ОНТОГЕНЕЗ, 2023, том 54, № 5, с. 341–357

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 576.385.8

ИНДУКТОР СТРЕССА ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ДИТИОТРЕИТОЛ ВЛИЯЕТ НА МОРФОЛОГИЮ И ПОДВИЖНОСТЬ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА И КЛЕТОК ФИБРОСАРКОМЫ ЛИНИИ HT1080

© 2023 г. Е. П. Турищева[a], *, Г. А. Ашниев[a], М. С. Вильданова[a], Е. А. Смирнова[a]

[a]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, ул. Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

**e-mail: kitten-caterina@yandex.ru*

Поступила в редакцию 05.07.2023 г.
После доработки 09.08.2023 г.
Принята к публикации 10.08.2023 г.

Некоторые индукторы стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) способны влиять на подвижность нормальных и опухолевых клеток. Однако неизвестно, какие механизмы опосредуют такой эффект и является ли он следствием стресса ЭПР. Целью нашей работы являлось исследование влияния индуктора стресса ЭПР дитиотреитола (ДТТ) на морфологические признаки, отражающие локомоторные свойства клеток, а также непосредственно на миграторные свойства культивируемых дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы HT1080 человека. Мы показали, что ДТТ вызывает нарушение организации актинового цитоскелета в обоих типах клеток, что сопровождается изменением клеточной поверхности и формы клеток, а также уменьшением площади их распластывания. Кроме того, в дермальных фибробластах наблюдалось уменьшение количества фокальных контактов. ДТТ также снижал подвижность дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы. Для анализа клеточной подвижности и определения момента возникновения ее изменения мы разработали метод, показавший, что изменение миграторных свойств клеток фибросаркомы при культивировании с ДТТ начиналось раньше, чем в дермальных фибробластах. Таким образом, активация стресса ЭПР с помощью ДТТ сопровождается изменением организации актинового цитоскелета и подвижности в нормальных и опухолевых клетках человека. Следовательно, стресс ЭПР, запускаемый различными индукторами с разными механизмами действия, влияет на подвижность нормальных и опухолевых клеток, что необходимо учитывать при разработке противоопухолевых препаратов, вызывающих гибель клеток через активацию стресса ЭПР.

Ключевые слова: дитиотреитол, подвижность клеток, фибробласты, клетки фибросаркомы, стресс ЭПР

DOI: 10.31857/S0475145023050063, **EDN:** KAKJKK

ВВЕДЕНИЕ

Определенные химические вещества и условия окружающей среды могут нарушать биосинтетические процессы в клетках, вызывая избыточное образование и накопление в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) поврежденных и неправильно уложенных белков, что приводит к состоянию, которое называется стресс ЭПР (Oslowski, Urano, 2011; Sicari et al., 2020; Турищева и др., 2022). В ответ на стресс ЭПР в клетке развивается физиологическая адаптивно-компенсаторная реакция, известная как ответ на неправильно свернутые белки, или UPR. Если с помощью активации UPR удается восстановить нормальное функционирование ЭПР, то клетка выживает, если этого не происходит, то активируется клеточная гибель.

Протеостаз является частью общего механизма поддержания клеточного гомеостаза, и поэтому нерегулируемый стресс ЭПР рассматривается как важный фактор, который может приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний (Hetz, Saxena, 2017) и туморогенезу (Limia et al., 2019). Отмечается, что UPR может становиться важным фактором в злокачественной трансформации и росте опухолей путем влияния на миграцию и инвазию опухолевых клеток, ремоделирование внеклеточного матрикса, модификацию клеточных адгезий, эпителиально-мезенхимный переход, модуляцию сигнальных путей, связанных с подвижностью клеток, т.е. на все процессы, в которых задействован цитоскелет (Limia et al., 2019).

В настоящее время накоплено много данных, касающихся молекулярных механизмов актива-

ции стресса ЭПР, сигнальных каскадов, ведущих к выживанию или гибели клеток, а также способов индукции стресса ЭПР (Corazzari et al., 2017; Almanza et al., 2019; Турищева и др., 2022). Экспериментальными индукторами стресса ЭПР являются самые разные химические агенты. Среди наиболее распространенных – туникамицин, который нарушает N-гликозилирование белков в ЭПР (Yoo et al., 2018); тапсигаргин, ингибирующий работу каналов SERCA в ЭПР и тем самым вызывающий нарушение метаболизма кальция (Wu et al., 2019); бортезомиб – специфический ингибитор протеасом 20S, блокирующий систему ЭПР-ассоциированной деградации белка (ERAD) и вызывающий накопление неправильно уложенных белков в ЭПР (Brüning et al., 2009), и дитиотреитол (ДТТ), нарушающий формирование S–S связей у синтезируемых белков (Ren et al., 2018).

Следует отметить, что некоторые индукторы стресса ЭПР являются медицинскими препаратами. Так, например, туникамицин – антибиотик (Ren et al., 2018), бортезомиб – противоопухолевый препарат, используемый для лечения множественной миеломы и некоторых неходжкинских лимфом (Curran, McKeage, 2009), тапсигаргин – также противоопухолевый агент (Wu et al., 2019) и потенциальный противовирусный препарат (Al-Beltagi et al., 2021). Но помимо влияния на протеостаз эти вещества могут оказывать влияние на разные клеточные функции и характеристики. Это особенно важно в связи с тем, что, например, при терапии и лечении опухолевых заболеваний воздействию подвергаются не только патологически измененные, но и нормальные клетки организма. Так, например, показано, что тапсигаргин индуцирует апоптоз в опухолевых клетках линии A549, однако у выживших клеток вызывает изменение формы и нарушение организации актинового цитоскелета (Wang et al., 2014). Туникамицин может способствовать апоптозу и повышать чувствительность раковых клеток к химиотерапии и лучевой терапии (Jung et al., 2012; Wu et al., 2018), таким образом устраняя эффект устойчивости к химиотерапевтическим препаратам. В других исследованиях было показано, что туникамицин усиливает миграцию опухолевых клеток кишечника (Gundamaraju et al., 2021), что будет также способствовать более активному метастазированию. Бортезомиб индуцирует аутофагическую гибель в культивируемых клетках эндотелия человека HUVEC, при этом клетки вытягиваются, становятся веретеноподобными и отростчатыми, наблюдается вакуолизация цитоплазмы (Belloni et al., 2010). Анализ данных литературы дает основания полагать, что при действии туникамицина (Kohno et al., 1979), тапсигаргина (Földi et al., 2013) и бортезомиба (Brüning et al., 2009; Belloni et al., 2010) происходит изменение формы культивируемых нормальных и опухолевых клеток, причем этот эффект носит обратимый характер.

Однако, с чем связаны такие изменения формы клеток в ответ на индукцию стресса ЭПР, неизвестно. Кроме этого, вопрос о том, отличается ли реакция на стресс ЭПР у нормальных и патологически измененных клеток, представляет и практический интерес. В связи с этим целью нашей работы было исследовать влияние распространенного экспериментального индуктора стресса ЭПР – ДТТ – на морфологические признаки, отражающие локомоторные свойства клеток (клеточная поверхность, форма и площадь клеток, состояние актинового цитоскелета, контакты клеток с субстратом), а также непосредственно на миграторные свойства культивируемых нормальных и опухолевых клеток человека соединительнотканного происхождения – дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы HT1080.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток

Клетки выращивали в стандартных условиях (+37°C и 5% CO_2). Дермальные фибробласты человека, предоставленные Е.Р. Андреевой (Институт медико-биологических проблем, РАН), культивировали в среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка (FBS, Biosera, Франция), 2 мМ L-глутамина (ПанЭко) и 60 мкг/мл антибиотика гентамицина (Белмедпрепараты, Беларусь). Клетки фибросаркомы человека линии HT1080, предоставленные И.И. Киреевым (НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова), культивировали в среде DMEM (ПанЭко) с теми же добавками. Клетки пассировали смесью растворов трипсина (ПанЭко) и Версена (ПанЭко) в соотношении 3 : 7. При проведении экспериментов дермальные фибробласты и клетки фибросаркомы высаживали в чашки Петри в концентрации 30000 и 40000 кл./мл, соответственно, или в чашки Петри с покровными стеклами в концентрации 25000 и 30000 кл./мл, соответственно, и культивировали в течение 24 ч. Через 24 ч кондиционированную среду в чашках Петри заменяли на свежую среду, содержащую 2 мМ ДТТ (PanReacAppliChem, Германия). В контрольных чашках Петри кондиционированную среду заменяли на свежую среду без ДТТ. Срок культивирования клеток в присутствии ДТТ составлял 24 ч.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Покровные стекла с клетками промывали фосфатно-солевым буферным раствором PBS (pH 7.4, Merck, США) 5 мин и затем фиксировали 2.5% раствором глутарового альдегида (Ted Pella

Inc., США) в течение 1 ч. Затем клетки на стеклах отмывали от фиксатора с помощью PBS 3 раза по 5 мин и обезвоживали в холодном (+4°C) этаноле возрастающей концентрации (от 40 до 96% с шагом в 10%, 2 смены каждой концентрации по 10 мин). Далее образцы проводили по смесям ацетона (Реахим, Россия) с этанолом с последовательно возрастающей концентрацией ацетона (1 : 3, 1 : 1, 3 : 1; 3 смены каждой смеси по 5 мин). Затем образцы помещали в чистый ацетон на 1 ч и высушивали в критической точке. Высушенные образцы покрывали 1–2 нм Au–Pd пленкой. Образцы анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (ускоряющее напряжение 20 кВ; SEI mode, JEOL, Япония).

Цитохимическое и иммуноцитохимическое маркирование

Клетки на покровных стеклах фиксировали 4% раствором формальдегида (Реахим), разведенным в PBS. Далее для **цитохимического** выявления полимеризованного F-актина клетки на стеклах инкубировали с 0.005 мг/мл фаллоидина, меченного TRITC (тетраметилродамин B изотиоцианат) (Merck), во влажной камере при +37°C в течение 30 мин. Для **иммуноцитохимического маркирования** фиксированные формальдегидом клетки пермеабилизовали с помощью 0.1% Triton X-100 (Serva, Германия). Для выявления винкулина использовали первичные мышиные моноклональные антитела к винкулину (Merck) и вторичные моноклональные антитела козы к IgG мыши (Thermo Fisher Scientific, США). Ядра визуализировали с помощью DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) (Merck); препараты заключали в Mowiol (Hoechst, Германия). Образцы анализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M (Zeiss, Германия) (объектив ×63 PlanApo NA 1.40 Oil), снабженного черно-белой цифровой камерой Carl Zeiss AxioCam (Zeiss Axiocam 202 mono, Германия), и моторизованного инвертированного флуоресцентного фазово-контрастного микроскопа (Keyence BZ-9000E BIOREVO, Boston Microscopes, США) (объектив ×60 PlanApo NA 1.40 Oil).

Прижизненная съемка клеток

Прижизненную съемку проводили с использованием специальной инкубационной камеры, поддерживающей температуру среды на уровне +37°C. Синие и фиолетовые области спектра света, использовавшегося для освещения камеры, отсекали с помощью светофильтров. Клетки в необходимой концентрации высаживали в чашки Петри. Спустя 24 ч культивирования кондиционированную среду заменяли свежей средой, содержащей 2 мМ ДТТ (для экспериментальных чашек Петри), или не содержащей ДТТ (для контрольных чашек Петри). Далее чашки Петри устанавливали в камеру для прижизненных наблюдений. Съемка клеток в чашке Петри производилась каждые 90 мин в течение суток с момента начала эксперимента.

Обработка и анализ результатов

Обработка полученных изображений проводилась при помощи программного обеспечения (ПО) Fiji. Изменение площади распластывания клеток оценивалось при измерении площади поверхности, ограниченной клеточным контуром. Траектории движения отдельных клеток были получены с помощью плагина MTrackJ. Референсной точкой при отслеживании клеток служил геометрический центр ядра (ГЦЯ) каждой из них. ГЦЯ – это центр тяжести для множества центров масс однородной геометрической фигуры на плоскости, коей и является изображение клеточного ядра. Визуализация и коллажирование полученных треков клеточной подвижности проводились при помощи среды создания и редактирования изображений CorelDRAW.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных выборочных значений площади распластывания, количества фокальных контактов и параметров клеточной подвижности проводился при помощи встроенных пакетов ПО Graphpad 8.0. Сравнительный анализ контрольных и экспериментальных групп проводился с использованием непараметрического двустороннего U-критерия Манна–Уитни. При получении p-значения ≤ 0.05 различия считались статистически значимыми.

Для анализа клеточной подвижности и определения момента возникновения ее изменения мы разработали метод, являющийся адаптацией $\Delta\Delta$Ct метода. Основная идея нашего метода заключается в количественной максимизации детектируемых отличий, связанных с изменением характера подвижности фибробластов и клеток линии HT1080. При анализе мы ввели следующие метрики: средняя скорость в контрольной и экспериментальной группах, метрика разности усредненных значений скорости контрольной и экспериментальной групп по модулю (ΔV) и метрика отличия каждого индивидуального измерения от ΔV ($\Delta\Delta V$). При дальнейшем возведении вещественного числа (в нашем случае эту роль взяла на себя экспонента) в степень $\Delta\Delta V_{(эксп)} - \Delta\Delta V_{(C1/C2/C3)}$ дифференцирующий эффект масштабируется для последующей интерпретации. Таким образом, для каждого измерения скорости при действии ДТТ были получены величины ($\exp\Delta\Delta V_{(эксп)} - \Delta\Delta V_{(C1/C2/C3)}$), распре-

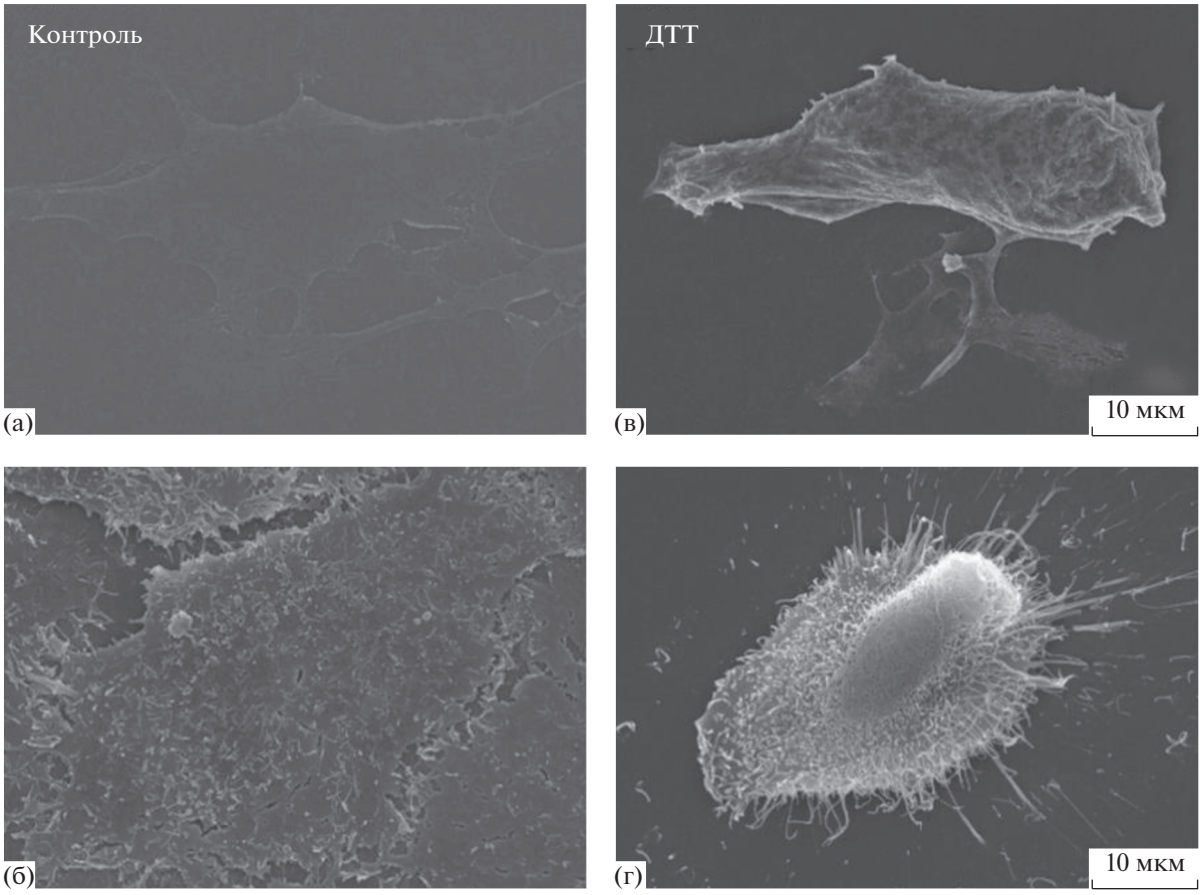

Рис. 1. Влияние ДТТ на форму, распластанность и микрорельеф клеточной поверхности дермальных фибробластов (а, в) и клеток фибросаркомы (б, г), СЭМ. (а, б) Контроль; (в, г) 24 ч воздействия ДТТ. Масштабный отрезок – 10 мкм.

деление которых приведено на рис. 8. Затем каждый столбец из экспериментальной группы измерений был выделен цветом с использованием условного форматирования этих величин ($\exp\Delta\Delta V_{(эксп)} - \Delta\Delta V_{(C1/C2/C3)}$). Подробнее метод описан в разделе "РЕЗУЛЬТАТЫ".

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ клеточной поверхности

С помощью СЭМ мы проанализировали поверхность дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы HT1080 (рис. 1) в нормальных условиях культивирования и при действии ДТТ.

В нормальных условиях культивирования в популяции дермальных фибробластов (рис. 1а) присутствовали клетки разной формы: веретеновидные, отростчатые, с разной степенью поляризации. Клеточные отростки имели разную длину и заканчивались филоподиями. Все клетки были тонкими, хорошо распластанными, со сглаженным микрорельефом поверхности. После воздействия ДТТ наблюдалось изменение формы и рельефа поверхности дермальных фибробластов (рис. 1в): клетки становились более выпуклыми и "поджатыми", их отростки – более толстыми и рельефными, на дорзальной поверхности клеток появлялись бугристые и складчатые образования.

В популяции клеток фибросаркомы в нормальных условиях культивирования (рис. 1б) присутствовали клетки разной формы, также с разной степенью поляризации и распластывания. Дорзальная поверхность клеток была покрыта множеством микроворсинок и складок. После воздействия ДТТ наблюдалось изменение формы и рельефа поверхности клеток фибросаркомы (рис. 1г): клетки поджимались и становились более выпуклыми, на их поверхности отмечались многочисленные филоподии и вздутия, морфологически похожие на те, которые формируются при блеббинге.

Таким образом, ДТТ вызывал поджимание клеток и изменение формы у обоих типов клеток. Наблюдалось также изменение поверхности фибробластов и клеток фибросаркомы, но эти изменения носили разный характер.

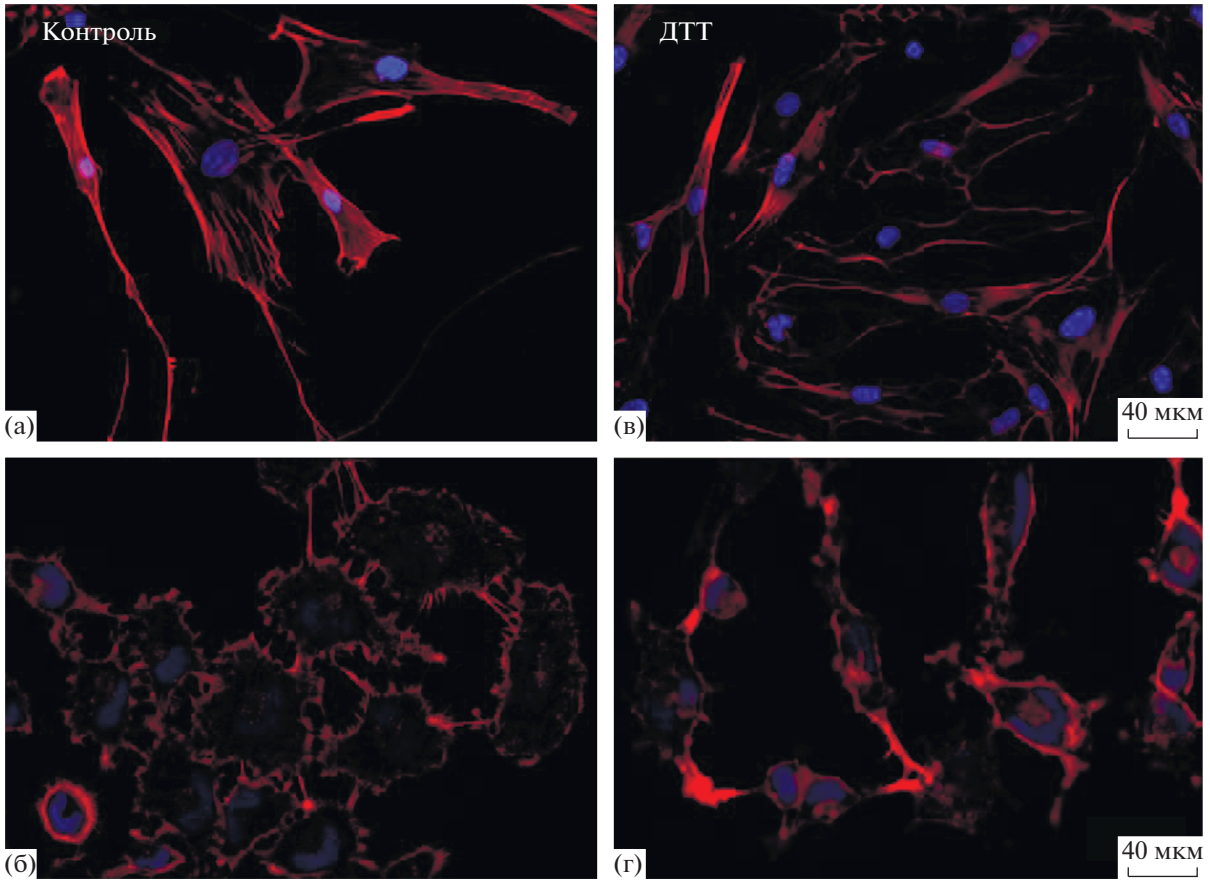

Рис. 2. Влияние ДТТ на состояние актиновых филаментов дермальных фибробластов (а, в) и клеток фибросаркомы (б, г). Цитохимическое выявление актиновых филаментов с помощью фаллоидина, конъюгированного с TRITC (*красный*; ядра окрашены в *синий* цвет DAPI). (а, б) Контроль; (в, г) 24 ч воздействия ДТТ. Масштабный отрезок – 40 мкм.

Анализ актинового цитоскелета

Изменения формы и поверхности клеток связаны с состоянием актинового цитоскелета. Поэтому мы проанализировали актиновый цитоскелет дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы в нормальных и экспериментальных условиях культивирования.

В нормальных условиях культивирования в дермальных фибробластах на переднем крае поляризованных клеток выявлялась плотная сеть актиновых филаментов, в центральной части клеток сеть была более разреженная (рис. 2а). Актин также выявлялся в клеточных отростках и филоподиях. В центральной и хвостовой части клеток присутствовали толстые и прямые пучки актиновых филаментов, по-видимому, представляющие собой стресс-фибриллы. При действии ДТТ наблюдалась дезорганизация системы актиновых филаментов (рис. 2в): пучки актина, характерные для контрольных клеток, становились менее выраженными или отсутствовали. Кроме того, выявление актиновых филаментов в кортикальной зоне отчетливо указывало на то, что клетки меняли свою форму и характер распластывания на субстрате, а также становились отростчатыми.

В клетках фибросаркомы в нормальных условиях культивирования выявлялась хорошо выраженная сеть кортикального актина и более разреженная сеть актина в центральной части клеток (рис. 2б). Пучки актиновых филаментов не выявлялись или были короткими и хаотически ориентированными. Между соседними клетками часто были видны тонкие выросты, содержащие актин и тянущиеся от одной клетки к другой в виде мостика. При действии ДТТ клетки фибросаркомы становились более поджатыми и отростчатыми (рис. 2г). Наблюдалось усиление окрашивания актина как в зоне кортекса, так и в центральной части клеток, что, по-видимому, связано с уменьшением площади распластывания и поджиманием клеток. Длинные нитевидные выросты, тянущиеся между соседними клетками, при действии ДТТ сохранялись.

Таким образом, ДТТ вызывал нарушение организации актинового цитоскелета только в дермальных фибробластах.

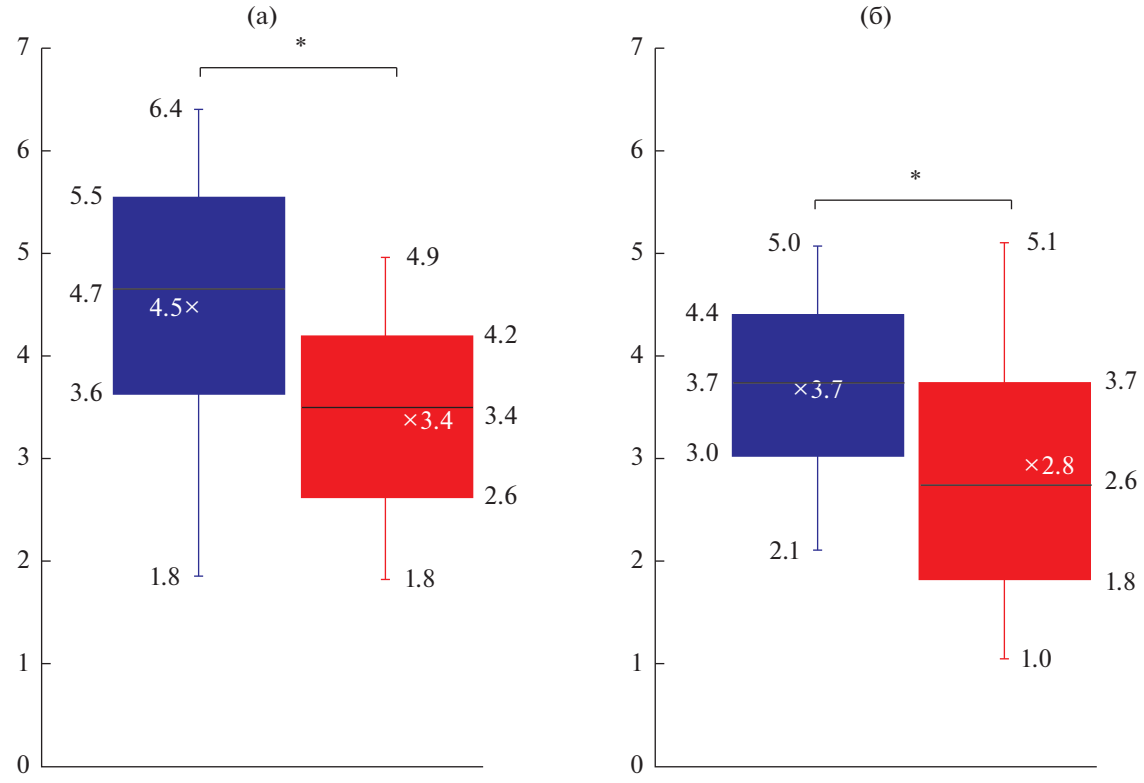

Рис. 3. Измерение площади дермальных фибробластов (а) и клеток фибросаркомы (б) в нормальных условиях культивирования (*синий*) и при действии ДТТ (*красный*). Площадь выражена в условных единицах, где 1 ≈ 100 мкм^2. Объем контрольной выборки дермальных фибробластов $n = 56$, объем экспериментальной выборки дермальных фибробластов $n = 82$. Объем контрольной выборки клеток фибросаркомы НТ1080 $n = 154$, объем экспериментальной выборки клеток фибросаркомы $n = 75$. * – $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни.

Оценка площади клеток

Хорошо выявляемый при маркировании фаллоидином кортикальный слой актина позволил оценить изменение площади дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы после воздействия ДТТ.

Было проанализировано 56 фибробластов в нормальных условиях культивирования и 82 фибробласта после воздействия ДТТ. Оказалось, что ДТТ вызывал уменьшение площади распластывания дермальных фибробластов в 1.3 раза (рис. 3а).

Анализ 154 клеток фибросаркомы в нормальных условиях культивирования и 75 клеток фибросаркомы после воздействия ДТТ показал, что в этих клетках ДТТ также вызывал уменьшение площади распластывания в 1.3 раза (рис. 3б).

Таким образом, при действии ДТТ происходило уменьшение площади распластывания дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы НТ1080 в 1.3 раза.

Характеристика фокальных контактов

Поскольку в дермальных фибробластах при действии ДТТ мы наблюдали дезорганизацию пучков актиновых филаментов, а стресс-фибриллы у фибробластов могут быть связаны с фокальными контактами (Tojkander et al., 2012), с помощью иммуноцитохимического выявления винкулина мы проанализировали распределение фокальных контактов в дермальных фибробластах. В нормальных условиях культивирования фокальные контакты были распределены по вентральной поверхности клеток и выявлялись в клеточных отростках (рис. 4а, 4б). ДТТ вызывал перераспределение фокальных контактов в дермальных фибробластах (рис. 4в, 4г): в распластанных и отростчатых клетках фокальные контакты присутствовали преимущественно в клеточных отростках, а в сильно поджатых клетках – наоборот, в центральной части клеток. Кроме того, при воздействии ДТТ количество фокальных контактов на клетку уменьшалось в 4 раза (рис. 4д). Следовательно, ДТТ вызывал уменьшение числа фокальных контактов у дермальных фибробластов.

В клетках фибросаркомы использование антител к винкулину выявило диффузное окрашивание цитоплазмы в теле клеток и точечные фокальные контакты по краям ламеллы (рис. 5а, 5б). После культивирования с ДТТ такое окрашивание ци-

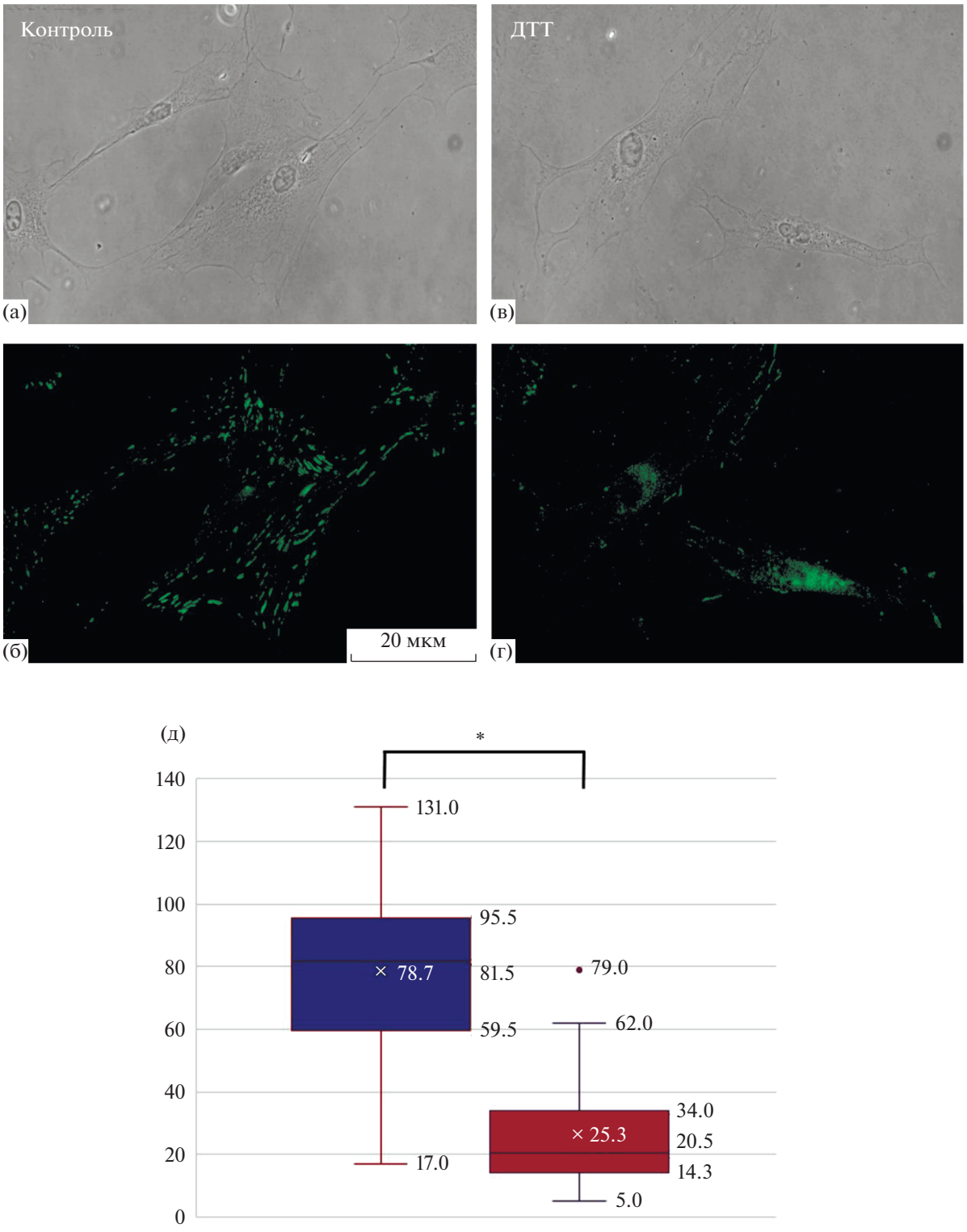

Рис. 4. Влияние ДТТ на распределение и количество фокальных контактов в дермальных фибробластах. (а, в) Фазовый контраст; (б, г) иммуноцитохимическое выявление винкулина (*зеленый*). (а, б) Контроль; (в, г) 24 ч воздействия ДТТ. Масштабный отрезок (а–г) – 20 мкм. (д) Подсчет количества фокальных контактов на клетку в нормальных условиях культивирования (*синий*) и при действии ДТТ (*красный*). Объем контрольной выборки $n = 44$, объем экспериментальной выборки $n = 32$. * – $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни.

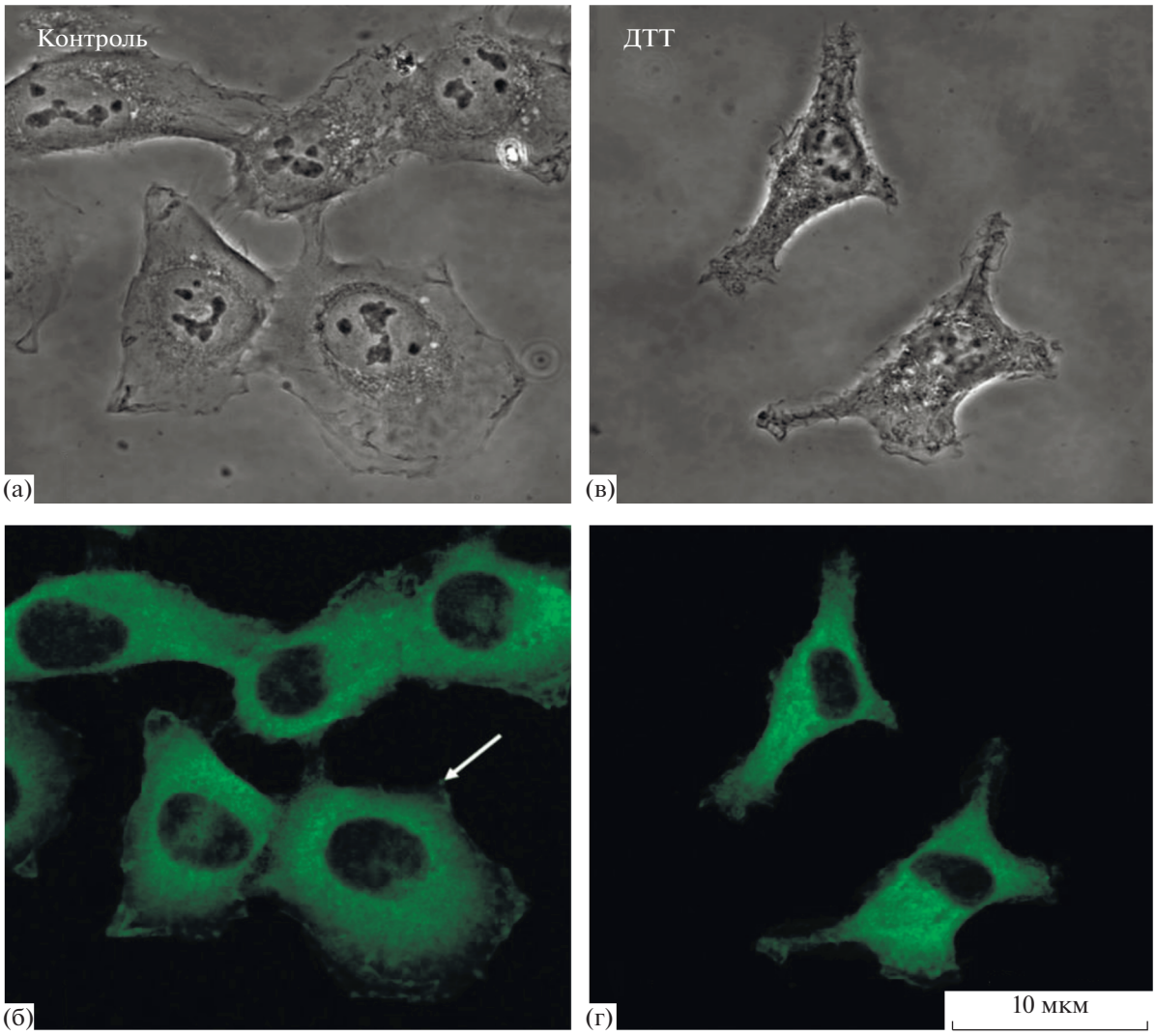

Рис. 5. Выявление винкулина в клетках фибросаркомы HT1080. (а, в) Фазовый контраст; (б, г) иммуноцитохимическое выявление винкулина (*зеленый*). (а, б) Контроль; (в, г) 24 ч воздействия ДТТ. Стрелкой показан фокальный контакт. Масштабный отрезок – 10 мкм.

топлазмы сохранялось. Диффузное окрашивание цитоплазмы не позволило нам оценить количество и распределение фокальных контактов на вентральной стороне клеток (рис. 5в, 5г).

Оценка параметров клеточной подвижности

Система актиновых филаментов отвечает за поддержание формы клеток и клеточную подвижность. В связи с этим с помощью прижизненных наблюдений мы проанализировали движение фибробластов и клеток фибросаркомы в нормальных условиях культивирования и в присутствии ДТТ (рис. 6 и 7), а также оценили возможность корреляции между изменением формы и подвижностью клеток. Для этого каждые 90 мин в течение 22.5 ч производилась съемка полей зрения и на полученных изображениях отмечалось положение каждой клетки. Затем с помощью плагина MTrackJ программы Fiji были получены траектории движения отдельных клеток и произведен анализ параметров клеточной подвижности. Изменение координат клеток в двумерном пространстве оценивалось с помощью перевода изображений треккинга в цифровой формат с последующей статистической обработкой полученных графов клеточной подвижности, которая заключалась в оценке изменений длины сегментов графа за выбранную единицу времени, выраженных в пикселях и минутах соответственно (Sharma et al., 2020).

Съемка проводилась в течение 24 ч, при этом обработка результатов осуществлялась в рамках

от 0 до 22.5. Подобный промежуток был выбран для облегчения визуализации получаемых данных и исключения из анализа средовых артефактов, возникающих за 40 мин до завершения 24-часового периода непрерывной съемки. Далее приведены результаты выбранного временного диапазона (0–22.5 ч).

В нормальных условиях культивирования дермальные фибробласты сохраняли распластанную морфологию в течение всего периода наблюдений (22.5 ч) (рис. 6а–6в). Отмечался ненаправленный характер движения клеток (рис. 6г). Среднее пройденное клетками расстояние за 22.5 ч составляло 296.75 пикселей. При наблюдении за движением фибробластов в течение 22.5 ч после добавления ДТТ (рис. 6д–6ж) было обнаружено, что через 9–10 ч культивирования с ДТТ 22 из 25 проанализированных клеток изменяли морфологию, становились более поджатыми и выпуклыми (рис. 6е). Кроме того, у большинства клеток через 9–10 ч изменялся характер движения, в частности, наблюдалось уменьшение среднего расстояния, пройденного отдельной клеткой за 22.5 ч (рис. 6з), на 36.15 пикселей. Среднее проходимое клеткой расстояние за 90 мин (средняя скорость) после 9 ч культивирования с ДТТ снижалась на 7.16 пикселей по сравнению с контролем.

Таким образом, ДТТ вызывал снижение подвижности дермальных фибробластов, по хронологии совпадавшее с уменьшением площади распластанности этих клеток. По-видимому, события, развивающиеся в клетке под воздействием ДТТ, связаны с изменением как морфологических, так и миграторных параметров.

Анализ движения клеток фибросаркомы показал, что в нормальных условиях культивирования эти клетки сохраняли распластанную морфологию в течение всего периода наблюдений (22.5 ч) (рис. 7а–7в). Отмечался ненаправленный характер движения клеток (рис. 7г). Среднее пройденное клетками расстояние за 22.5 ч составляло 247.82 пикселя. При наблюдении за движением клеток фибросаркомы в течение 22.5 ч после добавления ДТТ (рис. 7д–7ж) было обнаружено, что после 6–7 часов культивирования с ДТТ 18 из 25 проанализированных клеток тоже изменяли морфологию, становясь более поджатыми и выпуклыми, или шарообразными (рис. 7е). Кроме того, после 6–7 ч культивирования с ДТТ у 20 из 25 проанализированных клеток изменялся и характер движения. В частности, клетки проявляли осцилляторный (колебательный) характер движения, который выражался в хаотической смене направления движения (cell stalling). Кроме этого, отмечалось уменьшение среднего расстояния, пройденного отдельной клеткой, на 99.12 пикселей (рис. 7з). Средняя скорость после 6 ч культивирования с ДТТ снижалась на 6.23 пикселя по сравнению с контролем.

Таким образом, ДТТ вызывал снижение подвижности клеток фибросаркомы, по хронологии совпадавшее с уменьшением площади распластанности этих клеток. Наблюдалось падение величины среднего пройденного расстояния при небольшом изменении средней скорости клеток. Подобный эффект объясняется значимым ускорением клеток фибросаркомы в начале миграции и резким затормаживанием ближе к концу проведения наблюдений.

Полученные качественные характеристики изменения параметров клеточной подвижности были валидированы с помощью адаптации $\Delta\Delta$Ct метода. В рамках экспериментального подхода для каждой клетки был получен набор значений, отражающих скорость ее движения в установленные промежутки времени. Всего анализу подверглись 50 клеток при описании подвижности фибробластов (25 контроль и 25 ДТТ+) и 50 клеток для HT1080 (25 контроль и 25 ДТТ+). Каждая клетка в контрольных и экспериментальных группах считалась техническим повтором. Ниже мы приводим схему обработки значений для количественного обоснования особенностей клеточной подвижности при действии ДТТ для обеих клеточных линий.

1) Подсчет среднего значения скорости для каждого технического повтора в контрольной и опытной группе.

$$V_{\mathrm{av}\,j} = \mathrm{sum}\left(X_{ij}\right)/n,$$

где j – порядковый номер технического повтора (клетки), X_{ij} – значение скорости j-ой клетки в каждом i-ом временном промежутке, а n – количество разбиений временного континуума.

2) Подсчет ΔV как модуля разницы между $V_{\mathrm{av}\,j}$ контроля и $V_{\mathrm{av}\,j}$ экспериментальной группы.

$$\Delta V = \left|V_{\mathrm{av}\,j}C - V_{\mathrm{av}\,j}E\right|,$$

где $V_{\mathrm{av}\,j}C$ – средняя разница для j-того технического повтора в контроле, а $V_{\mathrm{av}\,j}E$ – средняя разница j-того технического повтора в экспериментальной группе.

3) Подсчет значений $\Delta\Delta V$ для обеих анализируемых групп

$$\Delta\Delta V = X_{ij} - \Delta V,$$

где X_{ij} – значение скорости j-ой клетки в каждом i-ом временном промежутке в контроле или экспериментальной группе.

4) Для наглядности и масштабирования результатов полученные значения для каждого тех-

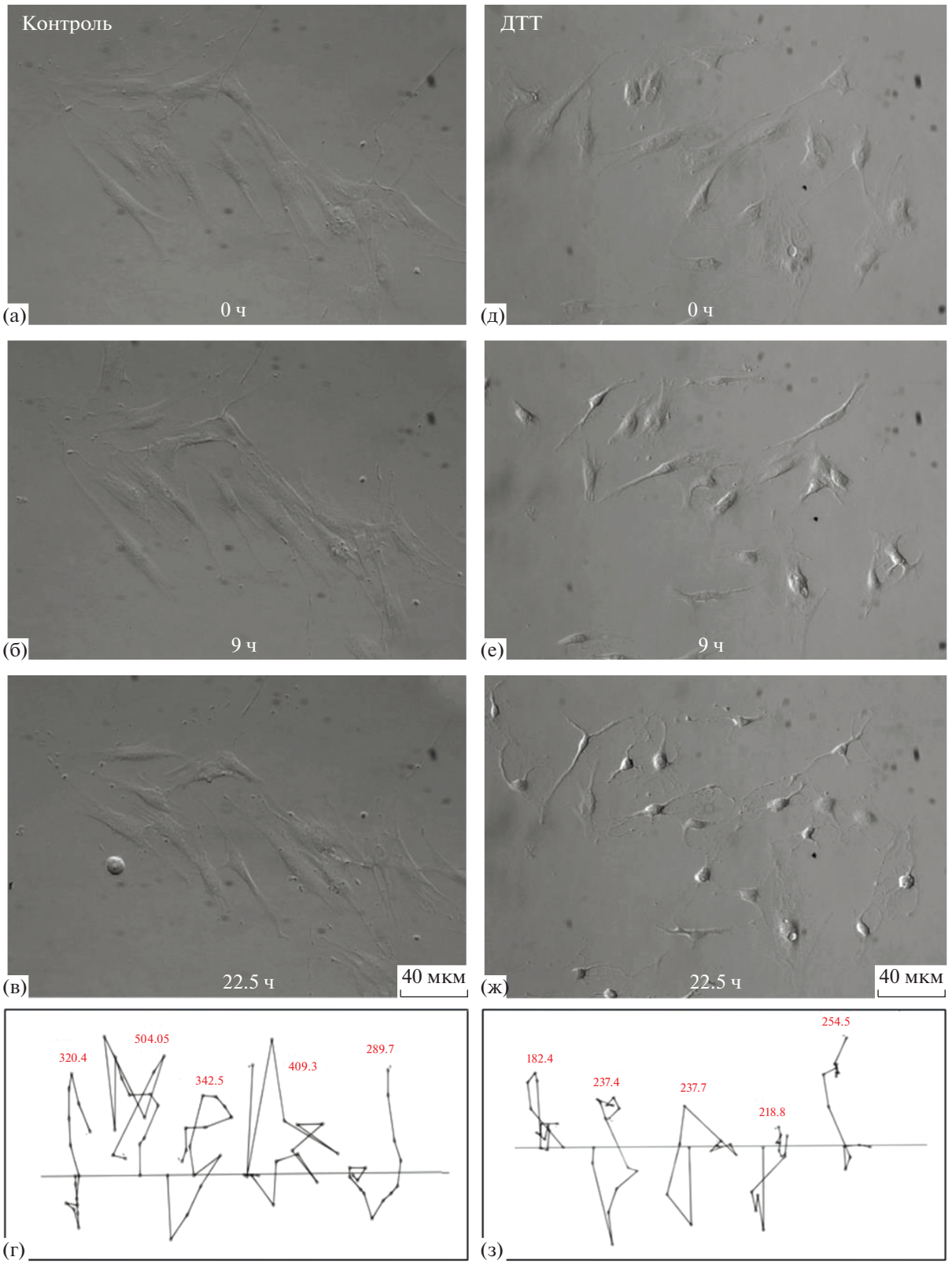

Рис. 6. Прижизненные наблюдения за поведением дермальных фибробластов в течение 22.5 ч. (а–г) Контроль; (д–з) 22.5 ч воздействия ДТТ. (а–в, д–ж) Фазовый контраст, масштабный отрезок 40 мкм. (г, з) Репрезентативные траектории движения отдельных клеток, полученные с помощью плагина MTrackJ программы Fiji. Положение клеток отмечалось каждые 90 мин (расстояние между двумя соседними точками). Красным цветом отмечен пройденный клетками путь.

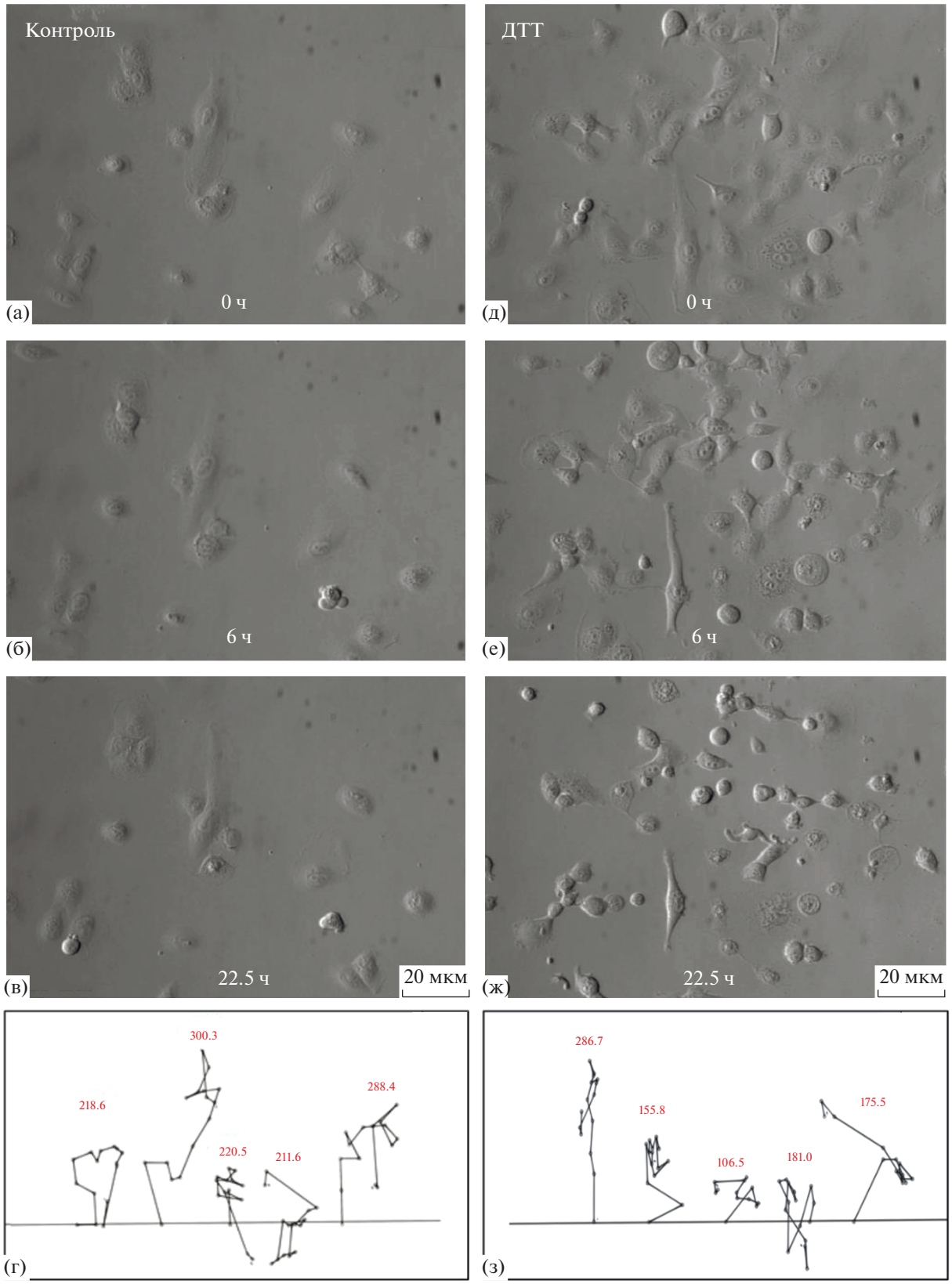

Рис. 7. Прижизненные наблюдения за поведением клеток фибросаркомы в течение 22.5 ч. (а–г) Контроль; (д–з) 22.5 ч воздействия ДТТ. (а–в, д–ж) Фазовый контраст, масштабный отрезок 20 мкм. (г, з) Репрезентативные траектории движения отдельных клеток, полученные с помощью плагина MTrackJ программы Fiji. Положение клеток отмечалось каждые 90 мин (расстояние между двумя соседними точками). Красным цветом отмечен проходимый клетками путь. Длина пути выражена в пикселях.

(а)

exp(ΔΔVal_C)			exp(ΔΔVal_-C1)					exp(ΔΔVal_-C2)					exp(ΔΔVal_-C3)					
C1	C2	C3	ДТТ1	ДТТ2	ДТТ3	ДТТ4	ДТТ5	ДТТ1	ДТТ2	ДТТ3	ДТТ4	ДТТ5	ДТТ1	ДТТ2	ДТТ3	ДТТ4	ДТТ5	Время, ч
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
3,00324	1,95285	0,19046	1,69857E-07	0,00169	2,4E-09	5594,2366	497868,9484	2,6E-07	0,00261	3,65815E-09	8603,22	765659	2,7E-06	0,02671	3,8E-08	88211,5	7850534	3
0,03461	0,6918	116,32	1042,879675	6,66281	0,02481	24,787539	1,41803E-05	52,1717	0,33332	0,001240974	1,24004	7,1E-07	0,31029	0,00198	7,4E-06	0,00738	4,2E-09	4,5
3,26795	5,36106	0,07487	6,4783E-07	6,3E-10	8,6E-11	5,6010967	0,000212783	3,9E-07	3,8E-10	5,21635E-11	3,41427	0,00013	2,8E-05	2,8E-08	3,7E-09	244,487	0,00929	6
5,66911	0,00845	55,0164	5,21343E-13	5,7E-14	2,2E-10	1,565E-11	2,25877E-14	3,5E-10	3,8E-11	1,48013E-07	1E-08	1,5E-11	5,4E-14	5,9E-15	2,3E-11	1,6E-12	2,3E-15	7,5
0,04246	104,31	0,56788	3,52986E-07	49117,2	1,3E-05	0,0164795	7,51029E-06	1,4E-10	19,9926	5,23009E-09	6,7E-06	3,1E-09	2,6E-08	3672,26	9,6E-07	0,00123	5,6E-07	9
0,00672	0,17043	15456	0,000964934	4,6E-08	7,2E-08	4,688E-07	3,77285E-08	3,8E-05	1,8E-09	2,85199E-09	1,8E-08	1,5E-09	4,2E-10	2E-14	3,1E-14	2E-13	1,6E-14	10,5
0,00447	7089,36	0,50649	3,75495E-05	7,4E-06	8E-08	13034,437	3,85215E-08	2,4E-11	4,7E-12	5,01956E-14	0,00822	2,4E-14	3,3E-07	6,5E-08	7E-10	115,025	3,4E-10	12
0,00364	6019,74	0,49947	1,87139E-08	1,8E-13	3,6E-10	2,099E-07	3,87445E-13	1,1E-14	1,1E-19	2,16011E-16	1,3E-13	2,3E-19	1,4E-10	1,3E-15	2,6E-12	1,5E-09	2,8E-15	13,5
0,87493	33429,4	0,00111	1,89542E-10	2,2E-15	1,4E-08	8,827E-14	8,50596E-15	5E-15	5,7E-20	3,6862E-13	2,3E-18	2,2E-19	1,5E-07	1,7E-12	1,1E-05	6,9E-11	6,7E-12	15
0,0002	165227	6,48748	4,40438E-05	6,2E-11	8,8E-08	1,145E-12	9,14777E-11	5,3E-14	7,5E-20	1,06357E-16	1,4E-21	1,1E-19	1,4E-09	1,9E-15	2,7E-12	3,5E-17	2,8E-15	16,5
2,6E-05	3,8E+07	41,6773	0,052076416	7,5E-10	0,0001	4,035E-07	1,36044E-10	3,5E-14	5,1E-22	6,78493E-17	2,7E-19	9,2E-23	3,2E-08	4,7E-16	6,2E-11	2,5E-13	8,4E-17	18
0,00631	359,017	2,35978	8,77288E-07	2E-12	1,1E-07	3,623E-10	4,72943E-11	1,5E-11	3,5E-17	1,92051E-12	6,4E-15	8,3E-16	2,3E-09	5,3E-15	2,9E-10	9,7E-13	1,3E-13	19,5
2E-05	3,2E+09	0,05854	2,41455E-12	1,1E-18	1,3E-16	3,205E-18	4,37464E-18	1,5E-26	6,8E-33	8,14196E-31	2E-32	2,7E-32	8,2E-16	3,7E-22	4,4E-20	1,1E-21	1,5E-21	21
0,43016	139,659	0,03414	8,53552E-11	5E-16	4E-16	1,135E-15	1,89557E-19	2,6E-13	1,5E-18	1,24325E-18	3,5E-18	5,8E-22	1,1E-09	6,3E-15	5,1E-15	1,4E-14	2,4E-18	22,5

(б)

exp(ΔΔVal_C)			exp(ΔΔVal_-C1)					exp(ΔΔVal_-C2)					exp(ΔΔVal_-C3)					
C1	C2	C3	ДТТ1	ДТТ2	ДТТ3	ДТТ4	ДТТ5	ДТТ1	ДТТ2	ДТТ3	ДТТ4	ДТТ5	ДТТ1	ДТТ2	ДТТ3	ДТТ4	ДТТ5	Время, ч
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
39,4259	22,4126	0,00341	7,19798E-15	1,5E-08	1,8E-15	5,959E-18	5,75187E-20	1,3E-14	2,7E-08	3,13052E-15	1E-17	1E-19	8,3E-11	0,00018	2,1E-11	6,9E-14	6,7E-16	3
0,01123	0,1244	6039,85	1,47548E-10	6,1E-11	1,4E-11	2,491E-09	1,43069E-12	1,3E-11	5,5E-12	1,2194E-12	2,2E-10	1,3E-13	2,7E-16	1,1E-16	2,5E-17	4,6E-15	2,7E-18	4,5
0,08364	1,74532	9,81528	8,16937E-10	8,7E-10	8,9E-06	2,644E-09	2,7727E-08	3,9E-11	4,2E-11	4,2522E-07	1,3E-10	1,3E-09	7E-12	7,4E-12	7,6E-08	2,3E-11	2,4E-10	6
103,845	0,01445	3,80799	8,80908E-08	1,1E-05	1,5E-08	4,688E-10	6,6098E-10	0,00063	0,08191	0,000108377	3,4E-06	4,8E-06	2,4E-06	0,00031	4,1E-07	1,3E-08	1,8E-08	7,5
1,46899	0,10331	9,32943	1,40252E-07	5,4E-09	2,4E-09	1,796E-09	7,52045E-10	2E-06	7,7E-08	3,4064E-08	2,6E-08	1,1E-08	2,2E-08	8,5E-10	3,8E-10	2,8E-10	1,2E-10	9
540,528	0,16536	0,04817	6,07725E-13	2,9E-08	1,1E-13	1,021E-11	3,4748E-14	2E-09	9,4E-05	3,46045E-10	3,3E-08	1,1E-10	6,8E-09	0,00032	1,2E-09	1,1E-07	3,9E-10	10,5
0,35969	0,06759	102,442	4,71028E-10	0,00213	3,8E-09	4,796E-11	1,80428E-09	2,5E-09	0,01131	2,01572E-08	2,6E-10	9,6E-09	1,7E-12	7,5E-06	1,3E-11	1,7E-13	6,3E-12	12
0,58422	0,04576	110,181	8,41949E-12	2,5E-07	1,4E-09	6,425E-08	2,86962E-10	1,1E-10	3,2E-06	1,81196E-08	8,2E-07	3,7E-09	4,5E-14	1,3E-09	7,5E-12	3,4E-10	1,5E-12	13,5
0,00525	0,10614	789834	3,93014E-07	7,4E-05	2,4E-05	9,435E-08	4,27117E-06	1,9E-08	3,7E-06	1,19684E-06	4,7E-09	2,1E-07	2,6E-15	4,9E-13	1,6E-13	6,3E-16	2,8E-14	15
0,00123	0,50193	169010	3,1373E-10	3,1E-10	4,5E-08	1,213E-08	2,25503E-10	7,7E-13	7,5E-13	1,09654E-10	3E-11	5,5E-13	2,3E-18	2,2E-18	3,3E-16	8,8E-17	1,6E-18	16,5
0,03883	0,09747	1276,67	5,13996E-11	1,8E-12	1,3E-08	1,16E-12	8,83937E-13	2E-11	7,1E-13	5,26813E-09	4,6E-13	3,5E-13	1,6E-15	5,4E-17	4E-13	3,5E-17	2,7E-17	18
0,59699	0,02363	387,821	1,15997E-10	8,9E-08	0,00063	1,369E-10	3,85124E-10	2,9E-09	2,2E-06	0,015874264	3,5E-09	9,7E-09	1,8E-13	1,4E-10	9,7E-07	2,1E-13	5,9E-13	19,5
1,5E+11	7,3E-05	0,00857	7,90655E-31	1,6E-28	7,2E-28	3,229E-30	2,94975E-29	1,6E-15	3,2E-13	1,42615E-12	6,4E-15	5,9E-14	1,3E-17	2,7E-15	1,2E-14	5,5E-17	5E-16	21
0,01941	0,1362	6262,66	1,18251E-08	7,9E-08	0,00021	4,518E-10	1,78257E-07	1,7E-09	1,1E-08	3,02735E-05	6,4E-11	2,5E-08	3,7E-14	2,4E-13	6,6E-10	1,4E-15	5,5E-13	22,5

Рис. 8. Количественный анализ особенностей клеточной подвижности при обработке ДТТ. (а) Дермальные фибробласты, (б) клетки фибросаркомы. Красным цветом обозначены ячейки, в которых характер движения клетки в заданный промежуток времени отличался от контрольного значения (посчитано независимо для С1, С2 и С3). Зеленый цвет, напротив, указывает на отсутствие значительного отличия от контрольного измерения на заданном промежутке времени при выбранном дискриминирующем пороге (60-ая перцентиль). Все 5 выборок измерений, полученных при анализе действия ДТТ, сравнивались с каждой контрольной выборкой как для фибробластов, так и для клеток линии HT1080. Синим цветом в таблице обозначены столбцы, относящиеся к контрольным группам, оранжевым цветом обозначены экспериментальные группы, а бесцветный столбец отражает разбиение по времени проведения прижизненной съемки.

нического контроля были использованы для возведения экспоненты в соответствующую степень.

$$D = \exp\left(\Delta\Delta V_j\right),$$

где $\Delta\Delta V_j$ – разница между средней разницей j-того технического повтора в контроле или экспериментальной группе и $V_{\text{av}\,j}$.

Полученные результаты были визуализированы в формате HeatMap, где каждая ячейка содержит значение D, величину, которая позволяет оценить скорость движения клетки по субстрату. При разбиении полученной выборки из контрольных и экспериментальных точек на перцентили по величинам D оказалось, что контрольная и экспериментальная группы образуют два множества значений с хорошо дискриминирующим порогом на уровне 60-ой перцентили (рис. 8). На рис. 8 красным цветом обозначены ячейки, в которых характер движения клетки в заданный промежуток времени отличался от контрольного значения (посчитано независимо для С1, С2 и С3), то есть красным выделены значения выше порога. Зеленый цвет, напротив, указывает на отсутствие значительного отличия от контрольного измерения на заданном промежутке времени при выбранном дискриминирующем пороге.

Таким образом, в рамках реализованного эксперимента 22.5-часовой промежуток времени был разбит на 14 промежутков, каждый из которых обладает введенным нами индивидуальным параметром скорости. Дальнейшая статистическая обработка наборов индивидуальных скоростей каждого временного промежутка для каждой анализируемой клетки позволила нам не только подтвердить факт снижения эффективности продвижения клетки по субстрату, но и достаточно точно определить момент возникновения наблюдаемого эффекта. Для фибробластов статистически значимые изменения эффективности подвижности клеток наблюдаются с 9 ч культивирования с ДТТ,

тогда как у клеток линии HT1080 падение активности было обнаружено уже через 6 ч в условиях экспериментального воздействия.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования показали, что индуктор стресса ЭПР ДТТ вызывает изменение формы и поверхности дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы HT1080, а также влияет на организацию актинового цитоскелета, фокальных контактов и подвижность в этих клетках.

ДТТ вызывает стресс ЭПР, блокируя образование дисульфидных связей между остатками цистеина в белках, из-за чего нарушается их сворачивание и происходит накопление не свернутых белков в ЭПР (Oslowski, Urano, 2011; Ren et al., 2018). В клетках человека дисульфидные связи присутствуют преимущественно в секретируемых белках, которые синтезируются в ЭПР, и практически отсутствуют в цитозольных белках (Weiss et al., 2022; Chang, Fu, 2023). Таким образом, ДТТ нарушает сворачивание преимущественно секреторных белков, синтезируемых в ЭПР.

Мы показали, что культивирование дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы линии HT1080 в присутствии ДТТ в течение 24 ч вызывает сжатие этих клеток, изменение их формы и поверхности и уменьшение площади распластывания. Изменение формы клеток при действии индукторов стресса ЭПР не считается характерным морфологическим признаком стресса ЭПР и UPR, однако есть данные о поджатии нормальных и опухолевых клеток при действии некоторых индукторов стресса ЭПР, имеющих разный механизм активации стресса ЭПР (Kohno et al., 1979; Brüning et al., 2009; Belloni et al., 2010; Földi et al., 2013). Интересно, что при действии тапсигаргина на клетки нейробластомы изменение формы клеток сопровождалось снижением уровня синтеза белков, участвующих в поддержании и динамике актинового цитоскелета, таких как винкулин и эзрин (отвечает за сборку актиновых пучков) (Földi et al., 2013). Однако механизмы таких изменений формы до сих пор неизвестны.

Изменение рельефа поверхности клеток и их сжатие свидетельствуют о перестройках актинового цитоскелета, так как изменение состояния системы актиновых филаментов, в частности, кортикального актина и стресс-фибрилл, влияет на форму, рельеф поверхности и площадь распластывания клетки (Cleuren, Boonstra, 2012). Действительно, мы показали, что в дермальных фибробластах при действии ДТТ наблюдалась реорганизация актинового цитоскелета, в частности, пучки актина, характерные для контрольных клеток, становились менее выраженными или отсутствовали. Кроме того, наблюдалось уменьшение числа фокальных контактов. По-видимому, изменение формы и поверхности фибробластов, а также уменьшение числа фокальных контактов, обусловлены реорганизацией актинового цитоскелета, вызванной действием ДТТ, так как деполимеризация и реорганизация актина может вызывать разборку фокальных контактов (Cleuren, Boonstra, 2012). В то же время известно, что стресс-фибриллы могут формироваться за счет полимеризации актина на фокальных контактах (Tojkander et al., 2012), поэтому отсутствие пучков актина, часть из которых, по-видимому, представляет собой стресс-фибриллы, при действии ДТТ может быть также вызвано уменьшением числа фокальных контактов.

В клетках линии HT1080 реорганизацию актинового цитоскелета мы не обнаружили с помощью окрашивания TRITC-фаллоидином, однако сжатие этих клеток, изменение их формы и поверхности и уменьшение площади распластывания под действием ДТТ тоже происходило. По-видимому, в клетках HT1080 при действии ДТТ происходит реорганизация кортикального актина, приводящая к изменению поверхности и площади распластывания клеток, которую мы не наблюдаем из-за ограничений разрешающей способности метода. Возможно, ДТТ влиял и на состояние фокальных контактов в клетках фибросаркомы, однако диффузное окрашивание цитоплазмы при выявлении винкулина, отмечаемое в литературе (Schwartz et al., 2013), не позволило сделать выводы об изменении количества фокальных контактов и их перераспределении.

Следует отметить, что актин и винкулин относятся к цитозольным белкам и, по-видимому, не имеют дисульфидных связей в своей структуре. Поэтому реорганизация актинового цитоскелета и уменьшение количества фокальных контактов после действия ДТТ, скорее всего, не связаны с влиянием ДТТ на структуру актина и винкулина. Однако нельзя исключать вероятность того, что ДТТ может оказывать влияние, не связанное с восстановлением дисульфидных связей белков. В этом случае возможно, что ДТТ нарушает функционирование белков, контролирующих состояние актиновой сети, т.е. актин-связывающих белков. Так, например, в мышиных фибробластах линии NIH-3T3 ингибитор Arp2/3 (Actin Related Protein 2/3 complex) CK666 вызывал переход сети актина в фибриллы в кортикальной зоне, а ингибитор формина SMIFH2 вызывал исчезновение стресс-фибрилл (Eghiaian et al., 2015). При действии ДТТ на фибробласты в нашем исследовании пучки актина, часть из которых, по-видимому, представляет собой стресс-фибриллы, отсутствовали или становились менее выраженными. Возможно, ДТТ

прямо или косвенно подавлял работу формина, который участвует в формировании стресс-фибрилл.

Система актиновых филаментов отвечает не только за поддержание формы клеток, но и за клеточную подвижность (Cleuren, Boonstra, 2012; Tojkander et al., 2012). Фибробласты перемещаются по 2D-субстрату с помощью полимеризации актина и формирования фокальных контактов (Sixt, 2012). Полимеризация актина в сторону плазматической мембраны обеспечивает силу, необходимую для формирования выступа (протрузии) плазматической мембраны (Cleuren, Boonstra, 2012). Поэтому высокая скорость роста актиновых филаментов очень важна для успешного перемещения клеток. Кроме того, актиновые филаменты формируют пучки – стресс-фибриллы, чаще всего способные сокращаться за счет связи с миозином II (Tojkander et al., 2012). Сократимые стресс-фибриллы обычно связаны с фокальными контактами. В связи с этим нарушение организации актинового цитоскелета и изменение количества фокальных контактов в дермальных фибробластах могут свидетельствовать о нарушении подвижности клеток. Действительно, мы показали, что ДТТ вызывал снижение подвижности дермальных фибробластов, по хронологии совпадавшее с уменьшением площади распластанности этих клеток, вызванной реорганизацией актинового цитоскелета. Снижение подвижности при активации UPR было обнаружено также при действии индуктора стресса ЭПР туникамицина. Так было показано, что туникамицин подавлял миграцию дермальных фибробластов и кератиноцитов человека (Bachar-Wikstrom et al., 2020) и миграцию гладкомышечных клеток сосудов, вызванную тромбоцитарным фактором роста (Yi et al., 2012). Однако исследования состояния актинового цитоскелета или механизмов, опосредующих такую клеточную реакцию, не проводилось.

Опухолевая трансформация включает в себя реорганизацию цитоскелета (кортикально организованный актин) и фокальных контактов, снижение адгезивности к субстрату (Schwartz et al., 2013). Клетки фибросаркомы HT1080 способны и к мезенхимному (как фибробласты, с участием фокальных контактов), и к амебоидному типу движения (с помощью блеббинга, без участия фокальных контактов) (Yamazaki et al., 2005). Для обоих типов движения необходимо участие актинового цитоскелета (Sixt, 2012; Limia et al., 2019). В связи с этим, обнаруженное нами снижение клеточной подвижности клеток HT1080 может быть связано с нарушением структурной целостности актиновой сети, что повлияло на эффективность продвижения клеток по субстрату. Влияние стресса ЭПР (UPR) на подвижность опухолевых клеток до сих пор однозначно не определено (Urra et al., 2016). Есть данные как о стимулирующем влиянии участников сигнальных каскадов UPR на миграцию опухолевых клеток и активации эпителиально-мезенхимного перехода, так и данные об ингибирующем влиянии. Противоречивость данных может быть связана с различными клеточными линиями и индукторами UPR. Так, например, туникамицин усиливал миграцию опухолевых клеток кишечника человека линии LS174T (Gundamaraju et al., 2021), но при этом подавлял миграцию стволовых клеток рака молочной железы линии MCF 7 фенотипа CD44+/CD24– (Nami et al., 2016). Кроме того, активация стресса ЭПР с помощью β-азарона в опухолевых клетках мочевого пузыря человека линий 253J и 5637 приводила к подавлению их миграции (Liu et al., 2023). Мы обнаружили снижение подвижности клеток фибросаркомы, по хронологии совпадавшее с уменьшением площади распластанности этих клеток, при этом наблюдалось значимое ускорение клеток фибросаркомы в начале миграции и резкое затормаживание ближе к концу проведения наблюдений. Возможно, индукция UPR с помощью ДТТ стимулировала подвижность клеток, однако другие воздействия ДТТ, не связанные непосредственно с активацией стресса ЭПР, приводили к снижению подвижности клеток фибросаркомы.

Существует несколько методов и подходов, используемых при измерении параметров движения клеток. Например, дифференциальное интерференционное контрастирование (DIC), фазовый контраст, time-lapse видеомикроскопия и треккинг (Sharma et al., 2020). Для проведения более точных измерений и количественной оценки эффекта используется метод треккинга, который подразумевает анализ кадров видеоряда за счет отслеживания пути движения клеток в рамках выделенного промежутка времени с использованием специального программного обеспечения. Для проведения количественной оценки широко используется подход, который заключается в оценке изменения отношения пути каждой отдельной клеточной единицы к ее перемещению. Метод позволяет отметить явные изменения в продвижении клеток по субстрату в рамках экспериментальной модели и дает статистически значимые и воспроизводимые результаты. Однако особенность метода, которая заключена в генерализации данных измерения и кумулятивной оценке эффективности продвижения по субстрату, не позволяет выявить точный момент возникновения эффекта, вызванного экспериментальным агентом (в нашем случае – ДТТ), и не подразумевает использование способов технологических методов повышения чувствительности проводимых изме-

рений. Разработанный нами метод позволяет значительно повысить чувствительность анализа и проводить оценку изменений клеточной подвижности не только в рамках полного экспериментального промежутка времени, но и на любом, сколь угодно малом, отрезке времени, задаваемом исследователем. При этом точность оценки может быть повышена за счет увеличения степени сегментации получаемых треков по времени, в зависимости от разрабатываемого дизайна и потребностей исследователя. Дополнительным преимуществом разработанного метода перед существующими способами оценки является устойчивость к выбросам в рамках анализируемой выборки клеток. Ранние или слишком поздние показатели снижения или увеличения эффективности клеточной подвижности достаточно просто отсеиваются на основании расчета коэффициента стандартного отклонения и стандартной ошибки среднего для анализируемой когорты, тогда как более конвенциональные методы требуют дополнительного раунда фильтрации данных.

Таким образом, разработанный метод позволяет провести количественную оценку и валидацию наблюдаемых качественных изменений характера подвижности клеток при действии разных агентов (в нашем случае – ДТТ), которое выражается в виде такого эффекта как cell-stalling (“застревание клетки”). Тем не менее, учитывая универсальность метода, мы предполагаем более широкое использование предлагаемой техники для количественной оценки изменения характера клеточной подвижности на 2D-субстратах. Так, адаптация адаптации $\Delta\Delta$Ct метода может быть использована при исследовании влияния потенциально лекарственных агентов на подвижность нормальных и опухолевых клеток. Методология позволит выявить не только факт зависимости подвижности от экспериментального воздействия, но и провести сравнительный анализ степени эффективности используемых потенциально лекарственных агентов в зависимости от момента возникновения терапевтического эффекта.

Таким образом, мы показали, что индуктор стресса ЭПР ДТТ оказывает сходное влияние на морфологические признаки, отражающие локомоторные свойства клеток, а также непосредственно на миграторные свойства культивируемых дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы HT1080, вызывая реорганизацию актинового цитоскелета и фокальных контактов в этих клетках, сопровождающуюся изменением поверхности клеток, уменьшением площади их распластывания и снижением подвижности клеток. Поэтому при разработке противоопухолевых препаратов, вызывающих гибель клеток через активацию стресса ЭПР, следует учитывать влияние этих препаратов на нормальные клетки, в том числе на мишени, не связанные непосредственно с активацией UPR.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН и ЦКП “Электронная микроскопия в науках о жизни” МГУ им. М.В. Ломоносова (УНУ “Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия”).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 19-015-00233 и 20-315-90118) в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300098-5.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В настоящей работе не проводили какие-либо исследования с использованием животных или людей в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Е.П. Турищева, Е.А. Смирнова – концепция и руководство работой; Г.А. Ашниев, М.С. Вильданова – проведение экспериментов; Е.П. Турищева, Г.А. Ашниев, Е.А. Смирнова – обсуждение результатов исследования; Е.П. Турищева, Г.А. Ашниев – написание текста; Е.А. Смирнова – редактирование текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Турищева Е.П., Вильданова М.С., Онищенко Г.Е. и др. Роль стресса эндоплазматического ретикулума в дифференцировке клеток мезенхимного происхождения // Биохимия. 2022. Т. 87. № 9. С. 1203–1222.

Al-Beltagi S., Preda C.A., Goulding L.V. et al. Thapsigargin is a broad-spectrum inhibitor of major human respiratory viruses: coronavirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus // Viruses. 2021. V. 13. № 2. P. 234–252.

Almanza A., Carlesso A., Chintha C. et al. Endoplasmic reticulum stress signalling–from basic mechanisms to clinical applications // FEBS. 2019. V. 286. № 2. P. 241–278.

Bachar-Wikstrom E., Manchanda M., Bansal R. et al. Endoplasmic reticulum stress in human chronic wound healing: rescue by 4-phenylbutyrate // Int. Wound J. 2021. V. 18. № 1. P. 49–61.

Belloni D., Veschini L., Foglieni C. et al. Bortezomib induces autophagic death in proliferating human endothelial cells // Exp. cell res. 2010. V. 316. № 6. P. 1010–1018.

Brüning A., Burger P., Vogel M. et al. Bortezomib treatment of ovarian cancer cells mediates endoplasmic reticulum stress, cell cycle arrest, and apoptosis // Invest. new drugs. 2009. V. 27. P. 543–551.

Chang Z., Fu X. Biogenesis of Secretory Proteins in Eukaryotic and Prokaryotic Cells // Encyclopedia of cell biology (second edititon). 2023. V. 1. P. 689–702.

Cleuren Y.T., Boonstra J. Actin: structure, function and disease // Actin: Structure, Functions and Disease, Consuelas VA, *Minas DJ* (eds.). 2012. P. 61–96.

Corazzari M., Gagliardi M., Fimia G.M. et al. Endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, and cancer cell fate // Front. oncol. 2017. V. 7. P. 78–88.

Curran M.P., McKeage K. Bortezomib: a review of its use in patients with multiple myeloma // Drugs. 2009. V. 69. P. 859–888.

Eghiaian F., Rigato A., Scheuring S. Structural, mechanical, and dynamical variability of the actin cortex in living cells // Biophys. J. 2015. V. 108. № 6. P. 1330–1340.

Földi I., Tóth A.M., Szabó Z. et al. Proteome-wide study of endoplasmic reticulum stress induced by thapsigargin in N2a neuroblastoma cells // Neurochem. Int. 2013. V. 62. № 1. P. 58–69.

Gundamaraju R., Vemuri R., Ambati R.R. et al. Tunicamycin via ER stress mediated 6th hour time point aggravates cell migration, cell invasion and cell proliferation in colonic epithelial cells // Advances in Cancer Biology-Metastasis. 2021. V. 2. P. 100007.

Hetz C., Saxena S. ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration // Nat. Rev. Neurol. 2017. V. 13. № 8. P. 477–491.

Jung Y.H., Lim E.J., Heo J. et al. Tunicamycin sensitizes human prostate cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL receptors and downregulation of cIAP2 // Int. J. Oncol. 2012. V. 40. №. 6. P. 1941–1948.

Kohno K., Hiragun A., Mitsui H. et al. Effect of tunicamycin on cell growth and morphology of nontransformed and transformed cell lines // Agric. Biol. Chem. 1979. V. 43. №. 7. P. 1553–1561.

Limia C.M., Sauzay C., Urra H. et al. Emerging roles of the endoplasmic reticulum associated unfolded protein response in cancer cell migration and invasion // Cancers. 2019. V. 11. № 5. P. 631–655.

Liu B., Dan W., Wei Y. et al. β-asarone inhibits the migration, invasion, and EMT of bladder cancer through activating ER stress // Cancer Medicine. 2023. V. 12. P. 13610–13622.

Nami B., Donmez H., Kocak N. Tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress reduces in vitro subpopulation and invasion of CD44+/CD24-phenotype breast cancer stem cells // Exp. Toxicol. Pathol. 2016. V. 68. № 7. P. 419–426.

Oslowski C.M., Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system // Methods Enzymol. 2011. V. 490. P. 71–92.

Ren B., Wang Y., Wang H. et al. Comparative proteomics reveals the neurotoxicity mechanism of ER stressors tunicamycin and dithiothreitol // Neurotoxicology. 2018. V. 68. P. 25–37.

Schwartz M.P., Rogers R.E., Singh S.P. et al. A quantitative comparison of human HT-1080 fibrosarcoma cells and primary human dermal fibroblasts identifies a 3D migration mechanism with properties unique to the transformed phenotype // PLoS One. 2013. V. 8. № 12. P. e81689.

Sharma P., Lam V.K., Raub C.B. et al. Tracking Single Cells Motility on Different Substrates // Methods and protocols. 2020. V. 3. № 3. P. 56–69.

Sicari D., Delaunay-Moisan A., Combettes L. et al. A guide to assessing endoplasmic reticulum homeostasis and stress in mammalian systems // FEBS. 2020. V. 287. № 1. P. 27–42.

Sixt M. Cell migration: fibroblasts find a new way to get ahead // J. Cell Biol. 2012. V. 197. № 3. P. 347–349.

Tojkander S., Gateva G., Lappalainen P. Actin stress fibers–assembly, dynamics and biological roles // J. Cell Sci. 2012. V. 125. № 8. P. 1855–1864.

Urra H., Dufey E., Avril T. et al. Endoplasmic reticulum stress and the hallmarks of cancer // Trends Cancer. 2016. V. 2. № 5. P. 252–262.

Weiss K., Racho J., Riemer J. Compartmentalized disulfide bond formation pathways // Redox Chemistry and Biology of Thiols. Academic Press, 2022. P. 321–340.

Wu J., Chen S., Liu H. et al. Tunicamycin specifically aggravates ER stress and overcomes chemoresistance in multidrug-resistant gastric cancer cells by inhibiting N-glycosylation // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2018. V. 37. № 1. P. 1–12.

Wu L., Huang X., Kuang Y. et al. Thapsigargin induces apoptosis in adrenocortical carcinoma by activating endoplasmic reticulum stress and the JNK signaling pathway: an *in vitro* and *in vivo* study // Drug Des. Devel. Ther. 2019. V. 13. P. 2787–2798.

Yamazaki D., Kurisu S., Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization // Cancer science. 2005. V. 96. № 7. P. 379–386.

Yi N., Chen S.Y., Ma A. et al. Tunicamycin inhibits PDGF-BB-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells through induction of HO-1 // Anat. Rec. 2012. V. 295. № 9. P. 1462–1472.

Yoo J., Mashalidis E.H., Kuk A.C. et al. GlcNAc-1-P-transferase–tunicamycin complex structure reveals basis for inhibition of N-glycosylation // Nat. Struct. Mol. Biol. 2018. V. 25. № 3. P. 217–224.

Endoplasmic Reticulum Stress Inducer Dithiothreitol Affects the Morphology and Motility of Cultured Human Dermal Fibroblasts and Fibrosarcome HT1080 Cell Line

E. P. Turishcheva[1, *], G. A. Ashniev[1], M. S. Vildanova[1], and E. A. Smirnova[1]

[1]Lomonosov Moscow State University, Department of Cell Biology and Histology, Moscow, 119234 Russia

**e-mail: kitten-caterina@yandex.ru*

Some inducers of endoplasmic reticulum (ER) stress can affect the motility of normal and tumor cells. However, it is unknown what mechanisms mediate this effect and whether it is a consequence of ER stress. The aim of our work was to study the effect of the ER stress inducer dithiothreitol (DTT) on morphological features reflecting the locomotor properties of cells, as well as directly on the migratory properties of cultured human dermal fibroblasts and fibrosarcoma HT1080 cells. We have shown that DTT causes disruption of the organization of actin cytoskeleton in both types of cells, which is accompanied by a change in the cell surface and shape of cells, as well as a decrease in their spreading area. In addition, a decrease in the number of focal contacts was observed in dermal fibroblasts. DTT also reduced the motility of dermal fibroblasts and fibrosarcoma cells. To analyze cell motility and determine the moment of its change, we developed a method which showed that the change in the migratory properties of fibrosarcoma cells cultured with DTT began earlier than in dermal fibroblasts. Thus, activation of ER stress by DTT is accompanied by a change in the organization of the actin cytoskeleton and motility in normal and tumor human cells. Consequently, ER stress triggered by various inducers with different mechanisms of action affects the motility of normal and tumor cells, which must be taken into account when developing antitumor drugs that cause cell death through activation of ER stress.

Keywords: dithiothreitol, cell motility, fibroblasts, fibrosarcoma cells, ER stress