

УДК 576.5

ПРИМЕНЕНИЕ ИМПЕДАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ МОНИТОРИНГА РОСТА КЛЕТОК ХОРИОКАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА BeWo b30

© 2019 г. С. В. Никулин^{a, b, *}, Е. Н. Князев^a, Т. Н. Герасименко^a, С. А. Шилин^a, И. Н. Газизов^a, Г. С. Захарова^a, А. А. Полозников^c, Д. А. Сахаров^a

^aООО НТЦ “БиоКлиникум”, Москва, 115088 Россия

^bМосковский физико-технический институт (Государственный университет), Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия

^cНациональный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, Калужская обл., 249036 Россия

*e-mail: s.nikulin@bioclinicum.com

Поступила в редакцию 29.08.2018 г.

После доработки 11.12.2018 г.

Принята к печати 11.12.2018 г.

Плацента – высокоспециализированный орган, играющий ключевую роль во время беременности. На сегодняшний день существует несколько различных моделей плацентарного барьера, используемых для изучения транспорта ксенобиотиков и других механизмов функционирования плаценты. Клетки хориокарциномы человека BeWo широко используются для создания *in vitro* моделей плацентарного барьера человека. Однако эти клетки не подвержены действию контактного ингибирования и способны образовывать многослойные структуры, которые в норме не встречаются в человеческой плаценте. Цель данной работы – поиск различных маркеров, позволяющих следить за ростом клеток BeWo b30 на мембранной подложке, для чего впервые применена импедансная спектроскопия. Проведенные теоретические расчеты и полученные экспериментальные данные свидетельствуют в пользу того, что электрические параметры клеток, измеренные методом импедансной спектроскопии, позволяют оценивать число клеточных слоев. По результатам транскриптомного анализа обнаружено значимое повышение экспрессии генов металлотioneинов (особенно *MT1B*, *MT1F* и *MT2A*) и синцитинов (*ERVW-1* и *ERVFRD-1*) в зрелых клетках BeWo b30.

Ключевые слова: импедансная спектроскопия, плацентарный барьер, многослойность, BeWo b30, металлотioneины

DOI: 10.1134/S0026898419030133

ВВЕДЕНИЕ

Плацента – высокоспециализированный орган, играющий ключевую роль при беременности. Основные функции плаценты заключаются в обмене различными соединениями между плодом и матерью (включая кислород, питательные вещества и продукты метаболизма) и в защите плода от токсинов и инфекционных агентов любой природы [1]. На сегодняшний день известно несколько различных модельных систем для изучения функционирования плаценты в норме и при патологии [2]. К наиболее популярным относятся эксперименты *in vivo* на животных. К плюсам этой модели можно отнести широкую доступность и наличие полноценного клеточного микроокружения. Однако результаты, полученные на животных, часто не могут быть перенесены на человека из-за существенных различий в

строении плаценты [3]. Еще одна модель – эксперименты *ex vivo* по перфузии человеческой плаценты. Несмотря на высокую релевантность результатов, полученных на этих моделях, существует ряд недостатков, связанных с их использованием. В частности, это низкая доступность материала, невозможность детально изучить некоторые аспекты функционирования на целом органе и низкая воспроизводимость результатов [2].

Альтернативой упомянутым выше методам служат модели *in vitro* на основе клеточных линий, полученных от человека. Использование этой модели позволяет детально изучать влияние различных факторов микроокружения на функционирование плацентарного барьера, а при работе со стандартизированными клеточными линиями воспроизводимость результатов существенно повышается. На сегодняшний день уже разработан ряд *in vitro* мо-

делей плаценты, в основе которых лежат как классические системы культивирования, так и микрофлюидные устройства [2, 4–6].

Клетки хориокарциномы человека BeWo широко используют для создания *in vitro* моделей человеческого плацентарного барьера [6]. Известно, что эти клетки не подвержены действию контактного ингибирования (то есть сохраняют подвижность и способность к делению при контакте с другими клетками [7]) и могут образовывать многослойные структуры в процессе роста [6, 8]; при этом клетки верхних слоев также образуют плотные контакты (но в меньшем количестве) с соседними клетками [6]. Известно, что плацента человека только на ранних этапах развития состоит из нескольких слоев клеток трофобласта, а, начиная с третьего триместра, в ней присутствует только один слой трофобластов [9]. Число слоев клеток трофобласта существенно влияет на свойства плацентарного барьера [8–10], поэтому в экспериментах по изучению транспорта различных соединений через плацентарный барьер необходимо контролировать число слоев клеток.

Целью данной работы был поиск маркеров различной природы, позволяющих следить за ходом роста клеток BeWo b30 и контролировать число клеточных слоев. Наличие генов, экспрессия которых существенно меняется при образовании многослойной структуры, позволит в перспективе создать репортерные конструкции для мониторинга состояния клеток оптическими методами [11, 12]. Для поиска генов-кандидатов, которые могут быть использованы при создании таких репортерных систем, использован высокопроизводительный транскриптомный анализ на микрочипах. Также изучена возможность применения импедансной спектроскопии для измерения различных электрических параметров клеток BeWo, растущих на пористой подложке. Импедансная спектроскопия позволяет измерять не только трансэпителиальное/трансэндотелиальное сопротивление (TEER), но и ряд дополнительных электрических параметров, таких как электрическая емкость и добавочное сопротивление (включает как сопротивление измерительных электродов, культуральной среды, мембранной подложки, так и сопротивление базальной мембраны) [13–15]. Импедансная спектроскопия – метод, не требующий использования меток и позволяющий проводить прижизненные измерения в режиме реального времени с высоким временным разрешением [13]. В результате проведенного исследования выявлена связь некоторых электрических параметров клеток с числом клеточных слоев и обосновано применение импедансной спектроскопии для контроля качества *in vitro* моделей плацентарного барьера.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток BeWo b30. После разморозки клетки линии BeWo b30 рассеивали в культуральные флаконы с площадью поверхности 25 см² в 5 мл полной питательной среды. Полная питательная среда состояла из базовой среды DMEM без пирувата натрия, содержащей 4.5 г/л глюкозы, 2 mM L-глутамин и 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 1% раствора заменимых аминокислот (“Gibco”, США), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все препараты фирмы “Gibco”). Флаконы помещали в клеточный инкубатор (5% CO₂, 37°C). Пересев производили каждые 2–3 суток. Подробная процедура культивирования описана ранее [5].

Для проведения экспериментов клетки BeWo b30 рассеивали в 96-луночный планшет, содержащий мембранные вставки Transwell с диаметром пор 1 мкм (“Corning”), все лунки которого предварительно были заполнены полной питательной средой (50 мкл в верхнюю камеру, 235 мкл в нижнюю камеру). Планшет помещали в клеточный инкубатор (5% CO₂, 37°C) на 1 ч. Клетки BeWo b30 прикрепляли от подложки, используя 0.25%-ный раствор трипсина–EDTA с солями Хенкса (“ПанЭко”, Россия), ресуспендировали в питательной среде и подсчитывали при помощи автоматического счетчика клеток Countess (“Invitrogen”, США). В каждую мембранную вставку добавляли по 50 мкл клеточной суспензии с концентрацией клеток 600000 клеток/мл (30000 клеток в лунку, около 210000 клеток/см²). Далее в течение всего эксперимента инкубировали мембранные вставки в клеточном инкубаторе (5% CO₂, 37°C). Смену среды производили каждые 24 ч.

Измерение импедансных спектров и обработка полученных результатов. Измерение импедансных спектров проводили в диапазоне частот от 20 Гц до 20 кГц при помощи системы импедансной спектроскопии (НТЦ “БиоКлиникум”, Россия) и электрода STX100C96 (“World Precision Instruments”, США) при комнатной температуре. Для получения средних значений электрических параметров использовали, по крайней мере, 4 независимые мембранные вставки с клетками. Обработку полученных данных проводили при помощи языка программирования Python 2.7 (<http://www.python.org>).

Для расчета основных электрических параметров клеточного монослоя (сопротивления R, электрической емкости C, добавочного сопротивления R_{add}) использовали упрощенную эквивалентную схему (рис. 1) [14, 16]. Значения R, R_{add} и C были рассчитаны при помощи нелинейной аппроксимации зависимости импеданса от частоты. Статистическую значимость отличий проверяли при помощи *t*-критерия Стьюдента с пороговым уровнем

нем значимости 0.05. Планки погрешностей на графиках показывают стандартное отклонение.

Оценка влияния роста клеток в несколько слоев на импеданс. На рис. 2 представлены эквивалентные электрические схемы для монослоя клеток и клеток, растущих в несколько слоев (в предположении, что все слои одинаковы). На основании представленных эквивалентных схем можно вычислить результирующий импеданс клеток:

$$Z = R_{add1} + (N - 1)R_{interlayer} + N \frac{RZ_{CPE}}{R + Z_{CPE}}, \quad (1)$$

где R_{add1} – добавочное сопротивление для монослоя клеток, $R_{interlayer}$ – сопротивление прослойки между слоями клеток, N – число слоев клеток, а Z_{CPE} – импеданс элемента постоянной фазы, который выражается комплексным числом и вычисляется по следующей формуле:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{A\omega^\alpha} \left(\cos \frac{\pi\alpha}{2} - j \cdot \sin \frac{\pi\alpha}{2} \right), \quad (2)$$

где $A \geq 0$, $0 \leq \alpha \leq 1$ – параметры, определяемые из аппроксимации зависимости импеданса от частоты (при этом при $\alpha = 1$, элемент постоянной фазы эквивалентен электрическому конденсатору с емкостью A , а при $\alpha = 0$ – резистору с сопротивлением $1/A$). При α , близких к 1 (именно этот случай часто реализуется на практике при измерении импеданса клеток, растущих на мембранной подложке), электрическая емкость может быть вычислена по следующей формуле (рис. 1) [17]:

$$C = R^{\frac{1-\alpha}{\alpha}} \frac{1}{A^\alpha}. \quad (3)$$

На основании анализа полученного выражения для полного импеданса можно сделать вывод, что в данном случае годограф (рис. 1б) будет представлять собой полуокружность с центром в точке:

$$\text{Re}[Z]_0 = R_{add1} + (N - 1)R_{interlayer} + \frac{N}{2} R_{layer}, \quad (4)$$

$$\text{Im}[Z]_0 = \frac{N}{2} R_{layer} \text{ctg} \frac{\pi\alpha}{2}.$$

то есть, при росте числа слоев клеток N центр полуокружности годографа импеданса будет на графике смещаться вправо и вниз (рис. 1б), при этом эффективная измеряемая величина добавочного сопротивления R_{add} будет линейно расти с ростом N . Учитывая, что на практике α всегда меньше 1, центр полуокружности лежит ниже оси абсцисс. Радиус полуокружности ρ (а, следовательно, и величина измеряемого сопротивления R) будет прямо пропорционально увеличиваться с ростом числа N :

$$\rho = \frac{N}{2} R_{layer} \sqrt{\left(\text{ctg} \frac{\pi\alpha}{2} \right)^2 + 1}. \quad (5)$$

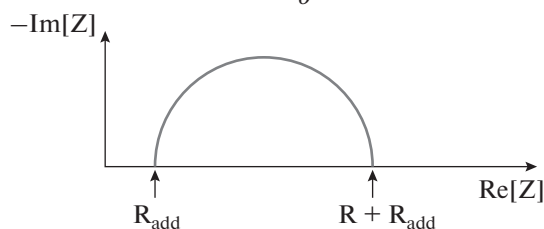
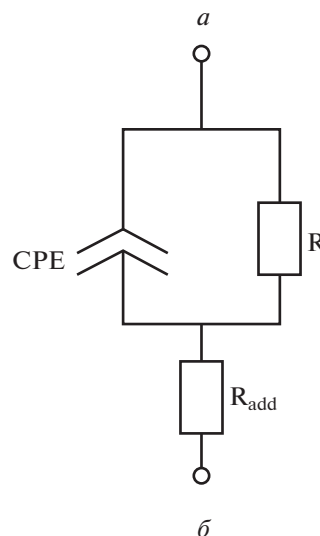


Рис. 1. Расчет основных электрических параметров клеточного монослоя. *a* – Упрощенная эквивалентная электрическая схема, использованная для вычисления основных электрических параметров (CPE – элемент постоянной фазы, отражает наличие электрической емкости у клеток; R – активное сопротивление возникающее за счет наличия клеточного сопротивления и сопротивления межклеточных контактов; вносит основной вклад в $TEER$; R_{add} – добавочное сопротивление, возникающее за счет наличия сопротивления мембранной подложки, сопротивления питательной среды, сопротивления слоя внеклеточного матрикса между мембраной и первым слоем клеток, а также за счет наличия сопротивления между слоями клеток). *б* – Годограф импеданса ($\text{Im}[Z]$), соответствующий упрощенной эквивалентной схеме.

Принимая во внимание все вышесказанное, можно сделать вывод, что при образовании многослойной структуры одновременно происходят 3 события (рис. 3): 1) заметный рост измеряемого сопротивления R , 2) рост измеряемого сопротивления R_{add} и 3) снижение ординаты центра полуокружности годографа импеданса.

Транскриптомный анализ. Для транскриптомного анализа отобрали клетки, растущие монослоем до посадки на мембранные вставки (0 ч), и клетки, растущие на мембранных вставках в течение 3 суток (72 ч) и образовавшие многослойную структуру. Эксперимент проводили в 3 биологических повторах. Клетки лизировали при помощи Qiazol lysis buffer (“Qiagen”) с добавлением 50 нг/мкл GlycoBlue Coprecipitant (“Thermo Fisher Scientific”, США). Выделение тотальной РНК проводили,

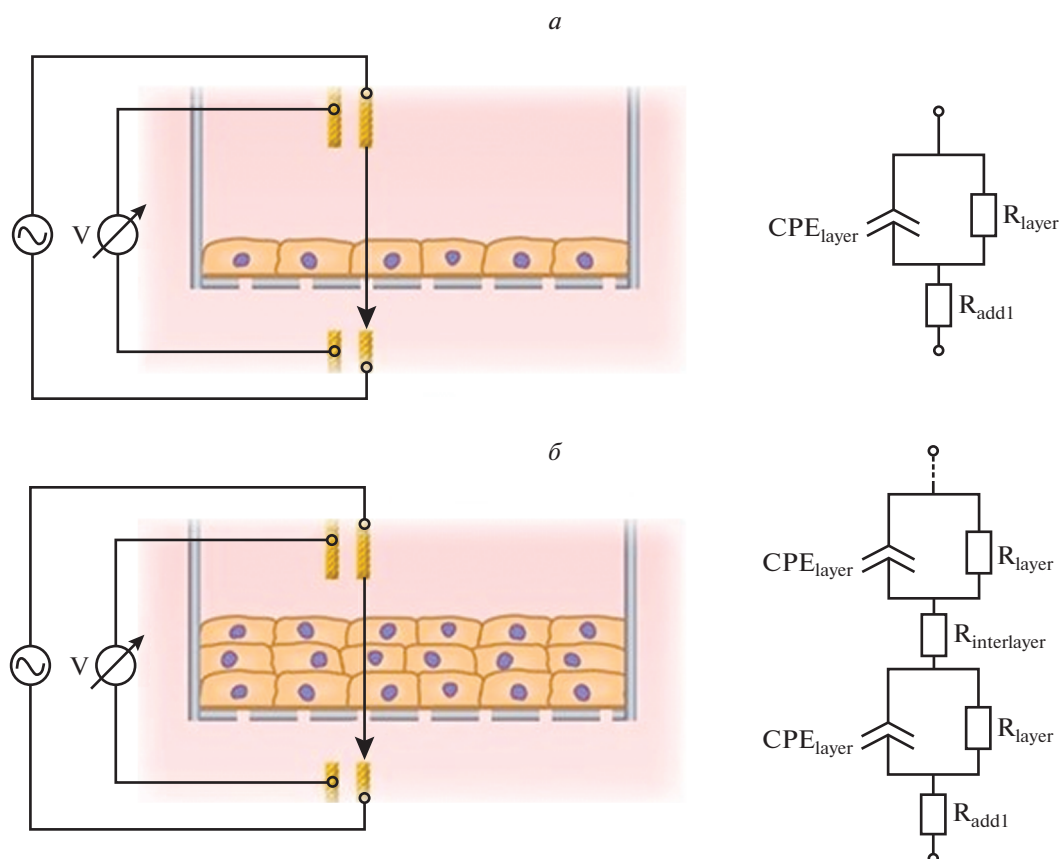


Рис. 2. Эквивалентные схемы. *a* – Полная эквивалентная электрическая схема для монослоя клеток. *b* – Полная эквивалентная электрическая схема для случая многослойной структуры (в предположении, что все слои одинаковые); (CPE_{layer} – элемент постоянной фазы для одного слоя клеток; R_{layer} – активное сопротивление одного слоя клеток; R_{add1} – добавочное сопротивление для монослоя клеток, $R_{interlayer}$ – сопротивление межклеточной прослойки).

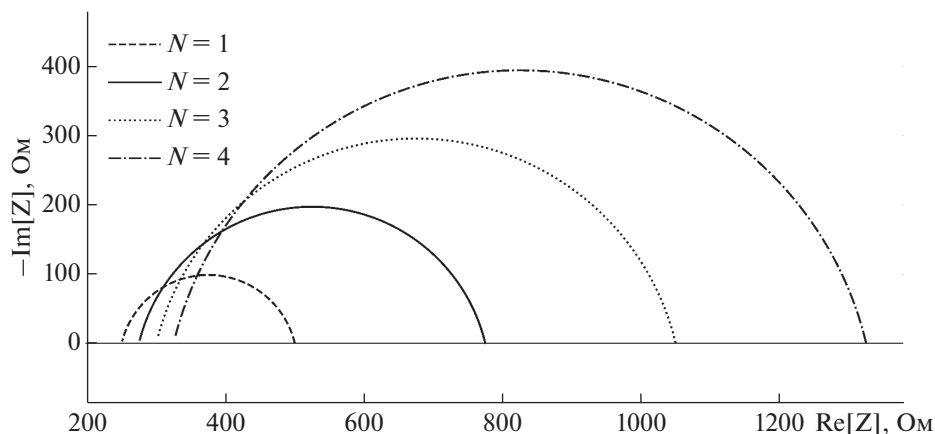


Рис. 3. Теоретическая зависимость годографа импеданса от числа слоев клеток (N).

используя набор miRNeasy Micro Kit (“Qiagen”) по протоколу производителя. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (“Thermo Fisher Scientific”). Качество выделенной РНК оценивали на приборе 2100 Bio-analyzer с набором реагентов RNA 6000 Nano Kit

(“Agilent”, США). Для дальнейшего анализа использовали образцы с показателем качества RIN более 9.5.

Транскриптомный анализ проводили на микрочипах Human Transcriptome Array 2.0 (“Affymetrix”, США). Результаты обрабатывали с помощью

алгоритма RMA в программном обеспечении Transcriptome Analysis Console version 4.0 (“Thermo Fisher Scientific”). Для оценки статистической значимости различий в экспрессии генов использовали скорректированные значения p -value (поправка FDR) с пороговым уровнем 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Измерения импеданса. При измерении импеданса клеток BeWo b30 в различные моменты времени от начала культивирования показано, что через 40 ч после начала эксперимента значения добавочного сопротивления R_{add} (рис. 4б) и ординаты центра полуокружности импеданса $Im[Z]_0$ (рис. 4в) статистически значимо не изменяются по сравнению со значениями, измеренными через 24 ч после посева клеток на мембранные вставки ($p = 0.72$ и $p = 0.13$ соответственно); при этом наблюдается рост сопротивления клеточного слоя R (рис. 4а), примерно на 124 Ом, в этом временном интервале ($p = 0.0003$). Однако уже через 8 ч начинается значительный рост добавочного сопротивления R_{add} (рис. 4б) по сравнению со значениями, измеренными через 24 ч после начала эксперимента (на 28 Ом через 48 ч, $p = 0.0004$; на 47 Ом через 96 ч, $p = 0.002$); при этом ордината центра полуокружности годографа импеданса начинает опускаться (на 16 Ом через 48 ч, $p = 0.08$; на 64 Ом через 96 ч, $p = 0.006$), а сопротивление клеточного слоя продолжает расти (на 227 Ом через 48 ч, $p = 0.008$; на 401 Ом через 96 ч, $p = 0.005$). Таким образом, по мере роста клеток радиус полуокружности годографа импеданса постоянно увеличивается, при этом после 40 ч культивирования начинается смещение центра полуокружности вправо и вниз (рис. 5).

Транскриптомный анализ. В результате проведенного транскриптомного анализа обнаружено значительное изменение экспрессии 1130 генов в клетках BeWo b30 через 72 ч после начала культивирования по сравнению с начальным моментом времени (изменение абсолютного значения экспрессии, по крайней мере, в 2 раза, FDR p -value < 0.05); при этом экспрессия 953 генов увеличилась, а 177 генов уменьшилась. Таблица 100 генов с наиболее сильным изменением экспрессии приведена в **Дополнительных материалах** (См. Приложение на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2019/3/supp_Nikulina_rus.pdf).

Среди наиболее значимых результатов транскриптомного анализа можно выделить повышенную экспрессию генов металлотионеиновых групп I и II в клетках BeWo b30 через 72 ч после начала культивирования (таблица) — без изменения экспрессии генов металлотионеиновых групп III и IV. В процессе роста клеток BeWo b30 наиболее сильное спонтанное усиление экспрессии наблюда-

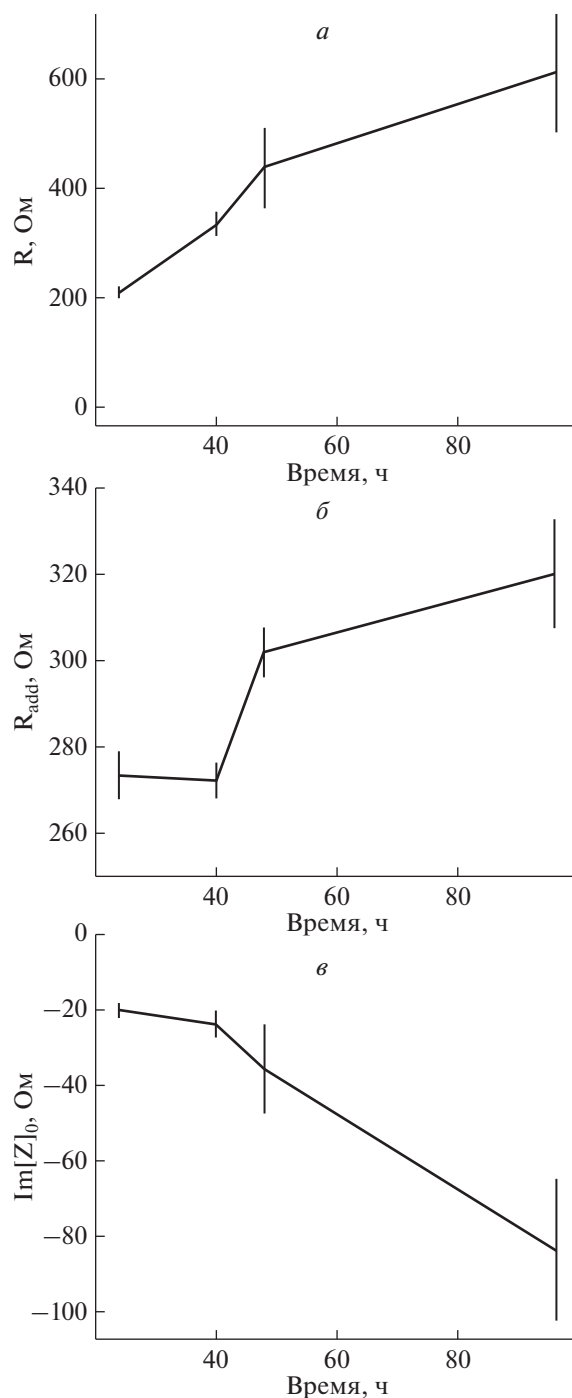


Рис. 4. Зависимость сопротивления клеток R (а), добавочного сопротивления R_{add} (б) и ординаты центра полуокружности годографа импеданса (в) от времени культивирования.

лось для генов *MT2A*, *MT1F* и *MT1B* (в 156, 111 и 99 раз соответственно).

Обнаружено, что в ходе роста клеток BeWo b30 спонтанно увеличивалась экспрессия генов *ERVW-1* (в 1.9 раза) и *ERVFRD-1* (в 8.1 раза) — кодируют белки синцитин-1 и синцитин-2 соответ-

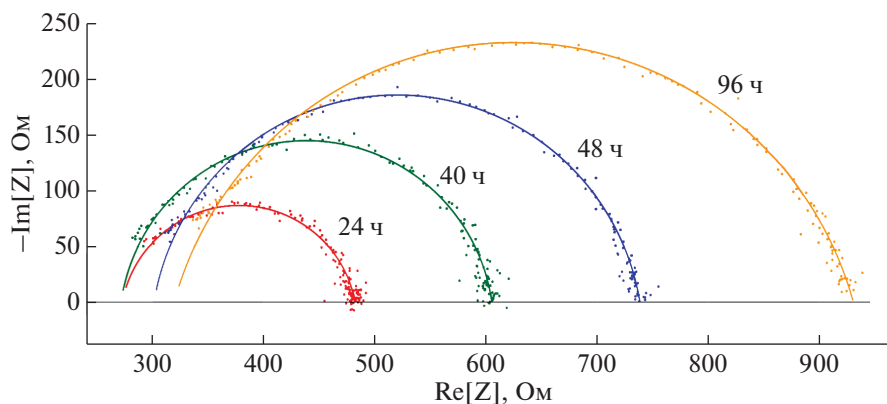


Рис. 5. Зависимость годографа импеданса клеток BeWo b30 от времени культивирования.

ственно, участвующие в синцитизации клеток трофобласта.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как показали Neaton и др. [6], клетки BeWo, посаженные на мембранную подложку при плот-

ности 80000 клеток/см², через 72 ч продолжают расти монослоем, а через 168 ч образуют четырехслойную структуру [6]. Позже Müller и соавт. [8] обнаружили, что при плотности посадки 150000 клеток/см² уже на 5 сутки формируется трехслойная структура, а при плотности посадки 610000 клеток/см² через такой же промежуток

Таблица. Относительный уровень экспрессии генов металлотионеинов в клеточной линии BeWo b30 через 72 ч после начала культивирования по сравнению с начальным моментом времени

Affymetrix ID	Степень изменения	FDR <i>p</i> -value	Ген	Описание
TC16002035.hg.1	2.88	2.0×10^{-4}	<i>MT1A</i>	Металлотионеин 1A
TC16000472.hg.1	98.80	3.5×10^{-7}	<i>MT1B</i>	Металлотионеин 1B
TC16000470.hg.1	2.27	1.1×10^{-3}	<i>MT1DP</i>	Металлотионеин 1D, псевдоген (функциональный)
TC16000468.hg.1	5.11	8.7×10^{-5}	<i>MT1E</i>	Металлотионеин 1E
TC16000473.hg.1	111.36	3.5×10^{-7}	<i>MT1F</i>	Металлотионеин 1F
TC16001135.hg.1	9.44	7.7×10^{-6}	<i>MT1G</i>	Металлотионеин 1G
TC16000474.hg.1	36.6	8.3×10^{-6}	<i>MT1H</i>	Металлотионеин 1H
TC01006221.hg.1	22.63	1.0×10^{-4}	<i>MT1HL1</i>	Металлотионеин 1H-подобный 1
TC01004008.hg.1	1.65	2.0×10^{-2}	<i>MT1HL1</i>	Металлотионеин 1H-подобный 1
TC16000475.hg.1	1.45	3.7×10^{-3}	<i>MT1IP</i>	Металлотионеин 1I, псевдоген
TC16001578.hg.1	1.44	3.6×10^{-3}	<i>MT1IP</i>	Металлотионеин 1I, псевдоген
TC16000469.hg.1	21.61	3.1×10^{-5}	<i>MT1JP</i>	Металлотионеин 1J, псевдоген
TC16001576.hg.1	5.69	1.0×10^{-4}	<i>MT1JP</i>	Металлотионеин 1J, псевдоген
TC16001575.hg.1	3.93	3.0×10^{-4}	<i>MT1L</i>	Металлотионеин 1L (ген/псевдоген)
TC16002075.hg.1	3.48	4.0×10^{-4}	<i>MT1L</i>	Металлотионеин 1L (ген/псевдоген)
TC16002074.hg.1	1.82	2.8×10^{-3}	<i>MT1M</i>	Металлотионеин 1M
TC16000476.hg.1	11.80	1.2×10^{-5}	<i>MT1X</i>	Металлотионеин 1X
TC16002034.hg.1	156.28	3.5×10^{-7}	<i>MT2A</i>	Металлотионеин 2A
TC16000465.hg.1	1.04	7.9×10^{-1}	<i>MT3</i>	Металлотионеин 3
TC16000464.hg.1	1.29	3.0×10^{-2}	<i>MT4</i>	Металлотионеин 4

времени образуется шестислойная структура. Таким образом, учитывая высокую плотность посадки клеток BeWo b30, использованную нами в работе (около 210000 клеток/см²), можно ожидать образования дополнительного слоя клеток уже на вторые или третьи сутки.

На основе полученных данных можно предположить, что формирование полноценного монослоя клеток BeWo занимает до 40 ч; при этом сопротивление клеток заметно растет, а значения добавочного сопротивления и ордината центра полуокружности годографа импеданса практически не меняются. Однако после 40 ч культивирования поведение всех электрических параметров клеток полностью совпадает с описанной выше моделью многослойного роста клеток. Ранее нами показано [15], что в процессе роста клеток эпителия кишечника Caco-2, которые подвержены действию контактного ингибирования и не образуют многослойных структур, импеданс ведет себя иначе. Слабое увеличение добавочного сопротивления в процессе роста клеток Caco-2, обусловленное, по-видимому, ремоделированием внеклеточного матрикса, не сопровождалось значимым ростом сопротивления клеток R.

Нами обнаружено значительное повышение экспрессии генов металлотионеинов в клетках BeWo b30. Металлотионеины представляют собой семейство богатых цистеином белков (Cys составляет до 30% последовательности) с относительно низкой молекулярной массой (~ 6 кДа) [18]. Эти белки принято делить на 4 группы: MT-I, MT-II, MT-III и MT-IV. Известно несколько изоформ металлотионеинов группы I, причем они кодируются разными генами. Основной функцией металлотионеинов считается связывание двухвалентных катионов, таких как Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺ и др [18, 19]. За счет высокой аффинности к ионам металлов металлотионеины принимают участие в регуляции обмена физиологически важных катионов, таких как цинк, содержание которого влияет на активность многих ферментов и транскрипционных факторов, а также участвуют в детоксикации при отравлении тяжелыми металлами. Благодаря наличию большого числа сульфгидрильных групп металлотионеины являются сильными антиоксидантами.

На сегодняшний день роль металлотионеинов в развитии и функционировании плаценты, как в норме, так и при отравлении тяжелыми металлами достаточно хорошо изучена. В экспериментах на животных показано, что в период вынашивания эмбриона экспрессия металлотионеинов постепенно возрастает и смещается от материнской части плаценты к плодной части [20]. Также в ходе беременности возрастает экспрессия металлотионеинов в печени плода. Судя по имеющимся данным, металлотионеины принимают участие в

транспорте физиологически важных ионов металлов через плацентарный барьер, а также защищают плод от воздействия тяжелых металлов [21–24]. Известно, что экспрессия металлотионеинов в клетках трофобласта повышается под воздействием ионов цинка и кадмия [25]; при этом концентрация Zn²⁺ в крови плода выше, чем в крови матери, а для Cd²⁺ наблюдается обратное соотношение [26].

Нами впервые показано, что экспрессия металлотионеинов спонтанно увеличивается в процессе роста клеток хориокарциномы человека BeWo b30. Содержание металлотионеинов может существенно влиять на транспорт металлосодержущих соединений через плацентарный барьер, что следует учитывать при постановке экспериментов на моделях *in vitro*. Также некоторые металлотионеины с наиболее ярко выраженными изменениями экспрессии (в частности, гены *MT1B*, *MT1F* и *MT2A*) могут быть использованы для создания репортерных генетических конструкций, позволяющих контролировать рост клеток BeWo b30.

Стоит также отметить, что в результате транскрипционного анализа обнаружено спонтанное увеличение экспрессии белков синцитин-1 и синцитин-2, играющих ключевую роль при синцитизации клеток трофобласта [27]. Известно, что синцитизация клеток BeWo b30 может быть индуцирована при помощи форсколина, при этом также возрастает экспрессия синцитина [28, 29]. Повышение экспрессии синцитинов может быть обусловлено тем, что в процессе роста клеток BeWo b30 происходит не только образование многослойной структуры, но и слияние клеток в синцитий, при этом гены *ERVW-1* и *ERVFRD-1* могут служить маркерами этого процесса.

Таким образом, в данной работе впервые описано применение импедансной спектроскопии для мониторинга роста клеток хориокарциномы человека BeWo b30, используемой для создания *in vitro* моделей плацентарного барьера. Получены экспериментальные доказательства возможности применения импедансной спектроскопии для дифференциации монослоя клеток от многослойной структуры. Импедансная спектроскопия относится к методам неинвазивным, не требующим использования молекулярных меток и работающим в режиме реального времени. Следовательно, импедансная спектроскопия может быть использована в моделях *in vitro* плацентарного барьера не только для контроля его целостности (как и классический метод измерения TEER), но и для оценки числа слоев клеток. В процессе роста клеток BeWo b30 выявлена повышенная экспрессия генов металлотионеинов и синцитинов, которые могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров роста. Кроме того, повышенную экспрессию генов синцити-

нов, возможно, стоит рассматривать и как маркер спонтанного слияния клеток BeWo b30 в синцитий.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 16-19-10597).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gude N.M., Roberts C.T., Kalionis B., King R.G. (2004) Growth and function of the normal human placenta. *Thromb. Res.* **114**, 397–407.
- Lee J.S., Romero R., Han Y.M., Kim H.C., Kim C.J., Hong J.-S., Huh D. (2016) Placenta-on-a-chip: a novel platform to study the biology of the human placenta. *J. Matern. Neonatal Med.* **29**, 1046–1054.
- Schmidt A., Morales-Prieto D.M., Pastuschek J., Fröhlich K., Markert U.R. (2015) Only humans have human placentas: molecular differences between mice and humans. *J. Reprod. Immunol.* **108**, 65–71.
- Blundell C., Tess E.R., Schanzer A.S.R., Coutifaris C., Su E.J., Parry S., Huh D. (2016) A microphysiological model of the human placental barrier. *Lab Chip.* **16**, 3065–3073.
- Bode C.J., Jin H., Rytting E., Silverstein P.S., Young A.M., Audus K.L. (2006) In vitro models for studying trophoblast transcellular transport. *Methods Mol. Med.* **122**, 225–39.
- Heaton S.J., Eady J.J., Parker M.L., Gotts K.L., Dainty J.R., Fairweather-Tait S.J., McArdle H.J., Srai K.S., Elliott R.M. (2008) The use of BeWo cells as an *in vitro* model for placental iron transport. *Am. J. Physiol. Physiol.* **295**, C1445–C1453.
- Ribatti D. (2017) A revisited concept: Contact inhibition of growth. From cell biology to malignancy. *Exp. Cell Res.* **359**, 17–19.
- Müller E., Gräfe C., Wiekhorst F., Bergemann C., Weidner A., Dutz S., Clement J. (2018) Magnetic nanoparticles interact and pass an *in vitro* co-culture blood-placenta barrier model. *Nanomaterials.* **8**, 108.
- Correia Carreira S., Walker L., Paul K., Saunders M. (2015) *In vitro* models of the human placental barrier – in regione caecorum rex est luscus. *Nanotoxicology.* **9**, 135–136.
- Sood A., Salih S., Roh D., Lacharme-Lora L., Parry M., Hardiman B., Keehan R., Grummer R., Winterhager E., Gokhale P.J., Andrews P.W., Abbott C., Forbes K., Westwood M., Aplin J.D., Ingham E., Papageorgiou I., Berry M., Liu J., Dick A.D., Garland R.J., Williams N., Singh R., Simon A.K., Lewis M., Ham J., Roger L., Baird D.M., Crompton L.A., Caldwell M.A., Swallow H., Birch-Machin M., Lopez-Castejon G., Randall A., Lin H., Suleiman M.-S., Evans W.H., Newson R., Case C.P. (2011) Signalling of DNA damage and cytokines across cell barriers exposed to nanoparticles depends on barrier thickness. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 824–833.
- Poloznikov A., Gazaryan I., Shkurnikov M., Nikulin S., Drapkina O., Baranova A., Tonevitsky A. (2018) *In vitro* and *in silico* liver models: current trends, challenges and opportunities. *ALTEX.* **35**, 397–412.
- Poloznikov A.A., Zakhariants A.A., Nikulin S.V., Smirnova N.A., Hushpuliyan D.M., Gaisina I.N., Tonevitsky A.G., Tishkov V.I., Gazaryan I.G. (2017) Structure-activity relationship for branched oxyquinoline HIF activators: effect of modifications to phenylacetamide “tail”. *Biochimie.* **133**, 74–79.
- Srinivasan B., Kolli A.R., Esch M.B., Abaci H.E., Shuler M.L., Hickman J.J. (2015) TEER measurement techniques for *in vitro* barrier model systems. *J. Lab. Autom.* **20**, 107–126.
- Henry O.Y.F., Villenave R., Cronce M.J., Leineweb W.D., Benz M.A., Ingber D.E. (2017) Organs-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function. *Lab Chip.* **17**, 2264–2271.
- Никунин С.В., Князев Е.Н., Герасименко Т.Н., Шилин С.А., Газизов И.Н., Захарова Г.С., Полозников А.А., Шкурников М.Ю. (2018) Неинвазивная оценка развития внеклеточного матрикса эпителии кишечника. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* **166**, 41–45.
- Никунин С.В., Князев Е.Н., Полозников А.А., Шилин С.А., Газизов И.Н., Захарова Г.С., Герасименко Т.Н. (2018) Экспрессия мРНК транспортеров SLC30A10 и SLC22A3 коррелирует с увеличением площади апикальной мембраны клеток Сасо-2. *Молекуляр. биология.* **52**, 667–674.
- Shoar Abouzari M.R., Berkemeier F., Schmitz G., Wilmer D. (2009) On the physical interpretation of constant phase elements. *Solid State Ionics.* **180**, 922–927.
- Thirumoorthy N. (2007) Metallothionein: an overview. *World J. Gastroenterol.* **13**, 993.
- Ruttikay-Nedecky B., Nejdil L., Gumulec J., Zitka O., Masarik M., Eckschlager T., Stiborova M., Adam V., Kizek R. (2013) The role of metallothionein in oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 6044–6066.
- Furukawa S., Usuda K., Abe M., Hayashi S., Ogawa I. (2008) Histological expression of metallothionein in the developing rat placenta. *J. Toxicol. Pathol.* **21**, 223–227.
- Lau J.C., Joseph M.G., Cherian M.G. (1998) Role of placental metallothionein in maternal to fetal transfer of cadmium in genetically altered mice. *Toxicology.* **127**, 167–178.
- Andrews G.K., Geiser J. (1999) Expression of the mouse metallothionein-I and -II genes provides a reproductive advantage during maternal dietary zinc deficiency. *J. Nutr.* **129**, 1643–1648.
- Ronco A.M., Arguello G., Suazo M., Llanos M.N. (2005) Increased levels of metallothionein in placenta of smokers. *Toxicology.* **208**, 133–139.
- Benitez M.A., Mendez-Armenta M., Montes S., Rembao D., Sanin L.H., Rios C. (2009) Mother-fetus transference of lead and cadmium in rats: involvement of metallothionein. *Histol. Histopathol.* **24**, 1523–1530.
- Waalkes M.P., Poisner A.M., Wood G.W., Klaassen C.D. (1984) Metallothionein-like proteins in human placenta and fetal membranes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **74**, 179–184.
- Goyer R.A., Haut M.D., Cherian M.G. (1992) Cellular localization of metallothionein in human term placenta. *Placenta.* **13**, 349–355.

27. Vargas A., Thiery M., Lafond J., Barbeau B. (2012) Transcriptional and functional studies of human endogenous retrovirus envelope EnvP(b) and EnvV genes in human trophoblasts. *Virology*. **425**, 1–10.
28. Azar C., Valentine M., Trausch-Azar J., Druley T., Nelson D.M., Schwartz A.L. (2018) RNA-Seq identifies genes whose proteins are transformative in the differentiation of cytotrophoblast to syncytiotrophoblast, in human primary villous and BeWo trophoblasts. *Sci. Rep.* **8**, 5142.
29. Borges M., Bose P., Frank H.-G., Kaufmann P., Pötgens A.J.G. (2003) A two-colour fluorescence assay for the measurement of syncytial fusion between trophoblast-derived cell lines. *Placenta*. **24**, 959–964.

IMPEDANCE SPECTROSCOPY AND TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF CHORIOCARCINOMA CELLS BeWo b30 AS A MODEL OF HUMAN PLACENTA

S. V. Nikulin^{1,2,*}, E. N. Knyazev¹, T. N. Gerasimenko¹, S. A. Shilin¹, I. N. Gazizov¹, G. S. Zakharova¹, A. A. Poloznikov³, and D. A. Sakharov¹

¹ SRC Bioclinicum LTD, Moscow, 115088 Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Moscow oblast, 141701 Russia

³ National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga oblast, 249036 Russia

*e-mail: s.nikulin@bioclinicum.com

Placenta is a highly specialized organ that is necessary for successful gestation. Several models of the placental barrier are used to study its functioning, including transplacental transport of xenobiotics. One of these models, human choriocarcinoma cell line BeWo is widely used *in vitro*. Notably, cancerous BeWo cells form multilayer structures that normally are not found in the human placenta. Here we aimed at the development of techniques suitable for the monitoring of BeWo b30 cells in the culture. To assess the state of BeWo b30 cells growing on a membrane, we utilized impedance spectroscopy, which allowed us to estimate the amounts of cell layers by the change in the electrical parameters of the biological system. In mature BeWo b30 cell cultures, we have also noted a significant increase in the expression of metallothionein- and syncytin-encoding genes, including *MT1B*, *MT1F*, *MT2A*, *ERVW-1* and *ERVFRD-1*, which could be used as biomarkers reflecting the development of mature phenotypic characteristics, namely, trophoblastic invasion and formation of syncytium.

Keywords: impedance spectroscopy, TEER, placental barrier, multilayer, BeWo b30, metallothionein