry D. An assessment of biopolymer- and synthetic polymer-based scaffolds for bone and vascular tissue engineering. *Polymer International.* 2013;62(4):523–533. DOI: 10.1002/pi.4474
71. Kochhar D, DeBari MK, Abbott RD. The Materiobiology of Silk: Exploring the Biophysical Influence of Silk Biomaterials on Directing Cellular Behaviors. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:697981. DOI: 10.3389/fbioe.2021.697981
72. Helenius J, Heisenberg C-P, Gaub HE, Muller DJ. Single-cell force spectroscopy. *J Cell Sci.* 2008;121(11):1785–1791. DOI: 10.1242/jcs.030999
73. Vogel V. Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2006;35:459–488. DOI: 10.1146/annurev.biophys.35.040405.102013
74. Chang G, Kim HJ, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL, Kandel R. Enhancing annulus fibrosus tissue formation in porous silk scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92(1):43–51. DOI: 10.1002/jbm.a.32326
75. Hendriks FM, Brokken D, Oomens CWJ, Bader DL, Baaijens FPT. The relative contributions of different skin layers to the mechanical behavior of human skin in vivo using suction experiments. *Med Eng Phys.* 2006;28(3):259–266. DOI: 10.1016/j.medengphy.2005.07.001
76. Salameh N, Peeters F, Sinkus R, Abarca-Quinones J, Annet L, Beek LC, et al. Hepatic viscoelastic parameters measured with MR elastography: correlations with quantitative analysis of liver fibrosis in the rat. *J Magn Reson Imaging.* 2007;26(4):956–962. DOI: 10.1002/jmri.21099
77. Wang D, Liu H, Fan Y. Silk fibroin for vascular regeneration. *Microscopy Research and Technique.* 2017;80(3):280–290. DOI: 10.1002/jemt.22532
78. Cheng L, Tong X, Li Z, Liu Z, Huang H, Zhao H, et al. Natural Silkworm Cocoon Composites with High Strength and Stiffness Constructed in Confined Cocooning Space. *Polymers (Basel).* 2018;10(11):1214. DOI: 10.3390/polym10111214

79. Cheng L, Li Z, Liu Z, Chen S, Bao Y, Gao L, et al. Enhanced thermal and mechanical properties of natural silkworm cocoon composites constructed by multi-silkworm larvae simultaneously. *Materials Letters*. 2019;247:126–130. DOI: 10.1016/j.matlet.2019.03.108
80. Boulet-Audet M, Holland C, Gheysens T, Vollrath F. Dry-Spun Silk Produces Native-Like Fibroin Solutions. *Biomacromolecules*. 2016;17(10):3198–3204. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00887
81. Wu G, Song P, Zhang D, Liu Z, Li L, Huang H, et al. Robust composite silk fibers pulled out of silkworms directly fed with nanoparticles. *Int J Biol Macromol*. 2017;104:533–538. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.069
82. Cheng L, Huang H, Chen S, Wang W, Dai F, Zhao H. Characterization of silkworm larvae growth and properties of silk fibres after direct feeding of copper or silver nanoparticles. *Materials & Design*. 2017;129:125–134. DOI: 10.1016/j.matdes.2017.04.096
83. Cai L, Shao H, Hu X, Zhang Y. Reinforced and Ultraviolet Resistant Silks from Silkworms Fed with Titanium Dioxide Nanoparticles. *ACS Sustainable Chem. Eng*. 2015;3:2551–2557. DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b00749
84. Wang J-T, Li L-L, Feng L, Li J-F, Jiang L-H, Shen Q. Directly obtaining pristine magnetic silk fibers from silkworm. *Int J Biol Macromol*. 2014;63:205–209. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.11.006
85. Wang Q, Wang C, Zhang M, Jian M, Zhang Y. Feeding Single-Walled Carbon Nanotubes or Graphene to Silkworms for Reinforced Silk Fibers. *Nano Lett*. 2016;16:6695–6700. DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b03597
86. Fan S, Zheng X, Zhan Q, Zhang H, Shao H, Wang J, et al. Super-strong and Intrinsically Fluorescent Silkworm Silk from Carbon Nanodots Feeding. *Nanomicro Lett*. 2019;11(1):75. DOI: 10.1007/s40820-019-0303-z
87. Gao Z-F, Zheng L-L, Fu W-L, Zhang L, Li J-Z, Chen P. Feeding Alginate-Coated Liquid Metal Nanodroplets to Silkworms for Highly Stretchable Silk Fibers. *Nanomaterials (Basel)*. 2022;12(7):1177. DOI: 10.3390/nano12071177
88. Minkner R, Xu J, Zagst H, Wätzig H, Kato T, Oltmann-Norden I, et al. A systematic and methodical approach for the efficient purification of recombinant protein from silkworm larval hemolymph. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2020;1138:121964. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.121964
89. Minkner R, Xu J, Takemura K, Boonyakida J, Wätzig H, Park EY. Ni-modified magnetic nanoparticles for affinity purification of His-tagged proteins from the complex matrix of the silkworm fat body. *J Nanobiotechnol*. 2020;18(1):159. DOI: 10.1186/s12951-020-00715-1
90. Yagi H, Yanaka S, Yogo R, Ikeda A, Onitsuka M, Yamazaki T, et al. Silkworm Pupae Function as Efficient Producers of Recombinant Glycoproteins with Stable-Isotope Labeling. *Biomolecules* 2020;10(11):1482. DOI: 10.3390/biom10111482
91. Yamada H, Nakao H, Takasu Y, Tsubouchi K. Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons. *Materials Science and Engineering*. 2001;14(1–2):41–46.
92. Rockwood D, Preda R, Yücel T, Wang X, Lovett M, Kaplan D. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat Protoc*. 2011;6(10):1612–631. DOI: 10.1038/nprot.2011.379.
93. Wöltje M, Kölbel A, Aibibu D, Cherif C. A Fast and Reliable Process to Fabricate Regenerated Silk Fibroin Solution from Degummed Silk in 4 Hours. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(19):10565. DOI: 10.3390/ijms221910565
94. Kim H, Song D, Kim M, Ryu S, Um I, Ki C, et al. Effect of silk fibroin molecular weight on physical property of silk hydrogel. *Polymer*. 2016;90:26–33. DOI: 10.1016/j.polymer.2016.02.054
95. Carissimi G, Lozano-Pérez A, Montalbán M, Aznar-Cervantes S, Cenis J, Villora G. Revealing the Influence of the Degumming Process in the Properties of Silk Fibroin Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 2019;11(12):2045. DOI: 10.3390/polym11122045
96. Feng Y, Lin J, Niu L, Wang Y, Cheng Z, Sun X, et al. High Molecular Weight Silk Fibroin Prepared by Papain Degumming. *Polymers (Basel)*. 2020;12(9):2105. DOI: 10.3390/polym12092105

97. Aoki M, Masuda Y, Ishikawa K, Tamada Y. Fractionation of Regenerated Silk Fibroin and Characterization of the Fractions. *Molecules*. 2021;26(20):6317. DOI: 10.3390/molecules26206317
98. Liu X, Huang Q, Pan P, Fang M, Zhang Y, Yang S, et al. Comparative Study of the Preparation of High-Molecular-Weight Fibroin by Degumming Silk with Several Neutral Proteases. *Polymers (Basel)*. 2023;15(16): 3383. DOI: 10.3390/polym15163383
99. Wang K, Ma Q, Zhou H-T, Zhao J-M, Cao M, Wang S-D. Review on Fabrication and Application of Regenerated Bombyx mori Silk Fibroin Materials. *AUTEX Research Journal*. 2023;23(2):164–183. DOI: 10.2478/aut-2021-0059
100. Liu J, Shi L, Deng Y, Zou M, Cai B, Song Y, et al. Silk sericin-based materials for biomedical applications. *Biomaterials*. 2022;287(17):121638. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2022.121638
101. Castrillón Martínez DC, Zuluaga CL, Restrepo-Osorio A, Álvarez-López C. Characterization of sericin obtained from cocoons and silk yarns. *Procedia Engineering*. 2017;200:377–383. DOI: 10.1016/j.proeng.2017.07.053
102. Aramwit P, Kanokpanont S, Nakpheng T, Srichana T. The effect of sericin from various extraction methods on cell viability and collagen production. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11(5):2200–2211. DOI: 10.3390/ijms11052200
103. Rocha LK, Favaro LI, Rios AC, Silva EC, Silva WF, Stigliani TP, et al. Sericin from Bombyx mori cocoons. Part I: Extraction and physicochemical-biological characterization for biopharmaceutical applications. *Process Biochemistry*. 2017;61:163–177. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.06.019
104. Bascou R, Hardouin J, Mlouka M, Guénin E, Nesterenko A. Detailed investigation on new chemical-free methods for silk sericin extraction. *Materials Today Communications*. 2022;33:104491. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2022.104491
105. Buckley CT, Vinardell T, Thorpe SD, Haugh MG, Jones E, McGonagle D et al. Functional properties of cartilaginous tissues engineered from infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cells. *J Biomech*. 2010;43(5):920–926. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2009.11.005
106. Yang L, Korom S, Welti M, Hoerstrup SP, Zünd G, Jung FJ, et al. Tissue engineered cartilage generated from human trachea using DegraPol scaffold. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003;24(2):201–207. DOI: 10.1016/s1010-7940(03)00263-x
107. Sionkowska A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Progress in Polymer Science*. 2011;36(9):1254–1276. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003
108. Sionkowska A, Michalska M, Walczak M. Preparation and characterization of silk fibroin/collagen sponge with nanohydroxyapatite. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 2016;640(1):106–112. DOI: 10.1080/15421406.2016.1257332
109. Grabska-Zielińska S, Sionkowska A. How to Improve Physico-Chemical Properties of Silk Fibroin Materials for Biomedical Applications?-Blending and Cross-Linking of Silk Fibroin-A Review. *Materials*. 2021;14(6):1510. DOI: 10.3390/ma14061510
110. Johari N, Khodaei A, Samadikuchaksaraei A, Reis RL, Kundu SC, Moroni L. Ancient fibrous biomaterials from silkworm protein fibroin and spider silk blends: Biomechanical patterns. *Acta Biomater*. 2022;153:38–67. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.09.030
111. Suzuki S, Rayner C, Chirila T. Silk fibroin/sericin native blends as potential biomaterial templates. *ATROA*. 2019;5(1): 11–19. DOI: 10.15406/atroa.2019.05.00093
112. Li M, Tian W, Zhang Y, Song H, Yu Y, Chen X, et al. Enhanced Silk Fibroin/Sericin Composite Film: Preparation, Mechanical Properties and Mineralization Activity. *Polymers (Basel)*. 2022;14(12):2466. DOI: 10.3390/polym14122466
113. Wang F, Guo C, Yang Q, Li C, Zhao P, Xia Q, et al. Protein composites from silkworm cocoons as versatile biomaterials. *Acta Biomater*. 2021;121:180–192. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.11.037
114. Han C, Liu F, Zhang Y, Chen W, Luo W, Ding F, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Delivered Using Silk Fibroin and Sericin Composite Hydrogel Promote Wound Healing. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:713021. DOI: 10.3389/fcvm.2021.713021

115. Ohnishi K, Murakami M, Morikawa M, Yamaguchi A. Effect of the silk protein sericin on cryopreserved rat islets. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2012;19(4):354–360. DOI: 10.1007/s00534-011-0415-4
116. Miyamoto Y, Oishi K, Yukawa H, Noguchi H, Sasaki M, Iwata H, et al. Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. *Cell Transplant.* 2012;21(2-3):617–622. DOI: 10.3727/096368911X605556
117. Jo Y, Kweon H, Ji S, Kim J, Kim K. Silk Protein as a Fetal Bovine Serum Substitute for Animal Cell Culture. *Microbiology and Biotechnology Letters.* 2019;47(4):487–497. DOI: 10.4014/mbl.1901.01015
118. Sezutsu H, Sumitani M, Kondo M, Kobayashi I, Takasu Y, Suzuki T, et al. Construction of a Platform for the Development of Pharmaceutical and Medical Applications Using Transgenic Silkworms. *Yakugaku Zasshi.* 2018;138(7):863–874. DOI: 10.1248/yakushi.17-00202-1
119. Biopharma-reporter.com. Vaxess announces \$9 million in funding for mRNA vaccine patch (2023). <https://www.biopharma-reporter.com/Article/2023/09/14/vaxess-announces-9-million-funding-for-mrna-vaccine-patch> [Accessed Dec 14, 2023].
120. Horizon Magazine. Spinning silk into next-generation eye and knee implants (2023). <https://projects.research-and-innovation.ec.europa.eu/en/horizon-magazine/spinning-silk-next-generation-eye-and-knee-implants> [Accessed Dec 15, 2023].
121. Lee HG, Jang MJ, Park B-D, Um IC. Structural Characteristics and Properties of Redissolved Silk Sericin. *Polymers (Basel).* 2023;15(16):3405. DOI: 10.3390/polym15163405

Об авторах

Юматов Евгений Николаевич — индивидуальный предприниматель, научный сотрудник Научно-исследовательской станции шелководства — филиала ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр»

Евлагина Елена Григорьевна — директор Научно-исследовательской станции шелководства — филиала ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр»

Евлагин Виктор Григорьевич — научный сотрудник Научно-исследовательской станции шелководства — филиала ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр»

Лейнвебер Евдокия Федотовна — кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник Научно-исследовательской станции шелководства — филиала ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр»

Товпеко Дмитрий Викторович — младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории (военной терапии) научно-исследовательского отдела (экспериментальной медицины) научно-исследовательского центра Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова

Дебенюк Семён Сергеевич — старший лаборант научно-исследовательской лаборатории (тканевой инженерии) научно-исследовательского отдела (медико-биологических исследований) научно-исследовательского центра Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова

Authors

Evgeniy N. Yumatov — individual entrepreneur, researcher Research Station of Sericulture — branch of the North Caucasus federal agricultural research centre

Elena G. Evlagina — director of the RS of Sericulture — branch of the North Caucasus FARC

Viktor G. Evlagin — researcher Research Station of Sericulture — branch of the North Caucasus federal agricultural research centre

Evdokia F. Leinweber — Ph.D. of Agricultural Sciences, senior researcher Research Station of Sericulture — branch of the North Caucasus federal agricultural research centre

Юматов Е.Н., Евлагина Е.Г., Евлагин В.Г., Лейнвебер Е.Ф., Товпеко Д.В., Дебенюк С.С.

Возможности биотехнологической платформы тутового шелкопряда (*B. mori*) для регенеративной медицины

Dmitry V. Tovpeko — junior researcher of the Research Laboratory of military therapy of the Research Department of experimental medicine of the Research Center of the S.M. Kirov Military Medical Academy

Semyon S. Debenok — senior laboratory assistant of Research Laboratory of tissue engineering of the Research Department of medical and biological research of the Research Center of the S.M. Kirov Military Medical Academy

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-55-59>



Первый клеточный продукт на основе технологий редактирования генома получил одобрение FDA США

П.И. Макаревич

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
119192, г. Москва, Ленинские горы, 1, Россия

Адрес для корреспонденции: makarevichpi@my.msu.ru

Аннотация

Перспективность технологий редактирования генома (ТРГ) для генной терапии стала одним из ключевых драйверов развития в области лечения моногенных наследственных заболеваний. Однако общий консенсус исследователей, разработчиков и многих клиницистов заключается в том, что в ряде случаев баланс риска и пользы от препаратов, основанных на ТРГ и CRISPR/Cas9, в частности, к настоящему времени изучен недостаточно полно. Тем не менее 3 декабря 2023 года Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) США одобрило вывод в обращение двух препаратов для лечения серповидноклеточной анемии. Один из них («Casgevy») является клеточным продуктом, состоящим из CD34⁺ аутологичных гематопоэтических стволовых клеток, в которых с помощью системы CRISPR/Cas9 удастся увеличить продукцию фетального гемоглобина, что приводит к компенсации состояния пациентов. Таким образом, впервые в мировой практике одним из ведущих регуляторов осуществлена регистрация не просто генетически модифицированного клеточного продукта, а продукта, полученного с помощью ТРГ. Этому историческому событию и его важности, а также возможным последствиям посвящено данное короткое сообщение.

Ключевые слова: генная терапия, редактирование генома, наследственные заболевания, FDA США, серповидноклеточная анемия

Конфликт интересов: автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Макаревич П.И. Первый клеточный продукт на основе технологий редактирования генома получил одобрение FDA США. *Регенерация органов и тканей*. 2023;1(2):55–59. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-55-59>

Поступила 12.12.2023

Обработана 19.12.2023

Принята к публикации 22.12.2023

The first genome-edited cell product receives FDA approval

Pavel I. Makarevich

Lomonosov Moscow State University, 119192, Moscow, Leninskiye Gory, 1, Russia

Correspondence address: makarevichpi@my.msu.ru

Abstract

The promise of genome editing technologies (GETs) for gene therapy is one of the key drivers for development of this field to treat monogenic hereditary diseases. However, the general consensus of research community and many physicians is that in some cases the balance of risk and benefit of GET-based drugs and CRISPR/Cas9, in particular, has not been fully studied to date. However, on December 03, 2023, the US Food and Drug Administration (FDA) approved marketing of two products for sickle cell disease. One of them (“Casgevy”) is a cellular product consisting of CD34⁺ autologous hematopoietic stem cells, in which, using the CRISPR/Cas9 system, it was possible to increase the production of fetal hemoglobin, which leads to compensation of patient’s condition. Thus, for the first time in world practice, national regulator has approved not just a genetically modified cell product, but a product obtained using GET. This short message is dedicated to this historical event and its importance, as well as possible consequences.

Keywords: gene therapy, genome editing, hereditary diseases, US FDA, sickle cell anemia

Conflict of interest: the author declares no conflict of interest.

For citation: Makarevich P.I. The first genome-edited cell product receives FDA approval. *Tissue and organ regeneration*. 2023;1(2):55–59. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-55-59>

Received 12.12.2023

Revised 19.12.2023

Accepted 22.12.2023

К настоящему времени ключевым подходом к лечению моногенных наследственных заболеваний стала генно-заместительная терапия, после которой нормальная копия гена, доставленная с помощью вектора, сосуществует с мутантной. Значительный интерес к технологиям редактирования генома (ТРГ) с момента их открытия был связан с возможностью именно стойкого исправления поломок в составе нативных элементов генома. Тем не менее реальная перспектива практического использования ТРГ в генной терапии возникла именно после открытия возможности использования системы CRISPR/Cas9 в клетках млекопитающих. Однако, как это часто бывает, значительные ожидания в биомедицинской науке связаны и с существенными рисками и даже скандальными попытками редактирования и сохранения эмбрионов человека. Несмотря на важность этих исследований с позиции принципиальной

демонстрации возможностей ТРГ, они принесли отрасли существенный репутационный ущерб и создали определенный резонанс, который сопровождал многих исследователей, неукоснительно соблюдавших все этические требования в своей работе.

Тем важнее сразу же после исторического решения FDA США сделать акцент на важности таких прецедентов для прогресса генной терапии как направления. Одобренный для применения препарат «Casgevy» (эксагамглоген аутоотемсел) предназначен для пациентов с серповидноклеточной анемией. От этого наследственного заболевания только в США страдает не менее 100 тыс. человек, что составляет примерно 20% от общемировой популяции [1]. В РФ это заболевание встречается относительно редко, в основном в приграничных с Азербайджаном областях [2]. Это тяжелое и жизнеугрожающее

состояние с учетом его орфанного статуса, несомненно, является логичным показанием для клеточной и генной терапии, а потенциальный баланс риска и пользы оправдывает ускоренный вывод в обращение, который был принят FDA в рамках протоколов прорывной терапии (“fast track” и “breakthrough accelerated approval priority review”).

«Casgevy» представляет собой модифицированные аутологичные гематопозитические стволовые клетки (ГСК), получаемые из периферической крови после мобилизации с помощью колониестимулирующих факторов. Полученные аферезом и обогащенные по CD34⁺ фенотипу ГСК далее *ex vivo* подвергаются процедуре редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9, суть которой заключается в разрушении сайта связывания транскрипционного фактора GATA1 в энхансерной области, взаимодействующей с геном *BCL11A*. Итогом такой манипуляции становится резкое падение экспрессии *BCL11A*, которое приводит к росту экспрессии гамма-глобина и формированию фетального гемоглобина [3].

Трансфузия полученного таким образом клеточного препарата после проведения миелоаблятивной химиотерапии приводила к успешной интеграции ГСК в 100% случаев ($n = 44$). К моменту принятия FDA решения об одобрении «Casgevy» из 31 пациента, получившего его в рамках клинических исследований и доступного для проспективной части, у 29 (93,5%) не было отмечено ни одного эпизода вазоокклюзивных кризов, являющихся одним из наиболее опасных проявлений серповидноклеточной анемии [1, 3]. Таким образом, основанием для ускоренной регистрации стали убедительные данные об эффективности нового препарата в ситуации, когда альтернативные методы лечения оказываются неэффективными, а пациенты постоянно нуждаются в поддерживающих переливаниях эритроцитарной массы.

В целом данный прецедент имеет важнейшее значение для истории развития генной терапии, и следует обсудить некоторые его научные и этические аспекты.

Помимо логичного и обоснованного показания, а также аутологичного протокола применения модифицированных ГСК, ключевым с точки зрения безопасности является применение ТРГ

ex vivo. При этом не происходит доставки вектора, несущего редактор генома, в организм и исключается внесение нецелевых изменений в хроматине. Кроме того, обогащение первично выделенных клеток по маркеру CD34 дополнительно повышает чистоту вводимого клеточного продукта. Важным достижением является и то, что применение ТРГ не привело к ухудшению успешности трансплантации, и в 100% случаев было достигнуто успешное приживление введенного клеточного материала.

С точки зрения общественности также важно и предостеречь от некорректной трактовки этой новости. Принцип действия «Casgevy» и материал, используемый для его получения, исключают передачу внесенных генетических изменений последующим поколениям. Таким образом, данный препарат придерживается ключевого принципа генной терапии и не затрагивает зрелые половые клетки (сперматозоиды и яйцеклетки), а также ооциты и сперматогониальные стволовые клетки. Таким образом, данный препарат принципиально не отличается от достаточно широкого спектра генно-терапевтических клеточных продуктов, основанных на модификации аутологичного материала *ex vivo* для последующей трансплантации донору. Корректным следует признать и обоснованный выбор когорты пациентов — подросткового и взрослого возраста, что исключает тяжелейшие репутационные и этические выборы, стоящие перед врачами и разработчиками при вхождении в педиатрическую практику, особенно в младенчестве и самом младшем возрасте.

Прогресс генной терапии неоднократно замедлялся из-за неблагоприятных событий, связанных с безопасностью разработанных векторных систем, в т.ч. и приводивших к гибели пациентов. Однако в случае клеточных продуктов к настоящему времени не зафиксировано ни одного достоверно связанного с ними случая гибели реципиента. Таким образом, несмотря на кажущуюся комплексность и сложность задачи обеспечения безопасности новых классов клеточных продуктов, в т.ч. на основе ТРГ, к настоящему времени отрасль, разработчики и регуляторы справились с этим вызовом. Нельзя не отметить, что применение Casgevy стало возможным за счет многолетнего опыта трансплантации ГСК, который составляет десятки тысяч успешных случаев применения этой процедуры при гематологических заболеваниях.

Из ключевых фундаментальных вопросов, которые будут еще долго оставаться в поле зрения исследователей, особняком стоит вопрос того, как применение ТРГ влияет на эпигенетический статус ГСК [4, 5]. Действительно, если в отношении последовательности ДНК и внесения нецелевых изменений исследователи в состоянии отследить их с помощью секвенирования (в т.ч. полногеномного), то в отношении эпигенома существующие возможности недостаточны. Пробелы в знаниях о функционировании эпигеномных систем приводят к невозможности предусмотреть и объективно оценить влияние ТРГ на их регуляцию, что требует дополнительной настороженности в этом вопросе. Тем не менее не вызывает сомнений, что фундаментальный прогресс в этой области в будущем позволит нам снять и эти вопросы [6].

Наконец, нельзя не отметить и роль регулятора в этом решении — разработка и внедрение FDA США соответствующих треков и процедур регистрации прорывных и орфанных продуктов является залогом быстрого доведения их до целевых пациентских групп. Эти лучшие практики должны изучаться и по возможности активно внедряться и в российском здравоохранении, особенно с учетом формирования наднациональных процедур Евразийского экономического сообщества и его единого рынка продуктов передовой терапии.

Следует отметить, что к настоящему времени существует реальная перспектива первых регистраций системно вводимых препаратов на основе ТРГ. Так, перспективный кандидат, использующий систему CRISPR/Cas9 и получивший название NTLA-2002, в 2022 году показал первые обнадеживающие данные у пациентов с наследственным ангионевротическим отеком. Выключение с его помощью гена калликреина

(*KLKB1*) привело к снижению уровня этого белка и улучшению течения заболевания у 6 пациентов, получивших NTLA-2002 в низкой (25 мг) и высокой дозах (75 мг) [7]. Такого рода препараты зачастую сложнее дозировать и отслеживать с позиции кинетики, однако их необходимость и целесообразность применения не вызывает сомнений, и можно предполагать, что успех «Casgevy» позволит активнее продвигаться в регистрацию новым кандидатам с системным введением.

Таким образом, хотя обсуждаемое решение FDA не выделялось в череде других новостей о регистрации клеточных продуктов и выводе их на рынок США, нельзя исключать, что с этого момента началось развитие новой отрасли генной терапии с применением ТРГ. Все масштабы и последствия этого мы сможем оценить позже, т.к. одновременно с этим начинается и период наблюдения и тщательного анализа любых сигналов о кратко- и долгосрочной безопасности этого класса препаратов. И долг профессионального сообщества — объективно оценивать и принимать во внимание как позитивные результаты, так и возможные риски и негативные исходы, что позволит обеспечить новую планку безопасности для пациентов.

Финансирование исследования: работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова и по перспективному направлению научно-образовательного развития Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Funding: The work was carried under state assignment of Lomonosov Moscow State University and the prospective direction of scientific and educational development of M.V. Lomonosov Moscow State University “Molecular technologies of living systems and synthetic biology”.

Литература

1. U.S. Food and drug administration (2023). <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-gene-therapies-treat-patients-sickle-cell-disease> [Accessed December, 12, 2024].
2. Румянцев А.Г., Токарев Ю.Н., Сметанина Н.С. Гемоглобинопатии и талассемические синдромы. М.: Практическая медицина, 2015. 448 с.
3. CASGEVY (exagamglogene autotemcel), suspension for intravenous infusion (2023). <https://www.fda.gov/media/174615/download?attachment> [Accessed December, 12, 2024].
4. Cancellieri S, Zeng J, Lin LY, et al. Human genetic diversity alters off-target outcomes of therapeutic gene editing. *Nat Genet.* 2023; 55(1):34–43.

5. Livshits G. Landmark CRISPR Approvals and the Rise of Epigenome Editing. *GEN Biotechnology*. 2023;2(6):476–478.
6. Макаревич П.И. Три десятилетия развития генной терапии: вехи и перспективы. Регенерация органов и тканей. 2023;1(1):16–24.
7. Intellia Therapeutics Announces Positive Interim Clinical Data for its Second Systemically Delivered Investigational CRISPR Candidate, NTLA-2002 for the Treatment of Hereditary Angioedema (HAE) (2022). <https://ir.intelliatx.com/news-releases/news-release-details/intellia-therapeutics-announces-positive-interim-clinical-data> [Accessed December, 12, 2024].

Об авторе

Макаревич Павел Игоревич — к.м.н., лаборатория генно-клеточной терапии, Институт регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова; кафедра биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Author

Pavel I. Makarevich — M.D., Ph.D., Laboratory of Gene and Cell Therapy, Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow; Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow.

Роль Plaur-miR1-5p, кодируемой геном урокиназного рецептора *Plaur*, в процессах ангиогенеза

П.С. Климович^{1,2}, А.В. Реутов¹, А.А. Щипова¹, В.Ю. Сысоева¹, М.С. Арбатский⁴,
К.А. Рубина¹, Е.В. Семина^{1,3}

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119192, г. Москва, Ленинские горы, 1, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России, 121552 г. Москва, ул. Академика Чазова, 15а, Россия

³ «Балтийский федеральный университета им. И. Канта», 236001, г. Калининград, ул. Гайдара, 6, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, РГНКЦ, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1, Россия.

Адрес для корреспонденции: lex2050@mail.ru

Аннотация

Ангиогенез необходим при регенерации органов и тканей, поскольку кровеносные сосуды обеспечивают снабжение питательными веществами и кислородом. Внеклеточные везикулы, секретируемые мезенхимальными стволовыми/стромальными клетками, принимают активное участие в стимуляции процессов ангиогенеза счет содержащихся в них проангиогенных факторов роста и микроРНК. МикроРНК, короткие некодирующие молекулы РНК, играют ключевую роль в ангиогенезе, регулируя пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и миграцию эндотелиальных клеток, а также экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. В настоящей работе мы оценили влияние внеклеточных везикул, содержащих микроРНК Plaur-miR1-5p, на ранние этапы ангиогенеза, а именно на миграцию/пролиферацию сосудистых клеток и формирование капиллярноподобных структур. Plaur-miR1-5p была открыта нами недавно, она экспрессируется с гена урокиназного рецептора (*Plaur*), однако ее функции остаются не изученными. Мы показали, что Plaur-miR1-5p входит в состав внеклеточных везикул и регулирует формирование капиллярноподобных структур на модели сосудистого колечка в Матригеле. Используя биоинформатический анализ, мы идентифицировали возможные гены-мишени Plaur-miR1-5p, вовлеченные в регуляцию ангиогенеза. Данное исследование углубляет понимание фундаментальных процессов регуляции ангиогенеза с участием внеклеточных везикул и содержащихся в них микроРНК, а также расширяет наши представления о функции гена *Plaur*.

Ключевые слова: микроРНК, урокиназный рецептор, ангиогенез, uPAR, внеклеточные везикулы, мезенхимальные стволовые клетки, *Plaur*

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Климович П.С., Реутов А.В., Щипова А.А., Сысоева В.Ю., Арбатский М.С., Рубина К.А., Семина Е.В. Роль Plaur-miR1-5p, кодируемой геном урокиназного рецептора *Plaur*, в процессах ангиогенеза. *Регенерация органов и тканей*. 2023;1(2):60–75. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-60-75>

Поступила 09.08.2022

Обработана 23.05.2023

Принята к публикации 20.06.2023

Onlinefirst: 26.12.2023

The role of Plaur-miR1-5p encoded within the urokinase receptor gene (*Plaur*) in angiogenesis

Polina S. Klimovich^{1,2}, Artem V. Reutov¹, Anna A. Shchipova¹, Veronika Yu. Sysoeva¹, Mikhail S. Arbatsky⁴, Kseniya A. Rubina¹, Ekaterina V. Semina^{1,3}

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Chazov National Medical Research Centre of Cardiology, Moscow, Russia

³ Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Correspondence address: lex2050@mail.ru

Abstract

Angiogenesis plays a crucial role in tissue and organ regeneration by supplying essential nutrients and oxygen through the development of new blood vessels. Mesenchymal stem/stromal cells release extracellular vesicles that actively contribute to angiogenesis by carrying pro-angiogenic growth factors and microRNAs. MicroRNAs, small non-coding RNA molecules, are central players in angiogenesis, affecting endothelial cell proliferation, specialization, migration, apoptosis, and post-transcriptional gene expression.

In the present study, we investigated the impact of extracellular vesicles containing Plaur-miR1-5p microRNAs on angiogenesis, specifically focusing on its initial stages: vascular cell migration and the formation of capillary-like structures. Recently we discovered Plaur-miR1-5p, which is encoded within the urokinase receptor gene (*Plaur*). However, the functions of this microRNA remain largely unexplored. Using a vascular ring model embedded in Matrigel, we demonstrate that Plaur-miR1-5p is encapsulated within extracellular vesicles and plays a regulatory role in capillary-like structure formation. Moreover, applying bioinformatic analysis, we have identified potential target genes of Plaur-miR1-5p that participate in the regulation of angiogenesis.

This study advances our comprehension of the fundamental processes governing angiogenesis, particularly the involvement of extracellular vesicles and microRNAs. Moreover, it sheds light on the functional aspects of the *Plaur* gene, contributing to a more profound understanding of its role in regulation of angiogenesis.

Keywords: microRNA, urokinase receptor, angiogenesis, uPAR, extracellular vesicles, mesenchymal stem/stromal cells, *Plaur*

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Klimovich P.S., Reutov A.V., Shchipova A.A., Sysoeva V.Yu., Arbatsky M.S., Rubina K.A., Semina E.V. The role of Plaur-miR1-5p encoded within the urokinase receptor gene (*Plaur*) in angiogenesis. *Tissue and organ regeneration*. 2023;1(2):60–75. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-60-75>

Received: 01.03.2023

Revised: 23.05.2023

Accepted: 31.05.2023

Onlinefirst: 26.12.2023

Список сокращений:

ЭК — эндотелиальные клетки

ВВ — внеклеточные везикулы

МСК — мезенхимальные стволовые/стромальные клетки

МСК-ЖТ — мезенхимальные стволовые/стромальные клетки из жировой ткани

uPAR — урокиназный рецептор

uPA — урокиназа

MMP-2 — матриксная металлопротеиназа 2

ФБС — фетальная бычья сыворотка

DMEM — Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени

Введение

Ангиогенез естественным образом происходит в организме в эмбриогенезе и во взрослом организме, а также в ответ на повреждение, требующее восстановления кровоснабжения тканей и заживления ран. Образование новых кровеносных сосудов происходит за счет миграции, пролиферации и дифференцировки эндотелиальных клеток (ЭК), а также последующей стабилизации образовавшихся сосудистых отростков с участием перicytот и гладкомышечных клеток [1]. Известно, что мезенхимальные стволовые/стромальные клетки (МСК) принимают активное участие в процессах ангиогенеза посредством продукции целого ряда факторов роста, цитокинов и хемокинов в виде растворимых факторов или в составе внеклеточных везикул (ВВ) [2]. Локальное и системное введение МСК, выделенных из жировой ткани (МСК-ЖТ), способствует увеличению количества сосудов в тканях с нарушенным кровоснабжением, приводит к улучшению кровотока и уменьшению или исчезновению симптомов ишемии, что было показано на моделях ишемии конечности и инфаркта миокарда у экспериментальных животных [3].

Такие эффекты МСК в основном определяются их способностью секретировать ВВ. Считается, что ВВ являются наиболее важными участниками межклеточной коммуникации: они транспортируют различные биоактивные молекулы, которые далее могут эндоцитироваться соседними клетками, что запускает различные сигнальные каскады в клетках-реципиентах. Состав ВВ весьма разнообразен и зависит как от состояния клетки-донора, так и от ее микроокружения. ВВ принимают участие в фор-

мировании, росте и созревании сосудистой системы, а их потенциальное терапевтическое применение в регенеративной медицине и при заболеваниях, связанных с недостаточным ангиогенезом, вызывает растущий интерес [4]. Так, терапевтическое действие ВВ было продемонстрировано на модели инфаркта миокарда у крыс: было показано, что ВВ, продуцируемые МСК костного мозга, эндоцитируются ЭК, что стимулирует образование капиллярноподобных структур *in vitro* и способствует ангиогенезу *in vivo* [5]. В основе этих эффектов лежит активация (NF)-κB сигнального пути, регулирующего транскрипцию генов проангиогенных белков [6]. Для ВВ, полученных из среды культивирования МСК-ЖТ, также было показано терапевтическое действие. В состав ВВ МСК-ЖТ входят такие факторы роста, как PDGF, FGF, EGF, VEGF, SCF и c-kit, которые стимулируют неоваскуляризацию, что приводит к улучшению функции сердца после ишемического повреждения на модели инфаркта миокарда у крыс [5, 7]. Однако наибольший интерес вызывают малые некодирующие РНК (микроРНК) в составе ВВ, имеющие широкий спектр функций в клетке, в том числе задействованных в регуляции процессов ангиогенеза.

МикроРНК представляют собой небольшие некодирующие РНК (~22 нт), которые взаимодействуют с 3'-нетранслируемыми концами (UTR) мРНК-мишеней, ингибируя трансляцию [8]. ВВ, полученные из среды культивирования МСК-ЖТ, содержат большое разнообразие микроРНК различного спектра действия. Так, например, в состав ВВ от МСК-ЖТ входят микроРНК-31, которая имеет проангиогенные свойства и действует путем подавления

экспрессии фактора, ингибирующего HIF-1 α [9]. Другим примером является микроРНК-125, участвующая в спецификации лидирующих клеток (tip cell) путем подавления экспрессии дельта-подобного белка 4 (Dll4) — основного лиганда Notch-рецепторов и стимулирующая миграции эндотелиальных клеток [10]. Еще одним примером микроРНК, обнаруженной во ВВ от МСК-ЖТ и стимулирующей процессы ангиогенеза, является микроРНК-126-3р, регулирующая уровень *Spred-1* в ЭК и вызывающая активацию ERK1/2 [11]. ВВ МСК-ЖТ могут содержать микроРНК, ингибирующие ангиогенез путем связывания мРНК положительных регуляторов. Так, например, микроРНК-222-3р, мишенью которой является ген *STAT5a*, вовлечена в отрицательное ремоделирование сосудов, опосредованное воспалением [12, 13].

В нашей лаборатории была идентифицирована неизвестная ранее микроРНК — *Plaur*-miR1, экспрессируемая с гена *Plaur* [14], однако ее участие в процессах ангиогенеза остается неясным. Урокиназный рецептор (uPAR), являясь частью системы активаторов плазминогена, фокусирует протеолитическую активность урокиназы (uPA), активатора плазминогена урокиназного типа, на поверхности ЭК, тем самым способствуя ангиогенезу. uPA при связывании с uPAR вызывает превращение плазминогена в плазмин, который разрушает внеклеточный матрикс, облегчая миграцию ЭК [15]. В литературе имеется большое количество публикаций, демонстрирующих участие uPAR в регуляции процессов ангиогенеза, включая такие механизмы, как индукция экспрессии матриксной металлопротеиназы 2 (MMP-2), активация рецептора VEGF 2 (VEGFR2; Flk-1/KDR), стимуляция формирования ламеллоподий за счет взаимодействия с витронектином и др. [16].

Также было обнаружено, что в отсутствие uPAR процессы ангиогенеза ингибируются. Так, в миокарде у мышей C57BL/129 (uPAR^{-/-}) с нокаутом гена *Plaur* наблюдаются признаки васкулопатии: уменьшение количества капилляров/артериол, ремоделирование сосудистой стенки и отложение компонентов внеклеточного матрикса. Эти изменения коррелируют с увеличением экспрессии урокиназы и активных форм TGF- β 1 [17]. Наблюдаемые множественные эффекты нокаута гена *Plaur* сложно объяснить одними лишь белковыми взаимодействиями, что позволило нам сделать предположение

о том, что эти процессы могут регулироваться на уровне экспрессии микроРНК с гена *Plaur*.

Таким образом, целью данной работы стало исследование влияния микроРНК *Plaur*-miR1 в составе ВВ МСК-ЖТ на процесс ангиогенеза. *Plaur*-miR1 экспрессируется с интронной области гена *Plaur* и процессируется с образованием двух зрелых форм микроРНК: *Plaur*-miR1-5p и *Plaur*-miR1-3p [18]. Ранее нами была обнаружена их экспрессия в нейтральных клетках и в головном мозге мыши [14].

В настоящей работе мы показали, что одна из зрелых форм (*Plaur*-miR1-5p) входит в состав ВВ от МСК-ЖТ. На эксплантной модели сосудистого колечка в Матригеле мы продемонстрировали, что ВВ от МСК-ЖТ стимулируют миграцию сосудистых клеток, и этот процесс является *Plaur*-зависимым. ВВ от МСК-ЖТ, выделенных из мышей, нокаутных по гену *Plaur*^{-/-}, стимулируют миграцию сосудистых клеток еще сильнее, однако не оказывают стимулирующего эффекта на миграцию ЭК и формирование ими капиллярноподобных структур. Используя *in silico* алгоритм TargetScan для поиска предполагаемых мишеней исследуемой микроРНК (*Plaur*-miR1-5p), нами был предложен ряд генов-кандидатов, регулирующих процессы ангиогенеза. Полученные результаты указывают на сложность и многообразие не только белок-белковых взаимодействий в процессах ангиогенеза, но и на механизмы регуляции генов с участием микроРНК.

Материалы и методы

1. Работа с животными

В работе использовали самцов мышей в возрасте 6 недель, лишенных гена *Plaur* (*Plaur*^{-/-}) C57Bl6/SV129, и мышей дикого типа (WT) C57BL/6NTac RRID:MGI:5658006. Мышей содержали в виварии лаборатории трансляционной медицины ФФМ МГУ в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» (Правила оборудования помещений и организации процедур). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Приказа № 267 Минздрава РФ «Об утверждении правил лабораторной практики» от 19 июня 2003 г., «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Мышей использовали для получения брюшной аорты и жировой ткани с последующим выделением мезенхимных стволовых/

стромальных клеток (МСК) для наработки и выделения внеклеточных везикул.

2. Выделение и культивирование первичной культуры МСК мышей

Мышей WT и мышей *Plaur*^{-/-} летально анестезировали внутрибрюшинным введением авертина и иммобилизовали на столике. Протирали кожу и шерсть животного спиртом, надрезали кожу в районе паха и продолжали разрез вдоль брюха. Фиксировали кожные лоскуты и собирали жировую ткань в пробирки объемом 1,5 мл с двукратным раствором антибиотика-антимикотика (HyClone, Новая Зеландия), приготовленном на буфере Хэнкса («ПанЭко», Россия). Для получения первичных МСК в стерильных условиях культурального бокса жировую ткань мышей фрагментировали до однородной массы в чашке Петри с небольшим количеством среды DMEM (Gibco, США), полученную суспензию подвергали ферментативной обработке с добавлением 200 ед/мл коллагеназы I типа и диспазы (40 ед/мл) (Worthington Biochemical, США) при 37 °C в течение 60 минут. Затем образцы центрифугировали 10 мин при 200 g, осадок ресуспендировали в среде DMEM с добавлением 10% сыворотки, 1-кратного раствора антибиотика-антимикотика. Клетки высевали в одинаковом количестве (1×10⁵ мл) в культуральные чашки Петри. Среда культивирования меняли каждые 3–4 дня. Все эксперименты были выполнены на клетках первых 5 пассажей.

3. Выделение и концентрирование внеклеточных везикул

После достижения клетками монослоя (примерно 48 ч после адгезии) клетки промывали буфером Хэнкса («ПанЭко», Россия), среду культивирования меняли на DMEM, содержащий сыворотку без экзосом (Fetal Bovine Serum, exosome-depleted Gibco). Через 48 ч среду культивирования собирали для последующего выделения ВВ. Полученную среду центрифугировали в течение 10 мин при 300 g для удаления клеточного дебриса. Для отделения и концентрирования фракции ВВ использовали метод ультрафильтрации на центриконах Vivaspın 20 (1000 кДа, Sartorius, Великобритания).

4. Характеристика внеклеточных везикул, секретируемых МСК мыши

Определение размера частиц и концентрацию ВВ проводили с помощью метода анализа траектории наночастиц (NTA) и прибора

ZetaView (Particle Metrix, Германия). Измерения проводили в режиме «бокового светорассеяния» при 25 °C. Для измерения использовали лазер с длиной волны 488 нм, объектив 10× и высокочувствительную камеру с матрицей КМОП-типа. Все измерения были выполнены в соответствии с рекомендациями стандарта ASTM E2834-12 с использованием протокола (SOP). Измерения каждого образца проводили в 5–10 повторах для достижения суммарного количества измеренных траекторий не менее 2500. Для обработки результатов и построения графиков использовали приложение ZetaView Analyzer (Particle Metrix, Германия).

5. Выделение брюшной аорты

Мышей дикого типа (WT) летально анестезировали внутрибрюшинным введением авертина, обескровливали путем декапитации и иммобилизовали на столике. Протирали кожу и шерсть животного спиртом. Удаляли кожу и делали боковые разрезы в зоне мечевидного отростка, стерильными инструментами отделяли аорту от соединительной ткани, проксимально отсекали на уровне аортальной дуги и дистально на уровне бифуркации. Выделенную аорту помещали в чашку Петри со стерильным охлажденным буфером Хэнкса, обескровливали и очищали от интимы. Все дальнейшие манипуляции осуществлялись в стерильных условиях.

6. Эксплантная модель *ex vivo* сосудистого колечка в Матригеле

Укомплектованную среду культивирования, содержащую однократный раствор антибиотика-антимикотика и EGMTM-2 BulletKit™, нагревали на водяной бане до температуры +37 °C. Размороженный Матригель (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix, США) помещали на подложку со льдом. Одноразовым стерильным скальпелем разрезали аорту на 7–8 частей для получения сосудистых колечек. В лунки 8-луночных культуральных планшетов Nunc® Lab-Tek® Chambered Coverglass помещали каплю Матригеля объемом 100 мкл, смешанную в соотношении 1:1 с ВВ, полученными от МСК мышей дикого типа (Везикулы WT), либо с ВВ, полученными от МСК мышей с нокаутом гена *Plaur* (Везикулы *Plaur*^{-/-}), либо со средой DMEM в качестве контроля. Далее стерильным пинцетом в каплю Матригеля помещали по одному сосудистому колечку так, чтобы эксплант располагался в середине объема капли. Планшет инкубировали 30 минут при +37 °C для полимеризации

Матригеля, затем вносили по 400 мкл предварительно нагретой укомплектованной среды и помещали в инкубатор. Культивировали в течение 5 суток.

7. Визуализация при помощи фазово-контрастной микроскопии

Изображения получали с помощью фазово-контрастного светового микроскопа Leica DMI 6000B, оснащенного цифровой камерой DFC 7000T и программой для анализа изображений LAS X (Leica Microsystems, Германия). Съемку проводили при увеличении 10×, масштабный отрезок — 750 нм.

8. Иммунофлуоресцентное окрашивание

Для предотвращения деполимеризации Матригеля все процедуры проводили при температуре 37 °С. Для иммунофлуоресцентного окрашивания экспланты промывали теплым фосфатно-солевым буфером («ПанЭко», Россия). Все растворы готовили на фосфатно-солевом буфере. Экспланты фиксировали в 4%-ном формальдегиде в течение 12 ч. После фиксации промывали буфером в течение 12 ч, затем пермеабилизировали 0,2%-ным Тритоном X-100 (Triton®X-100, Peroxide Free, Panreac, Испания) в течение 12 ч и повторяли промывку в буфере в течение 12 ч. Далее образцы обрабатывали 5%-ным BSA (Sigmaaldrich), содержащим 0,2% Тритона X-100, в течение 12 ч для блокирования неспецифического связывания. Затем образцы инкубировали в растворе первичных антител против VE-кадгерина (ID sc-9989, 1:500, SantaCruz, США) в течение 12 ч. После этого образцы промывали в буфере в течение 12 ч, инкубировали в растворе вторых антител AlexaFluor®488 (1:500, Molecular Probes, США). Ядра окрашивали DAPI (Sigma, США, 1:10 000). Для предотвращения контаминации образцы хранили в буфере, содержащем 0,001% азида натрия NaN₃. Количество мигрирующих клеток оценивали с помощью конфокальной микроскопии с последующим анализом с помощью программы для анализа изображений (ImageJ, США).

9. Визуализация при помощи конфокальной микроскопии

Изображения получали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с помощью системы (TCS SP5, Leica, Германия), оснащенной объективом Plan-Apo ×20. DAPI и AlexaFluor®488, последовательно возбуждая лазерами с длиной

волны 405 и 488 нм соответственно. Все изображения были получены при одинаковых настройках конфокального усиления и смещения. Изображения (1024×1024 пикселя) сохраняли в формате TIFF в программе LeicaLAS. Изображения представлены в виде наложения зеленой и синей флуоресценции.

10. Обработка микрофотографий сосудистого колечка

Анализ изображений проводили в программе ImageJ. Миграцию сосудистых клеток оценивали с использованием двух показателей: площади, занимаемой мигрирующими/пролиферирующими клетками, и количества мигрирующих клеток из эксплантов в Матригель. На изображениях, полученных на фазово-контрастном микроскопе, оценивали площадь эксплантов и общую площадь с включением всех мигрирующих/пролиферирующих клеток. Площадь рассчитывали как разницу между двумя этими переменными. Оценку количества ЭК проводили посредством подсчета флуоресцирующих клеток, положительно окрашенных антителами на VE-cadherin и DAPI, на изображениях, полученных с помощью конфокального микроскопа.

11. Полиаденилирование

Для проведения реакции обратной транскрипции и последующего ПЦР в реальном времени выделенные микроРНК полиаденилировали. Для полиаденилирования использовали набор Poly(A) Polymerase NEB# M0276 (New England BioLabs, США) в соответствии с протоколом производителя. 5 мкг микроРНК ресуспендировали в 15 мкл воды свободной от нуклеаз, добавляли 2 мкл буфера для полимеразной реакции, 2 мкл АТФ и 1 мкл полимеразы. Инкубировали при 37 °С в течение 30 минут. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ.

12. Выделение микроРНК, обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ)

Короткие РНК (малые РНК размером менее 200 нт, включая при-микроРНК, пре-микроРНК и зрелые микроРНК) выделяли из фракции BV коммерческим набором mirVana miRNA Isolation Kit (AM1560, Ambicon, Carlsbad, США) согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию выполняли с использованием набора MMLV RT («Евроген», Россия)

в соответствии с протоколом производителя. Синтез кДНК проводили из 500 мкг РНК с использованием праймеров oligo-dT и random-dT. ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) и системы детекции CFX96 (BioRAD) при следующих параметрах программы: начальная денатурация при 95 °C в течение 5 минут с последующими 40 циклами при 95 °C в течение 15 с, полимеризации праймеров при 57 °C 30 с и элонгации продукта при 72 °C в течение 10 с. *Snord95* использовали в качестве референсного гена. Относительную экспрессию рассчитывали при помощи метода $\Delta\Delta C_t$. Нормализацию проводили, принимая за единицу средний уровень транскрипта в контроле. Использовали следующие последовательности прямых праймеров: TGGTGATTGGCTGCCAGGTTC для *Plaur-miR1-5p*, AGAACCTGGCCGCCAACACA для *Plaur-miR1-3p*, AACACGTGCCAACAGTGATGAC для *Snord95*. В качестве обратного праймера использовали oligo-dT праймер.

13. Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили в программе SigmaPlot версии 11.0. Сравнение между группами проводили при помощи One-Way ANOVA с последующим *post hoc* тестом Тьюки для множественных сравнений. Парные сравнения проводили с помощью *T*-теста Стьюдента. Статистически достоверными считались отличия при $p < 0,05$.

14. Биоинформатический поиск мишеней микроРНК

Для нуклеотидной последовательности микроРНК *Plaur-miR1-5p* 5'-UGGUGAUUGGCUGC-CAGGUUC-3' (идентифицирована ранее [14]) был проведен поиск мишеней с помощью базы данных TargetScan (Release 8.0) [19]. Алгоритм TargetScan идентифицирует в UTR-области сегменты, идеально комплементарные основаниям 2-8 микроРНК; далее расширяет каждую затравку дополнительными парами оснований и оптимизирует сопряжение оставшейся 3' части микроРНК с 35 основаниями UTR; присваивает свободную энергию сворачивания *G* каждому такому взаимодействию микроРНК с целевым сайтом; сортирует UTR по Z-баллу и присваивает каждому из них ранг R_i ; повторяет этот процесс для набора UTR; предсказывает в качестве мишеней те гены, для которых $Z_i \geq Z_C$ и $R_i \leq R_C$ для ортологичной последовательности UTR, где Z_C и R_C — заранее выбранные

значения Z-балла и ранга. Из всех параметров алгоритма TargetScan 2 использовался показатель контекста (Context++ score) [20], учитывающий дополнительные 14 характеристик факторов микроокружения. Таким образом, было найдено 7620 потенциальных мишеней, из которых для дальнейшего анализа была использована 761 мишень с величиной Context++ score выше 90.

После этого была проведена кластеризация алгоритмом K-means 3 (алгоритм k-средних) [21]. 761 гена-мишени было выявлено с помощью базы данных STRING 4 [22].

При запуске алгоритма использовали различные значения k , однако при его значении, равном 3, в одном из трех полученных кластеров (226 генов) были сконцентрированы гены, относящиеся к GO:0072577 (Endothelial cell apoptotic process) (3 из 10 генов термина), GO:1905562 (Regulation of vascular endothelial cell proliferation) (5 из 31 генов термина), GO:0001525 (Angiogenesis) (12 из 346 генов термина), GO:0048514 (Blood vessel morphogenesis) (14 из 461 гена термина) и GO:0001568 (Blood vessel development) (17 из 568 генов термина).

Результаты

1. Везикулы, полученные от клеток с нокаутом гена *Plaur*, стимулируют образование капилляроподобных структур

Влияние ВВ на рост и регенерацию сосудов оценивали на модели сосудистого колечка в Матригеле. Аорту мышей дикого типа культивировали в Матригеле с добавлением ВВ, полученных от клеток МСК-ЖТ, выделенных из мышей WT или *Plaur*^{-/-}, в течение 5 дней. Далее проводили съемку на фазово-контрастном микроскопе для оценки формирования капилляроподобных структур. Рассчитывали площадь зоны миграции сосудистых клеток из эксплантов в Матригель относительно общей площади экспланта. При анализе оказалось, что ВВ WT достоверно стимулируют миграцию сосудистых клеток по сравнению с контролем (среда без везикул). При этом площадь миграции клеток после добавления ВВ от МСК-ЖТ из *Plaur*^{-/-} мышей была максимальной по сравнению с контролем (среда без везикул) и с ВВ от МСК мышей WT. Эти данные свидетельствуют о том, что в отсутствие гена *Plaur* наблюдается максимальная миграция сосудистых клеток на модели сосудистого колечка (рис. 1).

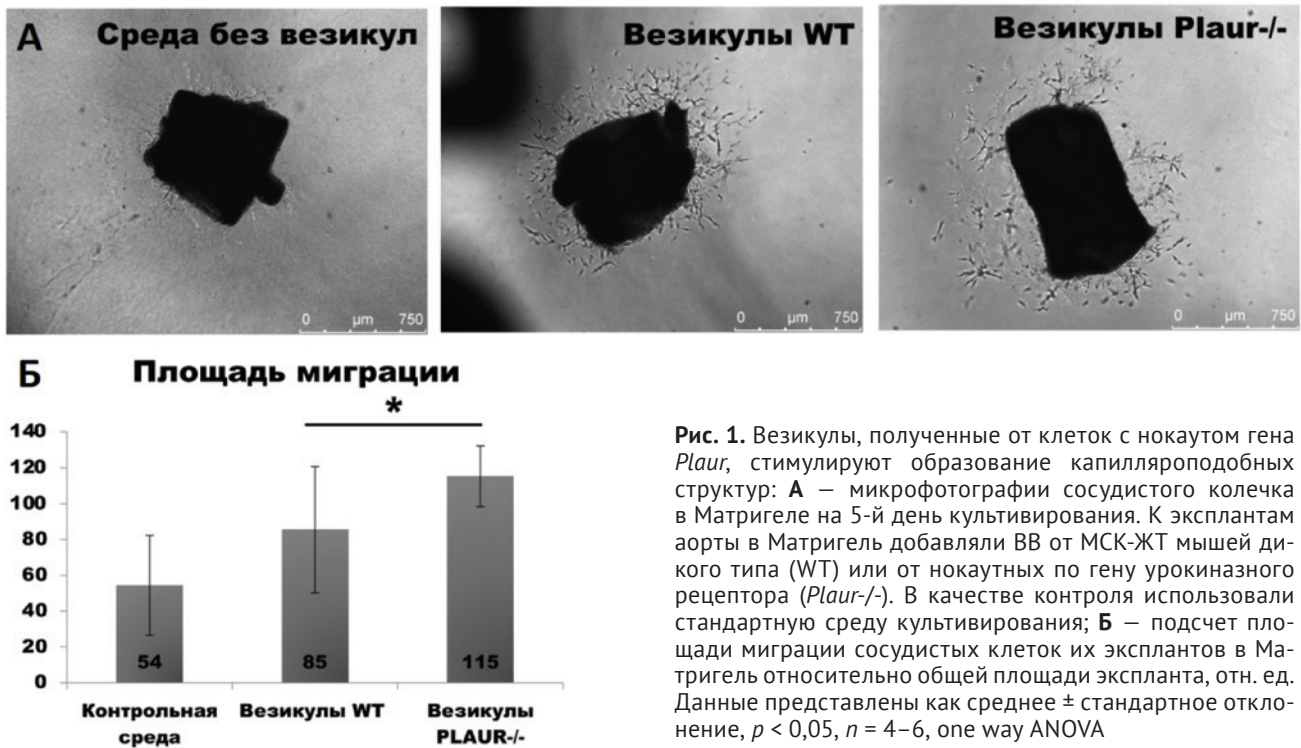


Рис. 1. Везикулы, полученные от клеток с нокаутом гена *Plaur*, стимулируют образование капилляроподобных структур: **А** — микрофотографии сосудистого колечка в Матригеле на 5-й день культивирования. К эксплантам аорты в Матригель добавляли ВВ от МСК-ЖТ мышей дикого типа (WT) или от нокаутных по гену урокиназного рецептора (*Plaur*^{-/-}). В качестве контроля использовали стандартную среду культивирования; **Б** — подсчет площади миграции сосудистых клеток их эксплантов в Матригель относительно общей площади экспланта, отн. ед. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, $p < 0,05$, $n = 4–6$, one way ANOVA

2. Везикулы от мышей дикого типа, но не *Plaur*^{-/-}, стимулируют миграцию эндотелиальных клеток

Далее полученные экспланты сосудистого колечка окрашивали антителами к VE-кадгерину для иммунофлуоресцентного анализа миграции/пролиферации ЭК. Оценивали количество VE-кадгеринпозитивных клеток относительно общего числа клеток (рис. 2). Оказалось, что ВВ от МСК-ЖТ WT мышей достоверно стимулировали миграцию/пролиферацию VE-кадгеринпозитивных ЭК по сравнению с контрольной средой, в отличие от ВВ *Plaur*^{-/-}, которые таким действием не обладали. Однако при подсчете общего числа клеток оказалось, что данный показатель выше в группе ВВ *Plaur*^{-/-} по сравнению с ВВ WT и контрольной средой.

Возможным объяснением данного феномена может являться то, что в выбранной экспериментальной модели помимо ЭК из эксплантов также мигрируют гладкомышечные клетки, перициты и МСК. Вероятно, нокаут гена *Plaur*^{-/-} приводит к изменению состава ВВ таким образом, что они теряют способность стимулировать образование капилляроподобных структур ЭК, но приобретают способность стимулировать миграцию/пролиферацию остальных клеток. Такое разнонаправленное действие ВВ может

объясняться изменением в составе микроРНК, являющихся их важным компонентом.

3. Идентификация микроРНК *Plaur*-miR1-5p и *Plaur*-miR1-3p в составе везикул, секретируемых МСК-ЖТ

Обнаружив различия в действии ВВ, полученных из МСК-ЖТ мышей дикого типа (WT) и нокаутных по гену урокиназного рецептора (*Plaur*^{-/-}), мы предположили, что это может быть связано с изменением состава микроРНК в самих ВВ. Ранее в клетках нейрального происхождения Neuro2A и головном мозге мыши нами была идентифицирована при-микроРНК *Plaur*-miR1, экспрессируемая с гена урокиназного рецептора *Plaur* [14] и процессируемая с образованием двух зрелых форм: микроРНК *Plaur*-miR1-5p и *Plaur*-miR1-3p. Чтобы проверить это предположение, мы выделили фракцию микроРНК из ВВ от МСК из мышей WT и *Plaur*^{-/-} и проанализировали в ней экспрессию *Plaur*-miR1-5p и *Plaur*-miR1-3p методом ПЦР-РВ. *Plaur*-miR1-5p была обнаружена в ВВ WT, но не *Plaur*^{-/-}, что дополнительно подтверждает зависимость ее экспрессии от наличия гена урокиназного рецептора и позволяет предположить ее роль в регуляции миграции сосудистых клеток (рис. 3). *Plaur*-miR1-3p в ВВ обнаружена не была, что позволяет предположить только ее внутриклеточную функцию.

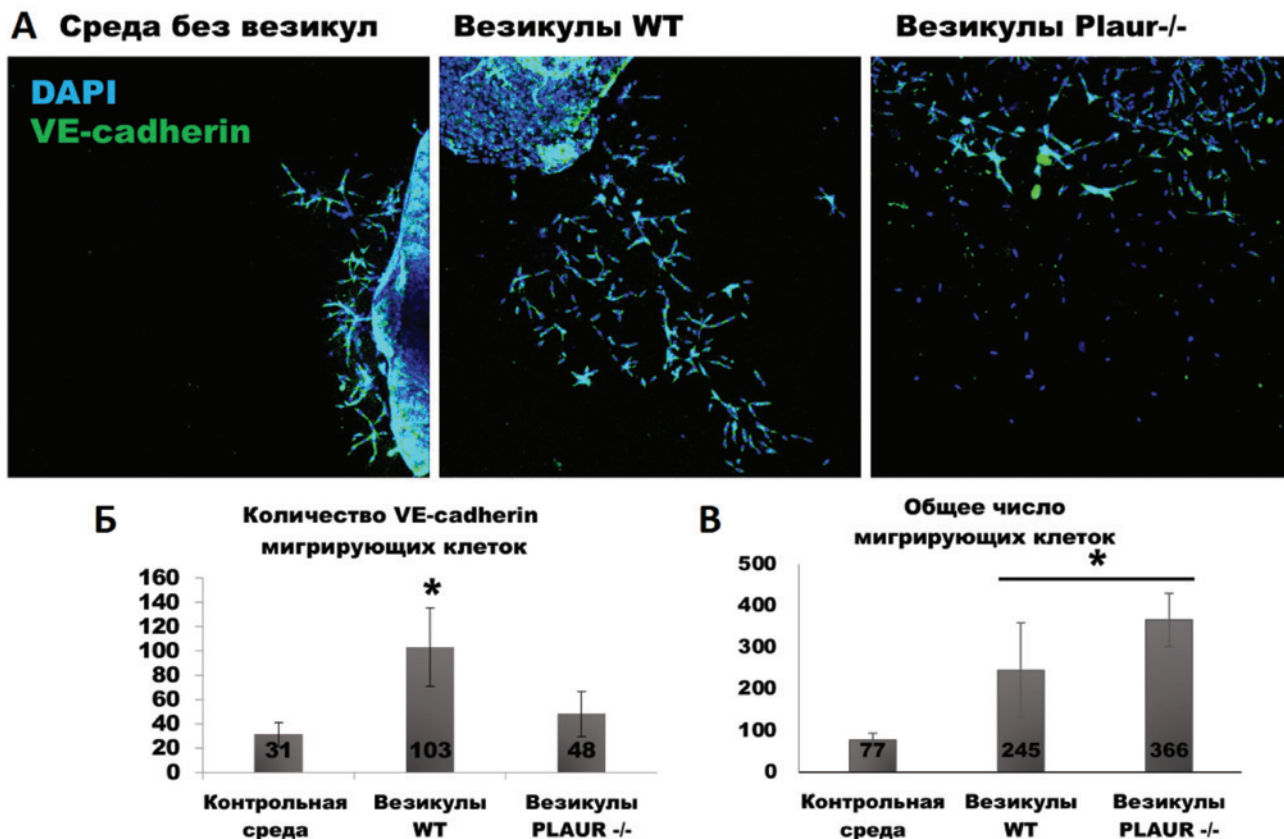


Рис. 2. Везикулы WT, но не *Plaur*^{-/-}, стимулируют миграцию и(или) пролиферацию эндотелиальных клеток: **А** — иммунофлуоресцентное окрашивание эксплантов сосуда в Матригеле антителами к VE-кадгерину (зеленая флуоресценция). Ядра окрашены DAPI. Масштабный отрезок 100 нм; **Б** — подсчет количества промигрировавших VE-кадгерин-позитивных клеток из экспланта в Матригель; **В** — подсчет общего количества мигрирующих клеток. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, $p < 0,05$, $n = 4$, one way ANOVA

3. Биоинформатический поиск мишеней микроРНК *Plaur-mir1-5p*, ассоциированных с ангиогенезом

Предположив, что *Plaur-mir1-5p* может быть регулятором миграции и/или пролиферации сосудистых и, в частности, ЭК, мы провели биоинформатический поиск возможных генов-мишеней изучаемой микроРНК. Для поиска мишеней использовали онлайн-сервис TargetScan, который идентифицировал 7621 мишень. Для дальнейшего процессирования были выбраны мишени с показателем связывания не менее 0,9 (дополнительные материалы, табл. 1). Далее была проведена кластеризация алгоритмом K-means 1 (алгоритм *k*-средних) 761 гена-мишени в 3 кластера с помощью базы данных STRING. В первом кластере сконцентрировались гены, регулирующие синаптическую пластичность, во втором — метаболизм, в третьем кластере сосредоточились гены (22 гена), относящиеся к GO:0072577 (Endothelial cell apoptotic process), GO:1905562

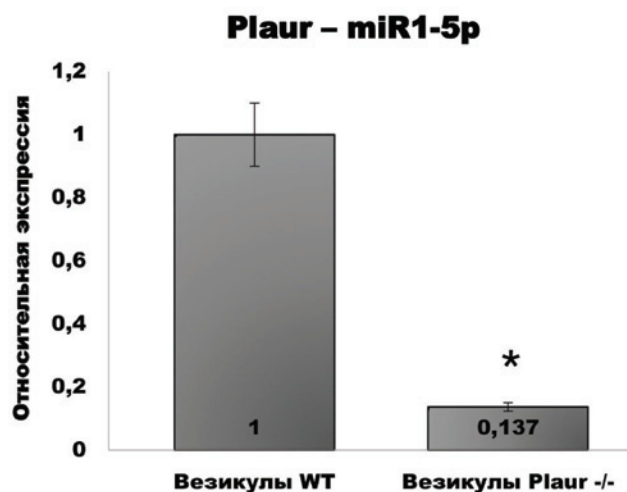


Рис. 3. Анализ содержания микроРНК *Plaur-mir1-5p* во ВВ, выделенных из среды культивирования МСК-ЖТ методом ПЦР-РВ. Данные рассчитаны методом $\Delta\Delta Ct$ и представлены как среднее ± стандартное отклонение, $p < 0,05$, $n = 3$, T-test

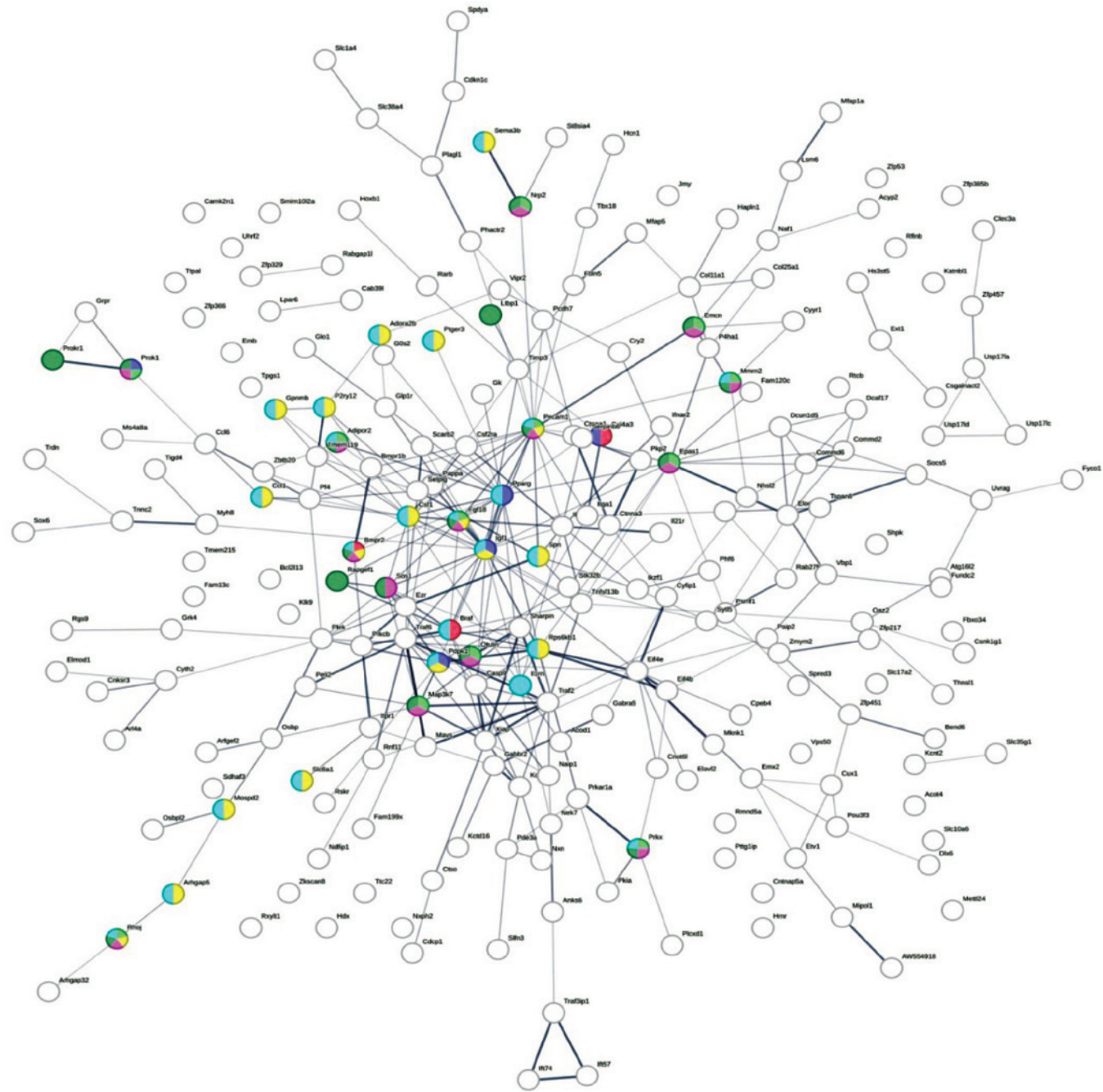
(Regulation of vascular endothelial cell proliferation), GO:0001525 (Angiogenesis), GO:0048514 (Blood vessel morphogenesis) и GO:0001568 (Blood vessel development). Гены 3-го кластера представлены на рисунке 4, цветом выделены гены, относящиеся к выбранным классификаторам. Дальнейший анализ был проведен с использованием данных литературы, и были выбраны гены, непосредственно регулирующие такие этапы ангиогенеза, как пролиферация и миграция ЭК и образование капиллярноподобных структур. По результатам анализа было выбрано 6 генов-кандидатов, 5 из которых являются положительными регуляторами ангиогенеза, один — негативным. Гены и функции кодируемых белков представлены в таблице 1. Найденные гены могут рассматриваться как потенциальные мишени новой Plaur-miR1-5p.

Обсуждение

uPAR был открыт в 1981 году и охарактеризован как рецептор активатора плазминогена урокиназного типа, основной функцией которого является протеолиз. С того времени был обнаружен целый ряд непротеолитических функций урокиназного рецептора, таких как регуляция экспрессии генов, пролиферации клеток, адгезии, миграции и инвазии клеток [23]. В литературе описано более 50 белков-партнеров, способных взаимодействовать с uPAR и вызывать сигнальные эффекты в клетках [24]. Несмотря на большое количество публикаций, появляются все новые данные о функциях урокиназного рецептора не только как белка, но и самого гена *Plaur*. Ген *Plaur* является геном раннего ответа в головном мозге мыши в ответ на индукцию судорожной активности, а его полиморфизмы

Таблица 1. Гены-мишени *Plaur-miR1-5p*, являющиеся регуляторами ранних этапов ангиогенеза

Ген и кодируемый им белок	Показатель связывания	Функция в ангиогенезе	Ссылка
Emcn Эндомуцин	97	Стимулирует образование капиллярноподобных структур, активируя сигнализацию VEGF/VEGFR2	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5719432/#:~:text=EMCN%20controls%20angiogenesis%20by%20altering,capillary%20EC%20migration%20C23
prkx Протеинкиназа, сцепленная с X-хромосомой	93	Стимулирует пролиферацию, миграцию эндотелиальных клеток и формирование капиллярноподобных структур	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160611009882?via%3Dihub
Rhoj (малая ГТФаза)	90	Обеспечивает адгезию эндотелиальных клеток во время формирования капиллярноподобных структур за счет регуляции фибриллогенеза через α5β1 интегрин	https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(20)30412-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0960982220304127%3Fshowall%3Dtrue
mmrn2 Мультимерин 2	98	Подавляет подвижность эндотелиальных клеток, связывая VEGFA, и действует как негативный регулятор ангиогенеза	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28435016/
Col4a3 Альфа 3 цепь коллагена 4	91	Основной компонент базальной мембраны в сосудах	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23551189/
prokr1 Прокинетицин 2	95	Стимулирует пролиферацию, миграцию эндотелиальных клеток и ангиогенез, активируя сигнальный путь PKR1/MAPK/Akt	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20023120/



Biological Process (Gene Ontology)				
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate
GO:0072577	Endothelial cell apoptotic process	3 of 10	1.46	0.0373
GO:1905562	Regulation of vascular endothelial cell proliferation	5 of 31	1.19	0.0082
GO:0001525	Angiogenesis	12 of 346	0.53	0.0435
GO:0048514	Blood vessel morphogenesis	14 of 461	0.47	0.0475
GO:0001568	Blood vessel development	17 of 568	0.46	0.0208

Рис. 4. Кластеризация мишеней Plaur-miR1-5p алгоритмом K-means. На рисунке представлен третий из кластеров, включающий гены, относящиеся к GO:0072577 (Endothelial cell apoptotic process), GO:1905562 (Regulation of vascular endothelial cell proliferation), GO:0001525 (Angiogenesis), GO:0048514 (Blood vessel morphogenesis) и GO:0001568 (Blood vessel development) (выделены цветом).

коррелируют с такими заболеваниями человека, как эпилепсия, аутизм, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера и опухоли головного мозга [25]. В связи с этим мы предположили, что ранее неизвестные микроРНК, расположенные в интронных последовательностях гена *Plaur*, могут определять целый ряд эффектов, связанных с геном *Plaur*, которые нельзя объяснить только функцией белка uPAR.

В нашей лаборатории была идентифицирована абсолютно новая микроРНК Plaur-miR1, которая экспрессируется с гена *Plaur* и процессируется с образованием двух зрелых форм: Plaur-miR1-3p и Plaur-miR1-5p. Однако функции данных микроРНК в настоящий момент остаются неизученными.

Известно, что микроРНК регулируют экспрессию генов на уровне трансляции, связываясь 3' участками РНК как в самой клетке-доноре, так и в составе ВВ, оказывая действие на соседние клетки [26]. В настоящем исследовании мы проверили, входят ли изучаемые микроРНК (Plaur-miR1-3p и Plaur-miR1-5p) в состав ВВ и какую роль они могут играть в регуляции процессов ангиогенеза. В работе использовали ВВ, полученные от клеток МСК-ЖТ. Известно, что ВВ МСК содержат целый ряд ангиогенных факторов и являются положительными регуляторами роста сосудов [2]. Клетки МСК выделяли из жировой ткани мышей дикого типа и нокаутных по гену *Plaur*. Известно, что при нокауте урокиназного рецептора Plaur-miR1-3p и Plaur-miR1-5p не экспрессируются [14]. Методом ПЦР в реальном времени мы показали, что одна из изучаемых микроРНК, а именно Plaur-miR1-5p, входит в состав ВВ МСК-ЖТ (рис. 3). Отличия в регуляции и функциях 3p и 5p микроРНК до сих пор недостаточно изучены. Например, имеются данные литературы о том, что одна из цепей может являться менее стабильной и лишь «направляющей», необходимой для того, чтобы микроРНК проходила процессинг комплексом RISC, после чего она деградирует. В то же время другие данные литературы свидетельствуют о том, что каждая из цепей микроРНК может быть стабильна и имеет свои мишени [27]. Возможно, Plaur-miR1-5p более стабильна, чем Plaur-miR1-3p, благодаря чему может быть упакована в мультивезикулярные тельца [27]. В дальнейшем Plaur-miR1-5p может быть транспортирована в соседние клетки или оказывать на них непосредственное действие. Это подтверждено ранее проведенной

работой нашего коллектива [14], в которой экспериментально было показано прямое связывание с мишенями только цепи Plaur-miR1-5p.

В настоящей работе мы оценивали влияние Plaur-miR1-5p на ангиогенез, используя эксплантную модель сосудистого колечка в Матригеле, и ВВ, полученные из среды культивирования МСК-ЖТ мышей дикого типа (везикулы WT) и нокаутных по гену *Plaur* (везикулы *Plaur*^{-/-}), не экспрессирующих Plaur-miR1-5p. ВВ оказывали стимулирующее влияние на процессы ангиогенеза, но отличались по направленности своего действия. Так, ВВ от МСК *Plaur*^{-/-} мышей отличались сниженной способностью стимулировать миграцию/пролиферацию эндотелиальных клеток по сравнению с ВВ от МСК WT мышей (рис. 1, 2). Однако ВВ от МСК *Plaur*^{-/-} мышей усиливали миграцию/пролиферацию других сосудистых клеток, не экспрессирующих VE-кадгерин — основной маркер эндотелиальных клеток [28]. Известно, что в данной модели из эксплантов в Матригель помимо эндотелиальных клеток могут мигрировать гладкомышечные клетки, перicytes или МСК [29]. В этой связи мы предположили, что данный эффект ВВ от МСК *Plaur*^{-/-} мышей может быть зависим от Plaur-miR1-5p. Известно, что микроРНК могут интерферировать сразу с несколькими генами-мишенями, при этом как ингибируя, так и усиливая их экспрессию, что объясняет дуализм наблюдаемого действия и разные эффекты в разных типах клеток [30]. Используя алгоритм TargetScan в сочетании с последующей кластеризацией мишеней в базе STRING, мы выделили ряд генов, которые потенциально могут быть мишенями Plaur-miR1-5p и при этом имеют прямое влияние на ангиогенез. Среди мишеней оказались гены как стимулирующие (*Emcn*, *Prkx*, *Rhoj*, *Col4a3*, *Prokr1*), так и подавляющие ангиогенез (*Mmrn2*). Эндомуцин, кодируемый геном *Emcn*, стимулирует образование капилляроподобных структур, активируя сигнализацию VEGF/VEGFR2 [31]. Его нокаут приводит к снижению пролиферации и миграции сосудистых клеток, а также подавляет сигнализацию VEGF/VEGFR2 [32]. Протеинкиназа, сцепленная с X-хромосомой (ген *Prkx*), и Прокинетицин 2 (ген *Prkx*) обладают схожим действием, усиливая миграцию и пролиферацию ЭК [33]. Протеинкиназа, сцепленная с X-хромосомой, являясь антагонистом протеинкиназы А, активирует ц-АМФ киназу [33]. В свою очередь, прокинетицин 2 активирует сигнальный каскад PKR1/MAPK/

Акт [34]. Малая ГТФ-аза Rhoj обеспечивает адгезию сосудистых клеток в капилляроподобных структурах за счет регуляции фибриллогенеза через $\alpha 5\beta 1$ интегрин [35]. Еще одна потенциальная мишень *Plaur-miR1-5p* — Мулитимерин 2 (ген *Mmrn2*), который является негативным регулятором ангиогенеза. Связывая VEGFA, Мулитимерин 2 подавляет подвижность эндотелиальных клеток [36].

Можно предположить, что у мышей, нокаутных по гену *Plaur*, в отсутствие *Plaur-miR1-5p* усиливается экспрессия Мулитимерина 2, чем и может быть обусловлен эффект сниженной миграции эндотелиальных клеток в отсутствие гена *Plaur*. Предложенные механизмы влияния нокаута гена *Plaur* и связанного с ним отсутствия *Plaur-miR1-5p* на процессы ангиогенеза нуждаются в экспериментальных доказательствах, что представляет собой перспективу наших дальнейших исследований.

Суммируя полученные в настоящей работе данные о возможном участии гена *Plaur* и *Plaur-miR1-5p* в регуляции процессов ангиогенеза, мы показали, что в отсутствие гена *Plaur* наблюдается максимальная миграция и (или) пролиферация сосудистых клеток на модели сосудистого колечка в Матригеле. В основе та-

кого эффекта нокаута гена *Plaur* может лежать регуляция с участием микроРНК, считываемых с гена урокиназного рецептора. Мы обнаружили, что *Plaur-miR1-5p*, транскрибируемая с гена *Plaur*, входит в состав внеклеточных везикул, продуцируемых МСК-ЖТ. МСК регулируют процессы ангиогенеза как за счет непосредственного контакта с сосудистыми клетками, так и за счет активно продуцируемых внеклеточных везикул. Действуя сразу на несколько генов-мишеней, *Plaur-miR1-5p* в составе ВВ, полученных от МСК-ЖТ, предположительно усиливает миграцию и(или) пролиферацию неэндотелиальных клеток, но не оказывает стимулирующего действия на эндотелиальные клетки и формирование ими капилляроподобных структур.

Финансирование исследования: Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения РФ в рамках научного проекта ГЗ НИР № НИОКТР 121031300184-8 «Посттрансляционные механизмы регуляции процессов роста сосудов и нервов урокиназной системой».

Funding: This work was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation (state assignment SRW No. RTD 121031300184-8 “Post-translational mechanisms the growth processes of blood vessels and nerves regulation by the urokinase system”).

Литература

1. Senger DR, Davis GE. Angiogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2011;3(8):a005090.
2. Merino-González C, Zuñiga FA, Escudero C, Ormazabal V, Reyes C, Nova-Lamperti E, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Angiogenesis: Potencial Clinical Application. Front Physiol. 2016;7:24.
3. Ефименко А, Джояшвили Н, Калинина Н, Кочегура Т, Акчуринов РС, Ткачук ВА и др. Изменения ангиогенных свойств ММСЖ жировой ткани с возрастом у больных ишемической болезнью сердца. Гены и клетки. 2012;7(4):73–82.
4. Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. Extracellular Vesicles in Angiogenesis. Circulation research. 2017;120(10):1658–1673.
5. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Sorting it out: regulation of exosome loading. Seminars in cancer biology. 2014;28:3–13.
6. Anderson JD, Johansson HJ, Graham CS, Vesterlund M, Pham MT, Bramlett CS, et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Mesenchymal Stem Cell Exosomes Reveals Modulation of Angiogenesis via Nuclear Factor-KappaB Signaling. Stem cells (Dayton, Ohio). 2016;34(3):601–613.
7. Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L, Salgado M, Van Badiavas E. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro. Stem cells and development. 2015;24(14):1635–1647.
8. Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. Nature structural & molecular biology. 2012;19(6):586–593.

9. Kang T, Jones TM, Naddell C, Bacanamwo M, Calvert JW, Thompson WE, et al. Adipose-Derived Stem Cells Induce Angiogenesis via Microvesicle Transport of miRNA-31. *Stem cells translational medicine*. 2016;5(4):440–450.
10. Liang X, Zhang L, Wang S, Han Q, Zhao RC. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a. *Journal of cell science*. 2016;129(11):2182–2189.
11. Lombardo G, Dentelli P, Togliatto G, Rosso A, Gili M, Gallo S, et al. Activated Stat5 trafficking Via Endothelial Cell-derived Extracellular Vesicles Controls IL-3 Pro-angiogenic Paracrine Action. *Scientific reports*. 2016;6:25689.
12. Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*. 2006;108(9):3068–3071.
13. Dentelli P, Rosso A, Orso F, Olgasi C, Taverna D, Brizzi MF. microRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(8):1562–1568.
14. Rysenkova KD, Troyanovskiy KE, Klimovich PS, Bulyakova TR, Shelomentseva EM, Shmakova AA, et al. Identification of a Novel Small RNA Encoded in the Mouse Urokinase Receptor uPAR Gene (*Plaur*) and Its Molecular Target Mef2d. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2022;15:865858.
15. Larusch GA, Merkulova A, Mahdi F, Shariat-Madar Z, Sitrin RG, Cines DB, et al. Domain 2 of uPAR regulates single-chain urokinase-mediated angiogenesis through β 1-integrin and VEGFR2. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013;305(3):H305–P320.
16. Prager GW, Breuss JM, Steurer S, Mihaly J, Binder BR. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells. *Blood*. 2004;103(3):955–962.
17. Dergilev KV, Beloglazova IB, Tsokolaeva ZI, Vasilets YD, Parfenova EV. Deficiency of Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Is Associated with the Development of Perivascular Fibrosis in Mouse Heart. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2022;173(1):5–9.
18. Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Molecular cell*. 2016;64(2):320–333.
19. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*. 2015;4.
20. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115(7):787–798.
21. Oti EU, Olusola MO, Eze FC, Enogwe SU. Comprehensive review of K-Means clustering algorithms. *criterion*. 2021;12:22–23.
22. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic acids research*. 2023;51(D1):D638–B646.
23. Mahmood N, Mihalcioiu C, Rabbani SA. Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Frontiers in oncology*. 2018;8:24.
24. Zhai BT, Tian H, Sun J, Zou JB, Zhang XF, Cheng JX, et al. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) as a therapeutic target in cancer. *Journal of translational medicine*. 2022;20(1):135.
25. Semina E, Rubina K, Stepanova V, Tkachuk V. Involvement of the urokinase receptor and its endogenous ligands in the development of the brain and the formation of cognitive functions. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2018;48:16–27.
26. Tang Y, Zong S, Zeng H, Ruan X, Yao L, Han S, et al. MicroRNAs and angiogenesis: a new era for the management of colorectal cancer. *Cancer cell international*. 2021;21(1):221.
27. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281–297.
28. Vestweber D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(2):223–232.

Климович П.С., Реутов А.В., Щипова А.А., Сысоева В.Ю., Арбатский М.С., Рубина К.А., Семина Е.В.
Роль Plaur-miR1-5p, кодируемой геном урокиназного рецептора *Plaur*, в процессах ангиогенеза

29. Nicosia RF. The aortic ring model of angiogenesis: a quarter century of search and discovery. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(10):4113–4136.
30. Lee D, Shin C. MicroRNA-target interactions: new insights from genome-wide approaches. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1271(1):118–128.
31. Park-Windhol C, Ng YS, Yang J, Primo V, Saint-Geniez M, D'Amore PA. Endomucin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration, growth, and morphogenesis by modulating VEGFR2 signaling. *Scientific reports*. 2017;7(1):17138.
32. Zhang G, Yang X, Gao R. Research progress on the structure and function of endomucin. *Animal models and experimental medicine*. 2020;3(4):325–329.
33. Li X, Iomini C, Hyink D, Wilson PD. PRKX critically regulates endothelial cell proliferation, migration, and vascular-like structure formation. *Developmental biology*. 2011;356(2):475–485.
34. Guilini C, Urayama K, Turkeri G, Dedeoglu DB, Kurose H, Messaddeq N, et al. Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;298(3):H844–P852.
35. Sundararaman A, Fukushima Y, Norman JC, Uemura A, Mellor H. RhoJ Regulates $\alpha 5 \beta 1$ Integrin Trafficking to Control Fibronectin Remodeling during Angiogenesis. *Current biology : CB*. 2020;30(11):2146–2155.e5.
36. Andreuzzi E, Colladel R, Pellicani R, Tarticchio G, Cannizzaro R, Spessotto P, et al. The angiostatic molecule Multimerin 2 is processed by MMP-9 to allow sprouting angiogenesis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2017;64:40–53.

Об авторах

Климович Полина Сергеевна — к.б.н., старший научный сотрудник факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. ак. Е.И. Чазова.

Реутов Артем Владимирович — магистрант факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

Щипова Анна Алексеевна — студентка факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

Сысоева Вероника Юрьевна — к.б.н., ведущий научный сотрудник факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

Арбатский Михаил Сергеевич — к.э.н., заведующий лабораторией, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова.

Рубина Ксения Андреевна — д.б.н., заведующая лабораторией морфогенеза и репарации тканей факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

Семина Екатерина Владимировна — д.б.н., заместитель руководителя по развитию и проектной деятельности, Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта), ведущий научный сотрудник факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

Authors

Polina S. Klimovich — Ph.D. in Biology, Senior researcher of Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University and of Chazov National Medical Research Centre of Cardiology.

Artem V. Reutov — master's student of Faculty of Fundamental Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Klimovich P.S., Reutov A.V., Shchipova A.A., Sysoeva V.Yu., Arbatsky M.S., Rubina K.A., Semina E.V.
The role of Plaur-miR1-5p encoded within the urokinase receptor gene (*Plaur*) in angiogenesis

Anna A. Shchipova — student of Faculty of Fundamental Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Veronika Yu. Sysoeva — Ph.D. in Biology, leading researcher of Faculty of Fundamental Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Mikhail S. Arbatsky — Ph.D. in Economics, head of the laboratory of Pirogov Russian National Research Medical University.

Kseniya A. Rubina — D.Sci. in Biology, head of the laboratory of morphogenesis and tissue repair of Faculty of Fundamental Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Ekaterina V. Semina — D.Sci. in Biology, deputy head for Development and Project Activities of Immanuel Kant Baltic Federal University, Leading Researcher of Faculty of Fundamental Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Постстрессорные изменения уровня мРНК *il-6* и *bdnf* в гиппокампе и крови крыс с генетически детерминированным контрастным уровнем возбудимости нервной системы

Е.Ю. Маянова¹, С.А. Новожилова¹, И.Г. Шалагинова¹, Т.Г. Зачепило², Н.А. Дюжикова²

¹ ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», 236041, г. Калининград, ул. Александра Невского, 14, Россия

² ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук», 199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6, Россия

Адрес для корреспонденции: shalaginova_i@mail.ru

Аннотация

Нейровоспаление рассматривают как один из механизмов, с помощью которых стресс потенциально может приводить к нарушению функций ЦНС. Генетические факторы, которые повышают риск развития постстрессорного нейровоспаления, исследованы недостаточно. Генетически детерминированная возбудимость нервной системы может являться одним из индивидуальных факторов риска развития постстрессорных нарушений, в том числе, связанных с особенностями формирования и течения нейровоспаления.

Целью данной работы являлось изучение постстрессорного изменения экспрессии генов провоспалительного *il-6* в крови и гиппокампе и противовоспалительного цитокина *bdnf* в крови у крыс с генетически детерминированным высоким и низким уровнями возбудимости нервной системы.

Были использованы селекционные животные, самцы двух линий крыс в возрасте 5 месяцев: с высоким порогом (ВП) возбудимости нервной системы (низковозбудимые) и низким порогом (НП) возбудимости нервной системы (высоковозбудимые) из биокolleкции ФГБУН «Институт физиологии им. И. П. Павлова» РАН. Модель стресса — длительное эмоционально-болевое стрессирование по схеме К. Гехта. Экспериментальных и контрольных животных декапитировали через 24 часа, 7 дней и 24 дня после окончания стрессового воздействия. Изменения уровня мРНК генов *il-6* и *bdnf* оценивали с помощью ПЦР в реальном времени.

Хронический стресс приводил к значимому увеличению уровня мРНК *il-6* в гиппокампе только у высоковозбудимых животных через 24 дня после окончания стрессирования. В крови уровень мРНК данного цитокина повышался только у низковозбудимых крыс. Экспрессия гена *bdnf* в крови не менялась в ответ на стресс ни у одной из линий.

Ключевые слова: *il-6*, *bdnf*, нейровоспаление, стресс, возбудимость нервной системы, крысы

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Маянова Е.Ю., Новожилова С.А., Шалагинова И.Г., Зачепило Т.Г., Дюжикова Н.А. Постстрессорные изменения уровня мРНК *il-6* и *bdnf* в гиппокампе и крови крыс с генетически детерминированным контрастным уровнем возбудимости нервной системы. *Регенерация органов и тканей*. 2023;1(2):76–84. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-76-84>

Поступила 30.10.2023

Обработана 20.11.2023

Принята к публикации 01.12.2023

Post-stress changes in *il-6* and *bdnf* mRNA levels in the hippocampus and blood of rats with a genetically determined contrast level of nervous system excitability

Ekaterina Yu. Mayanova¹, Sofiya A. Novozhilova¹, Irina G. Shalaginova¹,
Tatyana G. Zachepilo², Natalia A. Dyuzhikova²

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University, 236041, Kaliningrad, Alexandra Nevskogo str., 14, Russia

² Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, 199034, Saint-Petersburg, Makarova emb., 6, Russia

Correspondence address: shalaginova_i@mail.ru

Abstract

Neuroinflammation is considered as one of the mechanisms by which stress can potentially lead to a disturbance of the functions of the central nervous system. The presence of neuroimmune dysfunction after stress, and what genetic factors increase the risk of post-stress neuroinflammation has not been sufficiently investigated. Genetically determined excitability of the nervous system is a promising marker of individual vulnerability to stress, manifested in post-stress disorders associated with the specifics of the formation of neuroinflammation.

The aim of this work was to study post-stress changes in the expression of pro-inflammatory *il-6* genes in the blood and hippocampus and anti-inflammatory cytokine *bdnf* in the blood of rats with genetically determined high and low levels of excitability of the nervous system. Breeding animals were used, males of two strains of rats aged 5 months: with a high threshold (HT) of excitability of the nervous system (low excitable) and a low threshold (LT) of excitability of the nervous system (high excitable) from the biological collection of the Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences. The stress model is a long-term emotional and painful stress according to the scheme of K. Hecht. Experimental and control animals were decapitated 24 hours, 7 days and 24 days after the end of stress exposure. Changes in the mRNA level of the *il-6* and *bdnf* genes were evaluated using real-time PCR.

Chronic stress led to a significant increase in the level of *il-6* mRNA in the hippocampus only in high excitable animals 24 days after the end of stress. In the blood, the mRNA level of this cytokine increased only in low-excitable rats. The expression of the *bdnf* gene in blood did not change in response to stress in any of the strains.

Keywords: *il-6*, *bdnf*, neuroinflammation, stress, nervous system excitability, rats

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Mayanova E.Yu., Novozhilova S.A., Shalaginova I.G., Zachepilo T.G., Dyuzhikova N.A. Post-stress changes in *il-6* and *bdnf* mRNA levels in the hippocampus and blood of rats with a genetically determined contrast level of nervous system excitability. *Tissue and organ regeneration*. 2023;1(2): 76–84. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-76-84>

Received 30.10.2023

Revised 20.11.2023

Accepted 01.12.2023

Список сокращений:

IL-6 — интерлейкин-6, interleukin-6

IL-1b — интерлейкин-1b, interleukin-1b

BDNF — нейротрофический фактор головного мозга, brain-derived neurotrophic factor

НП — линия крыс с низким порогом, высокой возбудимостью

ВП — линия крыс с высоким порогом, низкой возбудимостью

Введение

Современная биомедицина далека от понимания патогенеза постстрессорных расстройств, отчасти из-за полигенной природы генетического риска, многообразия средовых факторов риска и неоднородности используемых исследователями методологий [1]. Одним из механизмов, лежащих в основе воздействия стрессовой реакции на функциональное состояние мозга, является нейровоспаление. Нейровоспаление — это процесс, который включает активацию микроглии и астроглии. Эти клетки выделяют провоспалительные цитокины и хемокины, которые могут привести к активации дополнительных глиальных клеток и привлечению периферических иммунных клеток в головной мозг [2].

Интерлейкин-6 (interleukin-6, IL-6) представляет собой провоспалительный цитокин и играет важную роль в иммунной регуляции и воспалительных процессах в нервной системе. Он также может влиять на функции нейронов, в том числе на обучение и память, а также на регуляцию сна и бодрствования [3].

Нейротрофический фактор головного мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) относится к противовоспалительным цитокинам, это нейротрофин, ответственный за пролиферацию, дифференцировку, выживание нейрональных и ненейрональных клеток, что делает его критически важным для функционального состояния нервной системы. BDNF можно количественно определить в цельной периферической крови, сыворотке или плазме. Кроме того, BDNF свободно пересекает гематоэнцефалический барьер. Таким образом, BDNF в сыворотке и плазме тесно связаны с BDNF центральной нервной системы. В исследовании с участием людей, в котором сравнивали уровень BDNF в крови у пациентов с большим депрессивным расстройством, биполярным расстройством и у здоровых лиц контрольной группы, обнаружен

низкий уровень BDNF у пациентов по сравнению с контрольной группой [4].

Среди факторов генетического риска развития постстрессорных нарушений особый интерес представляет генетически детерминированный уровень возбудимости нервной системы, поскольку порог возбудимости является объективно измеряемой характеристикой функционального состояния нервной системы.

Возбудимость определяется как способность нервных клеток генерировать и передавать электрические импульсы в ответ на различные стимулы [5], совпадая с идеями И.П. Павлова о роли генетически детерминированной возбудимости в поведении [6]. Линии крыс с контрастной возбудимостью (ВП — высокий порог, низкая возбудимость и НП — низкий порог, высокая возбудимость) были селектированы в Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН по порогу возбудимости большеберцового нерва. Различия в порогах сохраняются в нервно-мышечной системе и в ЦНС, включая ретикулярную формацию среднего мозга, гиппокамп и миндалину [7, 8]. На данный момент эти линии крыс не генотипированы и вклад конкретных генетических факторов в формирование высокого и низкого порогов возбудимости не выяснен. Тем не менее исследования показали межлинейные различия: крысы высоковозбудимой линии характеризуются повышенной активностью щитовидной железы, высоким базальным уровнем кортикостерона, высоким уровнем дофамина в миндалине, а также более высоким содержанием кальция в мозге и кальмодулина в гиппокампе по сравнению с линией ВП [7–9]. В поведенческих тестах высоковозбудимые крысы (НП) проявляют высокую эмоциональность, низкий порог агрессии, повышенную способность к выработке условного рефлекса активного и пассивного избегания и стереотипное поведение. Низковоозбудимые (ВП) крысы характеризуются низкой эмоциональностью,

высоким порогом агрессии и способностью к условному рефлексу активного избегания [8].

Предыдущие исследования показали, что высоковозбудимые крысы линии НП (низкий порог, высокая возбудимость) демонстрируют через 24 дня после окончания длительного эмоционально-болевого стрессирования увеличение уровня мРНК провоспалительного цитокина IL-1b в гиппокампе и миндалине по сравнению с контрольной группой. При этом в крови, напротив, уровень мРНК данного цитокина у экспериментальных животных высоковозбудимой линии снижается через сутки после окончания стресса [10].

Таким образом, периферические маркеры стресса, являясь перспективными для использования в медицине, не всегда отражают соответствующие изменения в мозге, и потому сопоставление уровня экспрессии генов про- и противовоспалительных молекул в крови и мозге предположительно позволит лучше понять механизмы постстрессорного повреждения мозговой ткани.

Поскольку гиппокамп считают одной из ключевых структур мозга, вовлеченных в патогенез постстрессорных расстройств [11], целью данного исследования было изучить изменения уровня мРНК генов *il-6* в крови и гиппокампе и *bdnf* в крови крыс с высокой и низкой возбудимостью нервной системы на разных сроках после длительного эмоционально-болевого стресса.

Материалы и методы

Объект исследования

Исследование проводили на пятимесячных самцах крыс линий, селективированных по величине порога возбудимости нервной системы: с высоким (ВП) и низким (НП) порогами возбудимости. Средняя масса животного в момент декапитации составляла 450 г. Исходным материалом для селекции были крысы линии Вистар. Отбор проводился по значению порога нервно-мышечной возбудимости в тесте на раздражение электрическим током большеберцового нерва *n. tibialis* (прямоугольные электрические импульсы длительностью 2 мс). В первых двух поколениях были скрещены полные сиблинги. Начиная с третьего поколения внутрилинейное скрещивание проводилось в случайном порядке. Начиная с 10-го поколения размножение достигло плато. В то же время 4-кратные различия между линия-

ми значительно превышали внутрилинейную изменчивость [8]. Линии принадлежат биокolleкции ФГБУН «Институт физиологии им. И. П. Павлова» РАН (ИФ РАН) (№ ГЗ 0134-2018-0003).

Животные содержались в стандартных условиях со свободным доступом к воде и пище, условия освещенности регулировались автоматически (12 часов — свет, 12 часов — темнота). При проведении экспериментов были соблюдены все требования, закрепленные в директивах Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов также были утверждены комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

В данном исследовании использовались 36 контрольных и 36 экспериментальных животных.

В качестве модели хронического стресса применяли эмоционально-болевое стрессирование по схеме К. Гехта [8].

Воздействие осуществлялось ежедневно на протяжении 15 дней в течение 13 минут: подача шести неподкрепляемых (10 с) и шести подкрепляемых током (2,5 мА, 2 мс) световых сигналов по стохастической схеме. Межсигнальный интервал составлял одну минуту. Чередование с вероятностью 0,5 условных и безусловных стимулов не позволяло выработать у крыс условный рефлекс. Контрольные группы животных (линии НП и ВП) не стрессировали.

Выделение РНК и обратная транскрипция

Через 24 часа, 7 и 24 дня после окончания протокола стрессирования экспериментальные ($n = 36$) и контрольные ($n = 36$) животные подвергались декапитации и извлечению мозга, в частности гиппокампа. После этого пробы гомогенизировали и проводили выделение суммарной РНК с помощью набора ExtractRNA (Евроген, Россия, кат. № BC032) по протоколу производителя, далее проводилось измерение концентрации экстрагированной РНК с помощью спектрофотометра. Забор крови производился при декапитации через 24 часа и 24 дня после длительного эмоционально-болевого стрессирования, экстракцию суммарной РНК из цельной крови проводили по протоколу, описанному выше.

Таблица 1. Последовательности праймеров

Название	Последовательность	Продукт, п.н.	Температура отжига, °С
<i>il-6</i>	прямой 5'-GCCTTCTTGGGACTGATGTT-3'	209	60
	обратный 5' GCATCATCGCTGTTTCATACAATC-3'		
<i>bdnf</i>	прямой 5'-CTGTCGCACGGTCCCCATT-3'	142	60
	обратный 5'-TTCTCGTCTGCCCAAAGCA-3'		
<i>gapdh</i>	прямой 5'- GTTTGTGATGGGTGTGAACC -3'	170	60
	обратный 5'- TCTTCTGAGTGGCAGTGATG -3'		

После этапа выделения суммарной РНК проводились измерения концентрации экстрагированной РНК для каждого отдельного образца методом спектрофотометрии (NanoDrop IM-PLN). Синтез комплементарной ДНК (обратная транскрипция) был произведен в соответствии с инструкцией к набору MMLV RT kit (Евроген, Россия, кат. № SK022S), концентрация РНК — 100 нг/мкл.

ПЦР в реальном времени

Для оценки экспрессии генов изучаемых цитокинов проводилась ПЦР в реальном времени. Для этого были подобраны ген-специфичные праймеры к генам *il-6* и *bdnf* с помощью Primer BLAST базы NCBI. В качестве флуоресцирующей метки использовался интеркалирующий краситель SYBR Green (смесь qPCRmix-HS SYBR, Евроген, Россия, кат. № PK147L). В качестве референсного гена использовался *gapdh* (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа). Также для каждого гена устанавливался негативный контроль, и ПЦР проводили в трех технических повторностях. Протокол ПЦР: 1) 95 °С — 5 минут; 2) 95° С — 15 секунд; 3) 59 °С — 15 секунд; 4) 72 °С — 15 секунд; далее циклы 2–4 повторяли 40 раз.

Статистическая обработка

Статистическая обработка данных производилась с помощью программы Prism 9. Нормальность распределения данных определяли с помощью теста Шапиро — Уилка. Для сравнительного анализа показателей между группами в качестве критерия был использован t-тест для двух независимых выборок. Значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты ПЦР-анализа интерпретировались с помощью метода $\Delta\Delta C_t$, который основан на оценке уровня экспрессии целевого гена по отношению к референсному.

Результаты

Длительное эмоционально-болевое воздействие не приводило к изменению уровня провоспалительного *il-6* в гиппокампе низковоzbудимых животных линии ВП ни в одной из временных точек после окончания стрессирования. У крыс высоковозбудимой линии НП обнаружено значимое по сравнению с контролем увеличение ($p \leq 0,05$, $n = 6$) уровня мРНК данного цитокина в гиппокампе через 24 дня после окончания стрессирования (рис. 1).

В крови значимое увеличение уровня мРНК гена *il-6* выявлено у низковоzbудимых крыс линии ВП через 24 часа после окончания стрессирования по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,0015$, $n = 6$) (рис. 2), тогда как у крыс высоковозбудимой линии НП эффектов стресса на уровень мРНК данного цитокина в крови не обнаружено.

Как видно из рисунка 3, значимых изменений в уровне мРНК нейротрофина *bdnf* в крови крыс исследуемых линий в ответ на стресс не обнаружено.

Обсуждение результатов

Нами обнаружено значимое увеличение уровня мРНК провоспалительного цитокина IL-6 в гиппокампе крыс высоковозбудимой линии НП через 24 дня после окончания длительного эмоционально-болевого стрессирования. Эти данные согласуются с обнаруженным ранее значимым увеличением уровня мРНК другого провоспалительного цитокина IL-1b в гиппокампе животных данной линии на том же сроке — 24 дня [10]. В совокупности с тем фактом, что усиление экспрессии гена *il-1b* наблюдалось у животных линии НП так же и в миндалине, можно предполагать, что к этому сроку в мозге крыс с низким порогом и высокой возбудимостью развивается более выраженное

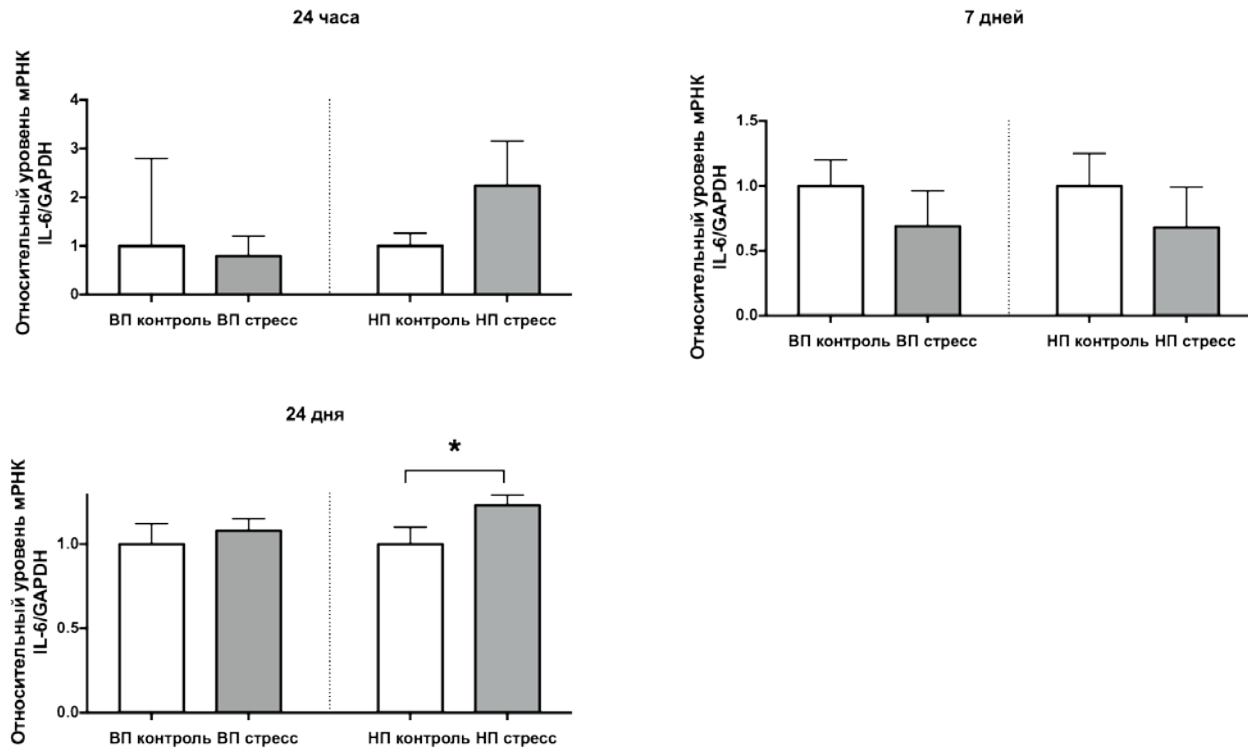


Рис. 1. Уровень мРНК гена *il-6* в гиппокампе крыс с высоким и низким порогами возбудимости через 24 часа, 7 и 24 дня после длительного эмоционально-болевого стрессирования. Здесь и далее на рисунках отображены средние и SEM, *t*-тест Стьюдента, (* $p \leq 0.05$, $n = 6$).

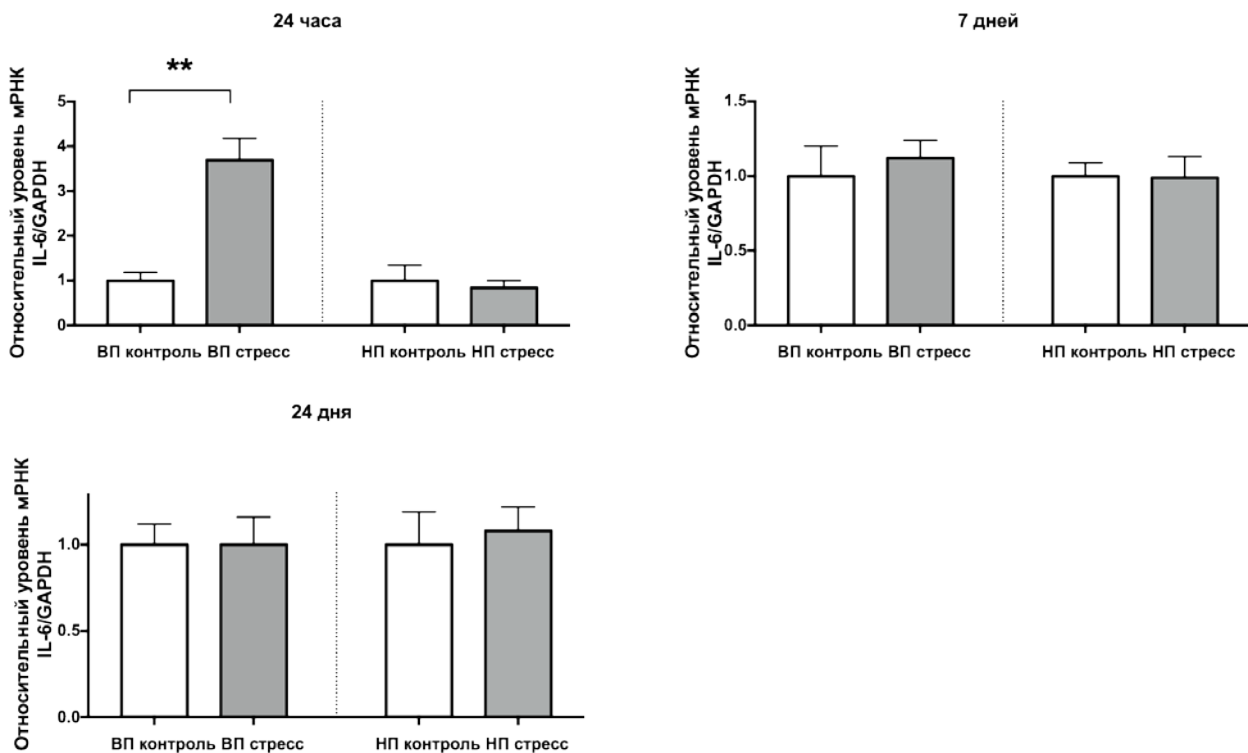


Рис. 2. Уровень мРНК гена *il-6* в крови крыс с высоким и низким порогами возбудимости через 24 часа, 7 и 24 дня после длительного эмоционально-болевого стрессирования. *t*-тест Стьюдента, (** $p \leq 0.0001$, $n = 6$).

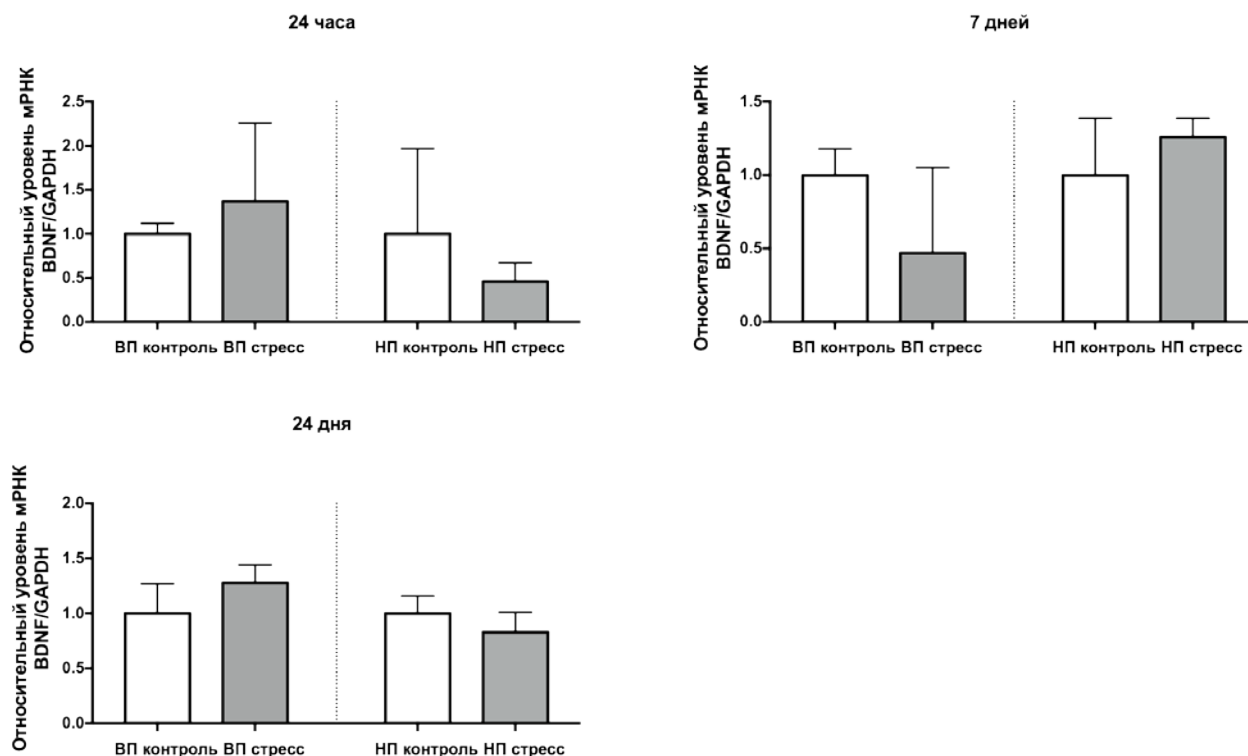


Рис. 3. Уровень мРНК гена *bdnf* в крови крыс с высоким и низким порогами возбудимости через 24 часа 7 и 24 дня после длительного эмоционально-болевого стрессирования. *t*-тест Стьюдента ($n = 6$)

нейровоспаление по сравнению с линией ВП, у которой уровень мРНК IL-1b значительно увеличивается только в гиппокампе [10], а изменений уровня мРНК IL-6 не обнаружено.

Значимое влияние стресса на уровень мРНК гена *il-6* в крови обнаружено только у низковозбудимых крыс: через 24 часа после окончания стрессирования уровень мРНК в экспериментальной группе значимо выше, чем в контроле. Данный факт показывает, что периферические изменения мРНК провоспалительных молекул могут не соответствовать тем изменениям, которые наблюдаются в мозге. Согласно данным литературы, усиление воспаления в крови наблюдается при низких дозах глюкокортикоидов, на ранних сроках после стресса и/или при остром стрессорном воздействии. В то время как высокие дозы гормонов стресса, хроническое воздействие и присутствие глюкокортикоидов после воспаления, как правило, оказывают противовоспалительное действие [12]. Более поздние эффекты, связанные с хроническим действием стрессора, по-видимому, призваны обеспечить контроль над потенциально разрушительными последствиями чрезмерно активного иммунного ответа в острой фазе. Таким образом, веро-

ятно, мы наблюдали естественную адаптивную реакцию у крыс линии ВП, которая проявлялась в усилении провоспалительного сигналинга в крови на ранних сроках после стрессового воздействия, и данная реакция отсутствовала у высоковозбудимых животных линии НП.

Нами не обнаружено значимых изменений в уровне мРНК гена *bdnf* в ответ на стресс в крови у животных обеих линий, при этом ранее установлено, что у крыс высоковозбудимой линии НП наблюдается снижение уровня мРНК этого нейротрофического фактора в префронтальной коре и гиппокампе на разных сроках после стресса [13]. Таким образом, эти данные — еще одно свидетельство в пользу того, что периферические маркеры могут не всегда напрямую отражать изменения, происходящие в мозге.

Для уточнения механизмов и динамики развития нейровоспаления в мозге крыс линий с генетически детерминированной высокой и низкой возбудимостью необходимы дополнительные исследования в отношении уровней мРНК других про- и противовоспалительных цитокинов, а также постстрессорных изменений в уровне экспрессии соответствующих белков.

Литература

1. Fenster RJ, et al. Brain circuit dysfunction in post-traumatic stress disorder: from mouse to man. *Nature Reviews Neuroscience*. 2018;19(9):535–551.
2. Dantzer R. Neuroimmune interactions: from the brain to the immune system and vice versa. *Physiol Rev*. 2018;98(1): 477–504.
3. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*. 2012;8:1254–1266.
4. Thakkar, B, Acevedo EO. BDNF as a biomarker for neuropathic pain: Consideration of mechanisms of action and associated measurement challenges. *Brain and Behavior*. 2023;13(e2903). DOI: 10.1002/brb3.2903
5. Rossini PM, et al. Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord, roots and peripheral nerves: Basic principles and procedures for routine clinical and research application. An updated report from an IFCN Committee. *Clin. Neurophysiol*. 2015;126(6):1071–1107.
6. Павлов ИП. Лекции о работе больших полушарий головного мозга. М.: Юрайт. 2024. 362 с.
7. Сиваченко ИБ, и др. Импульсная активность и нестабильность генома нейронов миндалевидного комплекса у крыс селективированных линий с контрастной возбудимостью нервной системы в нормальных и стрессовых условиях. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2020;70(5):655–667.
8. Вайдо АИ, Ширяева НВ, Павлова М. Б. и др. Селективированные линии крыс с высоким и низким порогом возбудимости: модель для изучения дезадаптивных состояний, зависящих от уровня возбудимости нервной системы. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018;3:12–22.
9. Вайдо АИ, Дюжикова НА, Ширяева НВ и др. Системный контроль молекулярно-клеточных и эпигенетических механизмов долгосрочных последствий стресса. *Генетика*. 2009;45(3):342–348.
10. Shalaginova IG, Tuchina OP, Turkin AV, Vylegzhanina AE, Nagumanova AN, Zachepilo TG, et al. The Effect of Long-Term Emotional and Painful Stress on the Expression of Proinflammatory Cytokine Genes in Rats with High and Low Excitability of the Nervous System. *J Evol Biochem Physiol*. 2023;59(2):642–652. DOI: 10.1134/S0022093023020291
11. Khan A, Geiger L, Czéh B. Stress-Induced Morphological, Cellular and Molecular Changes in the Brain-Lessons Learned from the Chronic Mild Stress Model of Depression. *Cells*. 2020;9. DOI: 10.3390/cells9041026
12. Sorrells SF, Sapolsky RM. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain. Behav. Immun*. 2007;21(3):259–272.
13. Шалагинова ИГ, Зачепило ТГ, Дюжикова НА. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на экспрессию гена *bdnf* в мозге крыс с контрастной возбудимостью нервной системы. *Медицинский академический журнал*. 2023;23(1):67–74. DOI: 10.17816/MAJ119980

Об авторах

Маянова Екатерина Юрьевна — студент, Высшая школа живых систем, БФУ им. И. Канта.

Новожилова София Андреевна — студент, Высшая школа живых систем, БФУ им. И. Канта.

Шалагинова Ирина Геннадьевна — к.б.н., старший преподаватель, Образовательно-научный кластер «МедБио», БФУ им. И. Канта.

Зачепило Татьяна Геннадьевна — к.б.н., зав. лабораторией генетики ВНД, Институт физиологии им. И.П. Павлова (РАН).

Дюжикова Наталья Алековна — д.б.н., директор Института физиологии им. И.П. Павлова (РАН).

Маянова Е.Ю., Новожилова С.А., Шалагинова И.Г., Зачепило Т.Г., Дюжикова Н.А.
Постстрессорные изменения уровня мРНК *il-6* и *bdnf* в гиппокампе и крови крыс...

Authors

Ekaterina Y. Mayanova — student, Higher School of Living Systems, Immanuel Kant Baltic State University.

Sofia A. Novozhilova — student, Higher School of Living Systems, Immanuel Kant Baltic State University.

Irina G. Shalaginova — Ph.D., senior lecturer, Educational and scientific cluster “MedBio”, Immanuel Kant Baltic State University.

Tatyana G. Zachepilo — Ph.D., head of Biological Sciences, Laboratory of Genetics of the higher nervous activity, I.P. Pavlov Institute of Physiology (RAS).

Natalia A. Dyuzhikova — Doctor of Biological Sciences, director of the I.P. Pavlov Institute of Physiology (RAS).