ЦИТОЛОГИЯ / CELL AND TISSUE BIOLOGY, 2026, том 68, № 2, с. 167—179

УДК 576.08:57.085.23:57.042
DOI: 10.7868/S3034606126020062

АКТИВАЦИЯ АУТОФАГИИ ЗАМЕДЛЯЕТ ДЕГРАДАЦИЮ РЕЦЕПТОРА ЭФР В МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Р. С. Каменцева[1, *], В. В. Кошеверова[1], М. В. Харченко[1], М. А. Котов[2], Е. С. Корнилова[1—3]

[1] Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Российская Федерация

[2] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого Санкт-Петербург, 195251, Российская Федерация

[3] Санкт-Петербургский государственный университет Санкт-Петербург, 199034, Российская Федерация

** E-mail: rkamentseva@incras.ru*

Аннотация. **Обоснование и цель.** Исследование механизмов эндоцитоза рецепторных тирозинкиназ, индуцированного его лигандами, часто связано с предварительным культивированием клеток в условиях сывороточного голодания для минимизации влияния сывороточных ростовых факторов, а также в связи с неоднократными заменами среды и промежуточными отмывками. На основании ранних исследований мы предполагаем, что в мезенхимных стромальных клетках (МСК) эти процедуры могут активировать аутофагию, имеющую общие с эндоцитозом компоненты везикулярного транспорта. Цель настоящей работы — определить, влияет ли активация аутофагии в МСК вследствие необходимых методических процедур на динамику эндоцитоза рецептора ЭФР (РЭФР). **Материал и методика.** В МСК оценивали количество $LC3^+$-везикул при культивировании в среде с пониженным содержанием сыворотки крови плодов коровы (СКПК). Затем в клетках с разным количеством аутофагосом исследовали динамику эндоцитоза РЭФР с помощью конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентно меченого лиганда, а также Вестерн-блот-анализа. **Результаты.** Показано, что значительное число аутофагосом выявляется в МСК через 3 ч после замены культуральной среды на среду с пониженным содержанием СКПК, а затем в течение 18 ч их количество снижается до контрольного уровня. При стимуляции эндоцитоза РЭФР в клетках с большим количеством $LC3^+$-везикул деградация ЭФР-рецепторных комплексов была медленнее, чем в контроле. **Заключение.** Методические процедуры, необходимые для стимуляции эндоцитоза РЭФР, активируют в МСК аутофагию. При этом наблюдается замедление динамики эндоцитоза РЭФР, что указывает на потенциальную конкуренцию между аутофагией и эндоцитозом в МСК.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, рецептор эпидермального фактора роста, аутофагия, эндоцитоз

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, МСК — мезенхимные стромальные клетки, СГ — сывороточное голодание, СКПК — сыворотка крови плодов коровы, ЭФР и РЭФР — эпидермальный фактор роста и рецептор ЭФР соответственно.

Финансирование работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-14-00335).

Соблюдение этических стандартов. Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. В работе использованы клетки линии HeLa, полученные из коллекции культур клеток позвоночных (центр коллективного пользования Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия), фмнансово поддержанной Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-683).

Ссылка для цитирования: Каменцева Р. С., Кошеверова В. В., Харченко М. В., Котов М. А., Корнилова Е. С. Активация аутофагии замедляет деградацию рецептора ЭФР в мезенхимных стромальных клетках человека. *Цитология / Cell and Tissue Biology.* 2026. Т. 68. № 2. С. 167—179. https://doi.org/10.7868/S3034606126020062

Поступила в редакцию: 02.12.2025
После доработки 10.12.2025
Принята к публикации 12.12.2025

© Каменцева Р. С., Кошеверова В. В., Харченко М. В., Котов М. А., Корнилова Е. С., 2026

ЦИТОЛОГИЯ / CELL AND TISSUE BIOLOGY, 2026, том 68, № 2, с. 167—179

DOI: 10.7868/S3034606126020062

Autophagy Activation Delays EGF Receptor Degradation in Human Mesenchymal Stromal Cells

R. S. Kamentseva[1, *], V. V. Kosheverova[1], M. V. Kharchenko[1], M. A. Kotov[2], E. S. Kornilova[1–3]

[1] Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, 194064, Russian Federation

[2] Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, 195251, Russian Federation

[3] Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034, Russian Federation

** E-mail: rkamentseva@incras.ru*

Abstract. **Objective:** The study of the mechanisms of receptor tyrosine kinase endocytosis induced by receptor binding to its ligands often involves preliminary cultivation of cells under serum-deprived conditions to minimize the influence of serum growth factors, as well as repeated medium changes and intermediate washes. Based on earlier studies, we hypothesize that in mesenchymal stromal cells (MSCs), these procedures may activate autophagy, which shares vesicular transport components with endocytosis. The aim of this study was to determine whether the activation of autophagy in MSCs due to the necessary methodological procedures affects the dynamics of EGF receptor (EGFR) endocytosis. **Methods:** The number of $LC3^+$-vesicles was assessed in MSCs cultured in medium with a reduced content of fetal bovine serum (FBS). Then, in cells with different quantities of autophagosomes, the dynamics of EGFR endocytosis were examined using confocal microscopy with a fluorescently labeled ligand, as well as Western blotting. **Results:** It has been shown that a significant number of autophagosomes are detected in MSCs 3 hours after replacing the culture medium with a medium with a reduced content of FBS, and then within 18 hours their number decreases to the control level. When endocytosis of EGFR was stimulated in cells with a high abundance of $LC3^+$-vesicles, the degradation of EGF-receptor complexes was slower than in the control. **Conclusion:** The procedures required to stimulate EGFR endocytosis activate autophagy in MSCs. However, a slowdown in EGFR endocytosis is observed, indicating potential competition between autophagy and endocytosis in MSCs.

Keywords: mesenchymal stromal cells, epidermal growth factor receptor, autophagy, endocytosis

Funding. This work was supported by the Russian Scientific Foundation (project ID: 23-14-00335).

Ethics approval and consent to participate: This work does not contain any studies involving human and animal subjects.

Conflict of interest. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the staff of the Collection of Vertebrate Cell Cultures Center for Collective Use, which has financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement no. 075-15-2021-683) for providing the HeLa cell line.

For citation: R. S. Kamentseva, V. V. Kosheverova, M. V. Kharchenko, M. A. Kotov, E. S. Kornilova. Autophagy activation delays EGF receptor degradation in human mesenchymal stromal cells. *Tsitologiya / Cell and Tiss. Biol.* 2026. Vol. 69. No. 2. P. 167—179. https://doi.org/10.7868/S3034606126020062

Received December 2, 2005
Revised December 10, 2025
Accepted December 12, 2025

© Kamentseva R. S., Kosheverova V. V., Kharchenko M. V., Kotov M. A., Kornilova E. S., 2026

Эндоцитоз рецепторных тирозинкиназ, в частности рецептора эпидермального фактора роста (РЭФР), является важным механизмом регуляции их функционирования. При связывании РЭФР с его лигандами происходит димеризация рецептора и активация его тирозинкиназного домена. Димеризованные лиганд-рецепторные комплексы быстро интернализуются и поступают в ранние эндосомы, где происходит сортировка: неактивные рецепторы (после диссоциации лиганда, например, TGF-α) через рециклирующие эндосомы возвращаются обратно на плазматическую мембрану, а активированные (в случае ЭФР) доставляются в поздние эндосомы и затем в лизосомы, где происходит их деградация (Kamentseva et al., 2020; Schultz et al., 2023). Таким образом, эндоцитоз позволяет контролировать количество РЭФР в клетке в целом и на поверхности плазматической мембраны, в частности. Кроме того, компоненты ряда стимулируемых рецептором ЭФР каскадов, такие как MAPK/ERK (Huang et al., 2011) и PI3K-AKT-mTOR (Yuan et al., 2024), локализуются на эндосомах и лизосомах, генерируя клеточные ответы в нужное время в нужном месте.

РЭФР и его лиганды являются классической моделью лиганд-рецепторного комплекса как в исследованиях внутриклеточной сигнализации, так и при изучении механизмов регуляции эндоцитозного пути. В таких экспериментах к клеткам добавляют лиганд, концентрация которого во многих случаях важна для стимуляции определенного ответа, поэтому используются специальные протоколы для того, чтобы минимизировать влияние ростовых факторов сыворотки, а также, если это возможно, синхронизировать прохождение клеток по циклу. Для этого клетки предварительно культивируют в условиях сывороточного голодания (СГ): за 12—24 ч до начала эксперимента культуральную среду заменяют на среду с пониженным содержанием сыворотки (0—1%). Во время эксперимента среду еще раз заменяют на экспериментальную, содержащую необходимые по условиям эксперимента вещества: лиганды, ингибиторы или другие модуляторы. Такая процедура рутинно используется разными научными группами при исследовании как сигнальных каскадов (Cheng et al., 2022; Negrón-Vega et al., 2022; Neves et al., 2022; Du et al., 2023; Takács et al., 2024; Pan et al., 2025), так и внутриклеточного транспорта РЭФР (Crotchett, Ceresa, 2021; Guo et al., 2022; Yang et al., 2022; Nyati et al., 2023; Wang et al., 2024; Xie et al., 2025). С применением таких схем получена основная масса данных по эндоцитозу и сигналингу РЭФР.

В то же время известно, что СГ используется, в частности, как один из способов стимуляции аутофагии в клетках (Huang et al., 2015; Robke et al., 2017). При культивировании в обычных условиях белки, содержащиеся в полной культуральной среде с сывороткой, поступают в клетку с помощью эндоцитоза, достигают лизосом, где перевариваются до аминокислот. Наличие аминокислот внутри лизосомы детектируется трансмембранными сенсорами, обеспечивающими стабилизацию на цитоплазматической стороне лизосомной мембраны супрамолекулярного комплекса с участием mTORC1 (Rabanal-Ruiz, Korolchuk, 2018). При голодании пул внутриэндолизосомных аминокислот истощается, что приводит к деактивации mTORC1 и активации комплекса ULK, который инициирует образование из мембран эндоплазматического ретикулума фагофора — чашеподобной структуры с двойной мембраной, из которой затем формируется аутофагосома. Далее мембрана фагофора укрупняется за счет слияния с $Atg9^{+}$-везикулами и в процессе роста рекрутирует различный груз. С самого начала формирования аутофагосомы внутренняя и внешняя мембраны обогащаются белком LC3-I (microtubule-associated protein 1 light chain 3), который ковалентно связывается с фосфатидилэтаноламином мембраны (липидированная форма обозначается как LC3-II) и часто используется в качестве маркера аутофагосом. LC3 участвует в связывании мишеней, подлежащих деградации. В конце концов фагофор замыкается, образуя аутофагосому. Подробно этот процесс описан в соответствующих обзорных статьях (см., например: Kench et al., 2023). Зрелые аутофагосомы сливаются с лизосомами, в результате чего их груз деградирует.

Многочисленные исследования показали, что целый ряд белков-регуляторов эндоцитозного пути, например Rab11, Vamp7, комплекс HOPS и др., участвует и в регуляции аутофагии (Lamb et al., 2013). Наиболее существенно, что ферментный комплекс фосфатидилинозитол-3-киназа класса III (PI3KC3), фосфорилирующая фосфатидилинозитол по третьему положению инозитольного кольца и, таким образом, создающая мембранную платформу для связывания большинства других регуляторных белков, узнающих модифицированный липид, работает как на эндоцитозном пути, так и на аутофагическом. PI3KC3 формирует комплексы с различным субъединичным составом: выделяют PI3KC3-CI, который участвует в аутофагии, и PI3KC3-CII, связанный с эндоцитозным путем. Коровую часть обоих комплексов составляют белки Vps34, Vps15 и Beclin1, а специфичность комплекса обеспечивают субъединицы ATG14 и UVRAG в составе PI3KC3-CI и PI3KC3-CII соответственно (Bilanges et al., 2019). Гипотетически при значительном увеличении потока аутофагии или эндоцитоза конкуренция за коровый комплекс PI3KC3 и другие белки везикулярного транспорта может приводить к изменению динамики этих процессов.

Ранее мы показали, что деградация РЭФР под действием ЭФР замедлена в мезенхимных стромальных клетках (МСК) человека (полученных из десквамированного эндометрия) по сравнению с линией трансформированных клеток HeLa в тех же условиях (Kamentseva et al., 2023). Эти данные были получены с использование упомянутого экспериментального протокола с предварительным культивированием клеток в среде с пониженным содержанием сыворотки. Учитывая возможную конкуренцию между эндоцитозным и аутофагическим путями, мы попытались понять, не связано ли это замедление с более высоким уровнем базальной или, возможно, стимулируемой одновременно с воздействием ЭФР аутофагии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные культуры. МСК были выделены из десквамированного эндометрия образцов менструальной крови и охарактеризованы в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия) Земелько и соавторами (Zemelko et al., 2012). Клетки карциномы шейки матки человека линии HeLa были получены из центра коллективного пользования (коллекция культур клеток позвоночных) Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). МСК культивировали в среде на основе ДМЕМ/F12, содержащей L-глутамин, HEPES и феноловый красный (Gibco™, Life Technologies Ltd., Великобритания), 10% сыворотки крови плодов коровы (СКПК, Biowest SAS, Франция) и раствор антибиотика/антимикотика (Capricorn Scientific GmbH, Германия). Использовали клетки 9—15-го пассажей.

Для культивирования клеток линии HeLa использовали ДМЕМ, содержащую L-глутамин, пируват натрия, 4.5 г/л D-глюкозы, феноловый красный (Gibco™, Life Technologies Ltd., Великобритания), 10% СКПК (Hyclone™, Cytiva, США) и раствор антибиотика/антимикотика (Capricorn Scientific GmbH, Германия). Все клетки культивировали при 37 °C в атмосфере 5% CO_2. Клетки выращивали в пластиковых чашках, либо на покровных стеклах размером 10×10 мм до конфлюэнтности 50—70% (в случае HeLa) или 80—100% (МСК).

В ходе экспериментов осуществляли замену культуральной среды на свежую того же состава, но с нормальным (10%) или сниженным (1%) содержанием СКПК согласно схемам (рис. 1*а*, 2*а*).

Стимуляцию эндоцитоза РЭФР проводили, добавляя ЭФР в конечной концентрации 10 нМ двумя способами: 1) заменой среды на свежую, содержащую ЭФР в указанной концентрации; 2) добавлением концентрированного раствора ЭФР непосредственно в среду клеток в чашки до конечной концентрации 10 нМ, минуя фактор замены среды.

Для флуоресцентного мечения ЭФР использовали биотинилированный ЭФР (Invitrogen™, Life Technologies Corp., США) и меченный флуорохромом стрептавидин-Cy3 (Invitrogen™, Life Technologies Corp., США), который добавляли в 10-кратном избытке относительно концентрации ЭФР во избежание связывания РЭФР с немеченным лигандом. Смесь предварительно инкубировали в течение 30 мин при постоянном перемешивании с помощью орбитального шейкера (Biosan SIA, Латвия) при комнатной температуре в темноте для образования комплексов биотин-стрептавидин.

При подготовке лизатов для белкового SDS-электрофореза и иммуноблотинга использовали немеченный ЭФР (Sigma-Aldrich Inc., США).

Иммунофлуоресцентный анализ. При изготовлении иммунофлуоресцентных препаратов для приготовления всех растворов, а также промывок использовали фосфатно-солевой буферный раствор (PBS, ООО «Биолот», Россия). В указанное время клетки, выращенные на покровных стеклах, промывали PBS, после чего фиксировали формалином (3.7%) в течение 15 мин. Затем клетки промывали 5 раз по 3 мин и для пермеабилизации инкубировали 15 мин в 0.5%-ном растворе Тритона X-100. После этого клетки вновь промывали 4 раза по 2 мин. Для блокировки неспецифического связывания антител клетки инкубировали 30 мин в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА). Все антитела разводили в 1%-ном БСА. В качестве первичных антител использовали поликлональные кроличьи антитела, узнающие белок LC3B (L10382; Molecular Probes™, Life Technologies Corp., США; разведение 1:1000). С первичными антителами клетки инкубировали при 4 °C в течение ночи с последующей серией отмывок 4 раза по 2 мин. Со вторичными антителами козы, узнающими иммуноглобулины кролика, конъюгированными с флуорофором Alexa Fluor 488 (A11008; Invitrogen™, Life Technologies Corp., США; разведение 1:200), инкубировали в течение 1 ч. Затем стекла промывали 4 раза по 2 мин. Препараты заключали в глицериновую заливку, содержащую 0.2 М DABCO (1,4-diazabicyclo(2.2.2) octane (Sigma-Aldrich Inc., США).

Изображения получали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FluoView3000 (Olympus Corp., Япония) с объективом 40×/1.3. Для возбуждения флуорофоров Alexa488 и Cy3 использовали лазеры с длиной волны 488 и 561 соответственно. В пределах одной серии препаратов настройки микроскопа поддерживали неизменными. Снимали не менее трех полей зрения с суммарным числом клеток не менее 10—15. Для каждого поля зрения получали серию оптических срезов по всей высоте клеток с шагом 0.5 мкм по оси Z. Для оценки количества везикул, а также их колокализации полученные изображения сегментировали в программе Ilastik версии 1.4.0, основанной на контролируемом машинном обучении (Berg et al., 2019). На сегментированных сериях оптических срезов везикулы подсчитывали в 3D-объеме клетки с помощью плагина 3D Objects Counter (Cordelières and Zhang, 2020) для Fiji (ImageJ версии 1.53h) (Schneider et al., 2012). Для оценки колокализации определяли долю везикул, выделенных с помощью 3D Objects Counter в канале ЭФР-Cy3, перекрывающихся с великулами в канале LC3.

SDS-электрофорез и иммуноблотинг. Для приготовления белковых лизатов клетки промывали холодным PBS, а затем лизировали в буфере RIPA (1% Тритона X-100, 20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭГТА, 1 мМ ЭДТА), содержащем смесь ингибиторов протеаз и фосфатаз (Halt™ protease and phosphatase inhibitor single-use cocktail (100×); 78442; Pierce Biotechnology Inc., США) и 1 мМ ортованадата натрия. Лизат гомогенизировали, пропуская 10—15 раз через шприц с иглой (27G), после чего осаждали дебрис центрифугированием в течение 5 мин при 1500 *g*. Затем супернатант смешивали с буфером Лэммли для проб и прогревали в течение 5 мин при 99 °C. Концентрацию белка оценивали

по методу Бредфорда с использованием планшетного спектрофотометра Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Пробы наносили из расчета 6 мкг белка на дорожку. Разделение белков проводили в полиакриламидном геле в модификации Лэммли (Laemmli, 1970) при постоянном напряжении.

Для переноса белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану 0.45 мкм (Bio-Rad Laboratories Inc., США) использовали трансблоттер Pierce™ Power System (22830; Thermo Fisher Scientific Inc., США). Для визуализации тотального белка для контроля нагрузки использовали краситель Ponceau S (Sigma-Aldrich Inc., США). Затем мембрану отмывали буфером TBST, содержащим 0.1% Tween-20 (20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7.6), и блокировали в течение 1 ч в 5%-ном БСА, растворенном в TBST. Далее белки инкубировали в течение ночи при 4 °C с первичными поликлональными антителами кролика против цитоплазматического домена рецептора ЭФР человека (4267; Cell Signaling Technology Inc., США; 1:1000), разведенными в 5%-ном растворе БСА на TBST. Затем мембрану промывали 5 раз по 4 мин и инкубировали в течение 1 ч с вторичными антителами козы против иммуноглобулинов кролика, коньюгированными с пероксидазой хрена (7076; Cell Signaling Technology Inc., США; 1:2000). После промывок 5 раз по 4 мин хемилюминисценцию визуализировали с использованием субстрата ECL SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34096; Pierce Biotechnology Inc., США) и системы документации гелей ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc., США).

Анализ данных. Эксперименты повторяли трижды, на иллюстрациях представлены результаты типичного (повторяющегося) эксперимента. Анализ данных производили с использованием языка программирования R (R Core Team, 2023; https://www.r-project.org/ (accessed 07.24.2025), а также Microsoft Excel 2007.

Наличие статистических различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. На рисунках представлены средние значения и стандартная ошибка среднего. Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы оценить интенсивность аутофагического потока, который может возникать при СГ в результате смены среды в экспериментах по стимуляции интернализации РЭФР, мы имитировали необходимые методические процедуры, сопровождающие стандартный эксперимент, но в отсутствие лиганда (рис. 1*а*). Клетки культивировали в среде, содержащей 10% СКПК. В контрольной группе клеток культуральную среду заменяли на свежую среду с таким же содержанием СКПК (К), а в экспериментальной — на среду с 1% СКПК, т. е. с условием СГ, и обе группы культивировали в течение приблизительно 18 ч. На следующий день экспериментальной группе СГ вновь заменяли среду на содержащую 1% СКПК и культивировали в течение 3 ч, имитируя условия и длительность эксперимента по анализу эффектов ЭФР.

В течение этого периода в клетках разных типов интернализованные с помощью рецептор-опосредованного

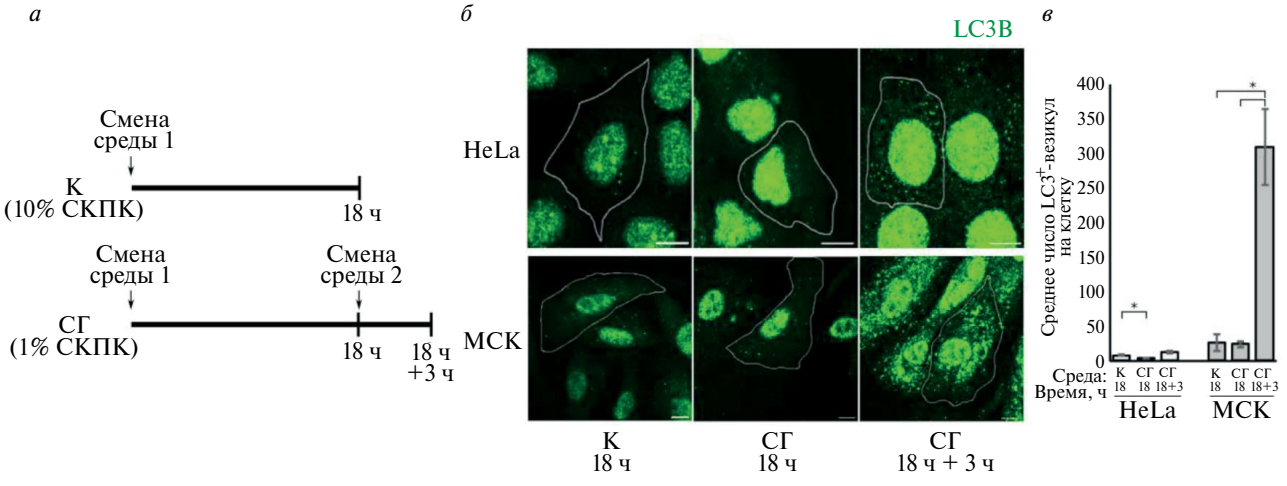


Рис. 1. Изменение числа LC3$^+$-везикул в цитоплазме клеток HeLa и МСК при сывороточном голодании (СГ) и смене среды. *а* — Схема эксперимента: в контроле (К, верхняя прямая) производили смену (1) полной среды, содержащей 10% СКПК и через 18 ч фиксировали; в экспериментальной группе (нижняя прямая) клетки подвергали СГ путем замены среды (1) на среду с пониженным содержанием СКПК (1%); через 18 ч часть клеток фиксировали, другой части меняли среду (2) повторно на ту же (СГ) и культивировали еще 3 ч, а далее тоже фиксировали. *б* — Иммунофлуоресцентное окрашивание фиксированных клеток антителами, специфически распознающих LC3B; представлены проекции максимальной яркости, масштабная шкала: 10 мкм. *в* — Зависимость числа LC3$^+$-везикул на клетку от смены среды [представлены средние значения и их стандартные ошибки; различия достоверны при $P < 0.05$ (*)]

эндоцитоза грузы, в том числе рецептор ЭФР, как правило, доставляются в лизосомы. Количество $LC3^+$-везикул (аутофагосом) анализировали с помощью иммунофлуоресцентного мечения (рис. 1*б*). Фактически в этом эксперименте выявляли влияние замены среды (на полную или бессывороточную) на интенсивность формирования аутофагосом.

На изображениях клеток HeLa и МСК, зафиксированных и маркированных флуоресцентно-окрашенными антителами против LC3, через 18 ч культивирования в среде с 10% СКПК (рис. 2, К) видно, что антиген выявляется в ядрах, а также детектируется в единичных точечных структурах в цитоплазме. Данные антитела распознают как LC3B-I, так и LC3B-II, поэтому, как правило, сигнал, соответствующий аутофагосомам, выделяют морфологически — по локализации на точечных структурах в цитоплазме клеток. Ядерная локализация отмечается для обеих форм белка (Huang et al., 2015; Shim et al., 2020), но роль ядерного LC3 не до конца изучена. Однако для целей нашего исследования важен именно LC3, ассоциированный с везикулами, поскольку именно образование последних может конкурировать с формированием и созреванием эндосом.

В контрольных клетках оказалось в среднем 8 ± 1 $LC3^+$-везикул на 1 клетку HeLa и 27 ± 12 на 1 МСК. После СГ в течение 18 ч (в группе СГ) число $LC3^+$-везикул значительно не увеличивалось (4 ± 0.8 на 1 клетку в HeLa, $P = 0.000005$; 24 ± 4 — в МСК, $P = 0.2$).

Через 3 ч после второй смены среды, имитирующей экспериментальное добавление лиганда, число $LC3^+$-везикул в HeLa не изменялось (13 ± 1 на 1 клетку, $P = 0.8$). В МСК, однако, через 3 ч после второй смены среды мы наблюдали увеличение числа аутофагосом практически на порядок (309 ± 54 на 1 клетку; $P = 0.0001$ по сравнению с контролем и $P = 0.00005$ по сравнению с СГ). Стоит также отметить, что среди МСК отмечается значительная гетерогенность по содержанию образующихся аутофагосом как между партиями клеток, используемых в разных экспериментах, так и среди одиночных клеток в пределах одной чашки. Так, в контрольных клетках число аутофагосом было от 1 до 122 на клетку, а при стимуляции аутофагии — от 1 до 648. При этом доля клеток с большим количеством аутофагосом варьирует от выборки к выборке. Значительную гетерогенность МСК в пределах одной культуры по самым разным признакам неоднократно отмечали и другие исследователи (Li et al., 2016; Poon et al., 2019; Sun et al., 2020; Tyurin-Kuzmin et al., 2020; Wang et al., 2021; Kulebyakin et al., 2022).

Таким образом, после СГ в течение 18 ч число $LC3^+$-везикул невелико. Повторная замена среды в смоделированных условиях типового эксперимента для исследования сигнализации и транспорта РЭФР стимулирует образование аутофагосом в МСК, но не в HeLa.

В работах, посвященных активации аутофагии под влиянием голода (Mura et al., 2014) или других факторов, таких как токсины (Korsnes et al., 2016) или гипоксия (Li et al., 2018), уровень аутофагии часто оценивают через 24—72 ч после воздействия. Но важно понимать, каким именно образом стимулировали и детектировали аутофагию в конкретном исследовании. При исследовании динамики аутофагии разными авторами показано, что без дополнительных воздействий при СГ аутофагосомы формируются быстро, в течение 1—2 ч, а затем их количество уменьшается вследствие слияния с лизосомами и деградацией груза (Köchl et al., 2006; Huang et al., 2015; Pantoom et al., 2020). В некоторых клетках скорость образования и деградации аутофагосом может отличаться (Chang et al., 2018). Однако распространена оценка степени аутофагии с использованием ингибиторов лизосомной деградации, таких как хлорохин или бафиломицин A1, которые приводят к накоплению непереваренных аутофагосом на более поздних сроках (более 6 ч) (Follo et al., 2016; Bresciani et al., 2018).

Таким образом, наблюдаемая нами в МСК картина соответствует динамике аутофагии, описанной для условий СГ без применения ингибиторов лизосомной активности: за 18 ч пребывания в среде с низким содержанием сыворотки волна аутофагии успевает закончиться, т. е. большая часть образовавшихся аутофагосом подвергается деградации. При повторной смене среды запускается новый цикл аутофагии, в котором в течение 3 ч аутофагосомы успевают сформироваться, но не деградировать. Стимуляция аутофагии при смене среды с низким содержанием сыворотки на такую же позволяет предполагать, что причиной новой волны является не столько голодание, сколько сам процесс смены среды, сопровождаемый механическим, осмотическим или окислительным стрессом (Kudriaeva et al., 2020). Активация аутофагии под действием напряжения сдвига (англ. shear stres), который может возникать из-за движения жидкости при смене культуральной среды, описана для эндотелиальных клеток (Ding et al., 2015) и клеток кишечного эпителия (Kim et al., 2017).

Основываясь на описанных результатах, мы исследовали влияние аутофагии, возникающей в МСК при повторной смене среды, на динамику эндоцитоза РЭФР под действием ЭФР (рис. 2—4). Для этого эндоцитоз (Э) РЭФР стимулировали путем добавления ЭФР, меченного флуорохромом Cy3 (ЭФР-Cy3), либо одновременно со стимуляцией аутофагии (А) при смене среды (А + Э), либо через 3 ч после смены среды, когда в МСК уже сформировано значительное число аутофагосом (последовательная стимуляция, А → Э). Схема эксперимента представлена на рис. 2*а*. В контрольной группе клеток, предварительно культивировавшихся в течение 18 ч в среде с 10% СКПК, производили ее смену на такую же и через 3 ч добавляли ЭФР-Cy3 путем введения непосредственно в чашку небольшого объема концентрированного раствора лиганда без смены среды (рис. 2*а*). При последовательной стимуляции аутофагии и эндоцитоза (А → Э, рис. 2*а*) после длительного

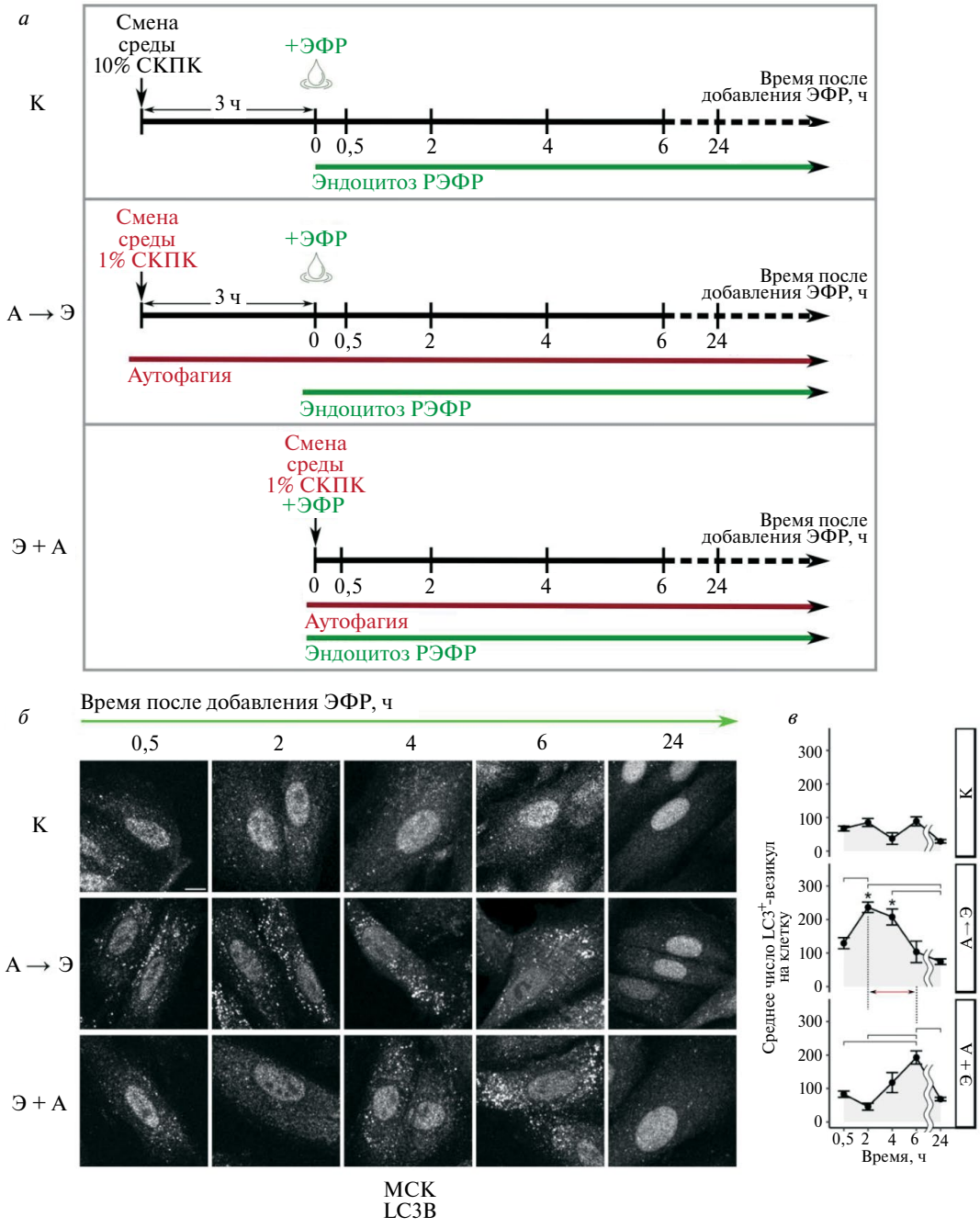


Рис. 2. Изменение числа LC3$^+$-везикул в МСК при последовательной или одновременной стимуляции аутофагии (А) и эндоцитоза (Э). *а* — Схема эксперимента: в контроле (К) клетки предварительно культивировали в полной среде (10% СКПК) в течение 18 ч, в то время как две экспериментальные группы подвергали СГ (см. рис. 1): в первой группе (А → Э) производили вторую смену среды для стимуляции аутофагии в течение 3 ч (параллельно в свежей среде с 10% СКПК культивировали контрольные клетки тоже 3 ч) и далее для стимуляции эндоцитоза рецептора ЭФР (РЭФР) прямо в чашку добавляли концентрированный раствор ЭФР-Cy3 до конечной концентрации 10 нМ; во второй группе эндоцитоз и аутофагию (Э + А) стимулировали одновременно со второй сменой среды, добавляя ЭФР-Cy3 в составе свежей среды с пониженным содержанием СКПК (1%); время отсчитывали с момента добавления ЭФР (0—24 ч); далее клетки фиксировали. *б* — Иммунофлуоресцентное мечение фиксированных клеток антителами, специфически распознающими LC3B (конфокальная микроскопия); представлены проекции максимальной яркости, масштабная шкала: 10 мкм. *в* — Зависимость числа LC3$^+$-везикул на клетку от смены среды; представлены средние значения и их стандартные ошибки; различия относительно контроля в те же сроки (*) и между временными точками в пределах группы (квадратные скобки) достоверны при $P < 0.05$; красной стрелкой указано смещение момента времени наибольшего числа аутофагосом: на 4 ч в группе одновременной стимуляции (Э + А) относительно группы последовательной (А → Э) стимуляции

СГ меняли среду на такую же (1 % СКПК) для активации аутофагии и через 3 ч также добавляли ЭФР-Cy3 в чашку без смены среды. Таким образом, в этой группе эндоцитоз РЭФР стимулировали в то время, когда формирование аутофагосом достигало пика, т. е. МСК предварительно «нагружали» аутофагосомами (А → Э). Для одновременной стимуляции аутофагии и эндоцитоза (А + Э, рис. 2*а*) после СГ добавляли ЭФР-Cy3 одновременно со сменой среды на среду с 1 % СКПК. В указанное время после стимуляции эндоцитоза РЭФР клетки фиксировали, красили флуоресцентно мечеными антителами против LC3B и оценивали количество $LC3^+$- (рис. 2*б*, 4*а*) и $ЭФР^+$- (рис. 3*а*, 4*а*) везикул на микрофотографиях.

В контроле (рис. 2*б*, *в*: К) число $LC3^+$-везикул в расчете на клетку варьировало (в силу гетерогенности МСК, описанной выше) и было в среднем меньше 100. В группе клеток, в которой эндоцитоз стимулировали на пике аутофагии (рис 2*б, в*: А → Э), число и яркость $LC3^+$-везикул, как и ожидалось, были максимальны через 0.5—2 ч после добавления ЭФР (т. е. через 3.5—5 ч после смены среды) и далее постепенно снижались до базального уровня в течение 4—24 ч после добавления ЭФР. При стимуляции эндоцитоза одновременно с аутофагией (А + Э), $LC3^+$-везикулы появлялись в значительных количествах через 4—6 ч после добавления ЭФР. Таким образом, формирование аутофагосом в МСК происходило приблизительно в одно и то же время после смены среды с низким содержанием СКПК практически вне зависимости от времени стимуляции эндоцитоза ЭФР.

Аналогично мы определили динамику изменения числа эндосом, меченных ЭФР-Cy3 (рис. 3). В наших предыдуших работах (Salova et al., 2025) было показано, что флуоресцентно меченный ЭФР практически полностью колокализуется с РЭФР вплоть до попадания в лизосомы как в клетках линии HeLa, так и в МСК. Таким образом, можно быть уверенным, что эндосомы, нагруженные ЭФР-Cy3, несут активный ЭФР-рецепторный комплекс.

После добавления ЭФР-Cy3 во всех группах клеток в течение 30 мин формируется множество $ЭФР^+$-эндосом: 152 ± 13 (рис. 3*а*, *б*: К), 106 ± 7 (рис. 3*а*, *б*: А → Э) и 122 ± 10 (рис. 3*а*, *б*: А + Э). В ходе эндоцитоза происходит снижение количества эндосом за счет двух процессов: гомотипического слияния эндосом на ранних стадиях эндоцитоза, а также деградации лиганд-рецепторных комплексов благодаря слиянию с лизосомами на поздних стадиях (Kamentseva et al., 2020). В контрольных МСК с минимальным числом $LC3^+$-везикул $ЭФР^+$-эндосомы быстро формируются и уже через 4 ч после добавления лиганда их число уменьшается в несколько раз (до 18 ± 4 на клетку), что подтверждается и данными статистической обработки 10—15 клеток на каждую временную точку (рис. 3*б*, $P < 0.05$).

В клетках, предварительно нагруженных аутофагосомами (рис. 3*а*, *б*: А → Э), снижение количества $ЭФР^+$-везикул было замедлено и через 6 ч в среднем на клетку детектировали 46 ± 8 эндосом. В третьей группе клеток, где аутофагия и эндоцитоз РЭФР стимулировались одновременно (рис. 3*а*, *б*: А + Э), изменение числа эндосом оказалось минимальным и уменьшалось в среднем со 122 ± 10 до 88 ± 13 на клетку за 6 ч. Такая же тенденция проявлялась и при оценке количества тотального рецепторного белка методом иммуноблотинга (рис. 3*в*): даже через 24 ч уровень РЭФР был сравним с таковым до стимуляции эндоцитоза в клетках второй группы, тогда как в клетках первой группы его количество заметно уменьшалось. Эти результаты предполагают существование конкуренции между эндоцитозным и аутофагическим путями.

Это предположение подкрепляется также анализом колокализации ЭФР-Cy3 и LC3, которая практически отсутствует в контрольных МСК и при одновременной стимуляции аутофагии и эндоцитоза (А + Э), и лишь в ситуации стимуляции эндоцитоза при максимальной активации аутофагического потока (А → Э) достигает величины 25 % (рис. 4*а, б*). Однако и эта величина близка к уровню случайной колокализации, наблюдаемой в ограниченном пространстве цитоплазмы, содержащей большое количество органелл, вследствие ограничений разрешения конфокальной микроскопии (около 200 нм по осям *X* и *Y*, 500 нм — по оси *Z*) (Kalaidzidis et al., 2015; Xu et al., 2016).

Таким образом, мы показали, что в экспериментах, сопряженных с неоднократными сменами среды, в клетках МСК может образовываться большое количество $LC3^+$-аутофагосом. Этот процесс может быть связан не только с условиями СГ, но и с механическим стрессом при физической замене среды в чашке. Более того, МСК гораздо более чувствительны к смене среды, чем HeLa, что необходимо учитывать при планировании экспериментов, предполагающих смену культуральной среды. Наши результаты говорят о том, что активация аутофагии оказывает сильный негативный эффект на динамику пути канонического рецептор-опосредованного эндоцитоза. Низкая степень колокализации эндосом и аутофагосом дополнительно указывает на то, что в данном случае эндоцитоз и аутофагия являются конкурирующими путями везикулярного транспорта даже на ранних этапах, до доставки в лизосомы.

Оценить колокализацию аутофагосом и эндосом после слияния с лизосомами затруднительно вследствие лизосомной деградации как эндосомальных грузов, так и маркеров аутофагосом. Однако исследуя влияние ингибитора вакуолярной протонной помпы бафиломицина A1, приводящего к подавлению закисления эндосом, мы показали, что снятие градиента величины pH в эндолизосомах замедляет продвижение ЭФР-рецепторных комплексов по компартментам эндоцитозного пути как в HeLa, так и в МСК (Salova et al., 2025). Но если в первом случае в контроле наблюдается эффективный переход ЭФР-рецепторных комплексов из поздних $CD63^+$-эндосом в $Lamp1^+$-лизосомы в течение 30—60

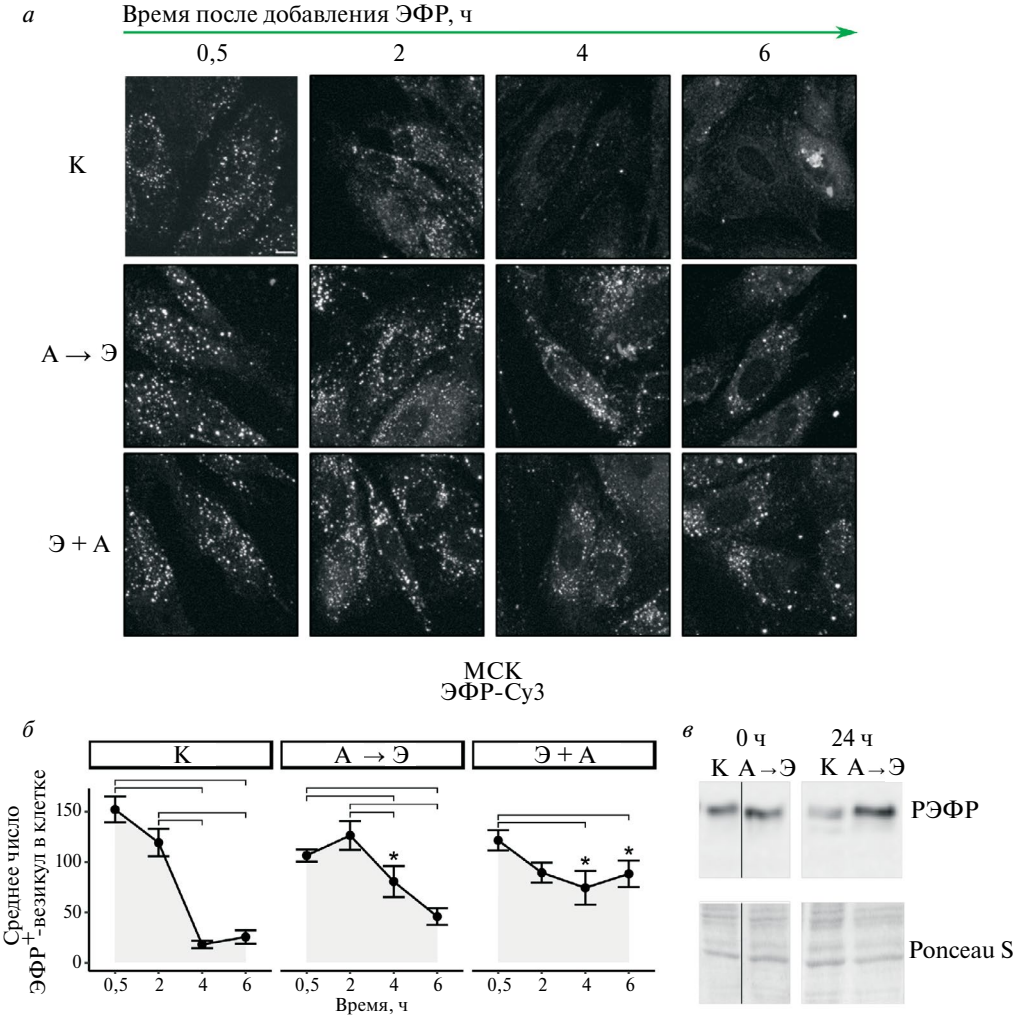


Рис. 3. Изменение числа везикул, содержащих ЭФР, и количества РЭФР в МСК при последовательной (А → Э) или одновременной (А + Э) стимуляции аутофагии и эндоцитоза. *а* — Распределение числа эндосом, содержащих ЭФР, конъюгированный с флуоресцентной меткой (ЭФР-Cy3); конфокальная микроскопия; представлены проекции максимальной яркости, масштабная шкала: 10 мкм. *б* — Среднее число и его стандартная ошибка $ЭФР^+$-эндосом в соответствующих группах клеток; различия относительно контроля в те же сроки (*) и между временными точками в пределах группы (скобки) достоверны при $P < 0.05$. *в* — Электрофоретическое разделение клеточного лизата МСК после стимуляции эндоцитоза ЭФР: вверху — иммуноблот с использованием антител, специфически узнающих РЭФР, внизу — окрашивание белков на мембране с помощью Ponceau S для нормализации нагрузки по общему белку. Схема эксперимента и условные обозначения соответствуют рис. 2

мин, и этот переход замедляется, но не блокируется бафиломицином А1, то в МСК накапливающиеся в поздних эндосомах РЭФР практически не доставляются в лизосомы, по крайней мере в течение следующих 2—3 ч даже в контроле, что свидетельствует о подавлении процесса взаимодействия поздних эндосом с лизосомами в этих клетках.

Таким образом, в ходе необходимых при стимуляции эндоцитоза РЭФР методических процедур, связанных с культивированием клеток в среде с пониженным содержанием сыворотки, в МСК, в отличие от HeLa, наблюдается образование большого числа $LC3^+$-везикул, что свидетельствует об активации аутофагии. В таких условиях наблюдается замедление динамики эндоцитоза и деградации РЭФР по сравнению с контрольными МСК с минимальным числом $LC3^+$-везикул. Это может быть связано с конкуренцией между аутофагией и эндоцитозом при одновременном протекании этих процессов. Учитывая такую возможность, при исследовании эндоцитоза следует контролировать число аутофагосом в конкретных условиях и клеточных культурах.

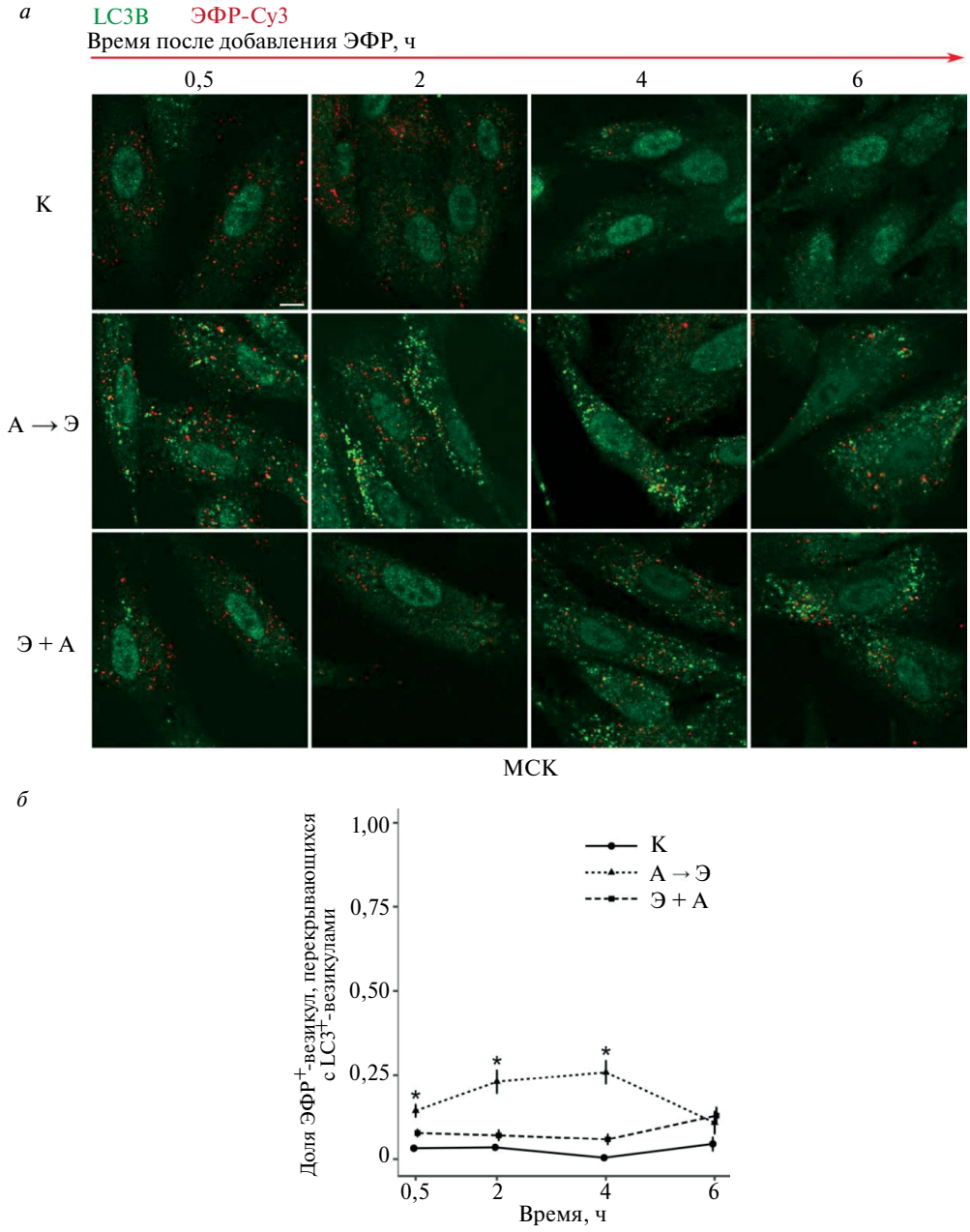


Рис. 4. Степень колокализации везикул, содержащих ЭФР (красный цвет) и LC3 (зеленый цвет) в МСК при последовательной (А → Э) или одновременной (А + Э) стимуляции аутофагии и эндоцитоза. *а* — Иммунофлуоресцентное мечение МСК после добавления ЭФР, конъюгированного с флуоресцентной меткой (ЭФР-Cy3, красный) и антител, специфически распознающих LC3B (зеленый); представлены оптические срезы толщиной 0.5 мкм в базальной части клеток, масштабная шкала 10 мкм. *б* — Доля $ЭФР^+$-эндосом (отн. ед.), перекрывающихся с $LC3^+$-везикулами; даны средние значения и их ошибки; различия относительно контроля в те же сроки достоверны при $P < 0.05$ (*), другие различия недостоверны. Схема эксперимента и условные обозначения соответствуют рис. 2

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Berg S., Kutra D., Kroeger T., Straehle C. N., Kausler B. X., Haubold C., Schiegg M., Ales J., Beie T., Rudy M., Eren K., Cervantes J. I., Xu B., Beuttenmueller F., Wolny A., et al.,* 2019. Ilastik: interactive machine learning for (Bio)image analysis. Nat. Methods. V. 16. P. 1226. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0582-9

2. *Bilanges B., Poso Y., Vanhaesebroeck B.* 2019. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. V. 20. P. 515.
https://doi.org/10.1038/s41580-019-0129-z
3. *Bresciani A., Spiezia M. C., Boggio R., Cariulo C., Nordheim A., Altobelli R., Kuhlbrodt K., Dominguez C., Munoz-Sanjuan I., Wityak J., Fodale V., Marchionini D. M., Weiss A.* 2018. Quantifying autophagy using novel LC3B and p62 TR-FRET assays. PLoS One. V. 13. Art. ID: e0194423.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194423
4. *Chang L., Chai X., Chen P., Cao J., Xie H., Zhu J.* 2018. miR-181b-5p suppresses starvation-induced cardiomyocyte autophagy by targeting Hspa5. Int. J. Mol. Med. V. 43. P. 143.
https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3988
5. *Cheng J.-C., Han X., Meng Q., Guo Y., Liu B., Song T., Jia Y., Fang L., Sun Y.-P.* 2022. HB-EGF upregulates StAR expression and stimulates progesterone production through ERK1/2 signaling in human granulosa-lutein cells. Cell Commun. Signal. V. 20. P. 166.
https://doi.org/10.1186/s12964-022-00983-4
6. *Cordelières F. P., Zhang C.* 2020. 3D Quantitative colocalisation analysis. In: Miura K., Sladoje N. (Eds.) Bioimage Data Analysis Workflows, Learning Materials in Biosciences. Springer, Cham. P. 33.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-22386-1_3
7. *Crotchett B. L.M., Ceresa B. P.* 2021. Knockout of c-Cbl slows EGFR endocytic trafficking and enhances EGFR signaling despite incompletely blocking receptor ubiquitylation. Pharmacol. Res. Perspect. V. 9. Art. ID: e00756.
https://doi.org/10.1002/prp2.756
8. *Ding Z., Liu S., Deng X., Fan Y., Wang X., Mehta J. L.* 2015. Hemodynamic shear stress modulates endothelial cell autophagy: Role of LOX-1. Intern. J. Cardiol. V. 184. P. 86.
https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.01.065
9. *Du L., Su Z., Wang S., Meng Y., Xiao F., Xu D., Li X., Qian X., Lee S. B., Lee J., Lu Z., Lyu J.* 2023. EGFR-induced and c-Src-mediated CD47 phosphorylation inhibits TRIM21-dependent polyubiquitylation and degradation of CD47 to promote tumor immune evasion. Adv. Sci. V. 10. Art. ID: 2206380.
https://doi.org/10.1002/advs.202206380
10. *Follo C., Barbone D., Richards W. G., Bueno R., Broaddus V. C.* 2016. Autophagy initiation correlates with the autophagic flux in 3D models of mesothelioma and with patient outcome. Autophagy. V. 12. P. 1180.
https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1173799
11. *Guo H., Wang J., Ren S., Zheng L.-F., Zhuang Y.-X., Li D.-L., Sun H.-H., Liu L.-Y., Xie C., Wu Y.-Y., Wang H.-R., Deng X., Li P., Zhao T.-J.* 2022. Targeting EGFR-dependent tumors by disrupting an ARF6-mediated sorting system. Nat. Commun. V. 13. Art. ID: 6004.
https://doi.org/10.1038/s41467-022-33788-7
12. *Huang L., Pan C. Q., Li B., Tucker-Kellogg L., Tidor B., Chen Y., Low B. C.* 2011. Simulating EGFR-ERK signaling control by scaffold proteins KSR and MP1 reveals differential ligand-sensitivity co-regulated by Cbl-CIN85 and endophilin. PLoS One. V. 6. Art. ID: e22933.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022933
13. *Huang R., Xu Y., Wan W., Shou X., Qian J., You Z., Liu B., Chang C., Zhou T., Lippincott-Schwartz J., Liu W.* 2015. Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. Mol. Cell. V. 57. P. 456.
https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.013
14. *Kalaidzidis Y., Kalaidzidis I., Zerial M.* 2015. A probabilistic method to quantify the colocalization of markers on intracellular vesicular structures visualized by light microscopy. AIP Conf. Proc. V. 1641. P. 580.
https://doi.org/10.1063/1.4906025
15. *Kamentseva R., Kosheverova V., Kharchenko M., Zlobina M., Salova A., Belyaeva T., Nikolsky N., Kornilova E.* 2020. Functional cycle of EEA1-positive early endosome: Direct evidence for pre-existing compartment of degradative pathway. PLoS One. V. 15. Art. ID: e0232532.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232532
16. *Kamentseva R. S., Kharchenko M. V., Gabdrahmanova G. V., Kotov M. A., Kosheverova V. V., Kornilova E. S.* 2023. EGF, TGF-α and amphiregulin differently regulate endometrium-derived mesenchymal stromal/stem cells. IJMS. V. 24. Art. ID: 13408.
https://doi.org/10.3390/ijms241713408
17. *Kench U. S., Sologova S. S., Prasolov V. S., Spirin P. V.* 2023. The role of autophagy in the development of pathological conditions of the body. Acta Naturae. V. 15. P. 37.
https://doi.org/10.32607/actanaturae.23838

18. *Kim S. W., Ehrman J., Ahn M.-R., Kondo J., Lopez A. A. M., Oh Y. S., Kim X. H., Crawley S. W., Goldenring J. R., Tyska M. J., Rericha E. C., Lau K. S.* 2017. Shear stress induces noncanonical autophagy in intestinal epithelial monolayers. MBoC. V. 28. P. 3043.
https://doi.org/10.1091/mbc.e17-01-0021

19. *Köchl R., Hu X. W., Chan E. Y. W., Tooze S. A.* 2006. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. Traffic. V. 7. P. 129.
https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00368.x

20. *Korsnes M. S., Kolstad H., Kleiveland C. R., Korsnes R., Ørmen E.* 2016. Autophagic activity in BC3H1 cells exposed to yessotoxin. Toxicol. In Vitro. V. 32. P. 166.
https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.12.010

21. *Kudriaeva A., Sokolov A., Belogurov A.* 2020. Stochastics of degradation: the autophagic-lysosomal system of the cell. Acta Naturae. V. 12. P. 18.
https://doi.org/10.32607/actanaturae.10936

22. *Kulebyakin K., Tyurin-Kuzmin P., Sozaeva L., Voloshin N., Nikolaev M., Chechekhin V., Vigovskiy M., Sysoeva V., Korchagina E., Naida D., Vorontsova M.* 2022. Dynamic balance between PTH1R-dependent signal cascades determines its pro- or anti-osteogenic effects on MSC. Cells. V. 11. Art. ID: 3519.
https://doi.org/10.3390/cells11213519

23. *Laemmli U. K.* 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. V. 227. P. 680.
https://doi.org/10.1038/227680a0

24. *Lamb C. A., Dooley H. C., Tooze S. A.* 2013. Endocytosis and autophagy: shared machinery for degradation. BioEssays. V. 35. P. 34.
https://doi.org/10.1002/bies.201200130

25. *Li B., Menzel U., Loebel C., Schmal H., Alini M., Stoddart M. J.* 2016. Monitoring live human mesenchymal stromal cell differentiation and subsequent selection using fluorescent RNA-based probes. Sci. Rep. V. 6. Art. ID: 26014.
https://doi.org/10.1038/srep26014

26. *Li W., Li S., Li Y., Lin X., Hu Y., Meng T., Wu B., He R., Feng D.* 2018. Immunofluorescence staining protocols for major autophagy proteins including LC3, P62, and ULK1 in mammalian cells in response to normoxia and hypoxia. In: Turksen K. (Ed.) Autophagy in differentiation and tissue maintenance. Meth. Mol. Biol. Springer New York, NY, P. 175.
https://doi.org/10.1007/7651_2018_124

27. *Mura E., Lepore G., Zedda M.* 2014. Sheep primary astrocytes under starvation conditions express higher amount of LC3 II autophagy marker than neurons. Arch. Ital. Biol. V. 152. P. 47.
https://doi.org/10.12871/00039829201415

28. *Negrón-Vega L., Cora E. M., Pérez-Torres M., Tang S.-C., Maihle N. J., Ryu J. S.* 2022. Expression of EGFR isoform D is regulated by HER receptor activators in breast cancer cells. Biochem. Biophys. Rep. V. 31. Art. ID: 101326.
https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101326

29. *Neves M., Marolda V., Mayor F., Penela P.* 2022. Crosstalk between CXCR4/ACKR3 and EGFR signaling in breast cancer cells. IJMS. V. 23. Art. ID: 11887.
https://doi.org/10.3390/ijms231911887

30. *Nyati S., Young G., Speers C., Nyati M. K., Rehemtulla A.* 2023. Budding uninhibited by benzimidazoles-1 (BUB1) regulates EGFR signaling by reducing EGFR internalization. Aging. V. 15. P. 6011.
https://doi.org/10.18632/aging.204820

31. *Pan Y., Kubota S., Zhang Y., Fang S., Takasugi N., Kumaga, Y., Uehara T.* 2025. 1,2-Naphthoquinone promotes cell migration through EGFR-ERK signaling pathway in human A549 cells. J. Toxicol. Sci. V. 50. Art. ID: 459.
https://doi.org/10.2131/jts.50.459

32. *Pantoom S., Konstantinidis G., Voss S., Han H., Hofnagel O., Li Z., Wu Y.-W.* 2020. RAB33B recruits the ATG16L1 complex to the phagophore via a noncanonical RAB binding protein. Autophagy. V. 17. P. 2290.
https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1822629

33. *Poon Z., Fan X., Cheung A., Bari S., Hwang W. Y.* 2019. A biophysically defined MSC subpopulation for enhanced homing and immunosuppression. Blood. V. 134. P. 2078.
https://doi.org/10.1182/blood-2019-126683

34. *Rabanal-Ruiz Y., Korolchuk V.* 2018. mTORC1 and nutrient homeostasis: the central role of the lysosome. IJMS. V. 19. Art. ID: 818.
https://doi.org/10.3390/ijms19030818

35. *Robke L., Laraia L., Carnero Corrales M.A., Konstantinidis G., Muroi M., Richters A., Winzker M., Engbring T., Tomassi S., Watanabe N., Osada H., Rauh D., Waldmann H., Wu Y.-W., Engel J.* 2017. Phenotypic identification of a novel autophagy inhibitor chemotype targeting lipid kinase VPS34. Angew. Chem. Int. Ed. V. 56. P. 8153. https://doi.org/10.1002/anie.201703738

36. *Salova A.V., Belyaeva T.N., Litvinov I.K., Kharchenko M.V., Kornilova E.S.* 2025. Deacidification of the endolysosomal system by the vesicular proton pump V-ATPase inhibitor bafilomycin A1 affects EGF receptor endocytosis differently in endometrial MSC and HeLa cells. IJMS. V. 26. Art. ID: 10226. https://doi.org/10.3390/ijms262010226

37. *Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W.* 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods. V. 9. P. 671. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089

38. *Schultz D.F., Billadeau D.D., Jois S.D.* 2023. EGFR trafficking: effect of dimerization, dynamics, and mutation. Front. Oncol. 13, Art. ID: 1258371. https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1258371

39. *Shim M.S., Nettesheim A., Hirt J., Liton P.B.* 2020. The autophagic protein LC3 translocates to the nucleus and localizes in the nucleolus associated to NUFIP1 in response to cyclic mechanical stress. Autophagy. V. 16. P. 1248. https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1662584

40. *Sun C., Wang L., Wang H., Huang T., Yao W., Li J., Zhang X.* 2020. Single-cell RNA-seq highlights heterogeneity in human primary Wharton's jelly mesenchymal stem/stromal cells cultured in vitro. Stem Cell. Res. Ther. V. 11. Art. ID: 149. https://doi.org/10.1186/s13287-020-01660-4

41. *Takács T., László L., Tilajka Á., Novák J., Buday L., Vas V.* 2024. Insulin receptor substrate 1 is a novel member of EGFR signaling in pancreatic cells. Eur. J. Cell Biol. V. 103. Art. ID: 151457. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2024.151457

42. *Tyurin-Kuzmin P.A., Karagyaur M.N., Kulebyakin K.Yu., Dyikanov D.T., Chechekhin V.I., Ivanova A.M., Skryabina M.N., Arbatskiy M.S., Sysoeva V.Yu., Kalinina N.I., Tkachuk V.A.* 2020. Functional heterogeneity of protein kinase A activation in multipotent stromal cells. IJMS. V. 21. Art. ID: 4442. https://doi.org/10.3390/ijms21124442

43. *Wang D., Zhao X., Wang P., Liu J.* 2024. SNX32 regulates sorting and trafficking of activated EGFR to the lysosomal degradation pathway. Traffic. V. 25. Art. ID: e12952. https://doi.org/10.1111/tra.12952

44. *Wang Z., Chai C., Wang R., Feng Y., Huang L., Zhang, Y., Yang S., Xiao X., Yang S., Zhang X.* 2021. Single-cell transcriptome atlas of human mesenchymal stem cells exploring cellular heterogeneity. Clin. Transl. Med. V. 11. Art. ID: e650. https://doi.org/10.1002/ctm2.650

45. *Xie X., Tong W., Xie Y., Jiang H., Jiang A., Huang J., Liu Z., Yu J.* 2025. Targeting the SYVN1-EGFR axis: a breakthrough strategy for TKI-resistant NSCLC. Cell Death Dis. V. 16. Art. ID: 655. https://doi.org/10.1038/s41419-025-07978-2

46. *Xu L., Rönnlund D., Aspenström P., Braun L.J., Gad A.K.B., Widengren J.* 2016. Resolution, target density and labeling effects in colocalization studies — suppression of false positives by nanoscopy and modified algorithms. FEBS J. V. 283. P. 882. https://doi.org/10.1111/febs.13652

47. *Yang Z., Feng Z., Li Z., Teasdale R.D.* 2022. Multifaceted roles of retromer in EGFR trafficking and signaling activation. Cells. V. 11. Art. ID: 3358. https://doi.org/10.3390/cells11213358

48. *Yuan L., Meng Y., Xiang J.* 2024. SNX16 is required for hepatocellular carcinoma survival via modulating the EGFR-AKT signaling pathway. Sci. Rep. V. 14. Art. ID: 13093. https://doi.org/10.1038/s41598-024-64015-6

49. *Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artzibasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Bichevaia N.K., Korsak V.S., Nikolsky N.N.* 2012. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. Cell Tis. Biol. V. 6. P. 1. https://doi.org/10.1134/S1990519X12010129