

3D сфероиды — клеточная модель для изучения воздействия гипоксии на эпикардальное микроокружение

К. В. Дергилев^{1*}, З. И. Цоколаева^{1,2}, И. Б. Белоглазова¹,
Д. О. Трактуетев³, М. Т. Расулова⁴, Е. В. Парфенова¹

¹ Лаборатория ангиогенеза, Институт экспериментальной кардиологии, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е. И. Чазова Минздрава России, Россия, 121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а

² НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии, Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2,

³ Отделение регенеративной медицины центра кардиоваскулярной медицины медицинского института Флориды, США, Флорида, 32610, Гейнсвилл, М421, 1600 SW Арчер рд.

⁴ Ферганский медицинский институт общественного здоровья, Узбекистан, 150100, Ферганская область, г. Фергана, ул. Янги Турон, д. 2А

Для цитирования: К. В. Дергилев, З. И. Цоколаева, И. Б. Белоглазова, Д. О. Трактуетев, М. Т. Расулова, Е. В. Парфенова. 3D сфероиды — клеточная модель для изучения воздействия гипоксии на эпикардальное микроокружение. *Общая реаниматология*. 2023; 19 (1): 43–49. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2023-1-2292> [На русск. и англ.]

*Адрес для корреспонденции: Константин Владимирович Дергилев, doctorkote@gmail.com

Резюме

Фундаментальные исследования последних лет позволили переосмыслить молекулярные и клеточные механизмы онтогенеза сердца и его репарации после повреждения. Особую актуальность приобретает изучение эпикарда — наружного, плотно примыкающего к миокарду слоя сердечной стенки, образованного гетерогенной популяцией клеток эпикардального мезотелия, коллагеновыми и эластическими волокнами, являющегося важным участником репаративных процессов. Изучение эпикарда затруднено в связи с анатомическими ограничениями и отсутствием релевантных клеточных моделей.

Цель исследования. Разработка 3D модели эпикардального микроокружения и оценка влияния гипоксии на ее характеристики.

Материал и методы. Сборку сфероидов проводили в V-образных культуральных чашках с низкоадгезионным покрытием. Характеристику сфероидов выполняли с использованием иммуофлуоресцентного окрашивания криосрезов, гистологических методов, ПЦР в реальном времени.

Результаты. Культивирование клеток в низкоадгезионных условиях в V-образных культуральных чашках ведет к формированию сфероидов, имеющих размер 136 ± 21 мкм и показатели жизнеспособности клеток более 98%. Клетки в составе сфероидов, культивированных в условиях нормоксии, образовывали плотные межклеточные контакты, характеризовались низким уровнем пролиферации и способностью синтезировать белки внеклеточного матрикса. В условиях гипоксии клетки сфероидов частично утрачивали межклеточные контакты, приобретали веретенообразную форму, экспресировали HIF1a, SNAI1, ACTA2, FN1, COL1A1 и накапливали коллаген, что указывает на признаки активации мезотелиально-мезенхимального перехода и сходные черты с клеточным ответом эпикарда на острое ишемическое повреждение *in vivo*.

Закключение. На основе клеточного сфероида разработали и охарактеризовали модель эпикарда, которая может реализовать клеточный ответ на воздействие гипоксического стимула и быть использована для изучения механизмов регуляции эпикардального микроокружения, тестирования лекарственных препаратов направленного действия.

Ключевые слова: сфероид; гипоксия; репарация сердца

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансовая поддержка. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-29-04164.

3D Spheroids — a Cellular Model for Studying the Effects of Hypoxia on the Epicardial Microenvironment

Konstantin V. Dergilev^{1*}, Zoya I. Tsokolaeva^{1,2}, Irina B. Beloglazova¹,
Dmitry O. Traktuev³, Mohidil T. Rasulova⁴, Elena V. Parfenova¹

¹ Laboratory of Angiogenesis, Experimental Cardiology Institute, Acad. Chazov National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of Russia, 15a Cherepkovskaya 3rd Str., 121552 Moscow, Russia

² V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, 25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

³ Regenerative Medicine Department, Center for Cardiovascular Medicine, Florida Medical Institute, 1600 SW Archer Rd, M421 Gainesville, FL 32610 USA

⁴ Fergana Medical Institute for Public Health, 2A Yangi Turon Str., 150100 Fergana, Fergana region, Uzbekistan

Summary

Fundamental research in recent years has allowed us to reassess the molecular and cellular mechanisms of cardiac ontogenesis and its repair after damage. The epicardium, the outer, tightly adjoining layer of the cardiac wall formed by epicardial mesothelial cells, collagen and elastic fibers, has gained special relevance as an important participant of reparative processes. Better insight into poorly understood epicardial function is challenged due to anatomical issues and lack of relevant cellular models.

The aim of this study was to develop a spheroid 3D model of the epicardial microenvironment and determine responses of spheroids to hypoxia.

Materials and methods. Spheroids were harvested in V-shaped culture dishes with a low adhesion coating. Immunofluorescent staining of cryosections, histological methods and real-time PCR were used for characterization of cultured spheroids.

Results. We demonstrated that cultivation of cells under low adhesion conditions in V-shaped culture dishes resulted in the formation of spheroids with an average size of 136±21 µm and cell viability rates of over 98%. The cells in the spheroids cultured under normoxic conditions formed tight junctions and were characterized by a low level of proliferation and the ability to synthesize extracellular matrix proteins. Under hypoxia cells in the spheroids showed partial loss of intercellular contacts, acquired a spindle shape, started to express HIF1α, SNAIL, COL1A1 and accumulate collagen. All these features demonstrated the activation of mesothelial (endothelial)-mesenchymal transition strongly resembling epicardial cellular responses to ischemia in vivo.

Conclusion. An epicardial spheroid cell culture model suitable for study cellular responses to hypoxic environment was developed. This model can be used to clarify mechanisms regulating epicardial microenvironment and test new targeted candidate drugs.

Keywords: *spheroid; hypoxia; cardiac repair*

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Read the full-text English version at www.reanimatology.com

Введение

На протяжении нескольких десятков лет сердечно-сосудистые заболевания занимают лидирующие позиции среди причин заболеваемости и смертности населения в России и во всем мире [1]. Важнейшим фактором прогрессирования большинства этих заболеваний является фиброз, связанный с избыточным отложением белков внеклеточного матрикса, в частности — фибриллярного коллагена, что ведет к повышению жесткости миокарда, потере систолической функции и развитию выраженных структурно-морфологических изменений [2, 3]. В последние годы появились свидетельства того, что активацию процессов фиброза может вызывать множество различных факторов, которые реализуют разноплановое воздействие на клетки, что определяет особенности и скорость течения патологического процесса [4]. Ключевым индуктором, запускающим развитие фиброза, является гипоксия [5, 6]. Ее воздействие вызывает стабилизацию гипоксия-индуцированных факторов (HIF) в фибробластообразующих клетках, в частности — в клетках эпикарда, обеспечивает их активацию, формирование фибробластов и прогрессирование фиброза [7–9]. Однако механизмы такой регуляции остаются малоизученными в связи с анатомическими ограничениями для доступа к эпикарду и отсутствием релевантных клеточных моделей.

Цель исследования — разработка 3D модели эпикардального микроокружения и оценка влияния гипоксии на ее характеристики.

Материал и методы

Животные. В работе использовали мышей линии C57b/6 (самцы, возраст 8 нед), содержащихся в виварии ФГБУ НМИЦ Кардиологии им. ак. Е. И. Чазова. План экспериментальной работы был одобрен этическим комитетом института экспериментальной кардиологии ФГБУ НМИЦ Кардиологии им. ак. Е. И. Чазова.

Моделирование инфаркта миокарда. Экспериментальный инфаркт миокарда у мыши выполнили в соответствии с протоколом, описанным ранее [10].

Получение культуры клеток эпикардального мезотелия. Выделение клеток эпикарда из сердца мыши проводили в соответствии с протоколом, описанным ранее [11].

Сборка сфероидов на основе клеток эпикарда мыши. Для сборки эпикардальных сфероидов использовали V-образные чашки с низкоадгезионным покрытием GravityTRAP™ ULA Plate («Inspheero», США). Для получения сфероидов суспензию клеток (5000 клеток) высаживали в лунки планшета, осаждали с помощью центрифугирования (200g, 2 мин) и культивировали 72 ч (в среде IMDM с добавлением 1% фетальной сыворотки теленка) в стандартных условиях инкубатора (37°C, 5% CO₂).

Оценка жизнеспособности клеток в составе сфероидов. Жизнеспособность клеток, формирую-

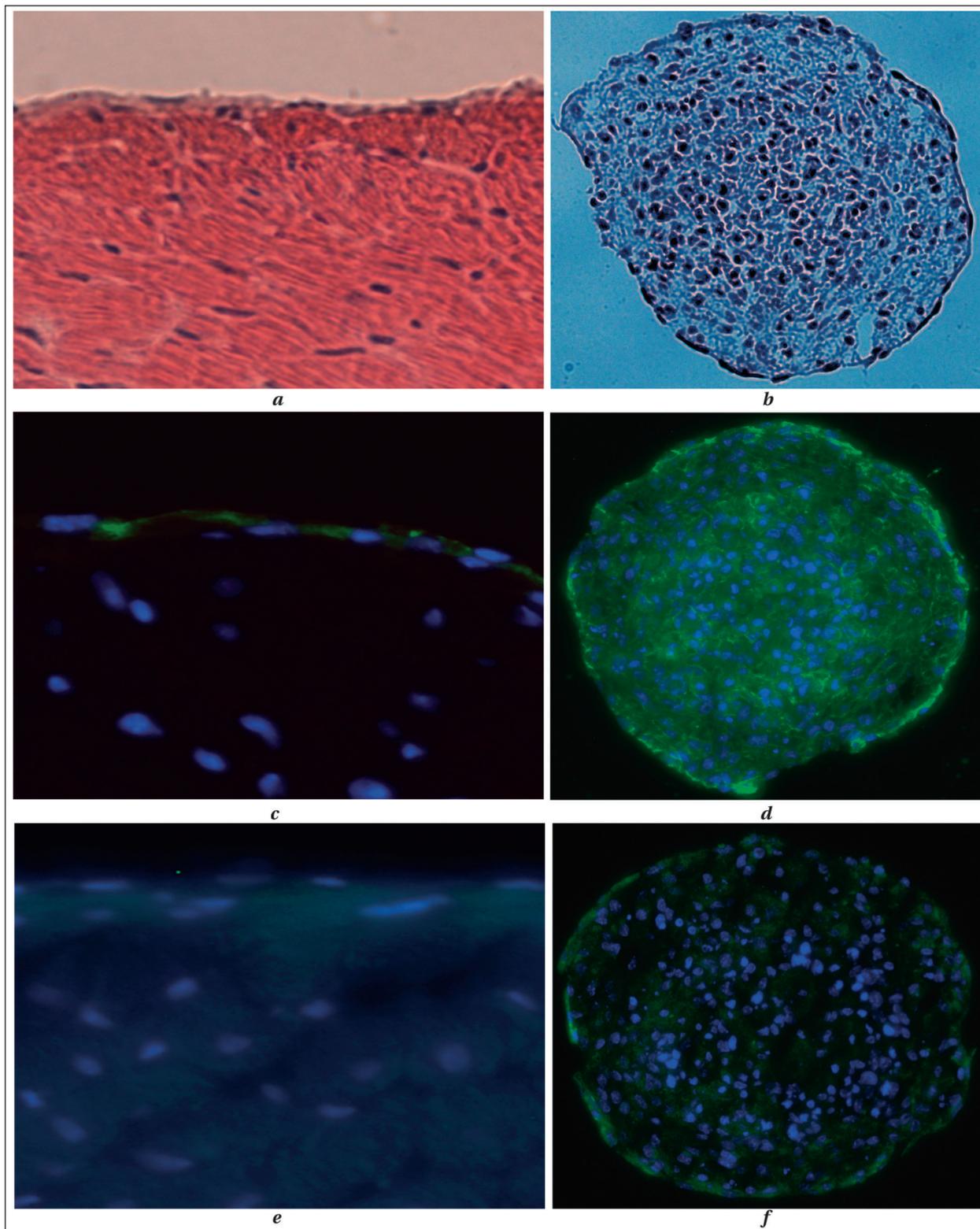


Рис. 2. Сравнительная характеристика организации зоны эпикарда в неповрежденном сердце и в составе сфероида.
Примечание. Репрезентативные изображения окрашивания криосрезов зоны эпикарда в неповрежденном сердце и сфероиде гематоксилин-эозином (*a, b*, соответственно), антителами к белку плотных контактов ZO1 (*c, d*, зеленый), коллагену 1 (*e, f*, зеленый). Ядра клеток окрашены DAPI (синий).

зования для последующего тестирования. Итоговый размер сформированных сфероидов составил 136 ± 21 мкм, а жизнеспособность клеток в его составе — более 98%.

Разрабатываемая модель эпикардального микроокружения с определенной долей допущения должна соответствовать принципу организации зоны неповрежденного эпикарда.

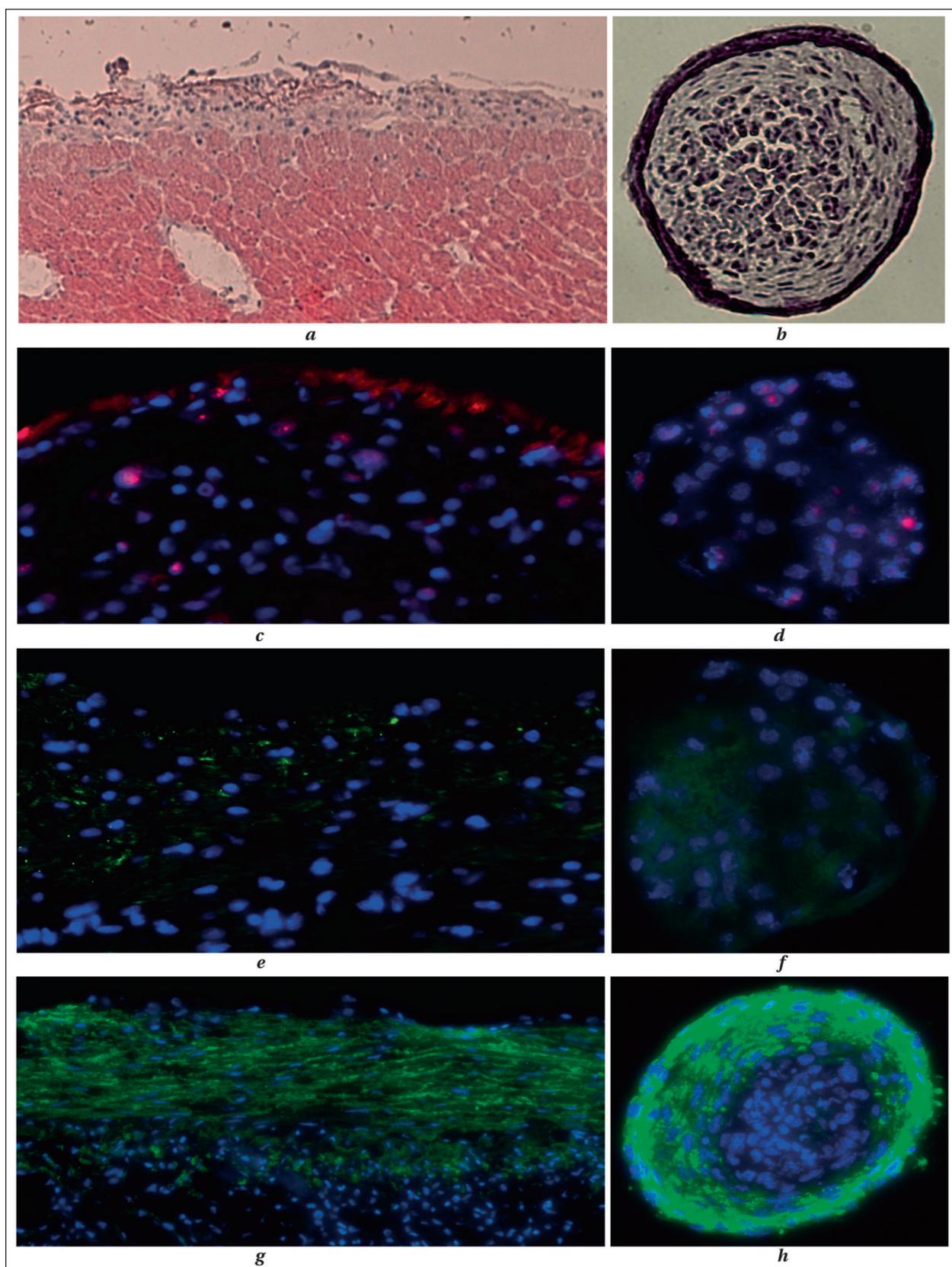


Рис. 3. Сравнительная характеристика организации зоны эпикарда в постинфарктном сердце и в составе сфероидов после гипоксического воздействия.

Примечание. Репрезентативные изображения окрашивания криосрезов зоны эпикарда в неповрежденном сердце и сфероиде гематоксилин-эозином (*a, b*, соответственно), антителами к маркеру гипоксии HIF1 α (*c, d*, зеленый), ZO-1 (*e, f*, зеленый), коллагену 1 (*g, h*, зеленый). Ядра клеток окрашены DAPI (синий).

Для этого сравнили структурную организацию зоны эпикарда в интактном/неповрежденном сердце и в составе сфероиде (рис. 2). Показали, что сфероид представлен клетками эпикарда, взаимодействующими между собой посредством ZO-1+ плотных контактов, имеющих низкий уровень экспрессии маркеров фибробластов (рис. 2 *c, d*) и коллагенового матрикса (рис. 2, *e, f*), что соответствует организации зоны эпикарда в неповрежденном сердце. Моделирование экспериментального инфаркта вызвало формирование обширной зоны ишемии и появление клеток, экспрессирующих HIF1 α в зоне эпикарда/субэпикарда (рис. 3, *c, d*). После острого ишемического воздействия наблюдали дезорганизацию плотных контактов между эпикардальными клетками, перераспределение, миграцию мезотелия в нижележащие слои сердечной стенки, что сопровождалось утолщением эпикардальной области, накоплением фибробластов и повышением продукции коллагенов (рис. 3, *e, g*). Похожие изменения наблюдали и в сформированных сфероиде, культивированных в условиях гипоксии. Гипоксическое воздействие приводило к потере межклеточных контактов (рис. 3, *f*), клетки приобретали веретенообразную форму (рис. 3, *b*), экспрессировали HIF1 α и накапливали коллаген. Выявленные изменения сопровождалась повышением экспрессии генов, связанных с активацией мезотелиально-мезенхимального перехода (ММП) (SNA11, ACTA2, FN1, COL1A1) и их дифференцировкой в направлении фибробластов/миофибробластов (рис. 1, *b*).

Обсуждение

В неповрежденном сердце клетки эпикарда преимущественно находятся в состоянии «покоя»: они характеризуются низким уровнем пролиферации, не проявляют признаков вступления в ММП и имеют сниженную способность синтезировать белки внеклеточного матрикса. И напротив, острое ишемическое повреждение оказывает активирующее воздействие на эпикардальный пул клеток, что ведет к их вступлению в ММП, повышению секреторной активности и их миграции в нижележащие отделы сердечной стенки для участия в репаративных процессах. Несмотря на высокий практический интерес к изучению механизмов репаративного ответа эпикарда на повреждение, его изучение затруднено в связи с отсутствием релевантных моделей. В настоящее время в научной литературе описана единственная модель на основе трехмерных органотипических эпикардальных срезов сердца свиньи [13], которая обладает значительными ограничениями для широкого использования в связи со сложностью создания, коротким временем

жизни *ex vivo* и невозможностью применения для моделирования гипоксического воздействия. Предложенная в данной работе клеточная модель лишена вышеуказанных недостатков. 3D модель может быть легко сформирована с использованием коммерчески доступных материалов/реагентов и с определенной долей допущения способна воспроизводить изменения, производящие в зоне эпикарда в условиях нормоксии и гипоксии. В базовом состоянии сфероид организован клетками эпикардального мезотелия, взаимодействующими между собой посредством ZO-1-содержащих плотных контактов и имеющих низкий уровень экспрессии маркеров фибробластов и коллагенового матрикса, что соответствует организации зоны эпикарда в неповрежденном сердце. Под действием гипоксии происходит стабилизация HIF1 α , клетки эпикардального мезотелия вступают в ММП, приобретают фибробластоподобные свойства и активируют продукцию белков внеклеточного матрикса, что соотносится с репаративным ответом эпикардальных клеток, возникающим в острую фазу после ишемического повреждения сердца. Эти данные соотносятся с исследованиями других научных групп, которые показали, что гипоксия является важным регулятором фиброза в тканях. Воздействуя через HIF-1 сигнальный механизм, гипоксия вызывает активацию ММП, что ведет к потере межклеточных контактов на основе E-кадгерина, реорганизации цитоскелета и в конечном итоге приводит к образованию фибробластоподобных клеток [14–17]. Напротив, подавление экспрессии HIF-1 α препятствовало формированию фибробластов и уменьшало накопление ВКМ [18]. Помимо воздействия на ММП, гипоксия может стимулировать фиброгенез через транскрипционную регуляцию экспрессии генов, связанных с обменом ВКМ. Гипоксия индуцирует формирование коллагена I типа, снижает уровень матриксной металлопротеиназы 2 (MMP-2), увеличивает экспрессию ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1), тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 (TIMP-1) и фактора роста соединительной ткани (CTGF) через HIF-зависимые механизмы [19–21].

Заключение

В рамках данного исследования разработали и охарактеризовали клеточную 3D модель эпикарда, которая может реализовать клеточный ответ на воздействие гипоксического стимула и использоваться для изучения механизмов регуляции эпикардального микроокружения, тестирования лекарственных препаратов направленного действия.

Литература

- Mendis S., Graham I., Narula J. Addressing the global burden of cardiovascular diseases; need for scalable and sustainable frameworks. *Glob Heart*. 2022; 17 (1): 48. DOI: 10.5334/gh.1139. PMID: 36051329.
- Raziyeva K., Kim Y., Zharkinbekov Z., Temirkhanova K., Saparov A. Novel therapies for the treatment of cardiac fibrosis following myocardial infarction. *Biomedicines*. 2022; 10 (9): 2178. DOI: 10.3390/biomedicines10092178.
- Scridon A., Balan A.I. Targeting myocardial fibrosis- a magic pill in cardiovascular medicine? *Pharmaceutics*. 2022; 14 (8): 1599. DOI: 10.3390/pharmaceutics14081599. PMID: 36015225.
- Braitsch C.M., Kanisicak O., van Berlo J.H., Molkentin J.D., Yutzey K.E. Differential expression of embryonic epicardial progenitor markers and localization of cardiac fibrosis in adult ischemic injury and hypertensive heart disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2013; 65: 108–119. DOI: 10.1016/j.jmcc.2013.10.005. PMID: 24140724.
- Wei X., Hou Y., Long M., Jiang L., Du Y. Molecular mechanisms underlying the role of hypoxia-inducible factor-1 α in metabolic reprogramming in renal fibrosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13: 927329. DOI: 10.3389/fendo.2022.927329. PMID: 35957825.
- Steiner C.A., Cartwright I.M., Taylor C.T., Colgan S.P. Hypoxia-inducible factor as a bridge between healthy barrier function, wound healing, and fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2022; 323 (3): C866–C878. DOI: 10.1152/ajpcell.00227.2022. PMID: 35912990.
- van den Berg N.W.E., Kawasaki M., Fabrizi B., Nariswari F.A., Verduijn A.C., Neefs J., Wesselink R., Al-Shama R.F.M., van der Wal A.C., de Boer O.J., Aten J., Driessen A.H.G., Jongejan A., de Groot J.R. Epicardial and endothelial cell activation concurs with extracellular matrix remodeling in atrial fibrillation. *Clin Transl Med*. 2021; 11 (11): e558. DOI: 10.1002/ctm.2558. PMID: 34841686.
- Ismail A., Saliba Y., Fares N. Early development of cardiac fibrosis in young old-father offspring. *Oxid Med Cell Longev*. 2022; 2022: 8770136. DOI: 10.1155/2022/8770136. PMID: 36193084.
- Дергилев К.В., Комова А.В., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Парфенова Е.В. Эпикард как новая мишень для регенеративных технологий в кардиологии. *Гены и клетки*. 2020; 14 (2): 33–40. DOI: 10.23868/202004016 [Dergilev K.V., Komova A.V., Tsokolaeva Z.I., Beloglazova I.B., Parfyonova Ye.V. Epicardium as a new target for regenerative technologies in cardiology. *Genes & Cells/ Geny i Kletki*. 2020; 14 (2): 33–40. (In Russ.). DOI: 10.23868/202004016.
- Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Ратнер Е.И., Молокотина Ю.Д., Парфенова Е.В. Характеристика ангиогенных свойств c-kit+ клеток миокарда. *Гены и клетки*. 2018; 14 (3): 86–93. DOI: 10.23868/201811038. [Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Beloglazova I.B., Ratner E.I., Molokotina Yu.D., Parfyonova Ye.V. Angiogenic properties of myocardial c-kit+ cells. *Genes & Cells/ Geny i Kletki*. 2018; 14 (3): 86–93. (In Russ.). DOI: 10.23868/201811038].
- Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Beloglazova I.B., Ratner E.I., Parfenova E.V. Transforming growth factor beta (TGF- β 1) induces pro-reparative phenotypic changes in epicardial cells in mice. *Bull Exp Biol Med*. 2021; 170 (4): 565–570. DOI: 10.1007/s10517-021-05107-5. PMID: 33730328.
- Massimini M., Romanucci M., De Maria R., Della Salda L. Histological evaluation of long-term collagen type I culture. *Methods Mol Biol*. 2022; 2514: 95–105. DOI: 10.1007/978-1-0716-2403-6_10. PMID: 35771422.
- Maselli D., Matos R.S., Johnson R.D., Chiappini C., Camelliti P., Campagnolo P. Epicardial slices: an innovative 3D organotypic model to study epicardial cell physiology and activation. *NPJ Regen Med*. 2022; 7 (1): 7. DOI: 10.1038/s41536-021-00202-7. PMID: 35039552.
- Kalluri R., Neilson E.G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*. 2003; 112 (12): 1776–1784. DOI: 10.1172/JCI20530. PMID: 14679171.
- Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15 (1): 1–12. DOI: 10.1097/01.asn.0000106015.29070.e7. PMID: 14694152.
- Iwano M., Neilson E.G. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004; 13 (3): 279–284. DOI: 10.1097/00041552-200405000-00003. PMID: 15073485.
- Strutz F., Okada H., Lo C.W., Danoff T., Carone R.L., Tomaszewski J.E., Neilson E.G. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol*. 1995; 130 (2): 393–405. DOI: 10.1083/jcb.130.2.393. PMID: 7615639.
- Higgins D.F., Kimura K., Bernhardt W.M., Shrimanker n., Akai Y., Hohenstein B., Saito Y., Johnson R.S., Kretzler M., Cohen C.D., Eckardt K-U., Iwano M., Haase V.H. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2007; 117 (12): 3810–3820. DOI: 10.1172/JCI30487. PMID: 18037992.
- Orphanides C., Fine L.G., Norman J.T. Hypoxia stimulates proximal tubular cell matrix production via a TGF-beta1-independent mechanism. *Kidney Int*. 1997; 52 (3): 637–647. DOI: 10.1038/ki.1997.377. PMID: 9291182.
- Kietzmann T., Roth U., Jungermann K. Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood*. 1999; 94 (12): 4177–4185. DOI: 10.1182/blood.V94.12.4177.
- Higgins D.F., Biju M.P., Akai Y., Wutz A., Johnson R.S., Haase V.H. Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 287 (6): F1223–F1232. DOI: 10.1152/ajprenal.00245.2004. PMID: 15315937.

Поступила 25.11.2022

Принята в печать 20.12.2022