

## ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ОТ МЕХАНИЗМОВ РЕПЛИКАЦИИ И ПАТОГЕНЕЗА К ПОДХОДАМ ТЕРАПИИ

УДК 578.2

### ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СРЕДЫ В ИССЛЕДОВАНИЯХ МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОК В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

© 2022 г. М. В. Голиков<sup>а</sup>, В. Т. Валуев-Эллистон<sup>а</sup>, О. А. Смирнова<sup>а</sup>, А. В. Иванов<sup>а</sup> \*

<sup>а</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: aivanov@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.01.2022 г.

После доработки 22.02.2022 г.

Принята к публикации 01.03.2022 г.

Изменения клеточного метаболизма сопровождают развитие широкого спектра патологий, включая рак, аутоиммунные и воспалительные заболевания. В связи с этим одна из стратегий создания терапевтических средств заключается в использовании ингибиторов ферментов измененных метаболических путей. Однако исследования нарушений метаболизма клеток затруднены, в том числе вследствие значительного влияния используемых культуральных сред, которые сами могут изменить многие процессы в клетке, которая в этом случае становится далекой от реальной. Многие группы, занимающиеся изучением аспектов метаболизма, сталкиваются с невозпроизводимостью результатов, полученных *in vitro*, при переходе к пациентам. В последнее десятилетие в биохимии появился подход, заключающийся в изменении классических культуральных сред с целью приближения их состава к составу плазмы крови. И в 2017–2019 гг. были предложены две культуральные плазмаподобные среды: Plasmaх и HPLM. Данный обзор посвящен анализу недостатков классических сред, а также различий в метаболизме клеток при культивировании в общераспространенных и плазмаподобных средах в норме и при патологии.

**Ключевые слова:** культуральная среда, клетки, метаболизм, окислительный стресс, вирусы

**DOI:** 10.31857/S002689842205007X

#### ВВЕДЕНИЕ

Основное условие получения достоверных результатов биомедицинских исследований *in vitro* – правильное культивирование клеточных линий [1]. Большинство работ в этой области основано на использовании в экспериментах разнообразных линий клеток человека, млекопитающих и других эукариот; при этом многие авторы, особенно занимающиеся исследованиями метаболизма клеток, зачастую сталкиваются с проблемами, связанными непосредственно с культивированием клеточных линий. Иногда эти проблемы касаются того, что определенные клеточные линии не могут нормально культивироваться в стандартных (широко распространенных во всем научном мире) средах: DMEM, MEM, RPMI, DMEM-F12 и т.д. В других случаях выбранный вектор исследования вынуждает авторов искать возможность максимально приблизить формат эксперимента к реальным условиям *in vivo*, в том числе адаптируя культивирование и приближая состав культуральных сред к составу и концентрациям внеклеточных метаболитов в тканях.

Основными клеточными культурами для современной биомедицинской науки стали разно-

образные линии опухолевых клеток. Различные виды рака занимают, пожалуй, главенствующее место среди всех исследуемых патологических процессов ввиду широкой распространенности, сложности и разнообразия молекулярных механизмов возникновения. Заметим, что сама по себе опухоль – это сложная, объемная, динамичная и гетерогенная структура внутри организма, включающая смешанные популяции нормальных, а также раковых (дифференцированных и недифференцированных) клеток, которые находятся в тесной взаимосвязи друг с другом и имеют уникальные черты в каждом случае. Но несмотря на это, практически все исследования проводятся с однородными раковыми клетками (линиями), растущими в виде монослоя (2D-культура). Эти исследования внесли огромный вклад в понимание основных клеточных процессов и механизмов канцерогенеза, а также многих других патологий. Однако нельзя отрицать, что используемые многими исследователями лабораторные модели воспроизводят далеко не все процессы реальной опухоли.

Один из факторов, определяющих отличие процессов в лабораторных клеточных моделях от процессов в клетках тканей, – разный процент кислорода вокруг клеток. Так, большин-

ство исследователей работает в нормальной атмосфере, содержащей 21% кислорода, к которой прибавляют 5% CO<sub>2</sub> (и доля кислорода составляет 18.6%) [2]. Процент кислорода в окружении клеток ниже этого значения из-за ограниченной диффузии через слой культуральной среды. В то же время в тканях уровень кислорода составляет 3.4–6.8% [2, 3], причем в опухолях уровень кислорода снижен по сравнению с нормальными тканями [2]. Таким образом, обычные условия культивирования на самом деле представляют не нормоксию, а гипероксию, что может нарушать многие редоксзависимые процессы и сигнальные пути, опосредованные в том числе факторами транскрипции HIF-1, NF-κB и др. [2].

Еще один фактор – геометрия культуры клеток. Подавляющее большинство исследований выполняется на 2D-культурах. В последнее десятилетие широко обсуждалось применение 3D-культур (сфероиды, органоиды), в которых клетки в большей степени приближены к реальным условиям, что, в свою очередь, позволяет получать более достоверные результаты [4]. Хотя такие культуры частично воссоздают микроокружение клеток, трудоемкость работы с ними и чувствительность к таким факторам, как качество реагентов, профессионализм экспериментатора и другим, резко ограничивают их применение.

Наконец, третий фактор – культуральные среды, так как состав и концентрации метаболитов в них могут влиять на рост и дифференцировку клеток, статус сигнальных путей и, как следствие, на результаты эксперимента. В последние годы появились новые среды для культивирования, имитирующие состав плазмы крови человека, которые получают распространение в мире.

Цель представленного нами обзора – показать примеры нарушения различных клеточных процессов в клетках, культивируемых при использовании традиционных сред, и представить немногочисленные литературные данные по изменениям метаболизма, которые происходят при переходе к новым, плазмаподобным, культуральным средам.

#### ПРИМЕРЫ ВЛИЯНИЯ НЕФИЗИОЛОГИЧНОГО СОСТАВА КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕД НА ПРОЦЕССЫ В КЛЕТКАХ

Традиционные (нефизиологические, стандартные) питательные среды для клеточных культур известны с 1950-х годов [5–7]. DMEM, RPMI и другие среды разрабатывались с целью насытить культуры клеток необходимыми питательными элементами, поддерживать стабильный и максимально быстрый рост и пролиферацию раковых клеток в течение длительного периода. И подавляющее большинство экспериментов, связанных с исследова-

нием метаболизма клеток, проводили именно в подобных средах [8].

Во многих классических средах отсутствуют некоторые природные метаболиты, присутствующие в плазме крови человека/животных, а концентрации других зачастую сильно отличаются от таковых *in vivo*. Примером может служить концентрация глюкозы. Так, в изначальном составе среды DMEM концентрация глюкозы составляла 1 г/л, что соответствует физиологической (5.5 мМ). Однако затем ее уровень был повышен до 4.5 г/л, что соответствует условиям гипергликемии. Именно эту среду чаще всего используют в работах с культурами прикрепленных клеток, причем большинство исследователей не обращает внимания на важность выбора адекватной концентрации глюкозы. Стоит отметить, что такое повышение концентрации глюкозы, как минимум, приводит к усилению продукции активных форм кислорода (АФК) вследствие повышения уровней экспрессии ряда изоформ NADPH-оксидаз (NOX) (данные суммированы в обзоре [9]). В свою очередь, активация в ответ на окислительный стресс защитного каскада Nrf2/ARE, приводящая к повышению уровня экспрессии NADPH-хиноноксидоредуктазы (Nqo1) [10], усиливает гликолиз [11]. Аномально высокий уровень глюкозы может вызывать и стресс эндоплазматического ретикулума и последующий ответ на несвернутые белки (unfolded protein response) [12]. Таким образом, использование культуральных сред с повышенным уровнем глюкозы приводит к тому, что процессы в клетках становятся заведомо нефизиологичными.

Наиболее известным обоснованием применения высокоглюкозных сред считается эффект Варбурга – усиленный гликолиз, характерный для большинства опухолевых клеток, и его разобщение с циклом Кребса [13]. Действительно, многие используемые линии раковых клеток характеризуются высоким уровнем поглощения глюкозы и ее превращения в пируват и затем в лактат [14]. Однако установлено, что на самом деле в микроокружении опухоли уровень глюкозы не повышен, а снижен – в 3–10 раз [15, 16]. Элегантный подход к моделированию таких условий предложила группа К. Bisroy [17]. Он заключается в постоянном восполнении глюкозы в среде на аппарате Nutrostat. Авторы обнаружили, что линии раковых клеток различаются по уровням окислительного фосфорилирования и, как следствие, чувствительности к бигуанидам (в том числе метформину). Примечательно, что при использовании стандартной среды эти различия “маскируются”.

Как показали Balsa и соавт. [18], высокое содержание глюкозы снижает активность системы окислительного фосфорилирования, тогда как сниже-

ние ее уровня усиливает дыхательную активность митохондрий. В условиях нормального или сниженного содержания глюкозы в культуральной среде происходит сборка “респирасом” (дыхательных суперкомплексов), а ключевую роль в этом процессе играет фактор транскрипции ATF4. Стоит отметить, что этот фактор активируется в ответ на “интегративный” стресс, который тесно связан с уровнями аминокислот и стрессом эндоплазматического ретикула [19].

Еще один компонент культуральных сред, высокий уровень которого оказывает влияние на клеточный метаболизм, — пируват. Известно, что многие линии раковых клеток зависят от глутаминолиза — процесса превращения глутамина в глутамат и далее в  $\alpha$ -кетоглутарат (метаболит цикла Кребса). Учитывая, что в опухолевых клетках *in vitro* гликолиз направлен не в цикл Кребса, а на выработку лактата, глутамин становится одним из основных доноров углерода для цикла. Соответственно ингибиторы глутаминазы, которая катализирует ключевую стадию глутаминолиза, рассматривают как потенциальные противоопухолевые препараты [20]. Однако сообщалось, что наличие в среде пирувата резко снижает чувствительность клеток к ингибиторам глутаминазы [21]. Примечательно, что концентрация пирувата в культуральных средах (например, 1 мМ в DMEM) существенно превосходит его концентрацию в плазме крови (0.05–0.1 мМ [22]). И хотя активно используются и среды без пирувата, многие исследователи рассматривают эту добавку не как возможный регулятор метаболических и сигнальных путей, а как одно из питательных веществ, которое увеличивает скорость роста клеток.

Некоторые научные группы все же пытались найти выход и создать некое подобие физиологически обоснованной среды, которая позволила бы повысить достоверность результатов экспериментов. Например, была создана особая среда BrainPhys с пониженной концентрацией нейрональных ионов и аминокислот по сравнению с классическими средами [23]. Эта специализированная среда позволила исследователям изучать электрическую активность нейронов. Практически одновременно другая группа ученых для изучения метаболизма клеток глиобластомы и рака молочной железы разработала среду SMEM с концентрациями аминокислот, пирувата и витаминов, приближенными к таковым в крови человека [24, 25]. Однако в состав этой среды не входили многие компоненты крови: карнитин, метаболиты цикла Кребса и др.

Подобное стремление научного сообщества максимально приблизиться к условиям *in vivo* вызвано и тем, что результаты исследований последних лет показали, что данные от используемых

*in vitro* моделей не всегда воспроизводятся *in vivo* и не подтверждаются данными, полученными от пациентов. В области исследования клеточного метаболизма таким примером может служить очень сильная антипролиферативная активность ингибиторов глутаминазы в отношении линий различных видов рака *in vitro*, но отсутствие противопухолевой активности этих соединений *in vivo* — как показано на примере рака поджелудочной железы [26].

## ПЛАЗМАПОДОБНЫЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Группа S. Tardito, предложившая среду SMEM [27], и группа D. Sabatini/J. Cantor [28] продолжили работы по усовершенствованию состава культуральных сред. Они предложили две похожие культуральные среды, состав которых имитирует плазму крови человека: HPLM (Human Plasma-Like Medium) и PlasmaX. За их основу была взята стандартная смесь неорганических солей EBSS (Earle's Balanced Salt Solution), к которой добавили витамины и полярные метаболиты, присутствующие в плазме в концентрациях не ниже 2 мкМ [27, 28]. Концентрация глюкозы в них составила 1 г/л (как в исходном варианте среды DMEM), а пирувата — 0.05–0.1 мМ. Еще одной важной добавкой стал лактат, который присутствует в крови человека в норме в концентрации не менее 1 мМ [22] и относится к важным питательным веществам для клеток многих тканей [29, 30]. Кроме того, эти среды содержали и непротеиногенные аминокислоты, и интермедиаты цикла Кребса: цитрат и ацетат, — а также карнитин и ацетилкарнитин, которые участвуют в метаболизме жирных кислот и ацетил-кофермента А (Ac-CoA) и важны для поддержания активной системы окислительного фосфорилирования [31–33].

Авторы подчеркивали важность уникальных метаболитов в составе разработанных ими сред. Например, мочевая кислота (конечный метаболит катаболизма пуринов) регулирует биосинтез пиримидиновых нуклеотидов за счет ингибирования урацилмонофосфатсинтетазы. В доказательство своей правоты J. Santog и соавт. [28] показали, что цитотоксическая активность 5-фторурацила в клетках, культивируемых в среде HPLM, ниже, чем в классических средах.

Практически всегда в стандартные лабораторные среды вносят 10–20% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS). В ее состав входят многочисленные факторы роста, гормоны и микроэлементы, необходимые для обеспечения стабильной пролиферации широкого диапазона клеточных культур. Однако сыворотка, помимо этого, привносит неопределенный и обычно не учитываемый пул полярных метаболитов и липидов, который может отличаться в зависимости от

лота сыворотки и ее происхождения, и этот состав практически никогда не анализируется. Существуют и специализированные культуральные среды, содержащие вместо сыворотки альбумин, трансферрин, инсулин, факторы роста и/или пептиды или гидролизаты белков [34]. Они поддерживают рост клеток, но их применение сильно ограничено из-за высокой стоимости и необходимости оптимизации протоколов культивирования. Для того, чтобы снизить влияние сыворотки на состав метаболитов в плазме, создатели среды Plasmax уменьшили ее содержание до 2.5%, в то время как создатели среды HPLM заменили обычную сыворотку на диализованную, то есть лишенную поллярных метаболитов.

Наконец, следует отметить, что эксперименты с физиологическими средами, имитирующими плазму крови человека, не всегда можно напрямую экстраполировать на животных. Так, группа J. Cantor [28] выявила различия в составе плазмы крови мыши и человека и продемонстрировала, что у мыши на порядок ниже концентрация мочевой кислоты (о значении которой говорилось выше) и в такой низкой концентрации она не подавляет биосинтез пиримидиновых нуклеотидов. Нельзя исключать, что различия в концентрации других низкомолекулярных соединений, а также гормонов и факторов роста также вносят существенные изменения в метаболизм клеток.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗЛИЧИЙ В МЕТАБОЛИЗМЕ КЛЕТОК ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В СТАНДАРТНЫХ И ПЛАЗМАПОДОБНЫХ СРЕДАХ

Использование физиологических сред в биологических исследованиях только начинается, но уже опубликованы результаты нескольких научных групп, показывающие и доказывающие актуальность и целесообразность использования таких сред.

Физиологические среды оказывают значительное влияние на метаболизм раковых клеток *in vitro*. Один из микроэлементов среды Plasmax, меняющий метаболизм, — селен, присутствующий в среде в форме селенита. Селеносодержащие белки, и прежде всего, глутатионпероксидаза-4 (GPx4), защищают клетки от окислительного стресса и от перекисного окисления липидов в частности (например, [35]). J. Vande Voorde и др. [27] продемонстрировали, что при низкой плотности классических сред (например, DMEM-F12) клетки гибнут по механизму ферроптоза. Использование же содержащей селенит физиологической среды Plasmax предотвращает гибель даже единичных клеток. Следует особо подчеркнуть, что данный подход может быть востребован и лабораториями, занимающимися клональной селекцией.

Использование физиологически обоснованных сред оказывало влияние на морфологию и скорость роста клеток некоторых клеточных линий (что проиллюстрировано на примере линии MDA-MB-468), а также на плотность межклеточных контактов [27]. Сходные данные получены и нашей группой для следующих линий клеток: гепатокарциномы Huh7.5, рака шейки матки HeLa и почки зеленой мартышки Vero E6, — которые при культивировании в среде Plasmax становились более вытянутыми и образовывали менее плотные контакты между собой [36].

Известно, что утилизация клетками глутамина сопровождается выработкой аммония, который токсичен и замедляет рост клеток [37]. С целью избежать этого некоторые группы исследователей добавляют пируват — для быстрого роста клеток. Однако установлено, что в обычно используемой концентрации (1–2 мМ) пируват может вызывать псевдогипоксический фенотип при нормоксии, что достигается стабилизацией фактора транскрипции HIF-1 $\alpha$  [27]. И опять следует отметить существование обратной связи, так как HIF-1 $\alpha$  регулирует экспрессию ключевых генов ферментов гликолиза [38].

Кроме того, на примере трижды негативного рака молочной железы продемонстрировано, что культивируемые в физиологической среде клетки потребляют в 2–3 раза меньше глутамина, лейцина, изолейцина, серина, цистина/цистеина и тирозина и характеризуются различными уровнями потребления других аминокислот, но сходным уровнем гликолиза и продукции лактата [27].

К наиболее заметным изменениям метаболизма в классических средах по сравнению с плазмаподобными относится нарушение цикла мочевины, который отвечает за утилизацию токсичного аммиака и превращение его в мочевины. В часто используемой среде DMEM-F12 концентрация аргинина, субстрата ключевого фермента цикла аргиназы, повышена по сравнению с природной в 10 (!) раз (700 vs 64 мкМ). Vande Voorde и соавт. [27] при помощи <sup>13</sup>C-меченого аргинина показали, что основная часть этой аминокислоты превращается не в орнитин (продукт аргиназы), а в аргининосукцинат. Следовательно, в среде DMEM-F12 цикл мочевины “идет в обратную сторону”. Примечательно, что в плазмаподобных средах этого нарушения нет. Хотя авторы этой работы не исследовали другие классические культуральные среды (например, DMEM), логично предположить, что повышенный уровень аргинина (398 мкМ) может вызывать нарушение цикла мочевины. Это ставит под сомнение результаты исследований сопряженных метаболических систем, полученные с использованием классических сред, по связанным с циклом мочевины процессам: утилизации аммиака, продукции NO при превраще-

нии аргинина в цитруллин NO-синтазами, метаболизме синтезирующихся из орнитина полиаминов. И действительно, согласно полученным нами предварительным результатам, в клетках, культивируемых в среде Plasmaх, существенно снижены уровни биогенных полиаминов (*данные не приведены*). Однако, учитывая важность этого класса соединений в процессах роста и дифференцировки клеток [39–41], можно ожидать измененной взаимосвязи между этой метаболической системой и ростом, и функциями клеток.

Физиологические культуральные среды влияют и на процессы дыхания (окислительного фосфорилирования). На четырех различных линиях клеток (Huh7.5, A549, HeLa и Vero E6) мы показали, что замена классических сред на Plasmaх приводит к резкому росту дыхательной активности митохондрий без заметного изменения их массы [36]. Стоит отметить, что для каждой из этих линий в качестве стандартной использовали различные культуральные среды: DMEM, DMEM-F12 и MEM. Сходное усиление дыхательной активности клеток описано и другими исследователями для других линий клеток: рака молочной железы MCF7, аденокарциномы простаты LNCaP и остеосаркомы SaOS2 [42, 43]. Более того, в последней работе описано усиление дыхательной активности и в условиях гипоксии. Это имеет огромное значение, так как стандартные условия культивирования в обычной атмосфере, на самом деле, обеспечивают повышенные уровни кислорода (корректнее называть гипероксией): в тканях уровень кислорода находится в диапазоне 3.4–6.8% [2, 3]. Интересно, что усиление дыхания сопровождается образованием протяженной митохондриальной сети, что отмечено для различных линий клеток человека и животных [17].

Стоит отметить и существенные различия в оценке влияния среды на гликолиз. Так, F. Moradi и соавт. [42] сообщали о снижении гликолиза в клетках остеосаркомы, рака молочной железы и простаты, культивируемых в плазмаподобной среде. По нашим данным, эффект зависит от линии клеток: среда Plasmaх не вызвала изменений гликолитической активности в клетках карциномы печени Huh7.5, снижала в клетках линий HeLa и Vero E6 и повышала в клетках рака легкого A549 [36].

Еще одно изменение, возникающее в клетках при использовании физиологической среды по сравнению с различными стандартными, – резкое снижение массы (количества) лизосом [36]. Известно, что лизосомы участвуют в хранении ряда аминокислот [44], поэтому изменение их содержания должно сказываться на метаболизме клеток. F. Moradi и соавт. [43] обнаружили снижение интенсивности митофагии, что также вносит вклад в увеличение длины и разветвленности митохондриальных сетей. Однако заметим, что дан-

ных об изменениях в активности аутофагии в литературе пока нет.

Наконец, замена классических сред на физиологические влияет и на редокс-статус клеток. Так, усиление дыхательной активности клеток Huh7.5, A549, HeLa и Vero E6 сопровождается усилением продукции АФК в целом и супероксид-анионов в митохондриях в частности [36]. Это можно объяснить повышенными уровнями (но не процентом) утечки электронов из цепи передачи электронов в дыхательных комплексах митохондрий. Не согласуются с этими данными результаты Moradi и соавт. [43], которые выявили снижение продукции пероксида водорода в миофибробластах линии C2C12, культивируемых в плазмаподобной среде в условиях нормоксии (21% кислорода). Авторы связывают этот эффект с возможной повышенной активностью и экспрессией антиоксидантных ферментов. В этой же работе продемонстрировано и отличие в чувствительности клеток к эстрадиолу E2 и селективным модуляторам рецепторов эстрогена. Так, при культивировании клеток C2C12 в классической среде эстрадиол E2 индуцировал снижение уровня пероксида водорода, но не оказывал влияния на клетки, которые росли в физиологической среде.

#### ПРИМЕНЕНИЕ ПЛАЗМАПОДОБНЫХ СРЕД В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

За последние несколько лет появились примеры использования плазмаподобных культуральных сред в различных областях биологии. Физиологические среды позволяют исследовать причины и механизмы, лежащие в основе резистентности некоторых типов раковых клеток к аспарагиназе. Этот фермент применяют для снижения уровня экзогенного аспарагина, биосинтез которого нарушен в клетках лимфобластного лейкоза. В исследовании M. Chiu и др. [45] использована физиологически обоснованная среда Plasmaх в эксперименте, направленном на изучение обмена аминокислот (аспарагин и глутамин) стромальными мезенхимальными клетками, в том числе при культивировании совместно с клетками острого лимфобластного лейкоза. Выявлено, что стромальные клетки в присутствии аспарагина в среде поглощают из среды как аспарагин, так и глутамин, в то время как в отсутствие аспарагина в среде стромальные клетки, напротив, аспарагин секретируют; причем около четверти этого аспарагина синтезируется из поступающего из среды глутамина. Таким образом, стромальные клетки могут использовать внеклеточный глутамин для синтеза и секреции необходимого бластным клеткам аспарагина, что снижает терапевтическую эффективность аспарагиназы.

Известно, что во многих случаях в клетках глиобластомы, опухолей желудочно-кишечного трак-

та, лейкоза и других видов злокачественных образований имеет место гомозиготная делеция гена метилтиоаденозинфосфорилазы (МТАР) [46]. В связи с тем, что этот фермент важен для метаболизма пуринов и биогенных полиаминов, отсутствие кодирующего его гена создает уязвимость для раковых клеток. Так, для них *in vitro* описано повышение внутриклеточной концентрации субстрата этого фермента – метилтиоаденозина (МТА) [47]; при этом высокие концентрации МТА снижают чувствительность клеток к аргинин-N-метилтрансферазе, что может быть использовано для противоопухолевой терапии. При использовании физиологической среды Plasmax Y. Varekatain и соавт. [48] показали, что описанная выше мутация не вызывает накопления МТА в клетках, но способствует его секреции. Более того, секретлируемый МТА может поглощаться стромальными клетками *in vivo*, что продемонстрировано в эксперименте по совместному культивированию клеток глиобластомы и макрофагов. Авторы высказали гипотезу, что различия в уровнях некоторых соединений (цистеина, метионина и др.) в физиологической среде препятствуют накоплению МТА в первичных опухолях пациентов.

Продолжая тему цитотоксичности и эффективности противоопухолевых препаратов, Khadka S. и др. [49] выявили, что в клетках глиомы с делецией в гене енoлазы (*ENO1*), одного из ферментов гликолиза, культивируемых в среде Plasmax, понижена зависимость от процессов глутаминолиза, но не гликолиза. Эти данные коррелируют с результатами исследований *in vivo*, в которых показано отсутствие заметной антипролиферативной активности ингибитора глутаминолиза против опухолей с делецией *ENO1* [49]. В то же время ингибитор глутаминазы одинаково активен против клеток с этой делецией и без нее, если клетки культивируют в стандартной среде. Это прекрасная иллюстрация того, что использование физиологических сред (из-за пониженных концентраций пирувата и 2-оксоглутарата) в подобных исследованиях целесообразно и позволяет более адекватно оценивать эффективность противоопухолевых препаратов. Кроме того, S. Khadka и др. [49] обнаружили и несколько минорных, но не менее интересных особенностей физиологических сред. Так, ими показано, что лактат, присутствующий в плазме крови и содержащийся в среде Plasmax, по-видимому, плохой донор углерода для клеточного цикла Кребса, тогда как пируват – гораздо более важный компонент восполнения цикла трикарбоновых кислот в раковых клетках. Следует упомянуть про полученные с использованием классических сред данные, где показано, что вклад лактата как донора углерода в цикл Кребса и, как следствие, в поддержание дыхательной активности клеток сильно зависит от типа ткани и клеток [29, 50]. На основании выше-

сказанного мы делаем вывод, что все эти данные требуют дополнительной верификации.

O. Bagshaw и соавт. [51] оценили влияние физиологических и нефизиологических концентраций цинка на различные аспекты метаболизма клеток гладких мышц аорты крысы и эндотелиальных клеток (RASMC и RAENDO), культивируемых в среде Plasmax. Выявлено нарушение экспрессии генов окислительного фосфорилирования, слияния и разобщения (*fusion-fission*) митохондрий при обработке клеток сульфатом цинка в обоих типах исследуемых клеток. К этим генам относились *Mff* (mitochondrial fission factor) и *Mfn2* (mitofusin 2), экспрессия которых повышалась. Используя технологию Seahorse, авторы провели визуализацию митохондриальных сетей, а также проанализировали митохондриальную функцию исследуемых клеточных линий. Показано, что увеличенные концентрации цинка по сравнению с физиологическими значениями индуцируют усиление процессов слияния/разобщения митохондрий, увеличивая как базовое, так и максимальное потребление кислорода. Полученные результаты позволят лучше понять, как применение, например, биоразлагаемых имплантов, содержащих цинк, может повлиять на клетки сосудов и сердечно-сосудистую систему человека.

N. Rossiter и соавт., разработчики среды HPLM [52], также представили результаты, полученные при исследовании эффектов, возникающих в клетках при переходе к физиологической среде. Они провели генетический скрининг с применением технологии CRISPR генов различных метаболических путей клеток хронического миелоидного лейкоза K562 и выявили 525 генов, экспрессия которых значительно повысилась при переходе к среде HPLM. Кроме того, им удалось выявить гены, изменение в экспрессии которых происходило при смене диализированной сыворотки на обычную. Одним из самых значимых результатов авторы считают наличие взаимосвязи аланинаминотрансферазы (ALT/GPT2) и митохондриального транспортера пирувата (mitochondrial pyruvate carrier, MPC). В клетках, культивируемых в физиологической среде с диализированной сывороткой, были повышены уровни обоих белков, что может способствовать синтезу аланина из пирувата.

Одна из наиболее интенсивно развивающихся областей биомедицинских исследований – иммунометаболизм [53]. Исследования в области иммунологии также имеет смысл проводить в средах с физиологическими концентрациями метаболитов. Например, M. Loney-Greene и др. [54] продемонстрировали, что в физиологической среде транскрипционный профиль Т-лимфоцитов значительно отличается от такового в стандартной среде RPMI. Кроме того, увеличивается уровень их активации в ответ на контакт с антигеном.

Также показано, что эти эффекты, главным образом, могут возникать из-за повышенной концентрации ионов кальция в физиологической среде HPLM. Повышение уровней экспрессии ряда генов метаболизма серина, аргинина, аспарагина и пролина (*ASS1*, *PHGDH*, *PCYR1*, *GOT1*), по-видимому, связано со значительно более низкой концентрацией аргинина в среде HPLM.

Следует сказать, что работа нашей группы была посвящена не только выявлению изменений клеточного метаболизма, но и эффектов, которые физиологическая среда может оказать на репликацию различных вирусов [36]. Нами показано, что клетки Huh7.5, A549 и Vero E6 при культивировании в среде Plasmaх поддерживают репликацию вируса гепатита С, вируса гриппа А и коронавируса-2, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2), соответственно, хотя репликативная активность вирусов была ниже, чем при репродукции в тех же клетках, культивируемых в классических средах. Точные причины снижения уровней репликации вирусов неясны. Однако можно предположить, что репликация вирусов снижается с нефизиологически высоких уровней, характерных для суперпермиссивных клеточных линий (Vero E6, Huh7.5).

Ранее показано, что респираторные вирусы и вирус гепатита С вызывают окислительный стресс в инфицированных клетках [55, 56]. В среде Plasmaх способность вирусов нарушать редокс-статус клеток была гораздо сильнее выражена: уровни АФК были сопоставимы с таковыми для классических культуральных сред, хотя репликативная активность вирусов была на порядок ниже [36]. Это можно объяснить наличием в физиологической среде не только пирувата, но и лактата, соотношение которых определяет соотношение между NAD и NADH [57].

В недалеком будущем можно с уверенностью ожидать появления исследований, в которых будут найдены новые метаболические отклонения, вызванные применением классических/стандартных сред. Но даже на основании доступной на данный момент информации можно сделать вывод, что результаты исследований метаболических особенностей тех или иных клеток необходимо верифицировать в физиологически обоснованных средах. Особенно это касается изучения биохимических процессов в митохондриях, лизосомах, окислительно-восстановительного баланса в клетке, а также нарушений этих и других путей при различных патологиях и вирусных инфекциях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка и использование физиологических сред чрезвычайно важно для понимания биоло-

гических процессов и интерпретации данных, особенно в области исследований клеточного метаболизма. Такие среды позволяют воспроизводить процессы *in vivo* в условиях более простых – в системах *in vitro*. Кроме того, использование нестандартных культуральных сред, лишенных одного или нескольких метаболитов, позволяет исследовать зависимость роста клеток и статус сигнальных каскадов от метаболических путей.

Стоит заметить, что репродукция вирусов и их цитопатический эффект напрямую зависят от метаболизма клеток, а значит тоже сильно подвержены влиянию состава культуральной среды. Для более глубокого и полного понимания механизмов патогенеза различных инфекционных заболеваний необходимы дальнейшие исследования опосредованных вирусом нарушений в клетке-хозяине. Желательно, чтобы эти исследования были основаны на моделях, которые максимально адекватно имитируют условия *in vivo* и поэтому не искажают естественные процессы. Одна из доступных возможностей значительного улучшения (приближения к реальным условиям) существующих моделей – использование физиологически обоснованных сред.

Физиологические варианты среды могут быть полезны и удобны для решения различных задач, включая культивирование первичных клеток, наработку биомолекул (в том числе вирусных белков) и т.д. Стоит отметить, что варианты физиологических сред могут быть модифицированы для выполнения множества самых разнообразных задач: симуляции различных диет, патологических состояний определенных тканей, старения и иных процессов. Возможно, в будущем будут использоваться варианты таких сред с концентрациями метаболитов, соответствующими значениям у конкретного пациента, тем самым приближая практическую медицину к персонализированному формату.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 18-29-07066) (разделы по классическим средам) и Российским научным фондом (21-14-10146) (разделы по плазмаподобным средам).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cox J., McBeath D., Harper C., Daniel R. (2020) Co-occurrence of cell lines, basal media and supplementation in the biomedical research literature. *J. Data Inform. Sci.* 5(3), 161–177.
2. Pavlacky J., Polak J. (2020) Technical feasibility and physiological relevance of hypoxic cell culture models. *Front. Endocrinol.* (Lausanne). 11, 57.

3. Ikari R., Mukaiishi K.I., Kageyama S., Nagasawa M., Kubota S., Nakayama T., Murakami S., Taniura N., Tanaka H., Kushima R.P., Kawauchi A. (2021) Differences in the central energy metabolism of cancer cells between conventional 2D and novel 3D culture systems. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(4), 1805.
4. Abbas M., Moradi F., Hu W., Regudo K.L., Osborne M., Pettipas J., Atallah D.S., Hachem R., Ott-Peron N., Stuart J.A. (2021) Vertebrate cell culture as an experimental approach – limitations and solutions. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **254**, 110570.
5. Dulbecco R., Hartwell L.H., Vogt M. (1965) Induction of cellular DNA synthesis by polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **53**, 403–410.
6. Eagle H., Habel K. (1956) The nutritional requirements for the propagation of poliomyelitis virus by the HeLa cell. *J. Exp. Med.* **104**(2), 271–287.
7. Moore G.E., Gerner R.E., Franklin H.A. (1967) Culture of normal human leukocytes. *JAMA.* **199**(8), 519–524.
8. Ackermann T., Tardito S. (2019) Cell culture medium formulation and its implications in cancer metabolism. *Trends Cancer.* **5**(6), 329–332.
9. Amanso A.M., Griendling K.K. (2012) Differential roles of NADPH oxidases in vascular physiology and pathophysiology. *Front. Biosci. (Schol. Ed.).* **4**(3), 1044–1064.
10. Ivanov A.V., Smirnova O.A., Ivanova O.N., Masalova O.V., Kochetkov S.N., Isagulians M.G. (2011) Hepatitis C virus proteins activate NRF2/ARE pathway by distinct ROS-dependent and independent mechanisms in HUH7 cells. *PLoS One.* **6**(9), e24957.
11. Dimri M., Humphries A., Laknaur A., Elattar S., Lee T.J., Sharma A., Kolhe R., Satyanarayana A. (2020) NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 ablation inhibits activation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt serine/threonine kinase and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways and blocks metabolic adaptation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* **71**(2), 549–568.
12. Irshad Z., Xue M., Ashour A., Larkin J.R., Thornalley P.J., Rabbani N. (2019) Activation of the unfolded protein response in high glucose treated endothelial cells is mediated by methylglyoxal. *Sci. Rep.* **9**(1), 7889.
13. Liberti M.V., Locasale J.W. (2016) The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem. Sci.* **41**(3), 211–218.
14. Jose C., Bellance N., Rossignol R. (2011) Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochim. Biophys. Acta.* **1807**(6), 552–561.
15. Hirayama A., Kami K., Sugimoto M., Sugawara M., Toki N., Onozuka H., Kinoshita T., Saito N., Ochiai A., Tomita M., Esumi H., Soga T. (2009) Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res.* **69**(11), 4918–4925.
16. Urasaki Y., Heath L., Xu C.W. (2012) Coupling of glucose deprivation with impaired histone H2B monoubiquitination in tumors. *PLoS One.* **7**(5), e36775.
17. Birsoy K., Possemato R., Lorbeer F.K., Bayraktar E.C., Thiru P., Yucler B., Wang T., Chen W.W., Clish C.B., Sabatini D.M. (2014) Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature.* **508**(7494), 108–112.
18. Balsa E., Soustek M.S., Thomas A., Cogliati S., Garcia-Poyatos C., Martin-Garcia E., Jedrychowski M., Gygi S.P., Enriquez J.A., Puigserver P. (2019) ER and nutrient stress promote assembly of respiratory chain supercomplexes through the PERK-eIF2 $\alpha$  axis. *Mol. Cell.* **74**(5), 877–890.e876.
19. Pakos-Zebrucka K., Koryga I., Mnich K., Ljujic M., Samali A., Gorman A.M. (2016) The integrated stress response. *EMBO Rep.* **17**(10), 1374–1395.
20. Yang W.H., Qiu Y., Stamatatos O., Janowitz T., Lukey M.J. (2021) Enhancing the efficacy of glutamine metabolism inhibitors in cancer therapy. *Trends Cancer.* **7**(8), 790–804.
21. Singleton D.C., Dechaume A.L., Murray P.M., Katt W.P., Baguley B.C., Leung E.Y. (2020) Pyruvate anaplerosis is a mechanism of resistance to pharmacological glutamine inhibition in triple-receptor negative breast cancer. *BMC Cancer.* **20**(1), 470.
22. Morrison M.A., Spriet L.L., Dyck D.J. (2000) Pyruvate ingestion for 7 days does not improve aerobic performance in well-trained individuals. *J. Appl. Physiol.* (1985). **89**(2), 549–556.
23. Bardy C., van den Hurk M., Eames T., Marchand C., Hernandez R.V., Kellogg M., Gorris M., Galet B., Palomares V., Brown J., Bang A.G., Mertens J., Bohnke L., Boyer L., Simon S., Gage F.H. (2015) Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**(20), E2725–E2734.
24. Tardito S., Oudin A., Ahmed S.U., Fack F., Keunen O., Zheng L., Miletic H., Sakariassen P.O., Weinstock A., Wagner A., Lindsay S.L., Hock A.K., Barnett S.C., Ruppin E., Morkve S.H., Lund-Johansen M., Chalmers A.J., Bjerkvig R., Niclou S.P., Gottlieb E. (2015) Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. *Nat. Cell Biol.* **17**(12), 1556–1568.
25. Schug Z.T., Peck B., Jones D.T., Zhang Q., Grosskurth S., Alam I.S., Goodwin L.M., Smethurst E., Mason S., Blyth K., McGarry L., James D., Shanks E., Kalna G., Saunders R.E., Jiang M., Howell M., Lassailly F., Thin M.Z., Spencer-Dene B., Stamp G., van den Broek N.J., Mackay G., Bulusu V., Kamphorst J.J., Tardito S., Strachan D., Harris A.L., Aboagye E.O., Critchlow S.E., Wakelam M.J., Schulze A., Gottlieb E. (2015) Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. *Cancer Cell.* **27**(1), 57–71.
26. Biancur D.E., Paulo J.A., Malachowska B., Quiles Del Rey M., Sousa C.M., Wang X., Sohn A.S.W., Chu G.C., Gygi S.P., Harper J.W., Fendler W., Mancias J.D., Kimmelman A.C. (2017) Compensatory metabolic networks in pancreatic cancers upon perturbation of glutamine metabolism. *Nat. Commun.* **8**, 15965.
27. Vande Voorde J., Ackermann T., Pfetzer N., Sumpston D., Mackay G., Kalna G., Nixon C., Blyth K., Gottlieb E., Tardito S. (2019) Improving the metabolic fidelity of cancer models with a physiological cell culture medium. *Sci. Adv.* **5**(1), eaau7314.
28. Cantor J.R., Abu-Remaileh M., Kanarek N., Freinkman E., Gao X., Louissaint A., Jr., Lewis C.A., Saba-

- tini D.M. (2017) Physiologic medium rewires cellular metabolism and reveals uric acid as an endogenous inhibitor of UMP synthase. *Cell*. **169**(2), 258–272.e217.
29. Hui S., Ghergurovich J.M., Morscher R.J., Jang C., Teng X., Lu W., Esparza L.A., Reya T., Le Z., Yanxiang Guo J., White E., Rabinowitz J.D. (2017) Glucose feeds the TCA cycle *via* circulating lactate. *Nature*. **551**(7678), 115–118.
  30. Rabinowitz J.D., Enerback S. (2020) Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. *Nat. Metab.* **2**(7), 566–571.
  31. Bastiaansen J.A., Merritt M.E., Comment A. (2016) Measuring changes in substrate utilization in the myocardium in response to fasting using hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]butyrate and [1-<sup>13</sup>C]pyruvate. *Sci. Rep.* **6**, 25573.
  32. Arnold P.K., Jackson B.T., Paras K.I., Brunner J.S., Hart M.L., Newsom O.J., Alibeckoff S.P., Endress J., Drill E., Sullivan L.B., Finley L.W.S. (2022) A non-canonical tricarboxylic acid cycle underlies cellular identity. *Nature*. **603**(7901), 477–481.
  33. Stephens F.B., Constantin-Teodosiu D., Greenhaff P.L. (2007) New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J. Physiol.* **581**(Pt. 2), 431–444.
  34. Keenan J., Pearson D., Clynes M. (2006) The role of recombinant proteins in the development of serum-free media. *Cytotechnology*. **50**(1–3), 49–56.
  35. Brault C., Levy P., Duponchel S., Michelet M., Salle A., Pecheur E.I., Plissonnier M.L., Parent R., Vericel E., Ivanov A.V., Demir M., Steffen H.M., Odenthal M., Zoulim F., Bartosch B. (2016) Glutathione peroxidase 4 is reversibly induced by HCV to control lipid peroxidation and to increase virion infectivity. *Gut*. **65**(1), 144–154.
  36. Golikov M.V., Karpenko I.L., Lipatova A.V., Ivanova O.N., Fedyakina I.T., Larichev V.F., Zakirova N.F., Leonova O.G., Popenko V.I., Bartosch B., Kochetkov S.N., Smirnova O.A., Ivanov A.V. (2021) Cultivation of cells in a physiological Plasmax medium increases mitochondrial respiratory capacity and reduces replication levels of RNA viruses. *Antioxidants* (Basel). **11**(1), 97.
  37. Genzel Y., Ritter J.B., Konig S., Alt R., Reichl U. (2005) Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotechnol. Prog.* **21**(1), 58–69.
  38. Khomich O., Ivanov A.V., Bartosch B. (2019) Metabolic hallmarks of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Cells*. **9**(1), 24.
  39. Smirnova O.A., Bartosch B., Zakirova N.F., Kochetkov S.N., Ivanov A.V. (2018) Polyamine metabolism and oxidative protein folding in the ER as ROS-producing systems neglected in virology. *Int. J. Mol. Sci.* **19**(4), 1219.
  40. Ivanova O.N., Snezhkina A.V., Krasnov G.S., Valuev-Elliston V.T., Khomich O.A., Khomutov A.R., Keinanen T.A., Alhonen L., Bartosch B., Kudryavtseva A.V., Kochetkov S.N., Ivanov A.V. (2018) Activation of polyamine catabolism by *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>11</sup>-diethylnorspermine in hepatic HepaRG cells induces dedifferentiation and mesenchymal-like phenotype. *Cells*. **7**(12), 275.
  41. Pegg A.E. (2009) Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*. **61**(9), 880–894.
  42. Moradi F., Moffatt C., Stuart J.A. (2021) The effect of oxygen and micronutrient composition of cell growth media on cancer cell bioenergetics and mitochondrial networks. *Biomolecules*. **11**(8), 1177.
  43. Moradi F., Fiocchetti M., Marino M., Moffatt C., Stuart J.A. (2021) Media composition and O<sub>2</sub> levels determine effects of 17β-estradiol and selective estrogen receptor modulators on mitochondrial bioenergetics and cellular reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **321**(1), C72–C81.
  44. Jonas A.J., Greene A.A., Smith M.L., Schneider J.A. (1982) Cystine accumulation and loss in normal, heterozygous, and cystinotic fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79**(14), 4442–4445.
  45. Chiu M., Taurino G., Dander E., Bardelli D., Fallati A., Andreoli R., Bianchi M.G., Carubbi C., Pozzi G., Galluppo L., Mirandola P., Rizzari C., Tardito S., Biondi A., D’Amico G., Bussolati O. (2021) ALL blasts drive primary mesenchymal stromal cells to increase asparagine availability during asparaginase treatment. *Blood Adv.* **5**(23), 5164–5178.
  46. Menezes W.P., Silva V.A.O., Gomes I.N.F., Rosa M.N., Spina M.L.C., Carloni A.C., Alves A.L.V., Melendez M., Almeida G.C., Silva L.S.D., Clara C., da Cunha I.W., Hajj G.N.M., Jones C., Bidinotto L.T., Reis R.M. (2020) Loss of 5'-methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) is frequent in high-grade gliomas; nevertheless, it is not associated with higher tumor aggressiveness. *Cells*. **9**(2), 492.
  47. Marjon K., Cameron M.J., Quang P., Clasquin M.F., Mandley E., Kunii K., McVay M., Choe S., Kernytzky A., Gross S., Konteatis Z., Murtie J., Blake M.L., Travins J., Dorsch M., Biller S.A., Marks K.M. (2016) MTAP deletions in cancer create vulnerability to targeting of the MAT2A/PRMT5/RIOK1 axis. *Cell Rep.* **15**(3), 574–587.
  48. Barekatin Y., Ackroyd J.J., Yan V.C., Khadka S., Wang L., Chen K.C., Poral A.H., Tran T., Georgiou D.K., Arthur K., Lin Y.H., Satani N., Ballato E.S., Behr E.I., deCarvalho A.C., Verhaak R.G.W., de Groot J., Huse J.T., Asara J.M., Kalluri R., Muller F.L. (2021) Homozygous MTAP deletion in primary human glioblastoma is not associated with elevation of methylthioadenosine. *Nat. Commun.* **12**(1), 4228.
  49. Khadka S., Arthur K., Barekatin Y., Behr E., Washington M., Ackroyd J., Crowley K., Suriyamongkol P., Lin Y.H., Pham C.D., Zielinski R., Trujillo M., Galligan J., Georgiou D.K., Asara J., Muller F. (2021) Impaired anaplerosis is a major contributor to glycolysis inhibitor toxicity in glioma. *Cancer Metab.* **9**(1), 27.
  50. TeSlaa T., Bartman C.R., Jankowski C.S.R., Zhang Z., Xu X., Xing X., Wang L., Lu W., Hui S., Rabinowitz J.D. (2021) The source of glycolytic intermediates in mammalian tissues. *Cell Metab.* **33**(2), 367–378.e5.
  51. Bagshaw O.R.M., Moradi F., Moffatt C.S., Thettwer H.A., Liang P., Goldman J., Drenlich J.W., Stuart J.A. (2021) Bioabsorbable metal zinc differentially affects mitochondria in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Biomaterials and Biosystems*. **4**, 100027.

52. Rossiter N.J., Huggler K.S., Adelman C.H., Keys H.R., Soens R.W., Sabatini D.M., Cantor J.R. (2021) CRISPR screens in physiologic medium reveal conditionally essential genes in human cells. *Cell Metab.* **33**(6), 1248–1263.e9.
53. Muri J., Kopf M. (2021) Redox regulation of immunometabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **21**(6), 363–381.
54. Leney-Greene M.A., Boddapati A.K., Su H.C., Cantor J.R., Lenardo M.J. (2020) Human plasma-like medium improves T lymphocyte activation. *iScience.* **23**(1), 100759.
55. Khomich O.A., Kochetkov S.N., Bartosch B., Ivanov A.V. (2018) Redox biology of respiratory viral infections. *Viruses.* **10**(8), 392.
56. Ivanov A.V., Valuev-Elliston V.T., Tyurina D.A., Ivanova O.N., Kochetkov S.N., Bartosch B., Isagulians M.G. (2017) Oxidative stress, a trigger of hepatitis C and B virus-induced liver carcinogenesis. *Oncotarget.* **8**(3), 3895–3932.
57. Hung Y.P., Albeck J.G., Tantama M., Yellen G. (2011) Imaging cytosolic NADH-NAD<sup>+</sup> redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor. *Cell Metab.* **14**(4), 545–554.

## PHYSIOLOGICAL MEDIA IN STUDIES OF CELL METABOLISM

M. V. Golikov<sup>1</sup>, V. T. Valuev-Elliston<sup>1</sup>, O. A. Smirnova<sup>1</sup>, and A. V. Ivanov<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: aivanov@yandex.ru

Changes in cell metabolism accompany development of a wide spectrum of pathologies including cancer, autoimmune and inflammatory diseases. Therefore, inhibitors of metabolic enzymes is considered a promising strategy for development of therapeutic agents. However, investigation of cellular metabolism is hampered by imprint of culture media that interfere with many cellular processes making cellular models non-relevant. There are numerous reports showing that the results from *in vitro* systems are not reproduced in *in vivo* models and in patients. During the last decade a novel approach has emerged which consists in adaptation of culture medium composition to the composition of blood plasma. In 2017–2019 two plasma-like media were proposed, Plasmax and HPLM. In the review, we summarized drawbacks of convenient media as well as changes in metabolism of cells cultivated in convenient and plasma-like media at normal state and in models of pathology.

**Keywords:** culture medium, cells, metabolism, oxidative stress, viruses