

Настоящая работа была выполнена на одиночных скелетных мышечных волокнах, лишенных миозина и регуляторных белков (на теневых волокнах), которые получали согласно методике, описанной ранее [3]. Миозин выделяли из скелетных мышц кролика [4] и с помощью α -химотрипсина расщепляли до субфрагмента-1 миозина (S1) [3]. S1 модифицировали флуоресцентным зондом 1,5-IAEDANS согласно методике Борейдо с соавторами [5]. Информацию о влиянии БДМ на взаимодействие миозина с актином получали путем анализа поляризованной флуоресценции 1,5-IAEDANS, введенного в S1 [3]. Измерения поляризованной флуоресценции осуществляли при моделировании нескольких стадий АТФазного цикла в отсутствие или в присутствии 3 мМ MgADP, 15 мМ MgAMPPNP, 15 мМ MgATP γ S, 3 мМ MgATP [6] и 20 мМ БДМ.

Было показано, что БДМ в цикле гидролиза АТФ усиливает жесткость связывания миозина с актином при моделировании слабых форм миозина с актином, что может замедлить переход актомиозина из состояния $A \cdot ADP \cdot Pi$ в состояние $A \cdot ADP$. Было предположено, что ингибирование сброса неорганического фосфата из активного центра миозина в АТФазном цикле является одной из причин ингибирования сократительной функции мышечного волокна и АТФазной активности миозина в присутствии БДМ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00523.

Литература:

1. Ostap E.J. Muscle Res. Cell Motil. 23, 305–308 (2002).
2. Stringham J. et al. Ann. Thorac. Surg. 54, 852–860 (1992).
3. Borovikov Y. et al. Biochim. Biophys. Acta 1794, 985–994 (2009).
4. Иванов И. & Юрьев В. Биохимия и патобиохимия мышц. (1961).
5. Borejdo J. et al. J. Mol. Biol. 158, 391–411 (1982).
6. Kakol I. et al. Biochim. Biophys. Acta 913, 1–9 (1987).

Н.А. Басалова^{1,2}, Е.С. Новоселецкая^{1,2},
О.А. Григорьева¹, П.П. Нимирицкий^{1,2},
П.И. Макаревич^{1,2}, А.Ю. Ефименко^{1,2}

ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННЫЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС, ПРОДУЦИРОВАННЫЙ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ, КАК МОДЕЛЬ ПРОФИБРОТИЧЕСКОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ IN VITRO

¹ Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

N.A. Basalova^{1,2}, E.S. Novoseletskaia^{1,2},
O.A. Grigorieva¹, P.P. Nimiritsky^{1,2},
P.I. Makarevich^{1,2}, A.Yu. Efimenko^{1,2}

DECELLULARIZED EXTRACELLULAR MATRIX PRODUCED BY STROMAL CELLS AS A MODEL OF PROFIBROTIC MICROENVIRONMENT IN VITRO

¹ Institute for regenerative medicine, Medical Research and Education Center,

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

natalia_ba@mail.ru

При прогрессировании фиброза основную роль играют сигналы, поступающие от микроокружения клеток. Одним из ключевых модуляторов данного процесса является внеклеточный матрикс (ВКМ), который нарабатывается преимущественно стромальными клетками, в первую очередь, фибробластами. На сегодняшний день не существует полноценной *in vitro* модели, воспроизводящей профиброгенные свойства ВКМ, для выяснения его роли в патогенезе фиброза. Поэтому целью данного исследования было создание *in vitro* модели с участием ВКМ, функционально и структурно имитирующей профиброзное микроокружение.

Для стимуляции продукции ВКМ в течение 2 недель культивировали дермальные фибробласты человека в виде клеточных пластов в присутствии аскорбиновой кислоты, фетальной бычьей сыворотки (ФБС) или лизата тромбоцитов, а также с или без добавления TGF β . Полученные мультиклеточные структуры были децеллюляризованы с использованием ранее разработанного протокола (CHAPS, ДНКаза I). Состав и структура полученного децеллюляризованного ВКМ (дВКМ) были охарактеризованы с помощью СЭМ, ИЦХ и дот-блоттинга на маркеры профиброзного матрикса. Мезенхимные стромальные клетки человека (МСК) культивировали на дВКМ для оценки его функциональной активности; анализировали в данных клетках экспрессию маркеров, ассоциированных с фиброзом, и фиброз-ассоциированный профиль мРНК.

Среди протоколов формирования профиброгенного внеклеточного матрикса оптимальными оказались условия культивирования фибробластов в присутствии ФБС и аскорбиновой кислоты. Полученный дВКМ имел трехмерную сетчатую структуру, схожую с ВКМ в многоклеточных пластах. Такой дВКМ содержал повышенный уровень EDA-FN и высокое соотношение коллагена I типа к III. Интересно, что добавление TGF β не оказало существенного влияния на отложение профиброгенных белков ВКМ, что может указывать на главенствующую роль источника ВКМ (фибробласты) по сравнению с условиями культивирования. МСК, культивированные на дВКМ, сохраняли веретенообразную морфологию, сходную с их формой в стромальных тканях. В этих клетках было выявлено увеличение экспрессии маркеров, ассоциированных с фиброзом (EDA-FN, альфа-гладкомышечный актин), и специфические изменения секретома (снижение секреции антифибротического фактора HGF и повышение секреции профибротических факторов SPARC и фибулина-2). Более того, профиль мРНК в таких МСК также сместился в сторону профибротического паттерна.

Таким образом полученный дВКМ может быть использован для имитации и изучения профибротического микроокружения *in vitro*. Данные результаты могут быть применены в дальнейших исследованиях, посвященных изучению влияния микроокружения на восстановление и регенерацию тканей.

Исследование проводилось с использованием биоматериалов, полученных в рамках проекта МГУ им. М.В. Ломоносова «Ноев ковчег» и при поддержке РФФИ (грант № 19-29-04172).