СОДЕРЖАНИЕ

Том 63, номер 6, 2021

Межклеточный транспорт митохондрий: молекулярные механизмы и роль	
в поддержании энергетического гомеостаза в тканях	
Ю. А. Успенская, Н. А. Малиновская, А. Б. Салмина	513
Роль вне- и внутриклеточного значения pH в регуляции опухолевого процесса В. А. Кобляков	531
Роль сигнального пути PI3K/Akt/mTOR в регуляции хондрогенной дифференцировки эндометриальных мезенхимных стромальных клеток	
А. С. Бровкина, Р. Е. Ушаков, И. О. Васильева, А. П. Домнина, Е. Б. Бурова	538
Изменение числа CD38 и Cx43-иммунопозитивных клеток в нейроваскулярной единице головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера	
Е. Д. Хилажева, А. И. Мосягина, А. В. Моргун, Н. А. Малиновская, Я. В. Горина, Е. В. Харитонова, О. Л. Лопатина, А. Б. Салмина	548
Метод одновременного выявления глиальных клеток и скоплений амилоида на светооптическом уровне	
О. И. Носова, В. В. Гусельникова, Д. Э. Коржевский	557
Флуоресцентная визуализация динамики распределения GFP ⁺ -клеток донора в органах мышей после трансплантации нативного или криоконсервированного костного мозга	
Л. А. Сергиевич, Е. В. Богданенко, А. В. Карнаухов, Н. А. Карнаухова, И. А. Лизунова	568
Влияние тиреоидного статуса на структуру и процесс восстановления области травматического повреждения нижней челюсти крыс в условиях стресса	
И. В. Городецкая, Т. Н. Маркевич	580
Условия культивирования, гистологический и биохимический анализ каллусной культуры солодки <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	
А. Н. Акулов, Ю. А. Костюкова	590
Кариотип и нуклеотидная последовательность гена <i>COI Chironomus sororius</i> Wülker, 1973 (Diptera, Chironomidae) из дельты р. Печора	
В. В. Большаков, Е. Б. Фефилова, Е. А. Мовергоз	605
Памяти Ольги Владимировны Зацепиной (1951–2020)	611

Contents

Vol. 63, No. 6, 2021

Review		
Intercellular mitochondrial transfer: molecular mechanisms and role in maintaining the energy homeostasis in tissues		
Yu. A. Uspenskaya, N. A. Malinovskaya, A. B. Salmina	513	
The role of extra- and intracellular pH in the regulation of tumor process V. A. Kobliakov	531	
Original Articles		
Involvement of the PI3K/Akt/mTOR pathway in controlling chondrogenic differentiation of endometrial mesenchymal stromal cells A. S. Brovkina, R. E. Ushakov, I. O. Vassilieva, A. P. Domnina, E. B. Burova	538	
Changes in the number of Cd38 and Cx43-immunopositive cells in the neurovascular unit of the brain in experimental Alzheimer's disease E. D. Khilazheva, A. I. Mosiagina, A. V. Morgun, N. A. Malinovskaya, Ya. V. Gorina, E. V. Kharitonova, O. L. Lopatina, A. B. Salmina	548	
Light microscopy approach for simultaneously identification of glial cells and amyloid plaques O. I. Nosova, V. V. Guselnikova, D. E. Korzhevskii	557	
Fluorescent visualization of the dynamics of donor GFP+-cells distribution in mouse organs after native or cryopreserved bone marrow transplantation L. A. Sergievich, E. V. Bogdanenko, A. V. Karnaukhov, N. A. Karnaukhova, and I. A. Lizunova	568	
Influence of the thyroid status on the structure and process of restoration of the rat's lower jaw traumatic damage area under stress I. V. Gorodetskaya, T. N. Markevich	580	
Cultivation conditions, histological and biochemical analysis of the callus culture of a liquorice Glycyrrhiza glabra L. A. N. Akulov, Yu. A. Kostyukova	590	
Karyotype and <i>COI</i> gene sequences of <i>Chironomus sororius</i> Wulker 1973 (Diptera, Chironomidae) from the Pechora river delta <i>V. V. Bolshakov, E. B. Fefilova, and E. A. Movergoz</i>	605	
Obituaries		
In memory of Olga Vladimirovna Zatsepina (1951–2020)	611	

УЛК 576.54:576.311.347

МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ МИТОХОНДРИЙ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И РОЛЬ В ПОДДЕРЖАНИИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА В ТКАНЯХ

© 2021 г. Ю. А. Успенская^{1, 2, *}, Н. А. Малиновская¹, А. Б. Салмина^{1, 3}

¹Научно-исследовательский институт молекулярной медицины и патобиохимии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ, Красноярск, 660022 Россия

²Красноярский государственный аграрный университет, Красноярск, 660049 Россия ³Отдел исследований мозга Научного центра неврологии, Москва, 125367 Россия *E-mail: yulia.uspenskaya@mail.ru Поступила в редакцию 16.08.2021 г. После доработки 26.08.2021 г. Принята к публикации 30.08.2021 г.

Митохондрии, которые определяют метаболические процессы в клетках и клеточную выживаемость, часто претерпевают структурно-динамические изменения при различных видах стресса и нарушениях энергетического гомеостаза. Помимо внутриклеточного перемещения митохондрий, большое значение имеет их межклеточный транспорт. Межклеточный трансфер происходит как в физиологических условиях, так и при различных патологиях, который сопровождается устранением повреждений стрессированных клеток и восстановлением структурно-функциональных нарушений тканей, вызванных митохондриальной дисфункцией. Настоящий обзор суммирует последние данные, полученные исследователями в этой области, и дает общее представление о молекулярных механизмах межклеточного транспорта митохондрий и его роли в поддержании энергетического гомеостаза в тканях. Отдельно обсуждаются перспективные пути изучения передачи митохондрий для таргетной терапии многих заболеваний.

Ключевые слова: митохондрии, межклеточный транспорт, митохондриальная дисфункция, митохондриальный биогенез, митохондриальная терапия, тканевой гомеостаз

DOI: 10.31857/S0041377121060110

Митохондрии являются одной из самых сложных и важных органелл в клетках эукариот, обеспечивая их необходимой для жизнедеятельности энергией. Митохондриальная дисфункция ассоциирована с большим количеством патологических нарушений и заболеваний (Ballinger, 2005; Gorman et al., 2009). Энергопотребляющие ткани и ткани, подверженные гипоксически-ишемическому повреждению, наиболее уязвимы в плане энергетического истощения из-

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; БА — болезнь Альцгеймера; МСК — мезенхимные стволовые клетки; КМ-МСК — костномозговые МСК; ММСК — мультипотентные МСК; мтДНК — митохондриальная ДНК; НСК — нейральные стволовые клетки; ПЭК — эндотелиальные клетки-предшественники; синдром MERRF — миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами; ТНТ — туннелирующие нанотрубочки; ЭКМО — экстракорпоральная мембранная оксигенация; ЭР — эндоплазматический ретикулум; ВМSС — костномозговые стволовые клетки; DAMP — паттерн-распознающие молекулы, ассоциированные с митохондриальным повреждением; EGFR — рецептор эпидермального фактора роста; Т-ALL-клетки — Т-лимфоидные клетки, полученные от больных с Т-клеточным острым лимфобластным лейкозом; ТАТ — трансактиватор транскрипционного белка.

за дисфункции митохондрий. Таким образом, поддержание количества и качества митохондрий имеет решающее значение для гомеостаза тканей и выживания клеток.

Долгое время считали, что митохондрии удерживаются в цитоплазме и подвергаются частому перепрограммированию и внутриклеточному перемещению (Rafelski, 2013). Широко исследовался двунаправленный (антероградный и ретроградный) внутриклеточный аксональный транспорт митохондрий из-за его значительного влияния на митохондриальный гомеостаз в нейронах (Morris, Hollenbeck, 1993). В настоящее время большой интерес вызывает роль межклеточного транспорта митохондрий в поддержании тканевого гомеостаза (Mittelbrunn, Sanchez-Madrid, 2012; Murray, Krasnodembskaya, 2019). В 2004 г. впервые обнаружено перемещение органелл между клетками млекопитающих через туннелирующие нанотрубочки (ТНТ) (Rustom et al., 2004), а в 2006 г. продемонстрировали межклеточный транспорт митохондрий из мезенхимных стволовых клеток животных (МСК) в клетки с поврежденными митохондриями (Spees et al., 2006). С тех пор накопленные к настоящему времени данные о межклеточном трансфере митохондрий свидетельствуют о более высокой активности митохондрий, чем это предполагали ранее (Spees et al., 2006; Islam et al., 2012; Hayakawa et al., 2016), а перенос митохондрий от клеток-доноров к клеткам-реципиентам представляется многообещающим подходом для поддержания межклеточного энергетического гомеостаза (Vignais et al., 2017; Rodriguez et al., 2018).

Во время митохондриального аэробного дыхания в результате утечки электронов из электрон-транспортной цепи образуются активные формы кислорода (АФК). Обычно количество электронов, выходящих из цепи переноса, минимально, и уровень АФК может контролироваться путем утилизации АФК митохондриями (Murphy, 2009). Однако при стрессовых воздействиях на клетки, таких как ишемия (гипоксия), химическое воздействие и делеция в митохондриальной ДНК (мтДНК), в митохондриях накапливается большое количество АФК в результате усиленной утечки электронов (Angelova, Abramov, 2016). Быстрое повышение уровня АФК вызывает деполяризацию мембранного потенциала митохондрий и впоследствии инициирует митофагию, которая представляет собой селективное разрушение поврежденных митохондрий путем аутофагии (Моhammadalipour et al., 2020). Клетки не могут выжить без этого источника энергии, поэтому замена митохондрий, несомненно, является эффективным способом восстановить истощенные клетки. Интересно, что имеется достаточное количество подтверждений тому, что митохондриальный транспорт происходит не только при восстановлении жизнедеятельности клеток, но и в других ситуациях.

Примечательно, что спонтанный транспорт митохондрий между клетками происходит и в физиологических условиях (Torralba et al., 2016; Liu et al., 2021). С другой стороны, межклеточная передача митохондрий, по-видимому, не только предотвращает тканевое повреждение, часто возникающее при патологии центральной нервной, сердечно-сосудистой и дыхательной систем, но также опосредует клеточную активность, и тем самым оказывает влияние на процессы резистентности к опухолевой терапии и регуляции воспаления. Более того, изучение трансцеллюлярной деградации поврежденных митохондрий из клеток, подвергшихся воздействию стресса, расширяет и понимание митофагии (Davis et al., 2014). Следует отметить, что стволовые клетки являются наиболее популярными донорскими клетками для передачи митохондрий, что указывает на то, что донорство митохондрий может играть ключевую роль в терапии стволовыми клетками.

Настоящий обзор ставит целью не только дать общее представление о межклеточном транспорте митохондрий как фундаментальных органелл, определяющих метаболические процессы в клетках и клет

точную выживаемость в физиологических условиях, но и собрать новейшие данные о молекулярных и сигнальных механизмах митохондриального трансфера в патологических условиях. Прогресс в изучении межклеточного транспорта митохондрий открывает перспективы для таргетной терапии многих заболеваний.

ТРАНСПОРТ МИТОХОНДРИЙ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ ГОМЕОСТАЗА И РАЗВИТИЯ ТКАНЕЙ

Клеточная терапия, особенно основанная на использовании стволовых клеток, считается перспективным подходом к лечению сердечных заболеваний (Payne et al., 2005), но специфические механизмы межклеточной передачи сигналов полностью не изучены. Для дальнейшего изучения влияния перекрестных связей между клетками, культивировали дифференцированные мышиные кардиомиоциты с мультипотентными стволовыми клетками человека, полученными из жировой ткани (Acquistapace et al., 2011), и впервые выявили важную роль транспорта митохондрий из стволовых клеток в кардиомиоциты мышей в перепрограммировании клеток. Доля клеток-предшественников кардиомиоцитов резко снизилась после уменьшения количества мтДНК в стволовых клетках. Учитывая, что мышиные кардиомиоциты демонстрируют небольшую гетерогенность, другие авторы (Sinclair et al., 2016) сравнили эффективность транспорта митохондрий между костномозговыми мезенхимными стволовыми клетками (КМ-МСК) и двумя другими популяциями мезенхимных стволовых клеток, полученными из здоровой легочной ткани и жидкости бронхоальвеолярного лаважа от реципиентов после трансплантации легких in vitro. Результаты показали, что МСК из здоровой легочной ткани и жидкости бронхоальвеолярного лаважа от реципиентов после трансплантации легких могут передавать цитоплазматическое содержимое и митохондрии здоровым эпителиальным клеткам бронхов человека с аналогичной эффективностью посредством однонаправленного переноса.

Примечательно, что несколько исследований *in vitro* показали, что этот спонтанный межклеточный транспорт митохондрий также может быть двунаправленным. Межклеточный обмен цитоплазмой и митохондриями между эпителиоцитами почечных канальцев и мультипотентными мезенхимными стволовыми (стромальными) клетками (ММСК) был обнаружен при их совместном культивировании, и он также был двунаправленным, хотя преобладал транспорт в ММСК (Plotnikov et al., 2010). Вероятно, что двунаправленный обмен клеточных компонентов способствует дифференцировке ММСК, поскольку в них наблюдали появление белков, специфичных для почечных канальцев (Plotnikov et al., 2010). Анало-

гичным образом, двунаправленный обмен митохондриями был обнаружен в физиологических условиях культивирования гладкомышечных клеток сосудов человека и КМ-МСК, и этот процесс способствовал пролиферации, но не дифференцировке MCK (Vallabhaneni et al., 2012). С другой стороны, спонтанный двунаправленный перенос митохондрий происходит между соматическими клетками через нанотрубочки, о чем свидетельствуют межклеточные взаимодействия между мышиными кардиомиоцитами и кардиальными фибробластами, обеспечивающие структурные и функциональные связи для поддержания межклеточного гомеостаза в миокарде (He et al., 2011). Несмотря на то, что исследования межклеточного транспорта митохондрий в отсутствие стрессовых факторов ограничены, они также представляют собой значимый пул, необходимый для изучения потенциальной роли митохондриального транспорта в поддержании тканевого гомеостаза.

ТРАНСПОРТ МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ ПАТОЛОГИИ

Транспорт митохондрий в ЦНС. Двунаправленный аксональный транспорт митохондрий - это особый вид внутриклеточной активности, необходимый для восполнения энергозатрат в различных областях нейронов (Morris, Hollenbeck, 1993). Heдавно было показано, что межклеточный митохондриальный транспорт является неотъемлемым биологическим событием в ЦНС, который, как полагают, играет решающую роль в устранении ишемических и геморрагических повреждений (Babenko et al., 2015, 2018; Morancho et al., 2015; Hayakawa et al., 2016, 2018; Chou et al., 2017; Huang et al., 2020), восстановлении спинного мозга после травм (Gollihue et al., 2018; Li et al., 2019), защите нейронов от нейротоксического действия, индуцированного химиотерапией (Boukelmoune et al., 2018; English et al., 2020), и нейродегенерации (Rostami et al., 2017; Nitzan et al., 2019; Valdinocci et al., 2019).

Эксперимент на мышиной модели инсульта подтвердил, что нормально функционирующие митохондрии в астроцитах могут транспортироваться к поврежденным нейронам для устранения ишемического повреждения и восстановления нервной системы (Hayakawa et al., 2016). При этом межклеточный транспорт митохондрий, вероятно, опосредуется кальций-зависимым механизмом, включающим CD38-сигнальный путь, и подавление CD38-сигнальной системы может привести к снижению транспорта митохондрий, жизнеспособности клеток и нарушению постишемического восстановления (Hayakawa et al., 2016). Бабенко с коллегами (Babenko et al., 2015, 2018) показали, что митохондрии из мультипотентных МСК могут передаваться в нейроны или астроциты, что приводит к восстановлению клеточного дыхания в клетках-реципиентах и уменьшению ишемического повреждения. По-

мимо МСК, эндотелиальные клетки-предшественники (ПЭК) также использовались для клеточной терапии благодаря их способности регулировать ангиогенез и васкулогенез (Morancho et al., 2015). Подтверждено (Hayakawa et al., 2018), что митохондрии из ПЭК могут доставляться в поврежденные эндотелиальные клетки головного мозга. Результаты этих авторов показали, что уровни митохондриального белка ТОМ40, количество копий мтДНК и продукшия АТФ были повышены в поврежденных эндотелиоцитах головного мозга. Плотность эндотелия восстанавливалась после обработки митохондриальными частицами, полученными из ПЭК, что демонстрирует способность митохондрий из ПЭК поддерживать функционирование церебральных эндотелиоцитов (Hayakawa et al., 2018).

В другом исследовании сообщалось о транспорте митохондрий после субарахноидального кровоизлияния и травмы спинного мозга. Авторы в экспериментах на крысах и у пациентов (Chou et al., 2017) показали, что митохондрии из астроцитов могут переноситься в спинномозговую жидкость после субарахноидального кровоизлияния. Более того, митохондриальный мембранный потенциал уменьшался в течение первых 72 ч после кровоизлияния и далее начинал расти, что коррелировало, соответственно, с неблагоприятным течением в начале, но в итоге с благоприятным исходом после субарахноидального кровоизлияния. Другой эксперимент, связанный с травмой спинного мозга, продемонстрировал, что экзогенные митохондрии могут быть трансплантированы в поврежденный спинной мозг крысы и способствовать поддержанию энергетического уровня, а также функциональному восстановлению после травмы (Gollihue et al., 2018).

Аналогичные исследования при сокультивировании КМ-МСК и нейронов в условиях глюкозо-кислородного голодания также выявили направленный транспорт митохондрий по пути нейронов и повышение их выживаемости, что иллюстрирует потенциальный терапевтический эффект митохондрий при травмах спинного мозга (Li et al., 2019). Дальнейшие исследования показали, что трансплантация как КМ-МСК, так и митохондрий, полученных из КМ-МСК, может уменьшать апоптоз нейронов и способствовать восстановлению локомоторных функций у крыс после травмы спинного мозга, доказывая, что транспорт митохондрий может рассматриваться как потенциальный механизм терапии стволовыми клетками при спинномозговых травмах (Li et al., 2019).

Когнитивные нарушения, вызванные химиотерапией, являются одной из критических проблем при лечении рака (Wefel, Schagen, 2012). Было продемонстрировано, что цисплатин (химиотерапевтический препарат на основе платины) может нарушать функцию внутрисинаптосомальных митохондрий и изменять морфологию митохондрий нейронов у мышей (Chiu et al., 2017). Недавно появилось сообщение о защитных эффектах межклеточного транспорта митохондрий при их дисфункции в условиях цисплатин-индуцированной нейротоксичности (Boukelmoune et al., 2018; English et al., 2020). При сокультивировании МСК и обработанных цисплатином нейральных стволовых клеток (НСК) МСК транспортировали свои функционирующие митохондрии в НСК, что сопровождалось снижением гибели НСК и восстановлением в них митохондриального мембранного потенциала (Boukelmoune et al., 2018). Кроме того, установлено, что здоровые митохондрии могут передаваться из астроцитов в поврежденные in vitro цисплатином нейроны, увеличивая их выживаемость и восстанавливая в них кальциевую динамику (English et al., 2020). Интересно, что та же доза цисплатина в астроцитах не влияла на их жизнеспособность (English et al., 2020). Результаты показали, что астроциты могут защищать нейроны от проявлений нейротоксичности, индуцированной химиотерапией *in vivo*, за счет передачи своих функционирующих митохондрий поврежденным нейронам.

Следует упомянуть о экспериментах с астроцитами, полученными из коры головного мозга крыс (Hayakawa et al., 2016). Исследователи выяснили, что астроциты действительно выделяют митохондрии в окружающую среду. С помощью метода CRISPR/Cas9 были получены и генномодифицированные клетки с усиленным производством белка СD38, который катализирует синтез циклической АДФ-рибозы, сигнальной молекулы, необходимой для работы кальциевых мембранных каналов, в том числе и в митохондриях. Как и ожидали авторы, генномодифицированные клетки с усиленной экспрессией CD38 производили и выделяли в среду намного больше митохондрий (Hayakawa et al., 2016). Ученые предположили, что этот процесс может развиваться при повреждении нейронов, помогая их восстановлению.

Митохондриальная дисфункция является важным следствием нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (Nitzan et al., 2019; Valdinocci et al., 2019). Показали, что мыши с экспериментальной БА, получавшие внутривенно свежевыделенные митохондрии человека, проявляли лучшие когнитивные способности, чем мыши в контрольной группе, и что у мышей, получавших лизат митохондрий, существенно уменьшались потери нейронов и подавлялись процессы глиоза по сравнению с мышами с БА, которым не вводили митохондрии (Nitzan et al., 2019). Хотя вопросы эффективности и безопасности вмешательства требуют дальнейшего рассмотрения, это исследование наглядно демонстрирует необходимость улучшения митохондриального биогенеза у пациентов с БА.

Прогрессирование болезни Паркинсона связано с агрегацией патологического α -синуклеина (α -syn). Недавние исследования показали, что белковые аг-

регаты α-syn могут связываться с митохондриями, вызывая их повреждение и фрагментацию (Grassi et al., 2018). Доказано, что α-syn может накапливаться в астроцитах, подвергнутых стрессовому воздействию, следствием которого является набухание эндоплазматического ретикулума и митохондриальная дисфункция (Rostami et al., 2017). Кроме того, накопленный α-syn из поврежденных астроцитов доставляется к соседним здоровым клеткам посредством прямого контакта или ТНТ, что, в свою очередь, индуцировало транспорт митохондрий от здоровых астроцитов к астроцитам, претерпевшим стресс (Rostami et al., 2017). Предполагается, что передача патологического α-syn между клетками и межклеточный транспорт митохондрий при прогрессировании болезни Паркинсона может представлять терапевтическую мишень для ее лечения.

Транспорт митохондрий в сердечно-сосудистой системе. Сердце — энергоемкий и автономный орган, которому требуется постоянное поступление кислорода для поддержания его физиологической функции. Митохондрии обеспечивают сердце первичной энергией за счет аэробного дыхания и составляют 30% объема кардиомиоцитов. Таким образом, митохондриальная дисфункция при кардиоваскулярной патологии или мутации мтДНК, вызванные окислительным стрессом, тесно связаны с сердечно-сосудистыми заболеваниями (Ballinger, 2005).

Ишемия является основной причиной повреждения миокарда и апоптоза, поскольку блокирование поступления кислорода к кардиомиоцитам обычно приводит к дисфункции митохондрий (Liu et al., 2021). Было показано, что трансплантация функционирующих митохондрий в ишемизированную ткань миокарда кроликов сопровождается кардиопротекторным действием и значительно уменьшает размер инфаркта сердца через 4 нед. после выздоровления (Masuzawa et al., 2013). С помощью флуоресцентной микроскопии было обнаружено, что митохондрии частично интернализуются кардиомиоцитами через 2-8 ч после трансплантации. Хотя конкретный механизм интернализации митохондрий не выявлен, результаты показали, что трансплантированные митохондрии могут увеличивать потребление кислорода, продукцию АТФ и секрецию хемокинов в ишемизированной ткани миокарда, а также способствовать синтезу кардиоспецифичных белков, необходимых для поддержания энергетического гомеостаза миокарда (Masuzawa et al., 2013).

Помимо прямой трансплантации митохондрий, МСК в экспериментах *in vitro* способны восстанавливать жизнеспособность кардиомиобластов, подвергшихся ишемии, за счет транспорта функциональных митохондрий из донорских клеток (Cselenyak et al., 2010). На примере модели гипоксии/реоксигенации кардиомиоцитов установлено, что однонаправленный транспорт митохондрий как от интактнах, так и от индуцированных гипоксией/реоксигенацией миофиб-

робластов по пути поврежденных кардиомиоцитов сопровождался подавлением в них апоптоза (Shen et al., 2018). Полученные результаты обновили существовавшие ранее данные о межклеточном трансфере митохондрий, выявив двунаправленный транспорт митохондрий между кардиофибробластами и кардиомиоцитами в условиях нормоксии (He et al., 2011). Кроме того, поврежденные кардиомиоциты, индуцированные липополисахаридом (Yang et al., 2016) или антрациклином (Zhang et al., 2016), также демонстрировали способность к восстановлению за счет функционирующих митохондрий, полученных из МСК.

Транспорт митохондрий в другие тканевые системы. МСК могут происходить из разных источников. поэтому разные типы МСК обладают разной способностью к дифференцировке и сохранению жизнеспособности других клеток. Так, установлено, что помимо восстановления жизнедеятельности наиболее уязвимых органов, МСК также транспортируют митохондрии в клетки, подвергшиеся стрессорному воздействию, и восстанавливают их аэробное дыхание. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека, подвергнутые глюкозо-кислородной депривации и реоксигенации, продемонстрировали восстановление при совместном культивировании с КМ-МСК человека, и этот эффект был опосредован однонаправленным переносом здоровых митохондрий от КМ-МСК к поврежденным эндотелиоцитам (Liu et al., 2014).

В другой совместной культуре в физиологических условиях происходил транспорт митохондрий из МСК, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, к эпителиальным клеткам роговицы кролика, при этом в условиях окислительного стресса, вызванного действием ротенона, трансфер митохондрий в клетки эпителия роговицы значительно возрастал (Jiang et al., 2016). Трансплантация скаффолдов с МСК способствовала заживлению ран роговицы, полученных на кроличьих моделях с использованием щелочи, в результате передачи митохондрий из МСК в клетки эпителия роговицы (Jiang et al., 2016). Перенос митохондрий также происходил между МСК человека, когда МСК реципиента подвергались Н₂О₂-индуцированному окислительному стрессу, а донорские МСК были предварительно обработаны N-ацетил-L-цистеином и L-аскорбат-2-фосфатом, которые благоприятно влияли на митохондриальный биогенез в MCK (Li et al., 2017). Таким образом, происходило подавление окислительного стресса в МСК после их обработки перексидом водорода, а также уменьшение фрагментации поврежденных митохондрий (Li et al., 2017).

Недавно было показано, что МСК, полученные из Вартонова студня пупочного канатика человека (WJ-MSCs), являются еще одним хорошим источником донорских митохондрий (Lin et al., 2015). Миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами (синдром MERRF) — редкое митохондриальное за-

болевание, которое приводит к нервно-мышечным расстройствам. Совместное культивирование клеток WJ-MSC с цитоплазматическими гибридами MERRF, которые демонстрируют высокий коэффициент митохондриальных мутаций, сопровождалось повышением митохондриальной биоэнергетики и жизнеспособности цитоплазматических гибридов MERRF (Chuang et al., 2017). При этом было показано, что положительные эффекты связаны именно с транспортом функционирующих митохондрий от WJ-MSC к клеткам MERRF.

Транспорт митохондрий для их деградации. Другая сторона межклеточного транспорта митохондрий заключается в том, что поврежденные митохондрии могут быть доставлены в другие клетки для деградации, повторного использования или даже для оказания положительного действия на передачу сигнала. Так, Девис с коллегами (Davis et al., 2014) впервые описали трансцеллюлярную деградацию митохондрий с использованием введенного с помощью вируса специфического белка, меченного флуорофорной группой. Было показано, что поврежденные митохондрии в ганглионарных клетках сетчатки в области головки зрительного нерва переносятся в соседние астроциты и деградируют внутри лизосом. Выявленный процесс деградации митохондрий в ганглионарных клетках сетчатки получил название трансмитофагии в отличие от известной митофагии. Интересно, что в отличие от переноса митохондрий из нормально функционирующих МСК к макрофагам, наблюдаемого при восстановлении структурнофункциональных нарушений тканей (Morrison et al., 2017), поврежденные в условиях окислительного стресса МСК также передавали свои частично деполяризованные митохондрии в макрофаги в составе микровезикул в экспериментальной системе совместного культивирования *in vitro* (Phinney et al., 2015).

Этот процесс рассматривается как форма митофагии, помогающая МСК выживать при окислительном стрессе. Примечательно, что транспортированные деполяризованные митохондрии повторно использовались посредством слияния митохондрий в макрофагах клеток реципиента для увеличения биоэнергетической эффективности (Phinney et al., 2015). Хотя поврежденные митохондрии были частично деполяризованы, структура их митохондриальной мембраны не была нарушена, что способствовало слиянию с мембранами функционирующих митохондрий в макрофагах клеток реципиента (Phinney et al., 2015). Опухолевые клетки также могут транспортировать нефункциональные митохондрии в нормальные клетки в опухолевом микроокружении для адаптации к различным нарушениям, тем самым способствуя прогрессированию опухоли. Так, обнаружен (Wang et al., 2018) двунаправленный транспорт митохондрий через ТНТ между КМ-МСК и Т-лимфоидными клетками (T-ALL-клетками), полученными от больных с Т-клеточным острым лимфобластным лейкозом. Авторы показали, что T-ALL-клетки после химиотерапевтического воздействия транспортировали гораздо больше митохондрий в МСК, чем сами КМ-МСК, что подавляло продукцию митохондриальных АФК в Т-ALL-клетках и повышало их химиорезистентность (Wang et al., 2018). Паттерн-распознающие молекулы, ассоциированные с митохондриальным повреждением (DAMP), такие как мтДНК, N-формил-пептиды и митохондриальные белки, высвобождаются из поврежденных клеток, распознаются иммунными клетками (нейтрофилами и моноцитами или макрофагами) и вызывают иммунный ответ (Krysko et al., 2011).

Таким образом, митохондрии можно рассматривать не только как сенсоры клеточного стресса, но и как регуляторы передачи сигналов опасности, выполняющие роль предупредительного знака для клетки или ткани и их своевременной реакции (Galluzzi et al., 2012) (рис. 1). Так, недавние открытия показали, что нормально функционирующие митохондрии могут высвобождаться из поврежденных клеток и действовать как специальные молекулы, при высвобождении которых запускаются воспалительные реакции (Maeda, Fadeel, 2014) или процессы восстановления повреждений тканей (Mahrouf-Yorgov et al., 2017). В экспериментах in vitro с сокультивируемыми клетками митохондрии, высвобождаемые из поврежденных соматических клеток (кардиомиоцитов или эндотелиальных), транспортировались в МСК и подвергались в них деградации через активацию сигнального пути гемоксигеназы-1 (НО-1), которая сопровождалась стимуляцией митохондриального биогенеза в MCK (Mahrouf-Yorgov et al., 2017). Активированные в МСК митохондрии затем передавались в соматические клетки, подвергшиеся воздействию пероксида водорода, и понижали в них уровень апоптоза (Mahrouf-Yorgov et al., 2017). Было обнаружено, что накопление в стрессированных клетках АФК, выступающих в роли триггера аутофагии (Bartz et al., 2015), является пусковым сигналом, необходимым для стимуляции НО-1-опосредованного антиапоптотического ответа. Низкий уровень АФК в стрессированных соматических клетках уменьшал высвобождение митохондрий из МСК (Mahrouf-Yorgov et al., 2017).

Конкретные механизмы трансфера митохондрий между клетками изучены пока недостаточно, поэтому для определения возможности использовать такие процессы, как транспорт поврежденных митохондрий из соматических клеток в МСК для последующей деградации, а также транспорт функциональных митохондрий из МСК в поврежденные клетки, требуется дальнейшее изучение механизмов транспорта митохондрий между клетками.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МЕЖКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА МИТОХОНЛРИЙ

В настоящее время молекулярные и сигнальные механизмы митохондриального транспорта изучены пока недостаточно. Большинство исследований показали, что ТНТ и микровезикулы являются наиболее распространенными путями межклеточного трансфера митохондрий (рис. 2). Однако факторы, активирующие транспорт митохондрий в клеткахдонорах и клетках-реципиентах, остаются менее изученными.

ПУТИ МЕЖКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА МИТОХОНЛРИЙ

Туннелирующие нанотрубочки. В 2004 г. было впервые описано образование ТНТ между крысиными клетками феохромоцитомы PC12 (Rustom et al., 2004) и иммунными клетками (Onfelt et al., 2004). Эти нанотрубочки представляют собой мембранные трубчатые выступы, отходящие от плазматической мембраны и позволяющие транспортировать различные клеточные компоненты или органеллы, что в значительной степени способствует межклеточному взаимодействию для поддержания тканевого гомеостаза (Vignais et al., 2017). Диаметр этих структур составляет от 50 до 1500 нм, а длина — от нескольких десятков до сотен микрон (Austefjord et al., 2014). Среди всех транспортируемых органелл основными считаются митохондрии, для которых описан как однонаправленный, так и двунаправленный транспорт через ТНТ. Кроме того, было подтверждено, что такие ТНТ-подобные мембранные структуры, как отростки остеоцитов, также выступают в роли переносчиков митохондрий внутри сети остеоцитов (Gao et al., 2019). При блокировании образования ТНТ актин-связывающим токсином цитохалазином В в наномолярной концентрации (350 нМ), который оказывал незначительное влияние на процессы эндоцитоза и фагоцитоза, транспорт органелл между клетками значительно снижался (Bukoreshtliev et al., 2009).

Известно, что различные стрессовые факторы, вызывающие повреждение митохондрий, способствуют образованию ТНТ и последующему транспорту по ним митохондрий, однако не так много исследований сосредоточено на механизме инициации и регуляции образования этих мембранных структур. Сообщалось, что активация фактора р53 является важным событием, запускающим образование ТНТ в ответ на клеточный стресс (Wang et al., 2011). В подвергшихся стрессу клетках активация р53 опосредовала регуляцию экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и активируемого им сигнального каскада Akt/PI3K/mTOR, что приводило к сверпродукции M-Sec (TNFαip2) (Wang et al., 2011), способствующего полимеризации актина и форми-

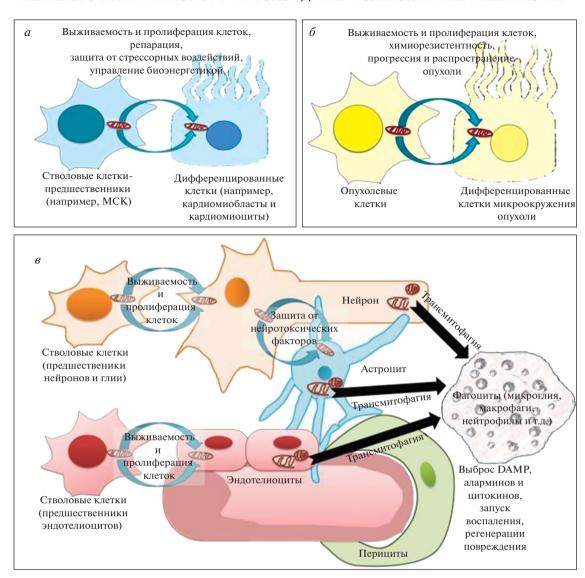


Рис. 1. Роль транспорта митохондрий для функционирования стволовых клеток (a), опухолевых клеток при злокачественном росте (δ) и клеток нейроваскулярной единицы (a) в норме и при патологии. DAMP — паттерн-распознающие молекулы, ассоциированные с митохондриальным повреждением.

рованию ТНТ путем взаимодействия с RalA (Hase et al., 2009). Показано также, что образование ТНТ между обработанными ротеноном эпителиальными клетками роговицы и МСК регулировалось сигнальным путем NF-κВ/TNFαір2, активированным ротенониндуцированными АФК (Jiang et al., 2016). Кроме того, процесс запуска формирования ТНТ может быть связан с взаимодействием р53 и АФК (Chen et al., 2018), в частности, с активацией р53 под действием АФК в условиях окислительного стресса. Наконец, установлено, что инициирование процесса образования ТНТ ассоциировано с увеличением при активации р53-зависимых сигнальных путей каспаза-3зависимого расщепления белка S100A4 (Sun et al., 2012) – кальций-связывающего белка семейства S100. Сообщалось, что наличие градиента белка S100A4 способствует росту ТНТ от поврежденных клеток с низкой концентрацией S100A4 к клеткам-мишеням с более высокой концентрацией S100A4 (Sun et al., 2012).

На экспериментальной модели острого липополисахарид-индуцированного повреждения легких у мышей *in vivo* получили доказательства (Islam et al., 2012) участия трансмембранного белка щелевых контактов коннексина 43 (Сх43) в передаче митохондрий путем стабилизации участков прикрепления костномозговых стволовых клеток (BMSC) к клеткам альвеолярного эпителия, а также стимулирования образования ТНТ и микровезикул. Однако образование ТНТ и микровезикул подавлялось в Сх43-мутантных ВМSC в результате нарушения функционирования контактов между ВМSС и аль-

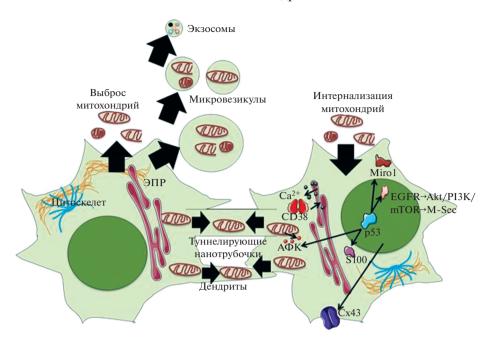


Рис. 2. Схема возможных путей и наиболее важных молекулярных механизмов межклеточного транспорта митохондрий. На рисунке показаны целые (неповрежденные функционально активные) и "усеченные" и фрагментированные (поврежденные нефункциональные) митохондрии. АФК — активные формы кислорода, ЭПР — эндоплазматический ретикулум, Сх43 — коннексин 43, EGFR — рецептор эпидермального фактора роста, PI3K, AKT, mTOR — киназы, M-Sec — белок, известный как TNFαip2, Miro1 — GTPаза. См. объяснения в тексте.

веолами. В таких условиях транспорт митохондрий был значительно подавлен и восстановления после повреждения легких не происходило.

Тем не менее, в некоторых других исследованиях также сообщалось об участии Сх43 в образовании THT (Osswald et al., 2015; Torralba et al., 2016). Было подтверждено (Osswald et al., 2015), что митохондрии быстро перемещаются по мембранным микротрубочкам опухолевых клеток, и что в области пересечения двух разных микротрубочек часто локализован Сх43, способствующий распространению кальция по этим структурам. Потеря Сх43 снижает синхронность распространения межклеточных кальциевых волн и долю клеток астроцитомы с множественными микротрубочками, что указывает на роль Сх43 в стабилизации этих структур в опухолевых клетках. Кроме того, сообщалось об экспрессии Сх43 в остеоцитарной сети, способствующей выживанию остеоцитов (Ma et al., 2019), что свидетельствует о вероятном участии Сх43 в транспорте митохондрий между остеоцитами за счет усиления межклеточных контактов. Хотя механизмы, опосредующие участие белков щелевых контактов в межклеточном транспорте митохондрий, требуют дальнейшего изучения, можно предположить, что Сх43 принимает участие в заякоривании митохондрий с помощью ТНТ.

Известно, что для ТНТ-опосредованного транспорта митохондрий требуется участие Rho-подобных ГТФаз, локализованных во внешней митохондриальной мембране, таких как Miro1 (Ahmad et al.,

2014; Babenko et al., 2015, 2018; Zhang et al., 2016). B нейронах Miro1 действует как заякоренный в наружной мембране митохондрии белок, который взаимодействует с митофузином1/2 и кинезином-1 через адаптерный белок milton (TRAK, существующий в нескольких изоформах — TRAK1/2 и OIP106/98), с образованием белкового комплекса, позволяющего митохондриям перемещаться по микротрубочкам (Misko et al., 2010). Показано влияние Miro1 на ТНТопосредованный межклеточный транспорт митохондрий от МСК к стрессированным эпителиальным клеткам (Ahmad et al., 2014). Сверхэкспрессия Miro1 в MCK способствовала усилению транспорта митохондрий и уменьшению повреждения эпителиальных клеток, тогда как нокаутирование гена белка Mirol в MCK подавляло перенос митохондрий и снижало эффективность восстановления.

Интересно, что по сравнению с КМ-МСК, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки были более эффективны в роли доноров митохондрий, а также способствовали восстановлению после антрациклин-индуцированной кардиомиопатии благодаря более высокой экспрессии Miro1 (Zhang et al., 2016). Бабенко с коллегами (Babenko et al., 2015) также обнаружили тесную взаимосвязь между Miro1 и транспортом митохондрий, о чем свидетельствовали увеличение количества белка Miro1 в МСК после их сокультивирования с нейронами и эффективность передачи митохондрий в МСК со сверхэкспрессией Miro1 при их трансплантации крысам с эксперимен-

тальным ишемическим инсультом (Babenko et al., 2018). Эти результаты доказывают значительный вклад транспорта митохондрий в постишемическую нейропротекцию. Таким образом, возможно, что межклеточный перенос митохондрий через ТНТ имеет схожие механизмы с Mirol-опосредованным аксональным транспортом митохондрий в нейронах.

Микровезикулы. Внеклеточные микровезикулы являются важными посредниками межклеточной коммуникации (Mittelbrunn, Sanchez-Madrid, 2012). В зависимости от их происхождения везикулы можно подразделить на несколько типов с различными размерами, которые включают экзосомы (30–100 нм), микровезикулы (от 100 нм до 1 мкм) и апоптотические тельца (>1 мкм) (Mittelbrunn, Sanchez-Madrid, 2012). В силу небольших размеров, экзосомы, происходящие из мембран эндосом, могут содержать только небольшие белки, липиды и РНК (Kourembanas, 2015), а также мтДНК (Guescini et al., 2010). Микровезикулы, образованные путем блеббинга плазматической мембраны, могут содержать целую органеллу из-за их большего диаметра и участвовать в транспорте митохондрий и мтДНК (Spees et al., 2006; Islam et al., 2012; Phinney et al., 2015; Hayakawa et al., 2016; Morrison et al., 2017). Было обнаружено, что BMSC предоставляют функционирующие митохондрии клеткам альвеолярного эпителия не только через ТНТ, но также и через микровезикулы, для образования которых показана зависимость от экспрессии Cx43(Islam et al., 2012). Наконец, микровезикулы также участвуют в трансмитофагии поврежденных ганглионарных клеток сетчатки (Davis et al., 2014) и стрессактивированных MCK (Phinney et al., 2015), что сопровождается реутилизацией деполяризованных митохондрий.

Выброс и интернализация митохондрий. Как уже говорилось выше, считается, что транспорт митохондрий от клеток-доноров к клеткам-реципиентам в большинстве случаев зависит от наличия таких межклеточных структур, как ТНТ и микровезикулы. Однако в некоторых исследованиях сообщается, что митохондрии или их фрагменты могут высвобождаться из клетки или поступать внутрь нее без формирования межклеточных структур путем выброса из клетки или погружения в клетку в процессе интернализации. Хотя доказательств транспорта митохондрий за счет процессов их выброса и поглощения из донорских клеток в клетки-реципиенты не так много, тем не менее, трансмембранная подвижность митохондрий также может способствовать межклеточной передаче митохондрий.

Предполагается, что выброс из клетки митохондрий необходим в основном для контроля качества митохондрий (Lyamzaev et al., 2008; Nakajima et al., 2008) или передачи стресс-сигналов (Boudreau et al., 2014; Maeda, Fadeel, 2014). Например, клетки HeLa выбрасывали фрагменты митохондрий в процессе элиминации митохондрий при митоптозе в условиях

окислительного стресса (Lyamzaev et al., 2008). Другие авторы обнаружили, что цитоплазматические вакуоли, отделившиеся от плазматической мембраны), поглощали поврежденные митохондрии, а затем вытесняли их из погибающих клеток (индуцированных фактором некроза опухоли ТNFa) путем повторного слияния с мембраной клеток каспазазависимым путем (Nakajima et al., 2008). Интересно, что для осуществления процессов блеббинга и выброса митохондрий требовалось отсутствие повреждений со стороны актинового и тубулинового цитоскелета, поскольку дестабилизация актина или тубулина подавляла образование цитоплазматических вакуолей.

В некоторых случаях выброс митохондрий из стрессированных клеток рассматривали как сигнал для запуска воспалительных реакций (Maeda, Fadeel, 2014). Выброс митохондрий и их фрагментов из клеток был обнаружен также в линиях клеток Jurkat и фибросаркомы мыши L929 с дефицитом Fasбелка, ассоциированного с доменом смерти, подвергнутых воздействию TNFα (Maeda, Fadeel, 2014). Дальнейшие эксперименты *in vitro* показали, что очищенные митохондрии, высвобождаемые некротизированными клетками, могут поглощаться макрофагами и дендритными клетками человека, что сопровождается модулирующим влиянием на продукцию цитокинов макрофагами и индукцию созревания дендритных клеток (Maeda, Fadeel, 2014). В другом исследовании показано, что функциональные митохондрии могут высвобождаться из активированных тромбоцитов как в виде инкапсулированных в мембрану микрочастиц, так и в виде свободных органелл (Boudreau et al., 2014). В дополнение к исследованиям in vitro, исследование in vivo показало, что внутривенное введение мышам внеклеточных митохондрий ускоряло адгезию нейтрофилов к эндотелию сосудов и что сопровождалось активацией нейтрофилов и воспалительной реакцией (Boudreau et al., 2014).

Интернализация митохондрий была впервые описана в 1982 г. Кларком и Шэем (Clark, Shay, 1982), которые назвали это явление митохондриальной трансформацией. В работе этих авторов было показано, что в чувствительных к хлорамфениколу и эфрапептину клетках млекопитающих происходит интернализация митохондрий, которая приводит к увеличению клеточной выживаемости при воздействии антибиотиков (Clark, Shay, 1982). Полученные результаты предполагают, что явление митохондриальной трансформации может служить терапевтической мишенью для лечения митохондриальных нарушений.

Считается, что трансплантация изолированных функциональных митохондрий и их интернализация в клетках-реципиентах путем макропиноцитоза (Chang et al., 2019) может сопровождаться восстановлением эффективности окислительного фосфори-

лирования в клетках-реципиентах и их пролиферации in vitro (Hayakawa et al., 2018; Chang et al., 2019). Недавние исследования продемонстрировали, что интернализация митохондрий зависит от целостности внешней митохондриальной мембраны и присутствия на ней белков синцитина-1 и синцитина-2, которые могут выступать в роли лигандов в процессах взаимодействия между митохондриями и клетками-реципиентами (Chang et al., 2019). В дополнение к экспериментам in vitro, некоторые исследования in vivo тоже показали положительное влияние трансплантации митохондрий на восстановление повреждений тканей (Masuzawa et al., 2013; Emani et al., 2017; Gollihue et al., 2018). Так, была проведена серия экспериментов *in vivo* и клинических исследований по изучению кардиозашитного эффекта трансплантации митохондрий на ишемическое и реперфузионное повреждение миокарда (Masuzawa et al., 2013; Emani et al., 2017). Функциональные аутологичные митохондрии, изолированные из неишемизированных скелетных мышц кролика, вводили непосредственно в ишемизированную зону сердца, где они могли быть интернализованы поврежденными кардиомиоцитами. Это приводило к ограничению размера инфаркта и восстановлению функции миокарда при постинфарктной сердечной недостаточности (Masuzawa et al., 2013). Кроме того, эта группа ученых (Emani et al., 2017) сообщила о первом клиническом применении митохондриальной аутотрансплантации для восстановления функции миокарда у детей, которым проводили экстракорпоральную мембранную оксигенацию (ЭКМО) из-за ишемического/реперфузионного повреждения (Emani et al., 2017).

Хотя некоторые вопросы, касающиеся дозы и способа митохондриальной трансплантации, еще нуждаются в корректировке, все-таки первичные результаты обнадеживают. Действительно, у четырех из пяти пациентов наблюдали улучшение сократительной функции сердца, что позволило прекратить поддержку ЭКМО (Emani et al., 2017). К настоящему времени механизм захвата митохондрий полностью не изучен, но трансплантация функционально активных митохондрий, по-видимому, является потенциальной терапевтической стратегией для лечения повреждения тканей.

ТРИГГЕРНЫЕ СИГНАЛЫ

По мере накопления доказательств появилось понимание того, что стрессовые сигналы, вызванные дисфункцией митохондрий или окислительным стрессом, могут передаваться от клеток-реципиентов клеткам-донорам и запускать в них транспорт митохондрий. Сообщается, что помимо паттернраспознающих молекул, ассоциированных с митохондриальным повреждением, и самих поврежденных митохондрий (Krysko et al., 2011; Maeda, Fadeel, 2014; Mahrouf-Yorgov et al., 2017), усиление межкле-

точного транспорта митохондрий происходит и под действием некоторых других молекул и связанных с ними сигнальных путей. В процессе окислительного фосфорилирования в нормально функционирующих митохондриях небольшая часть электронов выходит из комплексов I и III, увеличивая скорость продукции АФК за счет реакции с О₂ (Murphy, 2009).

В физиологических условиях защита клетки от АФК и контроль клеточного гомеостаза осуществляются антиоксидантными ферментами, такими как супероксиддисмутаза, каталаза или глутатионпероксидаза (Murphy, 2009). Однако при различных патологических условиях клетки, подвергшиеся воздействию ишемии (гипоксии), либо химическому воздействию, сопровождающемуся нарушением функций митохондрий, генерируют избыточное количество АФК, которые не могут быть эффективно обезврежены этими антиоксидантными ферментами, что приводит к окислительному повреждению. В клетках, функции которых сопряжены с особенно высокими энергозатратами, усиление продукции АФК при стрессе запускает механизм восстановления функций митохондрий (Ahmad et al., 2014; Mahrouf-Yorgov et al., 2017). И наоборот, МСК, которые обычно выступают в роли доноров митохондрий, поддерживают свои митохондрии в неактивном состоянии и используют для поддержания энергетического баланса аэробный гликолиз (Paliwal et al., 2018), что снижает риск гиперпродукции АФК. Кроме того, МСК характеризуются высоким уровнем экспрессии супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы, контролирующих уровень AФK (Valle-Prieto, Conget, 2010). Во время дифференцировки стволовых клеток процессы окислительного фосфорилирования сопровождаются усилением митохондриального биогенеза и изменением морфологии митохондрий для удовлетворения повышенной потребности в энергии (Guo et al., 2020).

Было показано, что в условиях стресса повышенный уровень АФК вызывает фрагментацию митохондрий, их кластеризацию в перинуклеарной области, формирование митоптозных телец и последующий выброс митохондрий из клетки (Lyamzaev et al., 2008). Интересно, что транспорт нефункциональных митохондрий из поврежденных соматических клеток в присутствии антиоксиданта N-ацетил-Lцистеина в МСК был значительно подавлен (Mahrouf-Yorgov et al., 2017). Кроме того, ингибировались процессы активации НО-1 и митохондриального биогенеза в МСК, а также трансфера митохондрий из MCK в соматические клетки (Mahrouf-Yorgov et al., 2017). Поскольку митохондрии участвуют в синтезе гема, было сделано предположение, что АФК-индуцируемая трансмиттофагия поврежденных митохондрий в клетках-реципиентах сопровождается высвобождением гема в МСК, что приводит к активации в них сигнального пути HO-1 (Mahrouf-Yorgov et al., 2017).

Как известно, активация НО-1 стимулирует митохондриальный биогенез (MacGarvey et al., 2012), что сопровождается повышением экспрессии рецептора РРАРу (рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом) и митохондриального фактора транскрипции А в МСК. Вероятно, это способствует слиянию митохондрий и их последующему транспорту для устранения повреждений стрессированных соматических клеток (Mahrouf-Yorgov et al., 2017). Кроме того, в недавнем исследовании было подтверждено индуцирующее действие АФК на передачу митохондрий из гемопоэтических стволовых клеток к КМ-МСК (Mistry et al., 2019). Так, накопление АФК в гемопоэтических стволовых клетках, вызванное грамотрицательной бактериальной микрофлорой, активировало РІЗК-сигнальный путь и способствовало Сх43-опосредованному транспорту митохондрий из КМ-МСК в гемопоэтические стволовые клетки (Mistry et al., 2019). Интересно, что р53-зависимая активация сигнального пути Akt/PI3K/mTOR также была связана с формированием ТНТ, приводя к гиперпродукции TNFα. Похоже, существует тесная взаимосвязь между АФК и р53: АФК, вероятно, являются индуктором транспорта митохондрий в стрессированных клетках, а РІЗК может выступать в роли медиатора, опосредующего межклеточные взаимосвязи и, соответственно, процесс трансфера.

CD38, многофункциональный трансмембранный гликопротеин, известен как катализатор синтеза вторичных посредников Са²⁺-зависимого сигналинга, таких как циклическая АДФ-рибоза (Howard et al., 1993) и никотиновая кислота – адениндинуклеотидфосфат (Guse, Lee, 2008) из никотинамидадениндинуклеотида (НАД+) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАД Φ^+) соответственно. Эти реактивные метаболиты необходимы для мобилизации внутриклеточного кальция. Недавно было показано, что CD38 участвует в двух механизмах транспорта митохондрий (Hayakawa et al., 2016; Marlein et al., 2019). Так, в донорских астроцитах белок CD38 способствовал переносу митохондрий в соседние нейроны через микровезикулы (Hayakawa et al., 2016), тогда как в миеломных клетках реципиента СD38 стимулировал транспорт митохондрий из соседних костномозговых стволовых клеток через ТНТ (Marlein et al., 2019).

С одной стороны, экспрессия CD38 в астроцитах опосредуется глутаматом, высвобождаемым нейронами при сокультивировании клеток (Bruzzone et al., 2004), а избыточный глутамат стимулирует генерацию АФК в нейронах (Kritis et al., 2015), и таким образом, вероятно, что эксайтотоксическое воздействие глутамата в ишемизированных нейронах может быть потенциальным триггером транспорта митохондрий из соседних астроцитов. С другой стороны, известно, что CD38 усиливает адгезию клеток (Deaglio et al., 2000), и что экспрессия CD38 в миеломных клетках положительно коррелирует с заяко-

риванием ТНТ в сокультивируемых гемопоэтических стволовых клетках (Marlein et al., 2019), что доказывает взаимосвязь между экспрессией СD38 и прикреплением микротрубочек к мембранам. Несколько исследований продемонстрировали, что липополисахарид может индуцировать транспорт митохондрий (Islam et al., 2012; Yang et al., 2016; Morrison et al., 2017), а также увеличивать экспрессию CD38 (Lee et al., 2012). Таким образом, CD38, вероятно играет роль в запуске митохондриального транспорта, хотя остается еще немало вопросов в отношении специфической функции CD38 в этом процессе, в том числе в отношении его изоформы, присутствующей на митохондриальной мембране.

ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ РЕТИКУЛУМ (ЭР) ОПОСРЕДУЕТ ТРАНСПОРТ МИТОХОНДРИЙ

В настоящее время имеются свидетельства в пользу того, что ЭР тесно контактирует с митохондриями и играет критическую роль в регуляции биогенеза митохондрий в результате взаимодействия этих двух органелл (Rowland, Voeltz, 2012). Участки контакта, которые ЭР образует с митохондриями (MAMs), координируют множество процессов в этих органеллах, включая передачу кальциевых сигналов, синтез липидов и транспорт митохондрий внутри клетки (Rowland, Voeltz, 2012). Известно, что белок Mfn2 необходим для аксонального транспорта митохондрий, во время которого он взаимодействует с комплексом Miro/Milton в системе микротрубочек (Misko et al., 2010). Нокаут Mfn2 в нейронах вызывает дефекты аксонального транспорта (Misko et al., 2010). Принимая во внимание роль Mfn2 в прикреплении митохондрий к ЭР, можно предположить, что Mfn2 регулирует аксональный транспорт митохондрий через MAMs. В недавних экспериментах продемонстрирован транпорт митохондрий между остеоцитами через тубулиновые структуры их отростков, и для этого процесса требовались межклеточные контакты (Gao et al., 2019). Кроме того, транспорт митохондрий связан с функционированием ЭР (Gao et al., 2019). Ингибирование Mfn2 или другого белка, присутствующего в области контакта между ЭР и митохондриями – везикуло-ассоциированного мембранного белка В – значительно подавляло транспорт митохондрий в сети остеоцитов, что подтверждает важную роль сайтов контактирования ЭР и митохондрий в механизме переноса митохондрий (Gao et al., 2019).

Как микрофиламенты, так и микротрубочки являются основными компонентами цитоскелета (Vignais et al., 2017) и представляют собой наиболее распространенные пути межклеточного переноса митохондрий. В основе формирования ТНТ лежит процесс полимеризации актина, включающий удлинение микрофиламентов. Для транспорта митохондрий по аксонам нейронов (Misko et al., 2010) или по ТНТ (Ahmad et al., 2014; Babenko et al., 2015, 2018) не-

обходим белок Miro1, который взаимодействует с молекулярным мотором кинезином-1, вызывая перемещение митохондрий вдоль микротрубочек. Другое исследование показало, что ЭР, как и митохондрии, двигаются только по стабильным ацетилированным микротрубочкам (Friedman et al., 2010), при этом места контактов между ЭР и митохондриями сохраняются даже в процессе их морфологических изменений (Friedman et al., 2010). Кроме того, распределение ЭР внутри клеток зависит от расположения микротрубочек (Kimura et al., 2017). Возможно, что митохондрии образуют комплексы с ЭР и микротрубочками в процессе переноса по трубчатым структурам, а микрофиламенты обеспечивают структурную основу для транспорта митохондрий. Таким образом, вполне вероятно, что существует система координации микротрубочек, микрофиламентов и MAMs, облегчающая процесс транспорта митохондрий между клетками через каналоподобные мембранные структуры. Однако механизмы межклеточного трансфера митохондрий могут отличаться в клетках разных типов, поэтому остается пока неясным, являются ли микрофиламенты, микротрубочки и MAMs незаменимыми элементами для различных вариантов митохондриального транспорта.

ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ ИЗУЧЕНИЯ ТРАНСПОРТА МИТОХОНДРИЙ

Несмотря на то, что различные механизмы транспорта митохондрий описаны достаточно широко и имеют четкое физиологическое значение (например, регуляция гомеостаза и развития тканей), некоторые важные вопросы все еще остаются без ответа.

Очевидно, что механизм межклеточного транспорта митохондрий не универсален и имеет особенности в различных типах клеточных систем. Однако остается неясным, зависит ли тот или иной вариант митохондриального транспорта от типа клеток-доноров или клеток-реципиентов. Кроме того, непонятен механизм запуска каскада событий, приводящих к формированию ТНТ. В ряде исследований описаны сигнальные механизмы инициации образования ТНТ, исходящие от клеток-реципиентов (Hase et al., 2009; Wang et al., 2011; Sun et al., 2012; Jiang et al., 2016), тогда как другие исследования продемонстрировали, что процесс формирования ТНТ начинается в донорских клетках (Islam et al., 2012; Zhang et al., 2016). Интересно, что в клетках, формирующих синцитий, таких как остеоциты и астроциты, отростки могут рассматриваться как особая форма ТНТ, обеспечивающая транспорт митохондрий в сети. Однако каким образом митохондрии проходят через мембранные барьеры и доставляются к участкам контакта между двумя клетками, полностью не изучено.

Несмотря на имеющиеся сведения об участии белка щелевых контактов Cx43 в передаче митохондрий, маловероятно, что митохондрии могут напря-

мую проходить через такие узкие щелевые каналы. Скорее всего, Сх43 может выступать в качестве поверхности прикрепления к мембранным структурам двух клеток. Основываясь на описанной выше роли контакта между ЭР и митохондриями в транспорте митохондрий в остеоцитах (Gao et al., 2019), можно предположить, что ЭР также регулирует межклеточные процессы переноса митохондрий в ТНТ-опосредованных моделях, однако подробные механизмы этого феномена пока неясны. Например, неизвестно, как ЭР управляет движением митохондрий по микротрубочкам, что происходит с участком контакта ЭР-митохондрии до того, как митохондрии попадают в клетку-реципиент, участвует ли ЭР в прорыве мембранного барьера в местах контакта клеток и способствует ли движению митохондрий вдоль микротрубочек клеток. Известно, что трубчатая сеть ЭР тесно взаимодействует с плазматической мембраной, и MAMs играют решающую роль в передаче кальциевых сигналов и метаболизме липидов (Wu et al., 2018). Таким образом, весьма вероятно, что ЭР является ключевым медиатором доставки митохондрий из цитоплазмы к плазматической мембране в результате связывания митохондрий с его трубчатой сетью и дальнейшего прохождения через мембранные барьеры в участке контакта ЭР с плазматической мембраной. Эти процессы неизбежно будут включать изменения внутриклеточного ионного гомеостаза (особенно Ca²⁺) и липидного метаболизма в местах заякоривания митохондрий и ЭР в мембране, однако конкретные механизмы этих событий еше неясны.

Ранее было показано, что деградация подвергшихся стрессу митохондрий, полученных из поврежденных соматических клеток, необходима для активации сигнального пути НО-1 в здоровых МСК и транспорта функциональных митохондрий в стрессированные клетки для стимуляции в них митохондриального биогенеза (Mahrouf-Yorgov et al., 2017). В клетках, подвергшихся стрессу, поврежденные митохондрии подвергаются фрагментации и последующей митофагии (Zhu et al., 2018). Продемонстрировано, что участки контакта ЭР и митохондрий координируют деление митохондрий (Lewis et al., 2016), и можно предположить, что ЭР также участвует в деградации поврежденных митохондрий, однако многие аспекты этого механизма неизвестны. Неясно, например, транспортируется ли ЭР из стрессированных клеток вместе с поврежденными митохондриями вдоль микротрубочек. Поэтому необходимы дальнейшие исследования процессов деградации митохондрий и изучение ее роли в контроле качества митохондрий.

Известно, что подвижность митохондрий обычно коррелирует с изменениями в биогенезе митохондрий, которые приводят к изменениям внутриклеточного дыхательного метаболизма. Хотя усиление митохондриального биогенеза и процесса слияния митохондрий наблюдали в донорских МСК еще до

донирования митохондрий (Mahrouf-Yorgov et al., 2017), неясно, является ли такое изменение митохондриального биогенеза обязательным и необходимы для преобразования транспортированных митохондрий в клетках-реципиентах.

Поскольку дисфункция митохондрий лежит в основе гипоксически-ишемического повреждения тканей и ряда наследственных митохондриальных заболеваний, коррекция митохондриальных патологий представляется весьма перспективным направлением для уменьшения митохондриальной (энергетической) недостаточности. Однако эффективность существующих терапевтических стратегий, которые в основном сосредоточены на возобновлении функционирования дыхательной цепи митохондрий и модификации мтДНК, остается недостаточной (Patananan et al., 2016). Принимая во внимание то, что стволовые клетки являются наиболее распространенными кандидатами на донорство митохондрий (и такой механизм, вероятно, отчасти определяет терапевтический эффект трансплантированных стволовых клеток), актуальным является дальнейшее изучение механизмов передачи митохондрий в клетки-реципиенты с целью поиска способов ее усиления, что может явиться новой стратегией митохондриальной терапии. Учитывая, что спонтанный перенос митохондрий происходит и в физиологических условиях, обеспечивая поддержание гомеостаза тканей, усиление межклеточного транспорта митохондрий, вероятно, может лечь в основу лечения дегенеративных заболеваний в процессе старения, таких как болезнь Альцгеймера и остеопороз. Кроме того, процессы выброса и интернализации митохондрий позволяют проводить прямую изоляцию и трансплантацию митохондрий в терапевтических целях (Masuzawa et al., 2013; Caicedo et al., 2017). Тем не менее, остаются еще некоторые вопросы относительно наиболее подходящих типов клеток для донирования митохондрий, а также возможные этические проблемы (Caicedo et al., 2017). Несмотря на определенные трудности, некоторый прогресс был достигнут в повышении эффективности переноса изолированных митохондрий в клетки-реципиенты. Недавно (Maeda et al., 2020) митохондрии впервые были объединены с трансактиватором транскрипционного (ТАТ) белка из вируса иммунодефицита человека и декстраном, что значительно усилило проникновение изолированных митохондрий в клетки и произвело более выраженный терапевтический эффект от транспорта митохондрий в поврежденные кардиомиоциты. В комплексе ТАТ-декстран пептид ТАТ способствует поглощению митохондрий клетками-реципиентами, а декстран присоединяет комплекс к внешней мембране митохондрий.

В дальнейшем усилия исследователей могут быть сконцентрированы на оптимизации процесса выделения митохондрий и искусственной транспланта-

ции для повышения эффективности митохондриальной терапии.

Протекторное действие межклеточного транспорта митохондрий в опухолевом микроокружении в отношении выживаемости злокачественных клеток, подавление процесса накопления злокачественными клетками функциональных митохондрий из соседних здоровых клеток может стать новой стратегией для борьбы с опухолевой прогрессией и лекарственной устойчивостью. Например, совсем недавно показано, что даратумумаб (моноклональное антитело к CD38) может ингибировать прогрессирование острого миелоидного лейкоза с помощью механизма, включающего блокирование передачи митохондрий от МСК к миелобластам (Mistry et al., 2021). Поскольку клетки злокачественных опухолей характеризуются высоким уровнем метаболических процессов, необходимы дальнейшие исследования для изучения влияния захвата митохондрий на дыхательный метаболизм раковых клеток и разработки методов подавления митохондриального переноса в опухолевом микроокружении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Межклеточный транспорт митохондрий является универсальным биологическим событием, которое происходит как в физиологических, так и патологических условиях для синхронизации энергетического обмена (рис. 3), хотя многие детали этого процесса все еще остаются в значительной степени неясными. С терапевтической точки зрения актуальным является открытие новых аспектов этого механизма с целью усиления или подавления этого вида клеточной коммуникации для восстановления поврежденных тканей и поддержания энергетического гомеостаза. Дальнейшие исследования требуются для изучения характеристик стрессовых факторов, способных инициировать транспорт митохондрий, механизмов формирования межклеточных связей в различных моделях передачи митохондрий, изменений митохондриального биогенеза как в донорских, так и в реципиентных клетках, а также роли иных клеточных органелл и компартментов в межклеточном транспорте митохондрий. Лучшее понимание оптимальных условий для трансфера митохондрий открывает принципиально новые возможности как для фундаментальных исследований в области молекулярной биологии митохондриального транспорта, так и для научно-прикладных исследований по разработке подходов и методов трансплантации митохондрий для управления метаболизмом и адаптацией клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ 2547.2020.7).

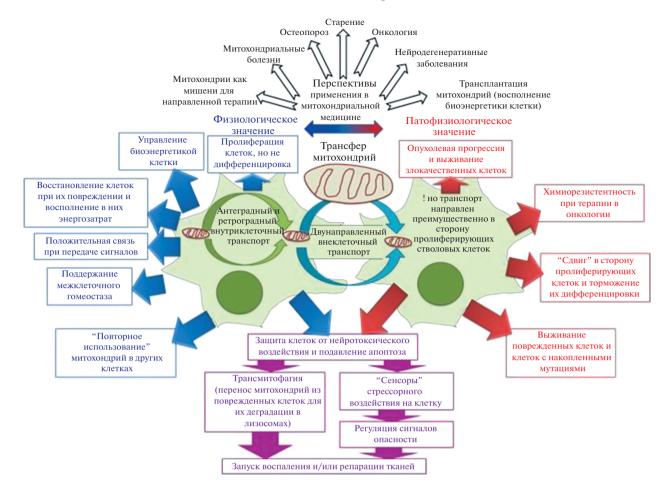


Рис. 3. Суммарное представление о физиологическом и патофизиологическом значении трансфера митохондрий в норме и при патологии и о потенциальных перспективах митохондриальной терапии.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не было экспериментов с участием животных или людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Acquistapace A., Bru T., Lesault P.-F., Figeac F., Coudert A.E., Coz O., Christov C., Baudin X., Auber F., Yiou R., Dubois-Randé J.-L., Rodriguez A.-M. 2011. Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. Stem Cells. V. 29. P. 812.
- Ahmad T., Mukherjee S., Pattnaik B., Kumar M., Singh S., Kumar M., Rehman R., Tiwari B.K., Jha K.A., Barhanpurkar A.P., Wani M.R., Roy S.S., Mabalirajan U., Ghosh B., Agrawal A. 2014. Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport and enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. EMBO J. V. 33. P. 994.

- Angelova P.R., Abramov A.Y. 2016. Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology. Free Rad. Biol. Med. V. 100. P. 81.
- Austefjord M.W., Gerdes H.H., Wang X. 2014. Tunneling nanotubes: Diversity in morphology and structure. Commun. Integr. Biol. V. 7. P. e27934. https://doi.org/10.4161/cib.27934
- Babenko V.A., Silachev D.N., Popkov V.A., Zorova L.D., Pevzner I.B., Plotnikov E.Y., Sukhikh G.T., Zorov D.B. 2018.
 Miro1 enhances mitochondria transfer from multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) to neural cells and improves the efficacy of cell recovery. Molecules. V. 23. P. 687.
- Babenko V.A., Silachev D.N., Zorova L.D., Pevzner I.B., Khutornenko A.A., Plotnikov E.Y., Sukhikh G.T., Zorov D.B. 2015. Improving the post-stroke therapeutic potency of mesenchymal multipotent stromal cells by cocultivation with cortical neurons: The role of crosstalk between cells. Stem Cells Transl. Med. V. 4. P. 1011.
- *Ballinger S.W.* 2005. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. Free Rad. Biol. Med. V. 38. P. 1278.
- Bartz R.R., Suliman H.B., Piantadosi C.A. 2015. Redox mechanisms of cardiomyocyte mitochondrial protection. Front. Physiol. V. 6. P. 291.

- Boudreau L.H., Duchez A.-C., Cloutier N., Soulet D., Martin N.,
 Bollinger J., Paré A., Rousseau M., Naika G.S., Lévesque T.,
 Laflamme C., Marcoux G., Lambeau G., Farndale R.W.,
 Pouliot M., et al. 2014. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. Blood. V. 124.
 P. 2173.
- Boukelmoune N., Chiu G.S., Kavelaars A., Heijnen C.J. 2018. Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells to neural stem cells protects against the neurotoxic effects of cisplatin. Acta Neuropathol. Commun. V. 6. P. 139.
- Bruzzone S., Verderio C., Schenk U., Fedele E., Zocchi E., Matteoli M., De Flora A. 2004. Glutamate-mediated overexpression of CD38 in astrocytes cultured with neurones. J. Neurochem. V. 89. P. 264.
- Bukoreshtliev N.V., Wang X., Hodneland E., Gurke S., Barroso J.F.V., Gerdes H.-H. 2009. Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. FEBS Lett. V. 583. P. 1481.
- Caicedo A., Aponte P.M., Cabrera F., Hidalgo C., Khoury M. 2017. Artificial mitochondria transfer current challenges, advances, and future applications. Stem Cells Int. V. 2017. P. 7610414. https://doi.org/10.1155/2017/7610414
- Chang C.-Y., Liang M.-Z., Chen L. 2019. Current progress of mitochondrial transplantation that promotes neuronal regeneration. Transl. Neurodegener. V. 8. P. 17.
- Chen Y., Liu K., Shi Y., Shao C. 2018. The tango of ROS and p53 in tissue stem cells. Cell Death Differ. V. 25. P. 637.
- Chiu G.S., Maj M.A., Rizvi S., Dantzer R., Vichaya E.G., Laumet G., Kavelaars A., Heijnen C.J. 2017. Pifithrin-µ prevents cisplatin-induced chemobrain by preserving neuronal mitochondrial function. Cancer Res. V. 77. P. 742.
- Chou S.H., Lan J., Esposito E., Ning M., Balaj L., Ji X., Lo E.H., Hayakawa K. 2017. Extracellular mitochondria in cerebrospinal fluid and neurological recovery after subarachnoid hemorrhage. Stroke. V. 48. P. 2231.
- Chuang Y.-C., Liou C.-W., Chen S.-D., Wang P.-W., Chuang J.-H., Tiao M.-M., Hsu T.-Y., Lin H.-Y., Lin T.-K. 2017. Mitochondrial transfer from Wharton's jelly mesenchymal stem cell to MERRF cybrid reduces oxidative stress and improves mitochondrial bioenergetics. Oxid. Med. Cell. Longev. V. 2017. P. 5691215. https://doi.org/10.1155/2017/5691215
- Clark M.A., Shay J.W. 1982. Mitochondrial transformation of mammalian cells. Nature. V. 295. P. 605.
- Cselenyak A., Pankotai E., Horvath E.M., Kiss L., Lacza Z. 2010. Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an *in vitro* ischemia model via direct cell-to-cell connections. BMC Cell Biol. V. 11. P. 29.
- Davis C.O., Kim K.-Y., Bushong E.A., Mills E.A., Boassa D., Shih T., Kinebuchi M., Phan S., Zhou Y., Bihlmeyer N.A., Nguyen J.V., Jin Y., Ellisman M.H., Marsh-Armstrong N. 2014. Transcellular degradation of axonal mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 111. P. 9633.
- Deaglio S., Mallone R., Baj G., Arnulfo A., Surico N., Dianzani U., Mehta K., Malavasi F. 2000. CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes. Chem. Immunol. V. 75. P. 99.
- Emani S.M., Piekarski B.L., Harrild D., Del Nido P.J., McCully J.D. 2017. Autologous mitochondrial transplantation for dys-

- function after ischemia-reperfusion injury. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. V. 154. P. 286.
- English K., Shepherd A., Uzor N.-E., Trinh R., Kavelaars A., Heijnen C.J. 2020. Astrocytes rescue neuronal health after cisplatin treatment through mitochondrial transfer. Acta Neuropathol. Commun. V. 8. P. 36.
- Friedman J.R., Webster B.M., Mastronarde D.N., Verhey K.J., Voeltz G.K. 2010. ER sliding dynamics and ER—mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. J. Cell Biol. V. 190. P. 363.
- Galluzzi L., Kepp O., Kroemer G. 2012. Mitochondria: Master regulators of danger signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. V. 13. P. 780.
- Gao J., Qin A., Liu D., Ruan R., Wang Q., Yuan J., Cheng T.S., Filipovska A., Papadimitriou J.M., Dai K., Jiang Q., Gao X., Feng J.Q., Takayanagi H., Zhang C., Zheng M.H. 2019. Endoplasmic reticulum mediates mitochondrial transfer within the osteocyte dendritic network. Sci. Adv. V. 5. P. eaaw7215. https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw7215
- Gollihue J.L, Patel S.P., Eldahan K.C., Cox D.H., Donahue R.R., Taylor B.K., Sullivan P.G., Rabchevsky A.G. 2018. Effects of mitochondrial transplantation on bioenergetics, cellular incorporation, and functional recovery after spinal cord injury. J. Neurotrauma. V. 35. P. 1800.
- Gorman G.S., Chinnery P.F., DiMauro S., Hirano M., Koga Y., McFarland R., Suomalainen A., Thorburn D.R., Zeviani M., Turnbull D.M. 2009. Mitochondrial diseases. Nat. Rev. Dis. Prim. V. 2. P. 16080. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80
- Grassi D., Howard S., Zhou M., Diaz-Perez N., Urban N.T., Guerrero-Given D., Kamasawa N., Volpicelli-Daley L.A., LoGrasso P., Lasmézas C.I. 2018. Identification of a highly neurotoxic alpha-synuclein species inducing mitochondrial damage and mitophagy in Parkinson's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 115. P. E2634.
- Guescini M., Genedani S., Stocchi V., Agnati L.F. 2010. Astrocytes and glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. J. Neural. Transm. V. 117. P. 1.
- Guo Y., Chi X., Wang Y., Heng B.C., Wei Y., Zhang X., Zhao H., Yin Y., Deng X. 2020. Mitochondria transfer enhances proliferation, migration, and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cell and promotes bone defect healing. Stem Cell Res. Ther. V. 11. P. 245.
- Guse A.H., Lee H.C. 2008. NAADP: A universal Ca²⁺ trigger. Sci. Signal. V. 1. P. re10.
- Hase K., Kimura S., Takatsu H., Ohmae M., Kawano S., Kitamura H., Ito M., Watarai H., Hazelett C.C., Yeaman C., Ohno H. 2009. M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. Nat. Cell Biol. V. 11. P. 1427.
- Hayakawa K., Chan S.J., Mandeville E.T., Park J.H., Bruzzese M., Montaner J., Arai K., Rosell A., Lo E.H. 2018. Protective effects of endothelial progenitor cell-derived extracellular mitochondria in brain endothelium. Stem Cells. V. 36. P. 1404.
- Hayakawa K., Esposito E., Wang X., Terasaki Y., Liu Y., Xing Ch., Ji X., Lo E.H. 2016. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. Nature. V. 535. P. 551.
- He K., Shi X., Zhang X., Dang S., Ma X., Liu F., Xu M., Lv Z., Han D., Fang X., Zhang Y. 2011. Long-distance intercellular connectivity between cardiomyocytes and cardiofibro-

- blasts mediated by membrane nanotubes. Cardiovasc. Res. V. 92, P. 39.
- Howard M., Grimaldi J.C., Bazan J.F., Lund F.E., Santos-Argumedo L., Parkhouse R.M., Walseth T.F., Lee H.C. 1993. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. Science. V. 262. P. 1056.
- Huang L., Reis C., Boling W.W., Zhang J.H. 2020. Stem cell therapy in brain ischemia: The role of mitochondrial transfer. Stem Cells Dev. V. 29. P. 555.
- Islam M.N., Das S.R., Emin M.T., Wei M., Sun L., Westphalen K., Rowlands D.J., Quadri S.K., Bhattacharya S., Bhattacharya J. 2012. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. Nat. Med. V. 18. P. 759.
- Jiang D., Gao F., Zhang Y., Wong D.S.H., Li Q., Tse H.-F., Xu G., Yu Z., Lian Q. 2016. Mitochondrial transfer of mesenchymal stem cells effectively protects corneal epithelial cells from mitochondrial damage. Cell Death Dis. V. 7. P. e2467.
 - https://doi.org/10.1038/cddis.2016.358
- Kimura K., Mamane A., Sasaki T., Sato K., Takagi J., Niwayama R., Hufnagel L., Shimamoto Y., Joanny J.-F., Uchida S., Kimura A. 2017. Endoplasmic-reticulum-mediated microtubule alignment governs cytoplasmic streaming. Nat. Cell Biol. V. 19. P. 399.
- *Kourembanas S.* 2015. Exosomes: Vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. Annu. Rev. Physiol. V. 77. P. 13.
- Kritis A.A., Stamoula E.G., Paniskaki K.A., Vavilis T.D. 2015. Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines: A comparative/collective analysis/study. Front. Cell Neurosci. V. 9. P. 91.
- Krysko D.V., Agostinis P., Krysko O., Garg A.D., Bachert C., Lambrecht B.N., Vandenabeele P. 2011. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. Trends Immunol. V. 32. P. 157.
- Lee C.U., Song E.K., Yoo C.H., Kwak Y.K., Han M.K. 2012. Lipopolysaccharide induces CD38 expression and solubilization in J774 macrophage cells. Mol. Cells. V. 34. P. 573.
- Lewis S.C., Uchiyama L.F., Nunnari J. 2016. ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. Science. V. 353. P. aaf5549.
- Li C.J., Chen P.K., Sun L.Y., Pang C.Y. 2017. Enhancement of mitochondrial transfer by antioxidants in human mesenchymal stem cells. Oxid. Med. Cell. Longev. V. 2017. P. 8510805.
 - https://doi.org/10.1155/2017/8510805
- Li H., Wang C., He T., Zhao T., Chen Y.-Y., Shen Y.-L., Zhang X., Wang L.-L. 2019. Mitochondrial transfer from bone marrow mesenchymal stem cells to motor neurons in spinal cord injury rats via gap junction. Theranostics. V. 9. P. 2017.
- Lin H.-Y., Liou C.-W., Chen S.-D., Hsu T.-Y., Chuang J.-H., Wang P.-W., Huang S.-T., Tiao M.-M., Chen J.-B., Lin T.-K., Chuang Y.-C. 2015. Mitochondrial transfer from Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells to mitochondria-defective cells recaptures impaired mitochondrial function. Mitochondrion. V. 22. P. 31.
- Liu D., Gao Y., Liu J., Huang Y., Yin J., Feng Y., Shi L., Meloni B.P., Zhang C., Zheng M., Gao J. 2021. Intercellular mitochondrial transfer as a means of tissue revitalization. Signal Transduct. Target Ther. V. 6. P. 65.

- Liu K., Ji K., Guo L., Wu W., Lu H., Shan P., Yan C. 2014. Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. Microvasc. Res. V. 92. P. 10.
- Lyamzaev K.G., Nepryakhina O.K., Saprunova V.B., Bakeeva L.E., Pletjushkina O.Yu., Chernyak B.V., Skulachev V.P. 2008. Novel mechanism of elimination of malfunctioning mitochondria (mitoptosis): formation of mitoptotic bodies and extrusion of mitochondrial material from the cell. Biochim. Biophys. Acta. V. 1777. P. 817.
- Ma L., Hua R., Tian Y., Cheng H., Fajardo R.J., Pearson J.J., Guda T., Shropshire D.B., Gu S., Jiang J.X. 2019. Connexin 43 hemichannels protect bone loss during estrogen deficiency. Bone Res. V. 7. P. 11.
- MacGarvey N.C., Suliman H.B., Bartz R.R., Fu P., Withers C.M., Welty-Wolf K.E., Piantadosi C.A. 2012. Activation of mitochondrial biogenesis by heme oxygenase-1-mediated NF-E2-related factor-2 induction rescues mice from lethal Staphylococcus aureus sepsis. Am. J. Resp. Crit. Care Med. V. 185. P. 851.
- Maeda A., Fadeel B. 2014. Mitochondria released by cells undergoing TNF-α-induced necroptosis act as danger signals. Cell Death Dis. V. 5. P. e1312. https://doi.org/10.1038/cddis.2014.277
- Maeda H., Kami D., Maeda R., Murata Y., Jo J.-I., Kitani T., Tabata Y., Matoba S., Gojo S. 2020. TAT-dextran-mediated mitochondrial transfer enhances recovery from models of reperfusion injury in cultured cardiomyocytes. J. Cell. Mol. Med. V. 24. P. 5007.
- Mahrouf-Yorgov M., Augeul L., Crola Da Silva C., Jourdan M., Rigolet M., Manin S., Ferrera R., Ovize M., Henry A., Guguin A., Meningaud J.-P., Dubois-Randé J.-L., Motterlini R., Foresti R., Rodriguez A.-M. 2017. Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties. Cell Death Differ. V. 24. P. 1224.
- Marlein C.R., Piddock R.E., Mistry J.J., Zaitseva L., Hellmich C., Horton R.H., Zhou Z., Auger M.J., Bowles K.M., Rushworth S.A. 2019. CD38-driven mitochondrial trafficking promotes bioenergetic plasticity in multiple myeloma. Cancer Res. V. 79. P. 2285.
- Masuzawa A., Black K.M., Pacak C.A., Ericsson M., Barnett R.J., Drumm C., Seth P., Bloch D.B., Levitsky S., Cowan D.B., McCully J.D. 2013. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. V. 304. P. H966.
- Misko A., Jiang S., Wegorzewska I., Milbrandt J., Baloh R.H. 2010. Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. J. Neurosci. V. 30. P. 4232.
- Mistry J.J., Marlein C.R., Moore J.A., Hellmich C., Wojtowicz E.E., Smith J.G.W., Macaulay I., Sun Y., Morfakis A., Patterson A., Horton R.H., Divekar D., Morris C.J., Haestier A., Di Palma F., et al. 2019. ROS-mediated PI3K activation drives mitochondrial transfer from stromal cells to hematopoietic stem cells in response to infection. Proc. Natl Acad. Sci. USA. V. 116. P. 24610.
- Mistry J.J., Moore J.A., Kumar P., Marlein C.R., Hellmich C., Pillinger G., Jibril A., Di Palma F., Collins A., Bowles K.M., Rushworth S.A. 2021. Daratumumab inhibits acute myeloid leukaemia metabolic capacity by blocking mitochondrial

- transfer from mesenchymal stromal cells. Haematologica. V. 106. P. 589.
- Mittelbrunn M., Sanchez-Madrid F. 2012. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. V. 13. P. 328.
- Mohammadalipour A., Dumbali S.P., Wenzel P.L. 2020. Mitochondrial transfer and regulators of mesenchymal stromal cell function and therapeutic efficacy. Front. Cell Dev. Biol. V. 8. P. 603292. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.603292
- Morancho A., Ma F., Barceló V., Giralt D., Montaner J., Rosell A. 2015. Impaired vascular remodeling after endothelial progenitor cell transplantation in MMP9-deficient mice suffering cortical cerebral ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab. V. 35. P. 1547.
- *Morris R.L., Hollenbeck P.J.* 1993. The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. J. Cell Sci. V. 104. P. 917.
- Morrison T.J., Jackson M.V., Cunningham E.K., Kissenpfennig A., McAuley D.F., O'Kane C.M., Krasnodembskaya A.D. 2017. Mesenchymal stromal cells modulate macrophages in clinically relevant lung injury models by extracellular vesicle mitochondrial transfer. Am. J. Respir. Crit. Care Med. V. 196. P. 1275.
- Murphy M.P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem. J. V. 417. P. 1.
- Murray L.M.A., Krasnodembskaya A.D. 2019. Concise review: Intercellular communication via organelle transfer in the biology and therapeutic applications of stem cells. Stem Cells, V. 37. P. 14.
- Nakajima A., Kurihara H., Yagita H., Okumura K., Nakano H. 2008. Mitochondrial extrusion through the cytoplasmic vacuoles during cell death. J. Biol. Chem. V. 283. P. 24128.
- Nitzan K., Benhamron S., Valitsky M., Kesner E.E., Lichtenstein M., Ben-Zvi A., Ella E., Segalstein Y., Saada A., Lorberboum-Galski H., Rosenmann H. 2019. Mitochondrial transfer ameliorates cognitive deficits, neuronal loss, and gliosis in Alzheimer's disease mice. J. Alzheimers Dis. V. 72. P. 587.
- Onfelt B., Nedvetzki S., Yanagi K., Davis D.M. 2004. Cutting edge: membrane nanotubes connect immune cells. J. Immunol. V. 173. P. 1511.
- Osswald M., Jung E., Sahm F., Solecki G., Venkataramani V., Blaes J., Weil S., Horstmann H., Wiestler B., Syed M., Huang L., Ratliff M., Karimian Jazi K., Kurz F.T., Schmenger T. et al. 2015. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. Nature. V. 528. P. 93.
- Paliwal S., Chaudhuri R., Agrawal A., Mohanty S. 2018. Regenerative abilities of mesenchymal stem cells through mitochondrial transfer. J. Biomed. Sci. V. 25. P. 31.
- Patananan A.N., Wu T.H., Chiou P.Y., Teitell M.A. 2016. Modifying the mitochondrial genome. Cell Metab. V. 23. P. 785.
- Payne T.R., Oshima H., Sakai T., Ling Y., Gharaibeh B., Cummins J., Huard J. 2005. Regeneration of dystrophin-expressing myocytes in the mdx heart by skeletal muscle stem cells. Gene Ther. V. 12. P. 1264.
- Phinney D.G., Di Giuseppe M., Njah J., Sala E., Shiva S., St Croix C.M., Stolz D.B., Watkins S.C., Di Y.P., Leikauf G.D., Kolls J., Riches D.W., Deiuliis G., Kaminski N., Boregowda S.V., McKenna D.H., Ortiz L.A. 2015. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. Nat. Commun. V. 6. P. 8472.

- Plotnikov E. Y., Khryapenkova T.G., Galkina S.I., Sukhikh G.T., Zorov D.B. 2010. Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture. Exp. Cell Res. V. 316. P. 2447.
- Rafelski S.M. 2013. Mitochondrial network morphology: building an integrative, geometrical view. BMC Biol. 2013. V. 11. P. 71.
- Rodriguez A.-M., Nakhle J., Griessinger E., Vignais M.-L. 2018. Intercellular mitochondria trafficking highlighting the dual role of mesenchymal stem cells as both sensors and rescuers of tissue injury. Cell Cycle. V. 17. P. 712.
- Rostami J., Holmqvist S., Lindström V., Sigvardson J., Westermark G.T., Ingelsson M., Bergström J., Roybon L., Erlandsson A. 2017. Human astrocytes transfer aggregated alphasynuclein via tunneling nanotubes. J. Neurosci. V. 37. P. 11835.
- Rowland A.A., Voeltz G.K. 2012. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: Function of the junction. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. V. 13. P. 607.
- Rustom A., Saffrich R., Markovic I., Walther P., Gerdes H.H. 2004. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. Science. V. 303. P. 1007.
- Shen J., Zhang J.-H., Xiao H., Wu J.-M., He K.-M., Lv Z.-Z., Li Z.-J., Xu M., Zhang Y.-Y. 2018. Mitochondria are transported along microtubules in membrane nanotubes to rescue distressed cardiomyocytes from apoptosis. Cell Death Dis. V. 9. P. 81.
- Sinclair K.A., Yerkovich S.T., Hopkins P.M., Chambers D.C. 2016. Characterization of intercellular communication and mitochondrial donation by mesenchymal stromal cells derived from the human lung. Stem Cell Res. Ther. V. 7. P. 91.
- Spees J.L., Olson S.D., Whitney M.J., Prockop D.J. 2006. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. Proc. Natl Acad. Sci. USA. V. 103. P. 1283.
- Sun X., Wang Y., Zhang J., Tu J., Wang X.-J., Su X.-D., Wang L., Zhang Y. 2012. Tunneling-nanotube direction determination in neurons and astrocytes. Cell Death Dis. V. 3. P. e438.
- Torralba D., Baixauli F., Sánchez-Madrid F. 2016. Mitochondria know no boundaries: mechanisms and functions of intercellular mitochondrial transfer. Front. Cell Dev. Biol. V. 4. P. 107.
- Valdinocci D., Simões R.F., Kovarova J., Cunha-Oliveira T., Neuzil J., Pountney D.L. 2019. Intracellular and intercellular mitochondrial dynamics in Parkinsonas disease. Front. Neurosci. V. 13. P. 930.
- Vallabhaneni K.C., Haller H., Dumler I. 2012. Vascular smooth muscle cells initiate proliferation of mesenchymal stem cells by mitochondrial transfer via tunneling nanotubes. Stem Cells Dev. V. 21. P. 3104.
- Valle-Prieto A., Conget P.A. 2010. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. Stem Cells Dev. V. 19. P. 1885.
- Vignais M.L., Caicedo A., Brondello J.M., Jorgensen C. 2017. Cell connections by tunneling nanotubes: Effects of mitochondrial trafficking on target cell metabolism, homeostasis, and response to therapy. Stem Cells Int. V. 2017. P. 6917941. https://doi.org/10.1155/2017/6917941
- Wang J., Liu X., Qiu Y., Shi Y., Cai J., Wang B., Wei X., Ke Q., Sui X., Wang Y., Huang Y., Li H., Wang T., Lin R., Liu Q., Xiang A.P. 2018. Cell adhesion-mediated mitochondria

- transfer contributes to mesenchymal stem cell-induced chemoresistance on T cell acute lymphoblastic leukemia cells. J. Hematol. Oncol. V. 11. P. 11.
- Wang Y., Cui J., Sun X., Zhang Y. 2011. Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. Cell Death Differ. V. 18. P. 732.
- Wefel J.S., Schagen S.B. 2012. Chemotherapy-related cognitive dysfunction. Curr. Neurol. Neurosci. Rep. V. 12. P. 267.
- Wu H., Carvalho P., Voeltz G.K. 2018. Here, there, and everywhere: the importance of ER membrane contact sites. Science. V. 361. P. eaan5835.
- Yang H., Borg T.K., Ma Z., Xu M., Wetzel G., Saraf L.V., Markwald R., Runyan R.B., Gao B.Z. 2016. Biochip-based study of unidirectional mitochondrial transfer from stem cells to

- myocytes via tunneling nanotubes. Biofabrication. V. 8. P. 015012.
- https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/1/015012
- Zhang Y., Yu Z., Jiang D., Liang X., Liao S., Zhang Z., Yue W., Li X., Chiu S.-M., Chai Y.-H., Liang Y., Chow Y., Han S., Xu A., Tse H.-F., Lian Q. 2016. iPSC-MSCs with high intrinsic MIRO1 and sensitivity to TNF-α yield efficacious mitochondrial transfer to rescue anthracycline-induced cardiomyopathy. Stem Cell Rep. V. 7. P. 749.
- Zhu T., Chen J.L., Wang Q., Shao W., Qi B. 2018. Modulation of mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases: An insight into prion diseases. Front. Aging Neurosci. V. 10. P. 336.

Intercellular Mitochondrial Transfer: Molecular Mechanisms and Role in Maintaining the Energy Homeostasis in Tissues

Yu. A. Uspenskaya^{a, b, *}, N. A. Malinovskaya^a, and A. B. Salmina^{a, c}

^a Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022 Russia

^b Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, 660049 Russia
 ^c Division of Brain Sciences, Research Center of Neurology, Moscow, 125367 Russia
 *e-mail: yulia.uspenskaya@mail.ru

Mitochondria determine cell metabolism and cell survival and frequently undergo structural and positional changes when responding to various stresses and impaired energy homeostasis. In addition to intracellular movement, intercellular transfer of mitochondria is of great importance. Intercellular mitochondrial transfer occurs both under physiological conditions and in pathology being accompanied with restoration of stressed cells and structural and functional alterations caused by mitochondrial dysfunction. This review summarizes the latest data obtained in this field and provides an overview of the molecular mechanisms of mitochondrial intercellular transport and its potential role in maintaining energy homeostasis in tissues. In addition, future directions in the study of mitochondrial transfer for mitochondria-targeted therapy of several diseases are discussed.

Keywords: mitochondria, intercellular transfer, mitochondrial dysfunction, mitochondrial biogenesis, mitochondrial therapy, tissue homeostasis

УДК 573.7:616-006

РОЛЬ ВНЕ- И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ЗНАЧЕНИЯ **р**Н В РЕГУЛЯЦИИ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА

© 2021 г. В. А. Кобляков*

Научно-исследовательский медицинский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115478 Россия *E-mail: kobliakov@rambler.ru

Поступила в редакцию 02.08.2021 г. После доработки 10.08.2021 г. Принята к публикации 10.08.2021 г.

В обзоре приводятся и обсуждаются данные о роли изменения рН вне- и внутри клетки, вызванного аэробным гликолизом в опухолевой ткани. По сравнению с нормальной тканью в опухоли происходит подкисление межклеточного пространства и увеличение рН внутри клеток опухоли. Основным фактором регуляции гликолиза является транскрипционный фактор HIF α . Изменения величины рН связано с тем, что конечным продуктом превращения глюкозы становится не пируват, а лактат. Лактат транспортируется через клеточную мембрану и подкисляет межклеточное пространство. Кроме того, фактор HIF α вызывает транскрипцию ряда протонных помп и матриксных протеиназ, которые активируются в кислой среде межклеточного пространства. Происходит разрушение межклеточного матрикса, что дает клеткам опухоли возможность инвазии. Подкисление межклеточного пространства благодаря функционированию протонных помп вызывает увеличение рН внутри клеток. Повышение внутриклеточного рН стимулирует ускоренное прохождение клетками фазы G_2 клеточного цикла. Обсуждаются молекулярные механизмы этого процесса. Делается заключение, что основные факторы опухолевого процесса — инвазия, ускоренная пролиферация, нестабильность генома — обусловлены аэробным гликолизом (эффектом Варбурга).

Ключевые слова: гликолиз, HIFa, инвазия, злокачественный рост, протеиназы, пролиферация

DOI: 10.31857/S0041377121060079

В настоящее время большое количество публикаций связно с понятием "перепрограммирование опухолевых клеток". Под этим термином понимается существование в опухолевых клетках отличной от нормальных клеток системы регуляции функционирования клеточных процессов. Исторически сложилось так, что первым описанным различием в функционировании нормальных и опухолевых клеток стало показанное Варбургом наличие гликолиза в опухолевых клетках при нормальном уровне кислорода (Warburg et al., 1924; Lu et al., 2002). Варбург считал, что переход на гликолиз обусловлен поломками в опухолевых клетках функционирования митохондрий, что влечет за собой и другие изменения функций клеток, ведущих в конечном итоге к развитию опухоли. Согласно современным представлениям, переход на аэробный гликолиз опухолевых клеток, как правило, не связан с нарушением митохондриальных функций, а основным фактором развития опухоли являются неконтролируемое функционирование онкогенов и (или) нарушения в структуре генов-супрессоров.

В нормальных клетках переход на гликолиз происходит в условиях гипоксии. Различие превращения глюкозы при нормоксии и гипоксии связано с тем, что при нормоксии основным конечным продуктом превращения глюкозы является пируват (рис. 1), транспортируемый в митохондрии пируватдегидрогеназным комплексом и под воздействием пируватдегидрогеназы превращаемый в ацетилкоэнзим А. Ацетилкоэнзим А является важным элементом цикла Кребса. При гипоксии экспрессируется, во-первых, фермент пируватдегидрогеназы киназа, которая фосфорилирует пируватдегидрогеназу, инактивируя ее (Кіm et al., 2006), а во-вторых, лактатдегидрогеназа А, которая превращает пируват в лактат (рис. 1).

Механизм перехода клеток при гипоксии на гликолиз хорошо изучен. Показано, что основным элементом этого события является функционирование транскрипционного фактора ΗΙΓα. При нормоксии этот белок окисляется по остаткам пролина в положении 402 и 405 ферментом пролилоксидазой (Benizri et al., 2003; Cash et al., 2007). Окисленный НІГα взаимодействует с убиквитинлигазой VHL и направляется в протеосомы, где разрушается (см. обзоры: Lee et al., 2007; Кобляков, 2010). При гипоксии в комплексе 3 дыхательной цепи митохондрий образуются активные формы кислорода в форме супероксидного аниона и пероксида водорода (Chandel et al., 2000; Lee et al., 2016). Активированные формы кислорода выходят из митохондрий, взаимодействуют с сульфгидрильными группами пролилоксидазы, блокируя активность фермента. В результате происходит накопление белка НІГа, который взаимодействует с другим компонентом транскрипционного комплекса – белком HIFβ (другое название ARNT), уровень

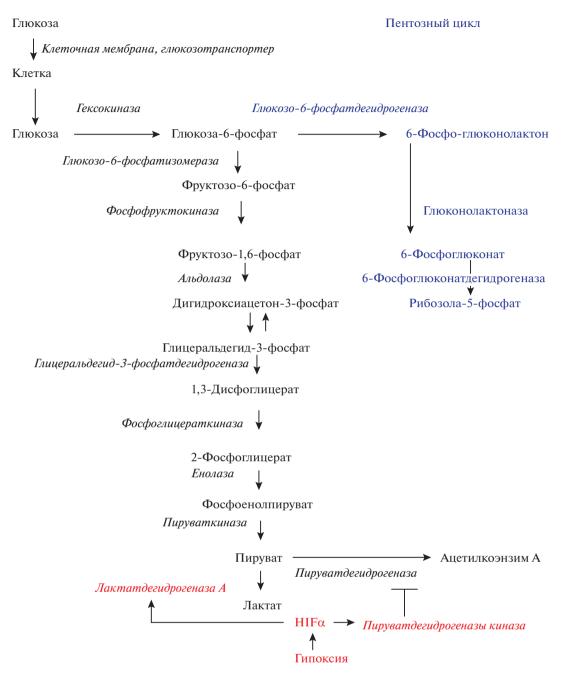


Рис. 1. Регуляция гликолиза. Глюкоза через клеточную мембрану транспортируется глюкозотранспортером внутрь клетки. Под действием гексокиназы образуется глюкоза-6-фосфат, который под действием глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы направляется в пентозный цикл, или под действием глюкозо-6-фосфатизомеразы и других ферментов превращается в пируват. Пируват под действием пируватдегидрогеназы превращается в ацетилкоэнзим А и напраляется в цикл Кребса. В условиях гипоксии транскрипционный фактор НІГо вызывает синтез пируватдегидрогеназы киназы, которая ингибирует пируватдегидрогеназу и препятствует образованию ацетилкоэнзима А. Под действием лактатдегидрогеназы А пируват превращается в лактат.

которого в клетке постоянен. Активируемые этим транскрипционным комплексом гены синтезируют белки гликолиза, которые усиливают процесс превращения глюкозы. Синтезируется пируватдегидрогеназа киназа, блокирующая превращение пирувата в коэнзим А, благодаря дезактивации пируватдегидрогеназы (Кіт et al., 2006). Экспрессируется лактатдегидрогеназа А, превращающая пируват в лактат. В

результате, конечным продуктом превращения глюкозы становится не пируват, а лактат (рис. 1). Одновременно активируются гены, кодирующие монокарбоксилат-транспортеры, транспортирующие лактат вместе с протоном в межклеточное пространство. Помимо синтеза этих ферментов гликолиза, комплекс $HIF\alpha-HIF\beta$ транскрибирует экспрессию большого количество других генов, белки которых, так или

иначе, участвуют в развитии опухолевого процесса. В настоящее время показано, что комплекс $HIF\alpha$ — $HIF\beta$ влияет на транскрипцию более 200 генов.

Анализ механизма действия различных онкогенов приводит к заключению, что синтезируемые ими онкобелки способны вызывать активацию аэробного гликолиза по различным механизмам, вызывая в конечном итоге стабилизацию и накопление НІГа (Кобляков, 2019). Одним из следствий функционирования НІГа является изменение рН в опухолевой ткани при анаэробном гликолизе. Происходят изменения рН как внутри, так и вне клеточного пространства.

В представленном обзоре анализируются механизмы изменения рН в опухолевой ткани, и делается заключение, что такие важные свойства опухолевого роста, как инвазия, нестабильность генома и повышенная пролиферативная активность обусловлены изменениями рН как внутри клеток опухоли, так и в межклеточном пространстве опухоли.

ЗНАЧЕНИЯ pH ВНУТРИ И ВНЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Одним из последствий перехода опухолевых клеток на гликолиз является изменение величины как внутриклеточного, так и внеклеточного рН. Переход клеток на гликолиз должен был бы понизить значение внутриклеточного рН благодаря образованию органических кислот в процессе гликолиза. Однако наблюдается обратная картина: в нормальных клетках при нормоксии различие между внутриклеточным и внеклеточным рН небольшое: незначительное превышение рН внеклеточного (~7.4) по сравнению с внутриклеточным (~7.2). В опухолевых клетках разброс между внутриклеточными (≥7.4) и внеклеточными (≤6.9) значениями рН значительно выше и наблюдается обратная картина: внутри клетки величина рН более щелочная, чем вне клетки. Считается, что изменение рН в опухолевой ткани является одним из самых ранних показателей опухолевой трансформации (Reshkin et al., 2000; Harguindey et al., 2013).

Связано это с тем, что в опухолевых клетках, блафункционированию транскрипционного фактора ΗΙΓα, синтезируются различные протонные помпы, которые выбрасывают протоны в межклеточное пространство, создавая протонный градиент между уровнем рН внутри и вне клетки. НІГа активирует следующие протонные помпы: монокарбоксилат-транспортеры, выводящие из клетки лактат вместе с протоном, карбоновые ангидразы, катализирующие образование протона при взаимодействии двуокиси углерода с водой в межклеточном пространстве (по схеме: $CO_2 + H_2O \rightarrow HCO_3^- + H^+$) и трансмембранный Na⁺/H⁺ обменник (NHE1 exchanger), транспортирующий в межклеточное пространство протон в обмен на ион натрия (см. обзор: Кобляков, 2017).

ИЗМЕНЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ЗНАЧЕНИЯ рН В ОПУХОЛЕВОМ ПРОЦЕССЕ

Различия величин рН в нормальных клетках и опухолях во многом определяет злокачественный фенотип. Показано, что инвазия происходит из зон опухоли с пониженным уровнем рН, а в зонах опухоли с нормальным рН инвазию не наблюдают (Estrella et al., 2013). Введение животным с опухолью слабощелочного буферного раствора (карбонатного или ТРИС) уменьшает метастазирование и рост опухоли (МсСагty and Whitaker, 2010; Martin et al., 2012; Fais et al., 2014). Показано также, что пониженный уровень рН в межклеточном пространстве опухоли уменьшает активность Т-лимфоцитов, что способствует росту опухоли (Ма et al., 2021).

Активированный при аэробном гликолизе транскрипционный комплекс HIFα—HIFβ транскрибирует активность генов различных протеиназ: катепсина В (Cheng Xiaofei et al., 2018), металлопротеаз (ММР) (Hui Zhang et al., 2019), сериновую протеазу тромбина (Deryugina, Quigley, 2012). Активность протеиназ вызывает разрушение межклеточного матрикса и способствует инвазии. Протеиназы разрушают также межклеточные связи, что дает возможность опухолевым клеткам отделиться от основной массы опухоли, что является начальной стадией метастазирования.

Катепсин В сначала был выявлен как лизосомный фермент, но в дальнейшем был показан его транспорт во внешнюю мембрану клетки. (Aggarwa, Sloane, 2014). Активность катепсина В увеличивается в кислой среде межклеточного пространства опухоли. Катепсин В, помимо того, сам разрушает компоненты межклеточного матрикса, активируя ММР, активность которых также увеличивается при низких рН внеклеточного пространства (Ning Cui et al., 2017).

Принято считать, что наибольшую роль в разрушении межклеточного матрикса играют ММР, насчитывающие 28 изоформ. Повышенная активность большинства изоформ ММР выявляется в опухолях человека (Ning Cui et al., 2017). Основными "опухолевыми" ММР считаются ММР-2 и ММР-9 (Shao-Wu Jing et al., 2012). Описан и другой механизм активации ММР. Так, при значениях рН ниже 6.5 активируется фосфолипаза D, стимулирующая транскрипционную активность фактора NF-кВ и протеинкиназы р38, что вызывает экспрессию ММР-9 (Williger et al., 1999; Kato et al., 2005). Таким образом, при понижении рН вне клетки активация протеиназ может происходить с помощью нескольких механизмов.

ИЗМЕНЕНИЕ pH ВНУТРИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Увеличение внутриклеточного рН изменяет активность внутриклеточных ферментов. Активность ферментов, участвующих в основной цепи превращения глюкозы с образованием пирувата и лактата усиливается. Так, активность одного из ключевых ферментов гликолиза фосфофруктокиназы в опухоле-

вых клетках увеличивается в 100 раз при повышении значения рН на 0.2 единицы (Alfarouk et al., 2014).

Другая ветвь превращения глюкозы (пентозный цикл) в клетке связана с синтезом рибозы, необходимой для пролиферации и других синтетических процессов в клетке (рис. 1). Оптимальная активность ферментов пентозного цикла наблюдается при повышенном значении рН, характерном для опухолевых клеток. Так, для глюкозо-6-дегидрогеназы оптимальное значение рН 7.6, для транскетолазы — 7.4 (Alfarouk et al., 2020). Поэтому в опухолевых клетках резко усиливаются синтетические процессы, в основе которых лежит синтез нуклеиновых кислот.

Изменение каталитической активности белков связано с тем, что аминокислоты, рКа которых находится вблизи нейтрального значения рН, протонируются при понижении рН и теряют протон при повышении рН. Наиболее чувствительным к изменению рН является гистидин, поскольку рКа его аминогруппы ровно 6.5. Помимо гистидина, чувствительными к изменению рН являются глутамин. лизин и аспарагин (Brandon et al., 2020; Czowski et al., 2020). С изменением рН внутри клетки изменяется и аллостерическая структура белков. Если эти изменения затрагивают активный центр белка, то его активность меняется. Белки, функциональная активность которых меняется в зависимости от рН, характеризуются как рН-сенсоры. Присоединение к аминокислотному остатку в структуре белка фосфорной или ацетильной групп изменяет рКа этой аминокислоты, что приволит к изменению функциональной активности белка в зависимости от рН окружающей среды (Schönichen et al., 2013). Так, например, в опухолях простаты показано ацетилирование цитохрома c по лизину 53, что вызывает падение электрон-транспортных свойств фермента и уменьшает его способность активировать каспазу 3. (Вахуlianska et al., 2021). Наблюдаемое в опухолях ацетилирование цитохрома с авторы связывают с эффектом Варбурга, считая, что переключение на гликолиз и меньшая чувствительность к апоптозу связаны с ацетилированием цитохрома c.

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ЗНАЧЕНИЯ pH НА ПРОХОЖДЕНИЕ ФАЗ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Клетки, подвергнутые гипоксии, усиливают пролиферацию, что связано с функционированием фактора HIF α (Lee et al., 2008; Zhao et al., 2008). В процессе деления клеток в различных фазах клеточного цикла происходят кратковременные изменения внутриклеточного pH. Важным фактором здесь является то, что в конце фазы S происходит увеличение pH, что необходимо для прохождения границы фаз G_2/M (Putney, Barber, 2003).

При ингибировании временного повышения рН происходит уменьшение уровня циклина В (основного элемента, стимулирующего прохождения фаз G_2/M), стабилизация ингибиторного фосфорилиро-

вания циклинзависимой киназы 1 (Cdk1) по тирозину 15, а также увеличение уровня тирозинкиназы Wee-1, которая фосфорилирует Cdk1 по тирозину 15 (рис. 2). В нормальных клетках Wee-1 ингибирует вход клетки в митоз до полной готовности к митозу, что дает возможность ферментам репарации устранить нарушения в структуре ДНК, возникающие при ее репликации. Этот этап пролиферации обозначается как точка проверки (checkpoint). При окончании проверки происходит повышение рН, что ингибирует активность киназы Wee-1 (Schmidt et al., 2017). Выключение Wee-1 с помощью трансфекции клеток соответствующей siRNA приводит к исчезновению сверочной точки и нарушению структуры ДНК (Beck et al., 2010).

Увеличение уровня рН увеличивает уровень циклина В и активность фосфатазы Cdc25, которая дефосфорилирует циклинзависимую киназу Cdk1 по Tyr15, делая ее активной. Комплекс Cdk1—циклин В фосфорилирует тирозинкиназу Wee1, что вызывает ее убиквитирование и разрушение в протеосомах. Дефосфорилированный комплекс Cdk1—циклин В стимулирует вход клетки в фазы G_2 и М и ускоряет пролиферацию (Putney, Barber, 2003; White et al., 2017). Фосфатазы семейства Cdc25 экспрессируются при передаче митотического сигнала транскрипционным фактором E2F и активируются фосфорилированием в поздней G_1 -фазе (Sur, Agrawa, 2016).

В нормальных клетках регулятором внутриклеточного рН при прохождении фаз G_2/M клеточного цикла является, по-видимому, трансмембранный протонно-натриевый обменник NHE1, поскольку ингибирование его активности предотвращает пролиферацию (Putney, Barbe, 2004). Другие регуляторы рН активируются в определенных функциональных состояниях клетки. Так, например, авторы утверждают, что каналы MCT (монокарбоксилат-ранпортеры), которые транспортируют лактат и протоны в межклеточное пространство, ответственны за увеличение внутриклеточного рН в быстро пролиферирующих клетках и первичных опухолях (Birkeland et al., 2020).

Активация NHE1-обменника обусловлена кратковременным повышением уровня НІГα в фазе G₂ клеточного цикла с последующей деградацией в фазе G₁ (Warfel et al., 2013; Hubbi et al., 2014). Повышение уровня ΗΙΕα происходит благодаря тому, что Cdk1 фосфорилирует HIF α по остатку Ser668, что стабилизирует его и позволяет избежать разрушения (Warfel et al., 2013). Однако повышенный уровень НІГα в клетке кратковременен и после митоза, когда клетки вступают в фазу G_1 , уровень HIF α падает. Это связано с тем, что Cdk2, которая катализирует прохождение фазы клеточного цикла G_1 , в комплексе с циклинами Е и А взаимодействует с НІГа. В результате образуется комплекс ΗΙΓα с шапероном, и ΗΙΓα направляется на деградацию в лизосомы по механизму аутофагии (Hubbi et al., 2014; Druker et al., 2021).

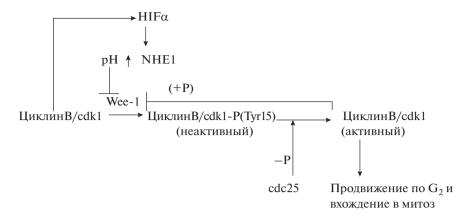


Рис. 2. Регуляция пролиферации клеток на стадии G_2 клеточного цикла. В фазе G_2 основным элементом продвижения клеток к митозу является циклинзависимая киназа cdk1 в комплексе с циклином В. После завершения S-фазы происходит проверка в контрольной точке (checkpoint) и исправление нарушений структуры ДНК после репликации. Для реализации контрольной точки киназа Wee-1 ингибирует активность cdk1, фосфорилируя остаток тирозина в положении 15. Для инактивации Wee-1 происходит повышение pH, благодаря стабилизации HIF α фосфорилированием cdk1. HIF α транскрибирует ген протонной помпы NHE1 (Na $^+$ /H $^+$ -обменника). Белок NHE1 увеличивает pH внутри клетки, что приводит к дезактивации Wee-1. Фосфатаза cdc25 дефосфорилирует киназу cdk1 по тирозину 15, активированный комплекс ЦиклинВ/cdk1 фосфорилирует Wee-1, что ведет к ее деградации.

Косвенным подтверждением того, что Cdk1 активирует ΗΙΓα, являются данные, в которых показано, что разрушение в клетке Cdk1 блокирует не только пролиферацию клеток, но и ангиогенез (Xin Gao et al., 2019), который регулируется фактором ΗΙΓα, транскрибирующим гены фактора роста эндотелия сосудов VEGF (Masoud, Li, 2015; Choueiri, Kaelin, 2020). Поскольку киназа Cdk1 не является транскрипционным фактором, то ее влияние на ангиогенез может быть только опосредованным. Так как ΗΙΓα является транскрипционным фактором, вызывающим синтез VEGF, можно предположить, что при нарушении Cdk1 отсутствует активация HIFa и, соответственно, нет ангиогенеза. В опухоли, благодаря постоянно повышенному уровню рН и фактора НІГа, происходит постоянный нерегулируемый процесс пролиферации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что на ранних стадиях канцерогенеза трансформированные клетки переходят на гликолиз и при аэробных условиях (эффект Варбурга). Переход на гликолиз обусловлен функционированием различных онкогенов. Общим свойством активированных онкогенов является стабилизация и активация транскрипционного фактора ΗΙΓα, который вызывает экспрессию генов, кодирующих белки гликолиза, протонные помпы, матриксные протеиназы. В результате происходят изменения рН в межклеточном пространстве и внутри опухолевых клеток по сравнению с нормой. Пониженный уровень рН (≤6.9) в межклеточном пространстве активирует матриксные протеиназы, что вызывает разрушение межклеточного матрикса и межклеточного взаимодействия. В результате опухолевые клетки получают возможность прорастать в окружающую нормальную ткань (инвазировать) и образовывать одиноч-

ные опухолевые клетки, не связанные с основной массой опухоли, и в дальнейшем давать метастазы. Протонирование межклеточного пространства за счет транспорта протонов из клетки в межклеточное пространство вызывает стабильное увеличение рН внутри опухолевых клеток. В процессе пролиферации нормальных клеток наблюдаются изменения рН в зависимости от фаз клеточного цикла. На стадии G₂ нормальные клетки после репликации ДНК имеют возможность репарировать нарушения, связанные с ошибками при репликации. После этого происходит повышение рН, необходимое для вхождения в фазу G₂. Благодаря постоянной и более высокой величине рН внутри опухолевых клеток, у них отсутствует сверочная точка (checkpoint) после репликации ДНК и они входят в фазу G_2 без исправления нарушений в структуре ДНК, которые ведут к появлению мутаций, наблюдаемых в опухолевых клетках, и поддержанию определенного уровня геномной нестабильности, что в итоге способствует росту опухоли (Ghelli et al., 2020) наравне с другими факторами, вызывающими нестабильность генома, например, мутаций в гене фактора р53.

Таким образом, такие основные свойства опухоли, как инвазия, постоянная пролиферативная активность и нестабильность генома, обусловлены изменением рН по отношению к нормальной ткани, как в межклеточном пространстве, так и внутри клеток, вызываемом постоянно протекающим гликолизом в опухоли, как в аэробных, так и анаэробных условиях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет бюджетного финансирования Научно-исследовательского медицинского центра онкологии им. Н.Н. Блохина.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах животные и люди не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- *Кобляков В.А.* 2010. Механизмы опухоль-промоторного действия активных форм кислорода. Биохимия. Т. 75. № 6. С. 757. (*Kobliakov V. A.* 2010. Mechanisms of tumor promotion by reactive oxygen species. Biochemistry (Moscow). V. 75. № 6. Р. 757.)
- *Кобляков В.А.* 2017. Роль протонных помп при злокачественном росте. Биохимия. Т. 82. № 4. С. 557. (*Koblia-kov V.A.* 2017. Role of proton pumps in tumorigenesis. Biochemistry (Mosc.). V. 82. № 4. Р. 401.)
- Кобляков В.А. 2019. механизмы регуляции онкобелками аэробного гликолиза (эффект Варбурга) в процессе канцерогенеза. Биохимия. Т.84. № 10. С. 1371. (Koblia-kov VA. 2019. The Mechanisms of regulation of aerobic glycolysis (Warburg effect) by oncoproteins in carcinogenesis. Biochemistry (Mosc.) V. 84. № 10. Р.1117. https://doi.org/10.1134/S0006297919100018
- Aggarwa N., Sloane B.F. 2014. Cathepsin B: Multiple roles in cancer. Proteomics Clin. Appl. V. 8. P. 427. https://doi.org/10.1002/prca.201300105
- Alfarouk K.O., Ahmed S.B.M., Elliott R.L., Benoit A., Alqahtan S.S., Ibrahim M.E., Bashir A.H., Alhoufie S.T.S., Elhassan G.O., Wales C.C., Reshkin S.J. 2020. The pentose phosphate pathway dynamics in cancer and its dependency on intracellular pH. Metabolites. V.10. P. 285. https://doi.org/10.3390/metabo10070285
- Alfarouk K.O., Verduzco D., Rauch C., Muddathir A.K., Adil H.H.B., Elhassan G.O., Ibrahim M.E., Orozco J.D.P., Cardone R., Reshkin S.J., Harguindey S. 2014. Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. Oncoscience. V. 1. P. 777.
- Bazylianska V., Kalpage H.A., Wan J., Vaishnav A., Mahapatra G., Turner A.A., D.D., Kim K., Morse P.T., Lee I., Brunzelle J.S. 2021. Lysine 53 acetylation of cytochrome c in prostate cancer: Warburg metabolism and evasion of apoptosis. Cells. V. 10. P. 802. https://doi.org/10.3390/cells10040802
- Beck H., Nähse V., Larsen M.S., Groth P., Clancy T., Lees M., Jørgensen M., Helleday T., Syljuåsen R.G., Sørensen C.S.
 2010. Regulators of cyclin-dependent kinases are crucial for maintaining genome integrity in S phase. J. Cell. Biol. V. 188. P. 629.
- Benizri B.E., Ginouve E., Volmat V., Roux D., PouysBeck H., Nähse V., Larsen M.S., Groth P., Clancy T., Lees M., Jørgensen M., Helleday T., Syljuåsen R.G., Sørensen C.S. 2010. Regulators of cyclin-dependent kinases are crucial for maintaining genome integrity in S phase. J. Cell. Biol. V. 188. P. 629.
- Birkeland E.S., Koch L.M., Dechant R. 2020. Another consequence of the warburg effect? Metabolic regulation of Na+/H+ exchangers may link aerobic glycolysis to cell growth. Front. Oncol. V. 10. P. 1561. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01561
- Czowski B.J., Romero-Moreno R., Trull K.J., White K.A. 2020. Cancer and pH dynamics: transcriptional regulation, proteostasis, and the need for new molecular tools. Cancers.

- V. 12. P. 2760. https://doi.org/10.3390/cancers12102760
- Cash T.P., Pan Y., Simon M.C. 2007. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. Free Radic. Biol. Med. V.43. P. 1219.
- Chandel N.S., McClintock D.S., Feliciano C.E., Wood T.M., Melendez J.A., Rodriguez A.M., Schumacker P.T. 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-lalpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. J. Biol. Chem. V. 275. P. 25130.
- Cheng Xiaofei, Li Yanqing, Zhou Dongkai, Chen Dong, Zhao Feng, Wang Weilin. 2018. Identification of cathepsin B as a novel target of hypoxia-inducible factor-1-alpha in HepG2 cells. Biochem. Biophys. Res. Com. V. 503. P. 1057. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.116
- Choueiri T.K., Kaelin W.G. Jr. 2020. Targeting the HIF2-VEGF axis in renal cell carcinoma. Nat. Med. 2020. V. 26. P. 1519. https://doi.org/10.1038/s41591-020-1093-z
- Deryugina E.L., Quigley J.P. 2012. Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme. J. Biomed. Biotechnol. V. 2012. Article ID 564259. https://doi.org/10.1155/2012/564259
- Druker J., Wilson J.W., Child F., Shakir D., Fasanya T., Rocha S. 2021. Role of hypoxia in the control of the cell cycle. Int. J. Mol. Sci. V. 22. P. 4874. https://doi.org/10.3390/ijms22094874
- Estrella V., Chen T., Lloyd M. 2013. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. Cancer Res. V. 73. P. 1524.
- Fais. S., Venturi. G., Gatenby. B. 2014. Microenvironmental acidosis in carcinogenesis and metastases: new strategies in prevention and therapy. Cancer Metastasis Rev. V. 33. P. 1095.
- Ghelli A di Rorà L., Cerchione C., Martinelli G., Simonetti G. 2020. A WEE1 family business: regulation of mitosis, cancer progression, and therapeutic target. J. Hematol. Oncol. V. 13. Article number126. https://doi.org/10.1186/s13045-020-00959-2
- Harguindey S., Arranz J.L., Polo Orozco J.D., Rauch C., Fais S., Cardone R.A., Reshkin S.J. 2013. Cariporide and other new and powerful NHE1 inhibitors as potentially selective anticancer drugs-an integral molecular/biochemical/metabolic/clinical approach after one hundred years of cancer research. Transl. Med. V. 11. P. 282. https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-282
- Hui Zhang, Qingju Yang, Xuanye Lian, Ping Jiang, Jing Cu. 2019. Hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) promotes hypoxia-induced invasion and metastasis in ovarian cancer by targeting matrix metallopeptidase 13 (MMP13). Med. Sci. Monit. V. 25. P. 7202.
- Hubbi M.E., Gilkesa D.M., Hu H., Ahmede I., Semenza G.L. 2014. Cyclin-dependent kinases regulate lysosomal degradation of hypoxia-inducible factor 1α to promote cell-cycle progression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 111. P. E3325.
- progression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 111. P. E3325. Kato Y., Lambert C.A., Colige A.C., Mineur P., Noël A., Frankenne F., Foidart J.M., Baba M., Hata R., Miyazaki K., Tsukuda M. 2005. Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. J. Biol. Chem. V. 25. P. 10938.
- Kim J.W., Tchernyshyov I., Semenza G.L., Dang C.V. 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. Cell Metab. V. 3. P. 177.
- Lee G., Won H.S., Lee Y.M., Choi J.W., Oh T.I., Jang J.H., Choi D.K., Lim B.O., Kim Y.J., Park J.W., Puigserver P.,

- *Lim J.H.* 2016. Oxidative Dimerization of PHD2 is Responsible for its inactivation and contributes to metabolic reprogramming via HIF-1 α activation. Sci. Rep. V. 6. P. 18928.
- https://doi.org/10.1038/srep18928
- Lee K.A., Roth R.A., LaPres J.J. 2007. Hypoxia, drug therapy and toxicity. Pharmacol. Ther. V. 13. P. 229.
- Lee S.H., Lee M.Y., Han H.J. 2008. Short-period hypoxia increases mouse embryonic stem cell proliferation through cooperation of arachidonic acid and PI3K/Akt signalling pathways. Cell Prolif. V. 41. P. 230.
- Lu H., Forbes R.A., Verma A. 2002. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis J. Biol. Chem. V. 277. P. 23111.
- Ma G., Li C., Zhang Z., Liang Ye, Liang Z., Chen Y., Wang L., Li D., Zeng M., Niu H. 2021. Targeted glucose or glutamine metabolic therapy combined with PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy for the treatment of tumors. mechanisms and strategies. Front. Oncol. V. 11. Article 697894.
 - https://doi.org/10.3389/fonc.2021.697894
- Martin N.K., Robey I.F., Gaffney E.A. 2012. Predicting the safety and efficacy of buffer therapy to raise tumour pHe: an integrative modelling study. Br. J. Cancer. V. 106. P. 1280.
- Masoud G.N., Li W. 2015. HIF-1α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. Acta Pharm. Sin. B. V. 5, P. 378.
- McCarty M.F., Whitaker J. 2010. Manipulating tumor acidification as a cancer treatment strategy. Altern. Med. Rev. V. 15. P. 264.
- Ning Cui, Min Hu, Raouf A. 2017. Khalil biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. V. 147. P. 1. https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005
- Putney D.L., Barber L.K. 2003. Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G₂/M entry and transition. J. Biol. Chem. V. 278. P. 44645. https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M308099200
- Putney D.L., Barber LK. 2004. Expression profile of genes regulated by activity of the Na-H exchanger NHE1. BMC Genomics. V. 16. P. 46. https://doi.org https://doi.org/10.1186/1471-2164-5-46
- Reshkin S.J., Bellizzi A., Caldeira S., Albarani V., Malanchi I., Poignee M., Alunni-Fabbroni M., Casavola V., Tommasino M. 2000. Na+/H+ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent

- transformation-associated phenotypes. FASEB J. V. 14. P. 2185.
- Schönichen B., Webb A., Jacobson M.P., Barbe D.L. 2013. Considering protonation as a posttranslational modification regulating protein structure and function. Ann. Rev. Biophys. V. 42. P. 289.
- Schmid M., Rohe A., Platzer C., Najja A., Erdmann F., Sippl W. 2017. Regulation of G2/M transition by inhibition of WEE1 and PKMYT1 kinases. Molecules. V. 22. P. 2045. https://doi.org/10.3390/molecules22122045
- Shao-Ŵu Jing, Ya-Di Wang, Masahiro Kuroda, Jing-Wei Su, Guo-Gui Sun, Qing Liu, Yun-Jie Cheng, Cong-Rong Yang. 2012. HIF-1α contributes to hypoxia-induced invasion and metastasis of esophageal carcinoma via inhibiting Ecadherin and promoting MMP-2 expression. Acta Med. Okayama. V. 66. P. 399. https://doi.org/10.18926/AMO/48964
- Sur S., Agrawa D.K. 2016. Phosphatases and kinases regulating CDC25 activity in the cell cycle: clinical implications of cdc25 overexpression and potential treatment strategies. Mol. Cell. Biochem. V. 416. P. 33. https://doi.org/10.1007/s11010-016-2693-2
- Warburg O., Posener K., Negelein E. 1924. Über den Stoffwechsel der Karzinomzellen. Biochemische Zeitschrift. V. 152. P. 309.
- Warfel N.A., Dolloff N.G., Dicker D.T., Malysz J., El-Deiry W.S. 2013. CDK1 stabilizes HIF-1α via direct phosphorylation of Ser668 to promote tumor grwth. Cell Cycle. V. 12. P. 3689.
- White K.A., Grillo-Hil B.K., Baber D.L. 2017. Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance. J. Cell. Sci. V. 130. P. 663. https://doi.org/10.1242/jcs.195297
- Williger B.T., Ho W.T., Exton J.H. 1999. Phospholipase D mediates matrix metalloproteinase-9 secretion in phorbol ester-stimulated human fibrosarcoma cells. J. Biol. Chem. V. 274. P. 735.
 - https://doi.org/10.1074/jbc.274.2.735
- Xin Gao, Yuan Zhang, Rui Zhang, Zichan Zhao, Haorui Zhang, Jinhui Wu, Wei Shen, Ming Zhong. 2019. Cyclin-dependent kinase 1 disruption inhibits angiogenesis by inducing cell cycle arrest and apoptosis. Exp. Ther. Med . V. 18. P. 3062. https://doi.org/10.3892/etm.27883
- Zhao T., Zhang C.P., Liu Z.H., Wu L.Y., Huang X., Wu H.T., Xiong L., Wang X., Wang X.M., Zhu L.L., Fan M. 2008. Hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells-role of hypoxia-inducible transcription factor-1alpha. FEBS J. V. 275. P. 1824.

The Role of Extra- and Intracellular pH in the Regulation of Tumor Process

V. A. Kobliakov*

Blochin Russian Cancer Research Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 115478 Russia *e-mail: kobliakov@rambler.ru

The review presents and discusses data on the role of changes in intra- and extracellular pH caused by aerobic glycolysis in tumor tissue. The main factor in the regulation of glycolysis is the transcription factor HIF α . Compared to normal tissue, the intercellular space in the tumor is acidified and the pH inside the tumor cells increases. Changes in pH are due to the fact that the final product of glucose conversion is not pyruvate, but lactate. Lactate is transported through the cell membrane and acidifies the intercellular space. HIF α also causes the transcription of a number of proton pumps and matrix proteases, which are activated in the acidic environment of the intercellular space. The intercellular matrix is destroyed and allows the tumor cells to be invaded. An increase in intracellular pH stimulates the accelerated passage of the G_2 phase of the cell cycle. The molecular mechanisms of this process are discussed. It is concluded that the main factors of the tumor process, invasion, accelerated proliferation, genome instability are due to aerobic glycolysis (the Warburg effect).

Keywords: glycolysis, HIFa, invasion, malignancy, proteinase, proliferation

УЛК 57.085.23

РОЛЬ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ PI3K/Akt/mTOR В РЕГУЛЯЦИИ ХОНДРОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

© 2021 г. А. С. Бровкина¹, Р. Е. Ушаков¹, И. О. Васильева², А. П. Домнина¹, Е. Б. Бурова^{1, *}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Городская клиническая больница № 31, Санкт-Петербург, 197110 Россия

*E-mail: lenbur87@mail.ru

Поступила в редакцию 12.07.2021 г.

После доработки 09.08.2021 г.

Принята к публикации 10.08.2021 г.

В представленной работе исследовали способность мезенхимных стромальных клеток человека (эМСК), выделенных из десквамированного эндометрия в менструальной крови, подвергаться дифференцировке в хондрогенном направлении. Возможность хондрогенной дифференцировки эМСК, как и регулирующие сигнальные пути, ранее не были исследованы. При культивировании монослойной культуры эМСК в индукционной хондрогенной среде уже через 11—14 сут выявили характерное для хондроцитов окрашивание клеточных препаратов альциановым синим и сафранином О, а также значительно повышенную экспрессию гена COL2A1, типичного маркера хондрогенной дифференцировки. Мы изучили взаимосвязь статуса активации PI3- и MAP-киназных сигнальных путей с экспрессией хондрогенных маркеров, культивируя эМСК в хондрогенной среде в присутствии ингибитора PI3-киназы — вещества LY294002. Обнаружили, что в процессе дифференцировки путь PI3K/Akt/mTOR негативно регулирует экспрессию COL1A1 и позитивно — COL2A1, а также вовлекается в регуляцию активности компонентов Raf/MEK/ERK каскада. Полученные данные позволяют заключить, что сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR вносит существенный вклад в регуляцию индуцированного хондрогенеза эМСК.

Ключевые слова: ОТ-ПЦР, сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR, хондрогенная дифференцировка, эндометриальные мезенхимные стромальные клетки

DOI: 10.31857/S0041377121060043

В настоящее время все большую актуальность приобретает поиск возможностей восстановления дегенеративных изменений суставного хряща, возникающих в процессе старения организма человека. В качестве одного из подходов для решения этой глобальной проблемы предлагалось использовать хондроциты для регенерации хряща, поскольку он по причине своей бессосудистой природы имеет низкую способность к самовосстановлению. Однако хондроциты, как известно, имеют ограниченную доступность и пролиферативный потенциал; кроме того, хирургические методы восстановления хрящевой ткани, основанные на трансплантации аутологичных хондроцитов, зачастую давали неоднозначные результаты. В связи с этим, внимание исследователей сфокусировалось на мезенхимных стромальных (стволовых) клетках (МСК) человека в качестве альтернативного источника для терапевтического восстановления хрящевой ткани (Granero-Molto et al., 2008;

Принятые сокращения: ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени; эМСК — эндометриальные мезенхимные стромальные клетки человека.

Richardson et al., 2010; Huselstein et al., 2012; Zha et al., 2021).

МСК представляют собой небольшую популяцию стромальных клеток, присутствующих в большинстве соединительных тканей организма взрослого человека, таких как костный мозг, жировая ткань. пульпа зуба, эндометрий, амниотическая жидкость, пуповина и др. МСК поддерживаются в относительном состоянии покоя *in vivo*, но в ответ на различные физиологические стимулы способны пролиферировать, а затем дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, адипоциты и другие клетки мезодермального типа, такие как кардиомиоциты и гладкомышечные клетки. Благодаря уникальным свойствам МСК – способности к самообновлению, мультипотентности, стабильности кариотипа и секреторному фенотипу – терапия, основанная на их применении, становится с каждым годом все более перспективным направлением в регенеративной медицине.

Согласно современным представлениям, позитивные эффекты трансплантированных МСК обеспечиваются паракринным действием секретируе-

мых биологически активных молекул (факторов роста, цитокинов, биоактивных липидов и многих других), которые стимулируют регенеративные процессы в поврежденной ткани, индуцируют ангиогенез и модулируют иммунную систему. Можно отметить несомненные успехи в терапии на основе МСК для лечения сердечно-сосудистых и ревматических заболеваний, диабета, заболеваний костей и хрящевой ткани (Bockeria et al., 2013; Maumus et al., 2013; Konala et al., 2016; Richardson et al., 2016; Cunningham et al., 2018).

Один из подходов, применяемых для восстановления нормальной функции нативного суставного хряща после повреждения или деградации сустава, заключается в предварительном культивировании тканевой конструкции in vitro с использованием хондрогенных клеток, полученных при направленной дифференцировке МСК; для возможного клинического применения тестировали МСК, выделенные из костного мозга, пуповины или жировой ткани (Lee et al., 2004; Kim et al., 2013; Richardson et al., 2016). Очевидно, что прогресс в этой области невозможен без детального изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе хондрогенной дифференцировки МСК. Обобщая достижения последних двух десятилетий в области изучения сигнальных путей, вовлеченных в хондрогенную дифференцировку МСК, следует подчеркнуть важную регуляторную роль MEK/ERK и р38 MAP-киназных каскадов, а также сигнальных путей Wnt и PI3K/Akt (Oh et al., 2000; Lee et al., 2004; McMahon et al., 2008; Li et al., 2010; Zhang et al., 2014; Jiang et al., 2017; Tanthaisong et al., 2017; Ma et al., 2019).

В представленной работе объектом исследования служили МСК, выделенные из десквамированного эндометрия в менструальной крови (эМСК). Высокая пролиферативная активность при длительном культивировании, генетическая стабильность (Domnina et al... 2013), отсутствие онкогенности и низкая иммуногенность (Murphy et al., 2008) делают эМСК весьма перспективным биоматериалом для будущего клинического применения; неинвазивный и легкодоступный источник эМСК обеспечивает широкомасштабные исследования in vitro. Ранее была продемонстрирована дифференцировка этих клеток в остеобласты и адипоциты (Zemelko et al., 2012; Domnina et al., 2016), тогда как дифференцировка в хондрогенном направлении до сих пор в литературе не описана. Соответственно, отсутствуют сведения о механизмах, регулирующих хондрогенез эМСК.

Мы исследовали способность эМСК дифференцироваться в хондрогенном направлении в монослойной (2D) культуре, а также выясняли роль сигнального пути PI3K/Akt/mTOR в регуляции этого процесса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток. эМСК, выделенные из лесквамированного энлометрия, солержащегося в менструальной крови здоровых доноров (Zemelko et al., 2012), культивировали во флаконах T25 и T75 (Thermo Scientific, США) в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1% PenStrep (Gibco, США) и 1% GlutaMAX (Gibco, США), при 37°С в атмосфере 5% СО₂. Для экспериментов по индуцированной дифференцировке в монослое клетки трипсинизировали с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и ЭДТА (Invitrogen, США) и рассевали на чашки диаметром 35 мм (Thermo Scientific, США): 150 тыс. кл. на 1 чашку для получения клеточных лизатов, или 200 тыс. кл. на 1 чашку для выделения РНК. Для проведения гистологического окрашивания сеяли 150 тыс. кл. на 1 чашку или 50 тыс. кл. в лунку 24-луночного планшета (Costar, США). Стимуляцию дифференцировки осуществляли на следующий день после рассева клеток.

Для проведения дифференцировки эМСК в 3D-культурах клетки рассевали в полной ростовой среде на специальные 96-луночные платы с неадгезивной поверхностью Nunclon Sphera (Thermo Scientific, США), не менее 1 млн кл. в лунку. Через 1 сут после формирования микромасс клеток осторожно заменяли ростовую среду на дифференцировочную и культивировали клетки в течение 3, 14 и 21 сут, меняя среду на свежую каждые 3 сут.

Ингибиторы. Использовали следующие вещества: U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-amino-phenylthio) butadiene) — высокоселективный ингибитор киназ МЕК1/2, регулирующих активность ERK1/2 MAP-киназного пути; SB203580 (4-(4-(4fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinyl) phenyl)-1H-imidazol-5-yl) pyridine) – специфический ингибитор р38-МАР-киназного пути, связывающийся в АТФсвязывающем кармане молекулы р38 и предотвращающий фосфорилирование мишеней р38, но не препятствующий фосфорилированию самой киназы p38; LY294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1benzopyran-4-one) – специфический ингибитор PI3K, регулирующий активность PI3K/Akt-киназного пути. Ингибиторы использовали в следующих концентрациях: 10 мкМ U0126, 5 мкМ SB203580 и 1, 10 или 20 мкМ LY294002. Условия предобработки клеток каждым из ингибиторов: инкубация в полной ростовой среде в течение 40 мин при 37° С в атмосфере 5% CO₂.

Индукция хондрогенной дифференцировки. Клетки культивировали в монослое (2D-культура) в коммерческой дифференцировочной среде (StemPro Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium; Gibco, США) в присутствии специального индуктора дифференцировки StemPro Chondrogenesis Supplement (Gibco, США). Хотя состав среды является коммерческим секретом, она содержит, как прави-

ло, следующие компоненты: DMEM-HG, инсулинтрансферрин-селенистую кислоту, дексаметазон, L-глютамин, пируват, аскорбат-2-фосфат, фактор роста TGFβ (Spagnoli et al., 2005). Хондрогенную среду меняли через каждые 3 сут; клетки культивировали в течение 3, 11 и 14 сут.

Получение клеточных лизатов. Лизаты получали, как описано ранее (Вигоva et al., 2013). Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда на спектрофотометре GeneQuant 1300 (Віосhгот, США). Электрофоретическое разделение белков проводили в полиакриламидном геле (8.5 или 10.5%) с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану Нуbond-С extra (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Для визуализации белковых полос мембрану окрашивали красителем Ponceau S (Sigma, США).

Вестерн-блот-анализ. Для специфического выявления белков использовали первичные поликлональные антитела против фосфорилированных (p) белков: p-Raf (Ser338), p-MEK1/2 (Ser217/221), (Thr202/Tyr204), ppERK1/2 p-Akt (Thr308). p-p70S6K (Thr389), p-S6 (Ser240/244), p-4EBP1 (Thr37/46), а также белков ERK2, Akt, α-тубулина и GAPDH. В качестве вторичных антител применяли GAR-HRP, GAM-HRP и DAG-HRP. Все антитела были получены из фирмы Cell Signaling (США). Пероксидазную активность коньюгатов вторичных антител тестировали с помощью метода ECL (Amersham, Швеция); хемилюминесцентное излучение регистрировали экспонированием на рентгеновскую пленку CEA RP NEW (Бельгия).

Выделение РНК. Для анализа экспрессии генов коллагена I типа (*COL1A1*), коллагена II типа (*COL2A1*), аггрекана (*ACAN*) и *GAPDH* проводили выделение РНК из клеток согласно протоколу RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Клеточный лизат подвергали многоступенчатой очистке на специальных колонках. На финальной стадии РНК с колонки элюировали водой, свободной от РНКаз. Степень очистки и концентрацию РНК определяли на приборе NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США); хранили препараты при -80° С.

Анализ экспрессии генов. Использовали следующие праймеры: к COL2A1 прямой GGCAATAGCAG-GTTCACGTACA и обратный CGATAACAGTCTTGC-СССАСТТ; к ACAN прямой GCTACGACGCCATCT-GCTAC и обратный GTCAGGCCAGGTCACTGTC; к COL1A1 прямой GACCTAAAGGTGCTGCAG и обратный CTTGTTCACCTCTCTCGCCA; к референсному гену *GAPDH* прямой GAAATCCCATCAC-CATCTTCCAGG И обратный GAGCCCCAG-ССТТСТССАТ G. Все праймеры были синтезированы в компании "Синтол" (Россия). Анализ экспрессии генов проводили с помощью количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени, на базе городской больницы № 31 (г. Санкт-Петербург).

Выявление гликозаминогликанов и протеогликанов. Для подтверждения дифференцировки в хондрогенном направлении клетки окрашивали альциановым синим или сафранином О для идентификации гликозаминогликанов и протеогликанов соответственно. Для этого клетки промывали PBS, фиксировали 3.7%-ным раствором формалина и окрашивали в течение 30 мин 1%-ным раствором альцианового синего в 3%-ной уксусной кислоте, либо 0.1%-ным раствором сафранина О в 1%-ной уксусной кислоте. После промывки препараты хранили в PBS при 4°C.

Статистическая обработка. Числовые данные, представленные как средние значения со стандартными отклонениями из трех независимых экспериментов, вычисляли с помощью программы Microsoft Excel с применением метода Дельта-дельта Ct ($\Delta\Delta Ct$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характерным общим свойством МСК, выделенных из различных источников, является их способность к дифференцировке в клетки мезодермального типа, такие как остеобласты, адипоциты и хондроциты. Что касается традиционного объекта наших исследований — эМСК, их пластичность ранее была подтверждена дифференцировкой в остеобласты и адипоциты (Zemelko et al., 2012; Domnina et al., 2016). Дифференцировка эМСК в хондрогенном направлении, как и контролирующие этот процесс молекулярные механизмы до сих пор оставались неизученными.

Чтобы восполнить этот информационный пробел, мы попытались индуцировать хондрогенную дифференцировку эМСК в микромассах (3D-культуры), согласно известному методу (Johnstone et al., 1998). Клетки культивировали в коммерческой хондрогенной среде в течение 3, 14 и 21 сут с одновременным выделением РНК и гистологическим окрашиванием микромасс альциановым синим в указанных временных точках. Если тест на выявление гликозаминогликанов давал положительный результат, то с выделением РНК возникли непредвиденные сложности. Как показал анализ причин неудач, в процессе дифференцировки в микромассах катастрофически падает жизнеспособность клеток, поэтому через 14 сут и позже оказалось невозможно выделить неповрежденную РНК для проведения ПЦР-анализа экспрессии генов интереса. Препарат РНК приемлемой чистоты и концентрации был выделен лишь через 3 сут после индукции хондрогенеза.

Следует отметить особенность эМСК, которая проявлялась при длительном культивировании монослойных клеток в хондрогенной среде: примерно через 14 сут клетки начинали усиленно мигрировать, образуя агрегаты различной формы типа 3D-структур, которые давали положительную окраску альциановым синим, что в перспективе неизбежно приво-

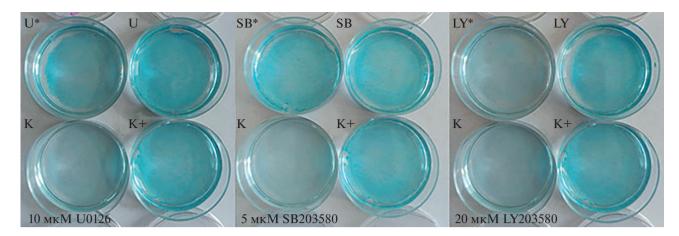


Рис. 1. Влияние ингибиторов U0126 (U), SB203580 (SB) или LY294002 (LY) на эффективность индуцированной хондрогенной дифференцировки эМСК. К — интактные клетки, окрашенные в начальный день эксперимента; K+ — положительный контроль (клетки культивировали в индукционной среде); U, SB, LY — предобработка одним из ингибиторов в течение 40 мин в полной ростовой среде с последующим культивированием в индукционной среде без ингибитора; U*, SB*, LY* — такая же предобработка клеток ингибитором с последующим культивированием при его постоянном присутствии в индукционной среде. Продолжительность дифференцировки — 11 сут, затем клетки во всех лунках, за исключением интактных клеток, были окрашены альциановым синим.

дило к потере жизнеспособности клеток в таких образованиях.

Принимая во внимание описанные выше результаты, мы решили для дальнейших исследований использовать монослойные (2D) культуры эМСК, индуцируя в них хондрогенную дифференцировку в течение 3, 11 и 14 сут. Такой дизайн экспериментов, во-первых, позволял избежать нежелательного образования 3D-структур; во-вторых, обеспечивал жизнеспособность клеток и выделение нативной РНК; в-третьих, позволял оценить динамику и модуляцию регуляторных сигнальных путей на начальных этапах дифференцировки. Для изучения вовлеченности основных игроков MAP- и PI3-киназных путей в индуцированный хондрогенез эМСК, применили ингибиторный анализ, основанный на двух подходах: 1) клетки предварительно обрабатывали в полной ростовой среде в течение 40 мин одним из ингибиторов — U0126, SB203580 или LY294002, а затем культивировали в индукционной среде в отсутствие ингибитора; 2) предобработанные одним из ингибиторов клетки культивировали в индукционной среде в присутствии соответствующего ингибитора. В качестве положительного контроля нативные эМСК подвергали хондрогенной дифференцировке в отсутствие ингибиторов.

Зависимость эффективности хондрогенной дифференцировки от активности сигнальных путей. Для выбора ингибитора, наиболее эффективно модулирующего дифференцировку, клетки культивировали в индукционной среде в течение 11 сут. Как видно на рис. 1, по сравнению с контрольными (К) нативными эМСК, клетки положительного контроля (К+) были интенсивно окрашены альциановым синим (тест на присутствие гликозаминогликанов, харак-

терных для хондроцитов), что свидетельствует в пользу их дифференцировки. Очевидно также, что из всех вариантов обработки клеток ингибиторами только вариант предобработки ингибитором PI3K (LY294002) с последующим постоянным его присутствием в среде эффективно препятствовал хондрогенной дифференцировке (рис. 1, LY*). Поэтому именно ингибитору PI3K мы отдали предпочтение в дальнейших исследованиях.

Для выявления зависимости эффективности дифференцировки эМСК от дозы и времени действия LY294002, стимулировали дифференцировку в присутствии 1, 10 или 20 мкМ LY294002, и затем окрашивали клетки альциановым синим через 3 и 14 сут или сафранином О через 14 сут (рис. 2). Как показывает анализ окраски альциановым синим, через 3 сут после индукции дифференцировки наблюдается незначительное, одинаковое по интенсивности, окрашивание клеток во всех лунках (рис. 2, 2a-5a) по сравнению с нативными клетками (рис. 2, лунка 1а). Напротив, через 14 сут (рис. 2, лунки 36-56) очевидна зависимость интенсивности окрашивания от концентрации LY294002: $26 \approx 36 > 46 > 56$. Градиент окраски клеток сафранином О через 14 сут дифференцировки (рис. 2, лунки 2b-5e) аналогичен окрашиванию альциановым синим в той же временной точке: $2\theta \approx 3\theta > 4\theta > 5\theta$.

По результатам гистологического окрашивания альциановым синим и сафранином О, которые выявляют характерные для хондроцитов гликозаминогликаны и протеогликаны соответственно, можно предположить, что РІЗ-киназный сигнальный путь вовлекается в регуляцию хондрогенной дифференцировки. Действительно, при специфическом блокировании этого пути мы наблюдали явно выражен-

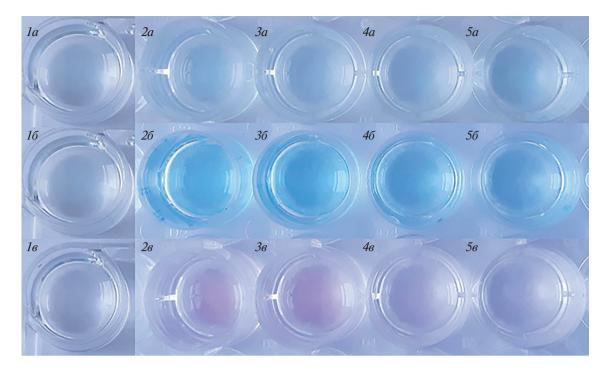


Рис. 2. Зависимость эффективности хондрогенной дифференцировки эМСК от дозы и времени действия ингибитора LY294002 (LY). Окраска клеток в лунках альциановым синим: 3 сут (лунки 1a-5a), 14 сут (лунки 16-5b); окраска сафранином О: 14 сут (лунки 16-5b). 1- интактные клетки, окраска в начальный день эксперимента; 2- индуцированная дифференцировка (положительный контроль); 3, 4, 5- дифференцировка в присутствии 1, 10, 20 мкМ LY соответственно.

ный дозозависимый эффект (интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации ингибитора) и его корреляцию с продолжительностью дифференцировки.

Уровень экспрессии коллагена I типа (COL1AI), коллагена II типа (COL2AI) и аггрекана (ACAN). Интактные и коммитированные к хондрогенной дифференцировке эМСК анализировали с помощью количественного метода ОТ-ПЦР в реальном времени. В необработанных эМСК относительный уровень экспрессии COL1A1 минимален; при запуске хондрогенной дифференцировки (K+) он увеличивался и далее существенно не изменялся в течение всего периода наблюдения (рис. 3а). Под действием ингибитора LY294002 уровень экспрессии COL1A1 через 14 сут возрастал в несколько раз относительно положительного контроля (К+) и почти в 50 раз относительно интактных клеток (К). Можно предположить, что функционально активная РІЗК через специфические сигнальные пути вовлечена в негативную регуляцию экспрессии гена COL1A1, что обеспечивает нормальное развитие дифференцировки эМСК.

Как видно на рис. 36, специфичный для хрящевой ткани ген *COL2A1* экспрессируется в контрольных эМСК на таком же низком уровне, как и ген *COL1A1*; после индукции хондрогенеза он увеличивается, достигая на 14-е сут максимального значения: наблюдаемый прирост относительно K+ (3 сут) составляет 60 раз, а относительно K — около 1800 раз.

Через 14 сут дифференцировки наиболее ярко выражен и эффект ингибитора LY294002: уровень экспрессии *COL2A1* падает почти в 7 раз по сравнению со значением для K+ (14 сут). Следовательно, LY294002 супрессирует экспрессию гена *COL2A1* в процессе хондрогенеза, причем особенно сильно на поздних стадиях. Эти результаты свидетельствуют о том, что активный PI3K-зависимый сигнальный путь может быть включен в сигнальные пути хондрогенеза эМСК и необходим для стимулирования экспрессии коллагена II типа в течение длительного времени.

Мы проверили также уровень экспрессии гена аггрекана (ACAN), специфичного для хрящевой ткани; однако экспрессия ACAN не была выявлена через 14 сут после индукции дифференцировки в монослойной культуре эМСК (данные не представлены). Чтобы исключить возможную ошибку из-за неподходящих праймеров, с помощью ОТ-ПЦР оценили уровень экспрессии аггрекана в первичных хондроцитах, выделенных из хряща человека: как и ожидалось, уровень экспрессии ACAN был высоким (рис. 3a); аналогичные результаты были продемонстрированы в нашей предыдущей работе (Ushakov et al., 2020).

РІЗК/Акt/mTOR сигнальный путь. Далее мы исследовали потенциальные механизмы, лежащие в основе наблюдаемых эффектов LY294002. В первую очередь мы проверили участие сигнального пути PI3K/Akt/mTOR в процессе дифференцировки. Механистическая мишень рапамицина (mTOR) являет-

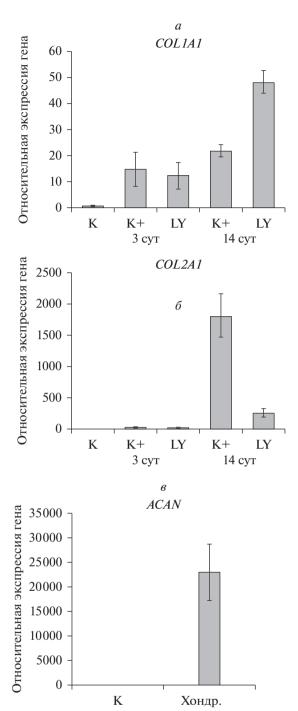


Рис. 3. Действие ингибитора LY294002 (LY) на экспрессию генов коллагена I типа (*COL1AI*), коллагена II типа (*COL2AI*) и аггрекана (*ACAN*) в процессе дифференцировки эМСК в хондрогенном направлении. Сравнение уровня экспрессии генов *COL1A1* (а), *COL2A1* (б) и *ACAN* (в) в эМСК до и после индукции дифференцировки; показаны средние значения из трех независимых экспериментов и стандартные отклонения (*вертикальные отрезки*) относительно *GAPDH*. К — контрольные интактные клетки; К+ — положительный контроль (клетки, в которых дифференцировка продолжалась в течение 3 или 14 сут; LY — дифференцировка в течение 3 или 14 сут при постоянном присутствии ингибитора в индукционной среде. Хондр. — хондроциты, выделенные из хряща человека.

ся интегральным компонентом этого пути и относится к семейству протеинкиназ, родственных РІЗК. Киназа mTOR функционирует как каталитическая субъединица в двух различных мультибелковых комплексах, которые контролируют в клетке разные программы (Loewith et al., 2002). Так, чувствительный к рапамицину комплекс mTORC1 характеризуется регуляторной субъединицей Raptor (regulatory associated protein of mTOR) и контролирует синтез белка (размер клеток) через фосфорилирование эффекторов – рибосомной киназы p70S6K и белка 4E-BP1, ингибитора фактора инициации элонгации. Это фосфорилирование стимулирует трансляцию мРНК, пролиферацию и клеточный рост (Sarbassov et al., 2005). PI3K/Akt-зависимая регуляция активности mTORC1 представляет собой сложный многоступенчатый процесс, подробно описанный в ряде обзоров (Sarbassov et al., 2005; Huang, Manning, 2009; Steelman et al., 2011).

Статус активации компонентов PI3K/Akt/mTOR пути оценивали методом иммуноблотинга. Рис. 4 показывает, что индукция дифференцировки (К+) приводит к значительному уменьшению уровня фосфорилирования Akt по сравнению с интактными клетками (К), тогда как фосфорилирование эффекторных мишеней mTORC1 – p70S6K и 4EBP1 – усиливается, оставаясь на высоком уровне весь период наблюдения, как и рибосомального белка S6. Кроме того, четко прослеживается дозозависимый эффект LY294002 на уровень фосфорилирования Akt, р70S6K, S6 и 4EBP1, что подтверждает специфичность действия ингибитора на ось PI3K/Akt/mTOR. Таким образом, можно заключить, что хондрогенная дифференцировка эМСК связана с РІЗК-зависимой модуляцией активности всех компонентов исследуемого сигнального пути.

Изучение роли PI3K в хондрогенезе МСК различной природы показало, что эта киназа вовлекается в контроль дифференцировки только в ответ на стимуляцию инсулиноподобным фактором роста (IGF-1), но не трансформирующим фактором роста β (TGF-β) (Starkman et al., 2005; McMahon et al., 2008; Yin et al., 2009), а партнерами PI3K по большей части служат протеинкиназы MAPK-семейства.

Влияние PI3-киназного пути на активность компонентов сигнального каскада Raf/MEK/ERK. Для понимания механизма хондрогенной дифференцировки эМСК важно выяснить не только функциональный статус отдельных белков в составе сигнальных каскадов, но и взаимную регуляцию различных каскадов (crosstalk). Как показывает анализ данных из литературы, механизмы внутриклеточной передачи сигналов, регулирующих хондрогенную дифференцировку взрослых МСК, включают, помимо PI3K, MAP-киназу ERK1/2. При этом в зависимости от клеточного контекста и используемого фактора роста, отмечали противоположную роль ERK1/2 в качестве регулятора дифференцировки — и негатив-

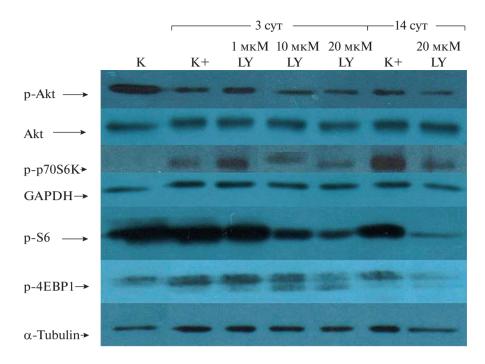


Рис. 4. Специфическое ингибирование PI3K уменьшает функциональную активность сигнального пути PI3K/Akt/mTOR при хондрогенной дифференцировке эМСК. Вестерн-блот-анализ с использованием специфических антител. K — контрольные интактные клетки; K — положительный контроль (клетки, в которых дифференцировка продолжалась в течение 3 или 14 сут); LY294002 (LY) — дифференцировка клеток при постоянном присутствии ингибитора в индукционной среде в течение 3 сут (1, 10 и 20 мкМ LY) или 14 сут (20 мкМ LY). Указаны фосфорилированные формы Akt, p70S6K, S6, 4E-BP1, а также белки Akt, GAPDH, α -Tubulin.

ную (Oh et al., 2000; Oh, Chun, 2003; Starkman et al., 2005; McMahon et al., 2008), и позитивную (Tuli et al., 2003; Lee et al., 2004; McMahon et al., 2008; Zhang et al., 2014; Jiang et al., 2017).

Известно, что PI3K/Akt и MAP-киназные сигнальные пути контролируют функцию mTORC1 (Manning et al., 2002; Ma et al., 2005), причем mTORC1 способен негативно регулировать ERK-зависимый MAP-киназный путь (Грюкова и др., 2017). Здесь мы проверили, возможно ли пересечение этих сигнальных путей в процессе хондрогенной дифференцировки эМСК. С этой целью провели анализ статуса активации MAP-киназного каскада в зависимости от ингибирования PI3K/Akt пути.

Как видно на рис. 5, интактные эМСК (К) характеризуются высоким уровнем фосфорилирования киназ Raf, МЕК и ERK, что обеспечивает высокий пролиферетивный потенциал этих клеток. При запуске хондрогенной дифференцировки (К+) уровень фосфорилирования каждой из киназ резко снижается и мало изменяется в течение всего эксперимента. Через 3 сут после индукции дифференцировки наблюдается дозозависимое активирующее действие LY294002 на МЕК1/2 и ERK1/2: при увеличении концентрации ингибитора уровень их фосфорилирования повышается, причем для p-ERK1/2 это не связано с увеличением экспрессии белка ERK2 в процессе дифференцировки. В отношении p-Raf имеет место

обратная закономерность. Следовательно, при отсутствии супрессирующего действия ингибитора, активная PI3K способна негативно регулировать активность MAP-киназ MEK1/2 и ERK1/2 и позитивно — MAP-киназы Raf. Эти данные свидетельствуют о пересечении функций сигнальных путей PI3K/Akt и MAPK в ходе хондрогенеза эМСК, причем для эффективной дифференцировки требуется повышенная активность первого при даун-регуляции второго из упомянутых путей.

В настоящей работе мы продемонстрировали возможность дифференцировки эМСК в хондрогенном направлении в монослойной культуре и оценили динамику этого процесса в течение 14 сут. Применяя фармакологическое ингибирование активности РІЗК-зависимого сигнального пути, показали его участие в хондрогенной дифференцировке на уровне аккумуляции гликозаминогликанов и протеогликанов, экспрессии генов *COL1A1* и *COL2A1* и регуляции активности киназ Raf/MEK/ERK сигнальной оси. Таким образом, наши находки однозначно указывают на важную регуляторную роль функционально активного PI3K/Akt/mTOR сигнального каскада для хондрогенной дифференцировки эМСК, что углубляет представление о молекулярном механизме хондрогенеза эМСК in vitro.

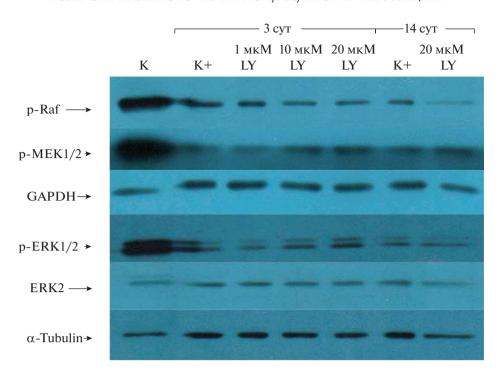


Рис. 5. Ингибитор LY294002 (LY) модулирует статус активации протеинкиназ каскада Raf/MEK/ERK в процессе хондрогенной дифференцировки эMCK. Обозначения те же, что на рис. 4. Указаны фосфорилированные формы киназ Raf, MEK1/2, ERK1/2, а также белков ERK2, GAPDH, α -Tubulin.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе было использовано оборудование ЦКП "Коллекция культур клеток позвоночных", поддержанное Минобрнауки Российской Федерации (Соглашение $N \ge 0.75-15-2021-683$).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 19-04-00598).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах животные и люди не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Прюкова А.А., Шатрова А.Н., Дерябин П.И., Бородкина А.В., Князев Н.А., Никольский Н.Н., Бурова Е.Б. 2017. Модуляция фенотипических признаков старения стволовых эндометриальных клеток в условиях ингибирования mTOR и MAP-киназных сигнальных путей. Цитология. Т. 59. № 6. С. 410. (*Grukova A.A., Shatrova A.N., Deryabin P.I., Borodkina A.V., Knyazev N.A., Nikolsky N.N., Burova E.B.* 2017. Modulation of senescence phenotype of human endometrial stem cells under inhibition of mTOR

and MAP-kinase signaling pathways. Tsitologiya. V. 59. \mathbb{N}_{2} 6. P. 410.)

Bockeria L., Bogin V., Bockeria O., Le T., Alekyan B., Woods E.J., Brown A.A., Ichim T.E., Patel A.N. 2013. Endometrial regenerative cells for treatment of heart failure: a new stem cell enters the clinic. J. Transl. Med. V. 11. P. 56. https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-56

Burova E., Borodkina A., Shatrova A., Nikolsky N. 2013. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. Oxid. Med. Cell. Longev. V. 2013. P. 474931. https://doi.org/10.1155/2013/474931

Cunningham C.J., Redondo-Castro E., Allan S.M. 2018. The therapeutic potential of the mesenchymal stem cell secretome in ischaemic stroke. J. Cereb. Blood Flow Metab. V. 38. P. 1276. https://doi.org/10.1177/0271678X18776802

Domnina A.P., Fridliandskaia I.I., Zemelko V.I., Pugovkina N.A., Kovaleva Z.V., Zenin V.V., Grinchuk T.M., Nikolsky N.N. 2013. Mesenchymal stem cells from human endometrium do not undergo spontaneous transformation during long-term cultivation. Cell Tiss. Biol. V. 7. P. 221

Domnina A.P., Novikova P.V., Lyublinskaya O.G., Zenin V.V., Fridlyanskaya I.I., Mikhailov V.M., Nikolsky N.N. 2016. Mesenchymal stem cells with irreversibly arrested proliferation stimulate decidua development in rats. Exp. Ther. Med. V. 12. P. 2447. https://doi.org/10.3892/etm.2016.3671

Granero-Molto F., Weis J.A., Longobardi L., Spagnoli A. 2008. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. Expert Opin. Biol. Ther. V. 8. P. 255.

546

- https://doi.org/10.1517/14712598.8.3.255
- Huang J., Manning B.D. 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and two mTOR complexes. Biochem. Soc. Trans. V. 37. P. 217. https://doi.org/10.1042/BST0370217
- Huselstein C., Li Y., He X. 2012. Mesenchymal stem cells for cartilage engineering. Biomed. Mater. Eng. V. 22. P. 69. https://doi.org/10.3233/BME-2012-0691
- Jiang X., Huang B., Yang H., Li G., Zhang C., Yang G., Lin F., Lin G. 2017. TGF-β1 is involved in vitamin d-induced chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by regulating the ERK/JNK pathway. Cell Physiol. Biochem. V. 42. P. 2230. https://doi.org/10.1159/000479997
- Johnstone B., Hering T.M., Caplan A.I., Goldberg V.M., Yoo J.U. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp. Cell Res. V. 238. P. 265. https://doi.org/10.1006/excr.1997.3858
- Kim D.W., Staples M., Shinozuka K., Pantcheva P., Kang S.D., Borlongan C.V. 2013. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. Int. J. Mol. Sci. V. 14. P. 11692. https://doi.org/10.3390/ijms140611692
- Konala V.B., Mamidi M.K., Bhonde R., Das A.K., Pochampally R., Pal R. 2016. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. Cytotherapy. V. 18. P. 13. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.008
- Lee J.W., Kim Y.H., Kim S.-H., Han S.H., Hahn S.B. 2004. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. Yonsei Med. J. V. 45. Suppl. P. 41. https://doi.org/10.3349/ymj.2004.45.Suppl.41
- Li J., Zhao Z., Liu J., Huang N., Long D., Wang J., Li X., Liu Y. 2010. MEK/ERK and p38 MAPK regulate chondrogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through delicate interaction with TGF-beta1/Smads pathway. Cell Prolif. V. 43. P. 333. https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2010.00682.x
- Loewith R., Jacinto E., Wullschleger S., Lorberg A., Crespo J., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P., Hall M.N. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. Mol. Cell. V. 10. P. 457. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00636-6
- Ma L., Chen Z., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Pandolfi P.P. 2005. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. Cell. V. 121. P. 179. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.031
- Ma N., Teng X., Zheng Q., Chen P. 2019. The regulatory mechanism of p38/MAPK in the chondrogenic differentiation from bone marrow mesenchymal stem cells. J. Orthop. Surg. Res. V. 14. P. 434. https://doi.org/10.1186/s13018-019-1505-2
- Manning B.D., Tee A.R., Logsdon M.N., Blenis J., Cantley L.C. 2002. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. Mol. Cell. V. 10. P. 151.
 - https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00568-3

- Maumus M., Jorgensen C., Noël D. 2013. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes. Biochimie. V. 95. P. 2229. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.04.017
- McMahon L.A., Prendergast P.J., Campbell V.A. 2008. A comparison of the involvement of p38, ERK1/2 and PI3K in growth factor-induced chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. V. 368. P. 990. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.16
- Murphy M.P., Wang H., Patel A.N., Kambhampati S., Angle N., Chan K., Marleau A.M., Pyszniak A., Carrier E., Ichim T.E., Riordan N.H 2008. Allogeneic endometrial regenerative cells: An 'off the shelf solution' for critical limb ischemia? J. Transl. Med. V. 6. P. 45. https://doi.org/10.1186/1479-5876-6-45
- Oh C.D., Chang S.H., Yoon Y.M., Lee S.J., Lee Y.S., Kang S.S., Chun J.S. 2000. Opposing role of mitogen-activated protein kinase subtypes, erk-1/2 and p38, in the regulation of chondrogenesis of mesenchymes. J. Biol. Chem. V. 275. P. 5613. https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5613
- Oh C.D., Chun J.S. 2003. Signaling mechanisms leading to the regulation of differentiation and apoptosis of articular chondrocytes by insulin-like growth factor-1. J. Biol. Chem. V. 278. P. 36563.

https://doi.org/10.1074/jbc.M304857200

- Richardson S.M., Hoyland J.A., Mobasheri R., Csaki C., Shakibaei M., Mobasheri A. 2010. Mesenchymal stem cells in regeneratives medicine: opportunities and challenges for articular cartilage and intervertebral disc tissue engineering. J. Cell Physiol. V. 222. P. 23. https://doi.org/10.1002/jcp.21915
- Richardson S.M., Kalamegam G., Pushparaj P.N., Matta C., Memic A., Khademhosseini A., Mobasheri R., Poletti F.L., Hoyland J.A., Mobasheri A. 2016. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. Methods. V. 99. P. 69. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.015
- Sarbassov D.D., Ali S.M., Sabatini D.M. 2005. Growing roles for the mTOR pathway. Curr. Opin. Cell Biol. V. 17. P. 596. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.09.009
- Spagnoli A., Longobardi L., O'Rear L. 2005. Cartilage disorders: potential therapeutic use of mesenchymal stem cells. Endocr. Dev. V. 9. P. 17. https://doi.org/10.1159/000085719
- Starkman B.G., Cravero J.D., Delcarlo M., Loeser R.F. 2005. IGF-I stimulation of proteoglycan synthesis by chondrocytes requires activation of the PI3-kinase pathway but not ERK MAPK. Biochem. J. V. 389. P. 723. https://doi.org/10.1042/BJ20041636
- Steelman L.S., Chappell W.H., Abrams S.L., Kempf R.C., Long J., Laidler P., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Stivala F., Mazzarino M.C., Donia M., Fagone P., Malaponte G., Nicoletti F., Libra M. et al. 2011. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/ Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. Aging (Albany NY). V. 3. P. 192. https://doi.org/10.18632/aging.100296
- Tanthaisong P., Imsoonthornruksa S., Ngernsoungnern A., Ngernsoungnern P., Ketudat-Cairns M., Parnpai R. 2017. Enhanced chondrogenic differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells by

- GSK-3 inhibitors. PLoS One. V. 12. P. e0168059. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168059
- Tuli R., Tuli S., Nandi S., Huang X., Manner P.A., Hozack W.J., Danielson K.G., Hall D.J., Tuan R.S. 2003. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling crosstalk. J. Biol. Chem. V. 278. P. 41227. https://doi.org/10.1074/jbc.M305312200
- Ushakov R.E., Skvortsova E.V., Vitte M.A., Vassilieva I.O., Shatrova A.N., Kotova A.V., Kenis V.M., Burova E.B. 2020. Chondrogenic differentiation followed IGFBP3 loss in human endometrial mesenchymal stem cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. V. 531. P. 133. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.064
- Yin W., Park J.I., Loeser R.F. 2009. Oxidative stress inhibits insulin-like growth factor-I induction of chondrocyte proteoglycan synthesis through differential regulation of phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt and MEK-ERK MAPK signature.

- naling pathways. J. Biol. Chem. V. 284. P. 31972. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.056838
- 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 Tiss. Biol. V. 6. P. 1. https://doi.org/10.1134/S1990519X12010129
- Zha K., Sun Z., Yang Y., Chen M., Gao C., Fu L., Li H., Sui X., Guo Q., Liu S. 2021. Recent developed strategies for enhancing chondrogenic differentiation of MSC: Impact on MSC-based therapy for cartilage regeneration. Stem Cells Int. V. 2021. P. 8830834. https://doi.org/10.1155/2021/8830834
- Zhang Y., Pizzute T., Pei M. 2014. A review of crosstalk between MAPK and Wnt signals and its impact on cartilage regeneration. Cell Tissue Res. V. 358. P. 633. https://doi.org/10.1007/s00441-014-2010-x

Involvement of the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Controlling Chondrogenic Differentiation of Endometrial Mesenchymal Stromal Cells

A. S. Brovkina^a, R. E. Ushakov^a, I. O. Vassilieva^b, A. P. Domnina^a, and E. B. Burova^a, *

^a Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia ^b City Clinical Hospital No. 31, St. Petersburg, 197110 Russia *e-mail: lenbur87@mail.ru

The present work describes ability to chondrogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells (MESCs) derived from desquamated endometrium in menstrual blood. Neither MESCs chondrogenic capacity nor related signaling pathways have been studied yet. MESCs monolayer culture cultivated in chondrogenic medium within 11—14 days demonstrates chondrogenesis markers such as positive staining with Safranin O and with Alcian blue as well as the increased *COL2A1* expression level. We studied linkage between expression of chondrogenic markers and activation status of PI3K and MAPK pathways by cultivating MESCs in chondrogenic medium in the presence of PI3K inhibitor LY294002; we found that PI3K/Akt/mTOR signaling negatively regulates *COL1A1* expression and positively regulates *COL2A1* during differentiation and that it is also involved in regulation of Raf/MEK/ERK kinase activity. These results suggest that PI3K/Akt/mTOR pathway plays significant role in regulation of MESCs chondrogenesis.

Keywords: chondrogenic differentiation, endometrial mesenchymal stromal cells, PI3K/Akt/mTOR pathway, qRT-PCR

УЛК 616-092.18

ИЗМЕНЕНИЕ ЧИСЛА CD38 И Cx43-ИММУНОПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК В НЕЙРОВАСКУЛЯРНОЙ ЕДИНИЦЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2021 г. Е. Д. Хилажева^{1, *}, А. И. Мосягина¹, А. В. Моргун¹, Н. А. Малиновская¹, Я. В. Горина¹, Е. В. Харитонова¹, О. Л. Лопатина¹, А. Б. Салмина^{1, 2}

¹Научно-исследовательский институт молекулярной медицины и патобиохимии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, 660022 Россия

²Отдел исследований мозга Научного центра неврологии, Москва, 125367 Россия

*E-mail: elena.hilazheva@mail.ru Поступила в редакцию 06.08.2021 г. После доработки 19.08.2021 г. Принята к публикации 20.08.2021 г.

Известно, что митохондриальная дисфункция может являться триггером или сопутствующим механизмом при развитии болезни Альцгеймера. Также известно, что восстановление внутриклеточной митохондриальной активности нейронов и церебральных эндотелиоцитов возможно за счет переноса неповрежденных митохондрий из других клеток головного мозга, в частности, астроцитов, причем этот перенос митохондрий опосредован белком CD38 и функционально связанным с ним коннексином 43 (Cx43). Отсюда следует, что указанные молекулы перспективны для изучения как в отношении механизмов развития нейродегенерации, так и в отношении возможной модуляции их активности для коррекции неврологического дефицита. Цель настоящей работы заключалась в исследовании изменения числа CD38- и Cx43-иммунопозитивных клеток в составе нейроваскулярной единицы и гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера. Нами показано, что токсическое действие бета-амилоида приводит к значительному увеличению числа CD38- и Cx43-позитивных клеток как в гиппокампе животных *in vivo*, так и в составе модели ГЭБ *in vitro*. Также нами показано, что культивирование изолированных астроцитов в присутствии бета-амилоида приводит к увеличению содержания Сх43 в клетках, причем проницаемость этих полуканалов достоверно увеличивается.

Ключевые слова: астроциты, нейроны, эндотелиоциты, болезнь Альцгеймера, митохондрии, CD38, Cx43 **DOI:** 10.31857/S0041377121060067

Болезнь Альцгеймера (БА) является одной из наиболее распространенных нейродегенеративных болезней и находится в фокусе многочисленных исследований уже на протяжении многих лет. Однако многие клеточно-молекулярные звенья патогенеза БА до сих пор остаются малоизученными (Compagnoni et al., 2020), что крайне затрудняет разработку эффективных и безопасных методов профилактики и лечения.

В последнее время в исследованиях процессов нейродегенерации особое внимание привлекают нарушения митохондриальной динамики в клетках нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы. Известно, что в развитии нейродегенеративных процессов задействованы различные механизмы, связанные с митохондриями, в частности дефекты энерго-

Принятые сокращения: АДФ и цАДФР — аденозиндифосфат и циклическая АДФ-рибоза соответственно; БА — болезнь Альцгеймера; ГЭБ — гематоэнцефалический барьер; НАД $^+$ и НАДФ — никотинамидадениндинуклеотид и его фосфат соответственно; НВЕ — нейроваскулярная единица; А β — бетаамилоид; Сх43 — коннексин 43; LY — Lucifer Yellow; PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

продукции, мутации митохондриальной ДНК, изменения динамики митохондрий и аберрантный гомеостаз ионов Ca^{2+} (Franco-Iborra et al., 2018).

Показано, что митохондриальная дисфункция может также являться триггером или сопутствующим механизмом при развитии БА (Swerdlow, 2018). К сожалению, к настоящему времени не разработаны способы фармакологической модуляции для восстанавления аберрантной активности митохондрий и митохондриальной динамики в клетках головного мозга. Однако некоторые исследования показывают, что восстановление митохондриальной активности нейронов и церебральных эндотелиоцитов возможно с использованием репаративного потенциала других клеток, входящих в состав нейроваскулярной единицы (НВЕ) и гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), например, астроцитов. В частности, было показано, что астроциты могут выступать в качестве доноров неповрежденных митохондрий при экспериментальной ишемии головного мозга, причем такой транспорт митохондрий связан с активностью CD38 в астроцитах, а также туннелирующих межклеточных нанотрубочек и экзосом (микровезикул) (Hayakawa et al., 2016).

CD38 — это трансмембранный гликопротеин, компонент клеточных сигнальных систем, сопряженных в клетках нервной системы с рецепторами многих нейротрансмиттеров. CD38 способен проявлять 2 типа ферментативной активности: АДФ-рибозилциклазную и цАДФ-рибозилгидролазную. Субстратами его являются НАД+, его фосфат НАДФ, а также цАДФ-рибоза. Кроме того, благодаря олигомерной структуре, СD38 может проявлять свою активность в качестве каталитически активного транспортера, ответственного за генерацию и вход цАДФ-рибозы в клетку. цАДФ-рибоза, генерируемая с помощью CD38, играет важную роль во многих биологических процессах в головном мозге и других тканях и органах. Примечательно, что такую же транспортную функциональную нагрузку дополнительно может нести и экспрессируемый в цитоплазматической мембране коннексин 43 (Сх43) (Салмина и др., 2012).

Известно, что Сх43 функционально связан с CD38, выполняя функцию канала для поступления НАД+ из цитозоля во внеклеточное пространство к активному сайту СD38, либо для поступления цАДФ-рибозы, синтезированной внеклеточно, в цитозоль для связывания с рианодиновыми рецепторами и индукции высвобождения кальция из внутриклеточных депо (Bruzzone et al., 2001; Song et al., 2011). Помимо этого, молекулы Сх43, находящиеся на поверхности астроцитов, обеспечивают формирование астроглиального синцития и могут служить в качестве каналов для секреции глиотрансмиттеров и ионов (Osipova et al., 2018). Показано, что в некоторых типах гликолитически активных клеток Сх43опосредованный механизм секреции и (или) транспорта лактата достаточно эффективен (Dovmark et al., 2017), что позволяет предположить его наличие в астроцитах головного мозга.

Интересно, что в условиях подавления гликолиза и окислительногофосфорилированияастроцитыснижают коммуникацию за счет Сх43-опосредованных межклеточных контактов (щелевых), но увеличивают активность Сх43-полуканалов, высвобождающих во внеклеточное пространство ионы и метаболиты (Contreras et al., 2002). Кроме того, несмотря на то, что экспрессия гена Сх43 долгое время считалась прерогативой астроцитов, существуют экспериментальные данные, демонстрирующие наличие этой молекулы в клетках нейрональной и эндотелиальной природы (Liu et al., 2012; Johnson et al., 2018), что может обеспечивать механизмы эффективной межклеточной коммуникации в пределах НВЕ головного мозга.

Вместе с тем, существуют экспериментальные данные, демонстрирующие повышение уровня содержания и активности белков CD38 и Cx43 при ряде нейродегенеративных заболеваний, что может говорить об их вкладе в развитие нейровоспаления и нейродегенерации (Camacho-Pereira, 2016; Yi et al., 2016).

В соответствии с вышеперечисленными обстоятельствами, изучение CD38 и сопряженного с ним Cx43 является перспективным как в отношении исследования механизмов развития нейродегенерации, в том числе альцгеймеровского типа, так и в отношении возможной модуляции процессов трансфера митохондрий в клетках НВЕ/ГЭБ для коррекции неврологического дефицита.

Таким образом, целью настоящей работы стало исследование изменения числа CD38 и Cx43-иммунопозитивных клеток в составе HBE/ГЭБ головного мозга при экспериментальной БА.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объекты исследования. Животные. Для экспериментов *in vivo* использовали мышей-самцов линии C57BL/6 в возрасте 4 мес. Животным с экспериментальной БА вводили бета-амилоид (А β) в CA1 зону гиппокампа. Контрольную группу составляли ложно-оперированные животные после введения в гиппокамп растворителя для А β — фосфатно-солевого буферного раствора (PBS). Всего использовали 20 животных (n=20). В экспериментах *in vitro* для получения первичных культур клеток использовали крыс линии Wistar. Общее число животных n=14.

Животных содержали в клетках со свободным доступом к воде и корму при постоянной температуре 21 ± 1 °C и регулярном световом цикле 12 ч день и 12 ч ночь. Исследования на животных проводили в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/EC).

Клетки. Использовали первично-выделенные культуры клеток церебрального эндотелия, астроцитов и нейросфер (НСФ). Из НСФ путем направленной дифференцировки получали сокультуру астроцитов и нейронов. Контрольную группу составляли интактные клетки, экспериментальную — клетки, культивируемые в течение 1 сут в присутствии $\Lambda\beta$ в конечной концентрации 100 нМ.

Моделирование нейродегенерации *in vivo*. Моделирование БА осуществляли интрагиппокампальным введением А β билатерально по 1 мкл в зону CA1 по стереотаксическим координатам ML = ± 1.3 мм, AP = 2.0 мм, DV = -1.9 мм (Epelbaum et al., 2015). А β (Sigma-Aldrich, США) перед введением животным растворяли в PBS до концентрации 50 мкМ с последующей агрегацией в термостате при 37°C в течение 7 сут. Оценку признаков БА проводили, начиная с 10-х сут (Sipos et al., 2007) после оперативного вмешательства. Модель БА верифицировали с помощью окрашивания тиофлавином S. После введения амилоида в ткани головного мозга наблюдали флуоресцирующие амилоидные бляшки зеленого цвета.

Приготовление срезов и иммуногистохимия. Для фиксации тканей осуществляли транскардиальную перфузию 4%-ным параформальдегидом с последующим забором головного мозга. Далее изолированный мозг фиксировали в 10%-ном нейтральном за-

буференном формалине, после чего погружали в 20%-ный раствор сахарозы.

С помощью микротома Microm HM 650 (Thermo Scientific, США) изготавливали срезы толщиной 50 мкм. Наличие в образцах исследуемых маркеров определяли методом непрямой иммуногистохимии для свободно плавающих срезов (Encinas, Enikolopov, 2008).

После промывки в PBS срезы блокировали 3%-ным козьим сывороточным альбумином в PBS и 1%-ном Тритоне Х-100 в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим инкубированием в течение ночи с первичными антителами в разведении 1:1000 в 3%-ном BSA в PBS и 0.2%-ном Тритоне X-100 при 4°C. Использовали первичные моноклональные крысиные антитела к CD31 (MBS532307; MvBioSource.com, США), куриные поликлональные антитела к нейронспецифической енолазе (NSE) (GTX85462; GeneTex, США), мышиные моноклональные антитела к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) (MBS8241552; MyBioSource.com, США), кроличьи поликлональные антитела к Cx43 (MBS9600634; My-BioSource.com, США) и кроличьи поликлональные антитела к CD38 (GTX37752; GeneTex, США). После инкубации с первичными антителами срезы промывали и инкубировали со вторичными антителами в разведении 1:1000 в течение 2 ч при комнатной температуре. Использовали вторичные поликлональные антитела (все от Авсат. Великобритания): ослиные, специфичные к кролику, Alexa Fluor 555 (ab150074); козьи, специфичные к курице, Alexa Fluor 647 (ab150171); козьи, специфичные к мыши, Alexa Fluor 647 (ab150115); козьи, специфичные к крысе, Alexa Fluor 647 (ab150159. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV 10і (Япония). В срезах головного мозга в НВЕ считали абсолютное число клеток в поле зрения нейрональной (NSE-позитивные), астроглиальной (GFAP-позитивные) и эндотелиальной (СD31-позитивные) природы, имеющих целевые молекулы (Сх43, СD38) на различных уровнях в гиппокампе. Каждый эксперимент проводили в 10 повторностях. Оценивали не менее пяти полей зрения в каждом срезе гиппокампа.

Выделение и культивирование церебральных эндотелиоцитов. Использовали модифицированный протокол (Liu et al., 2013). Выделение мозга с удалением мозговых оболочек и крупных церебральных сосудов осуществляли с помощью роллинга на фильтровальной бумаге. Выделяли кору головного мозга и удаляли крупные сосуды в холодном растворе Хенкса (ПанЭко, Россия). Мелконарезанную кору головного мозга центрифугировали в пробирке объемом 15 мл в течение 3 мин при 150 g и комнатной температуре. Последующие этапы включали:

- 1) добавление к осадку в двукратном объеме 25%ной FBS (HyClone, США), тритурирование 25 раз пипеткой 5 мл с последующим центрифугированием гомогената в течение 10 мин при 600 g при комнатной температуре;
- 2) забор самого нижнего слоя и перенос в новую коническую пробирку 15 мл;

- 3) повторение этапов тритурирования и центрифугирования три раза, после чего проводили ферментативную обработку пеллета в растворе 0.1%-ной коллагеназы II (ПанЭко, Россия) в течение 35 мин при 37°С с периодическим перемешиванием и дальнейшим центрифугированием в течение 5 мин при 200 g;
- 4) умеренное ресуспензирование осадка в питательной среде и посев в культуральные флаконы.

Культивирование эндотелиальных клеток осуществляли при 37°C, 5% CO₂ в культуральных флаконах, предварительно покрытых 0.1%-ным раствором желатина (Biological Industries, США) в культуральной среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 20% FBS (Ну-Clone, США), а также 0.58 мг/мл глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия). Смену среды проводили каждые 3 сут.

Выделение и культивирование нейросфер. Животных декапитировали после охлаждения на льду и производили забор головного мозга. Мозг помещали в ледяной раствор 2%-ной глюкозы в PBS (ПанЭко, Россия). Выделяли интересующие регионы (гиппокамп, стенки боковых желудочков) и иссекали до размеров 1 мм³. После окончания диссекции выделенную ткань переносили в свежий раствор 2%-ной глюкозы в PBS (в конической пробирке 14 мл) на 1 мин. После осаждения ткани удаляли супернатант. Оставшуюся ткань ресуспензировали в 1 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, США). Проводили тритурацию ткани (25-30 раз) стерильным пластиковым наконечником до получения однородной суспензии клеток. К полученной суспензии добаляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation. Через 2 мин после осаждения неразделенных кусочков ткани под силой тяжести собирали супернатант и переносили его в новую стерильную пробирку объемом 14 мл. Собранный супернатант центрифугировали при 150 g в течение 5 мин, после чего удаляли супернатант и добавляли 1 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation с последующей тритурацией. Полученную клеточную суспензию переносили в культуральные флаконы Т-75 см² с 25 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation. Культивирование осуществляли в условиях инкубатора при 5% СО2 и 37°C. Через 24-48 ч после выделения наблюдали образование нейросфер.

Получение культуры астроцитов. Использовали направленную дифференцировку нейросфер в среде Astrocyte Medium (ScienCell, США) следующего состава: базальная среда (Basal Medium, ScienCell, США), 10% FBS (HyClone, США), AGS (ScienCell, США), раствор пенициллина-стрептомицина (ScienCell, США) в конечной концентрации 50 ед./мл (Хилажева и др., 2015). Через 7—9 сут наблюдали образование монослоя астроцитов.

Получение сокультуры астроцитов и нейронов. Нейросферы направленно дифференцировали в астроциты и нейроны. Нейросферы ресуспендировали в культуральной среде NeuroCult NS-A Differentiation Kit (StemCell, США) и засевали в культуральные

флаконы T-75 см². Через 5—7 сут наблюдали образование сокультуры астроцитов и нейронов.

Получение модели ГЭБ *in vitro*. Для получения модели ГЭБ сокультуру астроцитов и нейронов засевали на дно лунок культурального планшета, затем в лунки устанавливали культуральные вставки (Corning-Costar, США), на которые помещали эндотелиоциты. Соотношение количества эндотелиоцитов, астроцитов и нейронов составляло 1 : 2 : 1 соответственно. Смесь клеток культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 20% FBS (HyClone, США), а также 0.58 мг/мл глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (все от ПанЭко, Россия) в условиях инкубатора при 37°С и 5% CO₂.

Оценка Сх43-опосредованного транспорта в астроцитах в присутствии и в отсутствие $A\beta$. Астроциты засевали в 12-луночный культуральный планшет по 2.5×10^5 клеток на 1 лунку. После достижения 95% конфлюентности производили замену культуральной среды на среду с $A\beta$ в конечной концентрации 100 нМ. Через 1 сут культивирования в среде с $A\beta$ оценивали Сх43-опосредованный транспорт в астроцитах с использованием красителя Lucifer Yellow (LY), а также иммуноцитохимически с использованием Сх43-антител.

Для оценки Сх43-опосредованной проницаемости астроциты культивировали в среде, содержащей флуоресцентный краситель LY в конечной концентрации 50 мкМ. Через 24 ч среду с LY убирали, клетки промывали раствором PBS и оценивали интенсивность флуоресценции красителя в астроцитах с помощью флуоресцентного микроскопа ZOE (Bio-Rad, США).

Иммуногистохимическое выявление белков CD38 и **Сх43 в культурах** *in vitro*. Клетки фиксировали в 4%ном параформальдегиде в течение 15 мин, после чего отмывали раствором PBS. Наличие в клетках исследуемых маркеров определяли методом непрямой иммуногистохимии. Использовали первичные поликлональные антитела: к белкам плотных контактов ZO1 (козлиные sc-8147; Santa Cruz, США и кроличьи orb11587; Biorbyt, Великобритания); куриные к GFAP (LS-B6299; LSBio, США); мышиные к нейрон-специфичному ядерному белку NeuN (MAB377; Merck Millipore, США); кроличьи к CD38 (LS-C331640; LSBio, США), кроличьи к Cx43 (ab11370; Abcam, США). Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1:300. Время инкубации составляло 18 ч при 4°С. После инкубации производили 2-х кратную отмывку клеток раствором PBS.

Вторичные поликлональные антитела от Abcam, Великобритания: ослиные, специфичные к мыши, Alexa Fluor 488 (ab150117); ослиные, специфичные к кролику, Alexa Fluor 555 (ab150077) и козьи, специфичные к курице Alexa Fluor 647 (ab150171), а также ослиные, специфичные к козе, Alexa Fluor 488 (A11055; Life Technologies, США). Антитела использовали в разведении 1:500, время инкубации составляло 2 ч при 37°C.

Микроскопию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE (Bio-Rad, США). Наличие изучаемых маркеров изучали в клетках эндотелия (ZO1-позитивные), нейронах (NeuN-позитивные) и астроцитах (GFAP-позитивные). Каждый эксперимент проводили в 6 повторностях. В каждой экспериментальной лунке не менее, чем в пяти полях зрения, считали долю клеток (%) нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы, несущих целевые молекулы.

Статистический анализ. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программ GraphPad Prizm 8.0.1 (версия 8.0, США) и Statplus Professional (AnalystSoft Inc, США), сборка 5.9.8.5/Соге v.5.9.33 и GraphPad 6.0 (США). Для оценки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова—Смирнова. При отсутствии условий нормальности распределения для сравнения выборок применяли U-критерий Манна—Уитни. Различия принимали значимыми при $P \leq 0.05$. Результаты представлены в виде средних значений M и их стандартных отклонений SD.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы обнаружили, что у животных с экспериментальной БА регистрируется значимое (P < 0.05) увеличение числа Сх43-позитивных клеток нейрональной, астроглиальной и эндотелиальной природы по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Так, абсолютное число нейронов гиппокампа, несущих Сх43, у мышей с моделью БА оказалось выше почти в 2 раза, чем у контрольных животных, а число Сх43-позитивных астроцитов — выше в 2.5 раза. Также зарегистрировано значимое увеличение числа эндотелиоцитов, несущих Сх43, у животных с БА (табл. 1).

Выявленное однонаправленное увеличение числа Сх43-позитивных клеток может являться результатом подавления метаболической активности клеток нейроваскулярной единицы (гликолиза, митохондриальной дисфункции), а также быть проявлением нейровоспаления в участках аккумуляции Аβ, вызванного активированными астроцитами.

Далее мы провели иммуноцитохимическое исследование содержания Cx43 в астроцитах и изучение проницаемости коннексиновых полуканалов в астроцитах в условиях *in vitro* с использованием красителя LY. При исследовании содержания Cx43 в астроцитах нами установлено, что число коннексиновых полуканалов в астроцитах при культивировании в присутствии А β статистически значимо возрастает по сравнению с контрольной группой ($P \le 0.05$, рис. 1a). При этом средняя площадь коннексиновых полуканалов в астроцитах экспериментальной группы оказалась в 1.5 раза меньше, чем в интактных астроцитах ($P \le 0.05$, рис. 16).

Для оценки Сх43-опосредованной проницаемости астроцитов в культуральную среду вносили флуоресцентный краситель LY и через 24 ч оценивали интенсивность флуоресценции красителя в астроцитах. Известно, что захват этого флуоресцентного

красителя из внеклеточного пространства в Сх43⁺-клетках опосредуется именно активностью Сх43-полуканалов (Lagos-Cabré et al., 2018). В результате исследования нами было выявлено, что в астроцитах, культивированных в присутствии А β , интенсивность флуоресценции красителя LY была в 1.5 раза выше, чем в интактных астроцитах ($P \le 0.05$, рис. 2).

Таким образом, астроциты гиппокампа демонстрируют увеличение числа Сх43 в ответ на токсическое действие Аβ *in vitro*, причем проницаемость этих полуканалов значимо увеличивается. С учетом данных о том, что метаболическое повреждение астроцитов вызывает активацию Сх43-полуканалов, эти данные могут быть интерпретированы и как доказательство нарушения процессов продукции энергии в аффектированных астроцитах в результате развития митохондриальной дисфункции, и как свидетельство их активации, необходимой для развития нейровоспаления.

Далее нами исследовано число CD38-позитивных клеток в гиппокампе животных с экспериментальной БА, т.е. клеток, несущих молекулу, потенциально сопряженную (в функциональном аспекте) с Сх43. В результате, было выявлено статистически значимое снижение CD38⁺-нейронов в гиппокампе головного мозга животных после интрагиппокампального введения АВ по сравнению с ложно-оперированными животными ($P \le 0.05$, табл. 2). В клетках эндотелиальной природы, напротив, отмечали двукратное увеличение числа CD38⁺-клеток в группе с экспериментальной БА относительно группы контроля ($P \le 0.05$, табл. 1). Однако не было выявлено статистически значимых отличий при сравнении количества СD38⁺-астроцитов в гиппокампе животных контрольной и экспериментальной групп.

Причиной увеличения числа CD38-позитивных клеток может быть их повреждение, а также дисфункция митохондрий, косвенным подтверждением чего является увеличение содержания Cx43 как маркера метаболического ингибирования. Ранее было показано, что повреждение митохондрий вызывает открытие мегаканалов (MPT) в местах контакта их

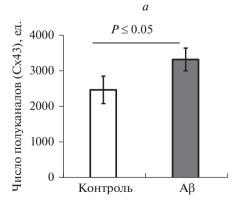
Таблица 1. Число Сх43- и CD38-позитивных клеток на срезах гиппокампа мышей контрольных и с экспериментальной БА

Условия	Число клеток, ед. ($M \pm SD$)							
эсловия	нейроны	астроциты	эндотелиоциты					
Cx43 ⁺								
Контроль	6.81 ± 1.22	2.94 ± 0.39	6.63 ± 1.05					
БА	11.27 ± 1.41	7.36 ± 0.76	8.25 ± 0.93					
	(P = 0.0018)	$(P \le 0.0001)$	(P = 0.0361)					
CD38 ⁺								
Контроль	8.6 ± 0.84	8.73 ± 0.89	4.2 ± 1.8					
БА	4.75 ± 0.42	8.11 ± 0.81	7.1 ± 0.46					
	(P = 0.0003)		(P = 0.0361)					

внутренней и внешней мембран, что вызывает высвобождение в цитозоль НАД⁺ (выступающего в качестве субстрата для CD38) и белков с проапоптотической активностью (Alano et al., 2007). В этом контексте вполне объяснимо, почему астроциты не демонстрируют значимого увеличения содержания CD38 in vivo:

1) астроциты являются более устойчивыми к повреждению в силу того, что максимально экипированы ферментами гликолиза и могут продуцировать АТФ даже при значимом подавлении активности митохондрий; 2) они имеют минимальное количество митохондрий по сравнению с нейронами и эндотелиоцитами, что позволяет им избегать выраженного окислительного стресса; 3) они имеют высокую концентрацию НАД+, причем преимущественно в цитозоле, тогда как нейроны и эндотелиоциты имеют меньшие уровни НАД+, который, в основном, аккумулируется в митохондриях; 4) они имеют высокий уровень содержания Сх43 и могут благодаря этому регулировать биодоступность НАД+ для других астроцитов в составе астроглиального синцития (Alano et al., 2007).

Далее мы проверили, насколько это справедливо для клеток HBE головного мозга при токсическом



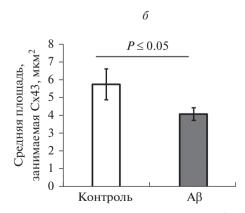


Рис. 1. Содержание Cx43 в астроцитах *in vitro* в физиологических условиях в контроле и в присутствии А β (100 нМ). a — Число коннексиновых полуканалов, δ — средняя площадь сигнала флуоресценции.

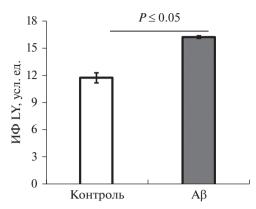


Рис. 2. Интенсивность захвата красителя Lucifer Yellow астроцитами из среды культивирования *in vitro* в контрольных условиях и в присутствии $100 \text{ нM A}\beta$. ИФ — интенсивность флуоресценции.

действии А β *in vitro*. Мы оценили количество Сх43позитивных и СD38-позитивных клеток эндотелия, нейронов и астроцитов, культивируемых совместно в течение 24 и 48 ч в статической модели ГЭБ *in vitro* в присутствии и в отсутствие А β .

Так, при культивировании клеток ГЭБ в присутствии А β через 24 ч было выявлено статистически значимое увеличение количества CD38-позитивных эндотелиоцитов, которое сохранялось в течение 48 ч культивирования ($P \le 0.05$, рис. 3a). К этому же времени (48 ч) было зафиксировано и статистически значимое увеличение в присутствии А β количества астроцитов и нейронов, несущих CD38 ($P \le 0.05$, рис. 36, θ).

При анализе количества Сх43-позитивных клеток в составе ГЭБ при культивировании в присутствии А β было выявлено статистически значимое увеличение числа Сх43⁺-астроцитов ($P \le 0.05$, рис. 4 δ), которое сохранялось на протяжении всего времени наблюдения (24 и 48 ч). Также было зафиксировано увеличение количества Сх43⁺-эндотелиоцитов и нейронов (48 ч культивирования с А β) ($P \le 0.05$, рис. 4a, e).

Таким образом, нами выявлено, что токсическое действие $A\beta$ *in vitro* приводит к значительному увеличению количества Сх43-позитивных и СD38-позитивных клеток в составе модели ГЭБ. Это соответствует изменениям, зарегистрированным нами при исследовании действия $A\beta$ *in vivo*.

Между тем известно, что выраженное увеличение экспрессии CD38 в клетках может приводить к значительному истощению уровня HAД⁺ (Camacho-Pereira et al., 2016), поэтому увеличение количества CD38-иммунопозитивных нейронов и эндотелиоцитов способно усугублять последствия митохондриальной дисфункции и активировать механизмы клеточной гибели. Снижение уровня HAД⁺ может быть одной из причин возрастных дисфункций, оказывающих влияние на процесс развития болезни Альцгеймера (Lautrup et al., 2019). Отмечается, что процесс старения сопровождается увеличением экспрессии в клетках CD38, контро-

лирующего уровень НАД+ (Chini, 2009). Известно, что у мышей экспрессия и активность CD38 увеличиваются во время старения, а СD38 вносит значительный вклад в связанное с возрастом истощение НАД+ и митохондриальную дисфункцию, по крайней мере частично за счет ингибирования активности НАД+-зависимых сиртуинов (гистоновых деацетилаз) (Сатасho-Pereira et al. 2016). Нокдаун CD38 у мышей линии APP/PS1 уменьшает аккумуляцию АВ и уровни растворимого АВ, а также восстанавливает пространственное обучение, возможно, за счет повышения уровня НАД+ в мозге (Blacher et al., 2015). Выявлено (Camacho-Pereira et al., 2016), что экспрессия и активность CD38 при нейродегенеративных заболеваниях возрастают, что является первым косвенным доказательством участия CD38 в нейродегенерации и нейровоспалении.

С другой стороны, в экспериментальной модели гипоксии на клеточных культурах доказано, что CD38 участвует в переносе митохондрий от астроцитов к нейронам после инсульта (Hayakawa et al., 2016), что позволяет рассматривать CD38-экспрессирующие астроциты в качестве клеток-доноров митохондрий для нейронов и эндотелиоцитов при нейродегенерации, индуцированной токсическим действием Аβ.

Также известно, что содержание Сх43 увеличивается в астроцитах, окружающих амилоидные бляшки, как в головном мозге пациентов с БА (Nagy et al., 1996), так и в головном мозге мышей с генетической моделью БА линии APP/PS1 (Yi et al., 2016), тем самым способствуя снижению жизнеспособности нейронов и развитию синаптической дисфункции. В культуре клеток АВ не только запускает активацию Сх43-полуканалов, но и глиальных глутаматных и пуринергических рецепторов; последние, в свою очередь, высвобождают АТФ и глутамат, что способствует повреждению и гибели нейронов (Koulakoff et al., 2012). Кроме того, Сх43-опосредованное высвобождение АТФ, зарегистрированное у мышей линии APP/PS1, провоцирует дальнейшее прогрессирование нейродегенерации (Delekate et al., 2014). Интересно, что уменьшение уровня содержания Сх43 или его фармакологическое ингибирование у мышей линии APP/PS1 приводит к выраженному снижению дистрофических изменений нейритов, уменьшению митохондриального окислительного стресса, а также препятствует прогрессированию когнитивных нарушений на фоне отсутствия видимого уменьшения отложения $A\beta$ в головном мозге (Ren et al., 2018).

Сдругой стороны, ряд исследований показывает, что Сх43обладаетнейропротекторным эффектом (Kozorizet al., 2010a; Le et al., 2013). Согласно недавно полученным данным (Kajiwara et al., 2018), экспрессия Сх43 при аккумуляции АВ вткани головного мозгазащищает клетки от альтерации. В этом контексте важно отметить, что Сх43 экспрессируется и на мембранах митохондрий, чтобыло убедительно показано для клеток миокарда (Rodríguez-Sinovas et al., 2018), жировой ткани (Kim et al., 2017) и астроцитов (Kozoriz et al., 2010b). Выяснение, насколько

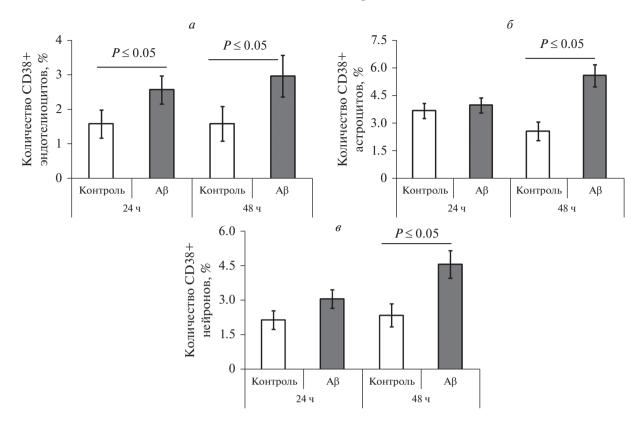


Рис. 3. Количество CD38-позитивных клеток в модели ГЭБ *in vitro* при культивировании в контрольных условиях и в присутствии $100 \text{ нM A}\beta$. a — Эндотелиоциты, δ — астроциты, ϵ — нейроны.

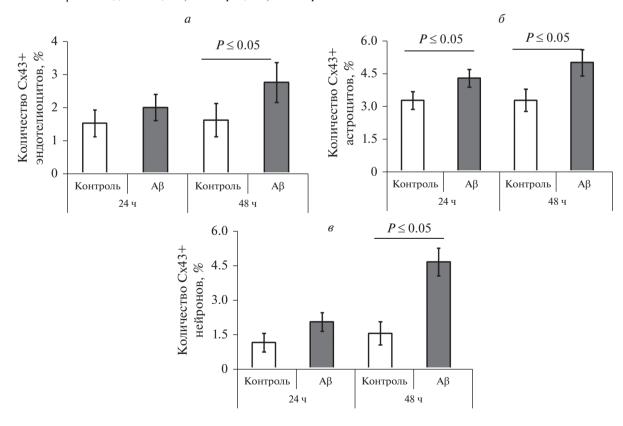


Рис. 4. Количество Сх43-позитивных клеток в модели ГЭБ *in vitro* при культивировании в контрольных условиях и в присутствии $100 \text{ нM A}\beta$. a — Эндотелиоциты, δ — астроциты, ϵ — нейроны.

митохондриальная локализация Сх43 актуальна для клеток НВЕ при экспериментальной БА, требует дальнейшего экспериментального исследования.

Таким образом, белки CD38 и Cx43 можно рассматривать в качестве перспективных мишеней для фармакологической модуляции при нейродегенерации, в том числе альцгеймеровского типа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена при финансовой поддержке Программы Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ (РФ НШ-2547.2020.7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных проведены в соответствии с общепринятыми этическими международными нормами с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС) и требованиями приказа Минздрава России № 267 от 19.06.2003 "Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации".

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Салмина А.Б., Инжутова А.И., Моргун А.В., Окунева О.С., Малиновская Н.А., Лопатина О.Л., Петрова М.М., Таранушенко Т.Е., Фурсов А.А., Кувачева Н.В. 2012. НАД⁺-конвертирующие ферменты в клетках нейрональной и глиальной природы: CD38 как новая молекула-мишень для нейропротекции. Вестник Росс. акад. мед. наук. Т. 67. № 10. С. 29. (Salmina A.B., Inzhutova A.I., Morgun A.V., Okuneva O.S., Malinovskaya N.A., Lopatina O.L., Petrova M.M., Taranushenko T.E., Fursov A.A. Kuvacheva N.V. 2012. NAD⁺-converting enzymes in neuronal and glial cells: CD38 as a novel target for neuroprotection. Ann. Russ. Acad. Med. Sci. V. 67. № 10. P. 29.)
- *Хилажева Е.Д., Бойцова Е.Б., Пожиленкова Е.А., Солониук Ю.Р., Салмина А.Б.* 2015. Получение трехклеточной модели нейроваскулярной единицы *in vitro*. Цитология. Т. 57. № 10. С. 710. (*Khilazheva E.D., Boytsova E.B., Pozhilenkova E.A., Solonchuk Yu.R., Salmina A.B.* 2015. The model of neurovascular unit *in vitro* consisting of three cells types. Tsitologiya. V. 57. № 10. Р. 710.)
- Alano C.C., Tran A., Tao R., Ying W., Karliner J.S., Swanson R.A. 2007. Differences among cell types in NAD(+) compartmentalization: a comparison of neurons, astrocytes, and cardiac myocytes. J. Neurosci. Res. V. 85. P. 3378. https://doi.org/10.1002/jnr.21479
- Blacher E., Dadali T., Bespalko A., Haupenthal V.J., Grimm M.O., Hartmann T., Lund F.E., Stein R., Levy A. 2015. Alzheimer's disease pathology is attenuated in a CD38-deficient mouse model. Ann. Neurol. V. 78. P. 88. https://doi.org/10.1002/ana.24425
- Bruzzone S., Franco L., Guida L., Zocchi E., Contini P., Bisso A., Usai C., De Flora A. 2001. A self-restricted CD38-connexin 43 cross-talk affects NAD⁺ and cyclic ADP-ribose metabolism and regulates intracellular calcium in 3T3 fibroblasts.

- J. Biol. Chem. V. 276. P. 48300. https://doi.org/10.1074/jbc.M107308200
- Camacho-Pereira J., Tarragó M.G., Chini C.C.S., Nin V., Escande C., Warner G.M., Puranik A.S., Schoon R.A., Reid J.M., Galina A., Chini E.N. 2016. CD38 Dictates age-related NAD decline and mitochondrial dysfunction through an SIRT3-dependent mechanism. Cell Metab. V. 23. P. 1127. https://doi.org/1016/j.cmet.2016.05.006
- Chini E.N. 2009. CD38 as a regulator of cellular NAD: A novel potential pharmacological target for metabolic conditions. Curr. Pharm. Des. V. 15. P. 57. https://doi.org/10.2174/138161209787185788
- Compagnoni G.M., Fonzo A.D., Corti S., Comi G.P. 2020. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases: The lesson from Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Mol. Neurobiol. V. 57. P. 2959. https://doi.org/10.1007/s12035-020-01926-1
- Contreras J.E., Sánchez H.A., Eugenin E.A., Speidel D., Theis M., Willecke K., Bukauskas F.F., Bennett M.V., Sáez J.C. 2002. Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 99. P. 495. https://doi.org/10.1073/pnas.012589799
- Delekate A., Füchtemeier M., Schumacher T., Ulbrich C., Foddis M., Petzold G.C. 2014. Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. Nat. Commun. V. 5. https://doi.org/10.1038/ncomms6422
- Dovmark T.H., Saccomano M., Hulikova A., Alves F., Swietach P. 2017. Connexin-43 channels are a pathway for discharging lactate from glycolytic pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Oncogene. V. 36. P. 4538. https://doi.org/10.1038/onc.2017.71
- Encinas J.M., Enikolopov G. 2008. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. Methods Cell. Biol. V. 85. P. 243. https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)85011-X
- Epelbaum S., Youssef I., Lacor P.N., Chaurand P., Duplus E., Brugg B., Duyckaerts C., Delatour B. 2015. Acute amnestic encephalopathy in amyloid-β oligomer-injected mice is due to their widespread diffusion in vivo. Neurobiol. Aging. V. 36. P. 2043.
 - https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.005
- Franco-Iborra S., Vila M., Perier C. 2018. Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases: Focus on Parkinson's disease and Huntington's disease. Front. Neurosci. V. 12. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00342
- Hayakawa K., Esposito E., Wang X., Terasaki Y., Liu Y., Xing C., Ji X., Lo E.H. 2016. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. Nature. V. 535. P. 551. https://doi.org/10.1038/nature18928
- Johnson A.M., Roach J.P., Hu A., Stamatovic S.M., Zochowski M.R., Keep R.F., Andjelkovic A.V. 2018. Connexin 43 gap junctions contribute to brain endothelial barrier hyperpermeability in familial cerebral cavernous malformations type III by modulating tight junction structure. FASEB J. V. 32. P. 2615. https://doi.org/10.1096/fj.201700699R
- Kajiwara Y., Wang E., Wang M., Sin W.C., Brennand K.J., Schadt E., Naus C.C., Buxbaum J., Zhang B. 2018. GJA1 (connexin43) is a key regulator of Alzheimer's disease pathogenesis. Acta Neuropathol. Commun. V. 6. P. 144. https://doi.org/10.1186/s40478-018-0642-x
- Kim S.N., Kwon H.J., Im S.W., Son Y.H., Akindehin S., Jung Y.S., Lee S.J., Rhyu I.J., Kim I.Y., Seong J.K., Lee J., Yoo H.C.,

- Granneman J.G., Lee Y.H. 2017. Connexin 43 is required for the maintenance of mitochondrial integrity in brown adipose tissue. Sci. Rep. V. 7. P. 7159. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07658-y
- Koulakoff A., Mei X., Orellana J.A., Sáez J.C., Giaume C. 2012. Glial connexin expression and function in the context of Alzheimer's disease. Biochim. Biophys. Acta. V. 1818. P. 2048. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.001
- Kozoriz M.G., Bechberger J.F., Bechberger G.R., Suen M.W., Moreno A.P., Maass K., Willecke K., Naus C.C. 2010a. The connexin43 C-terminal region mediates neuroprotection during stroke. J. Neuropathol. Exp. Neurol. V. 69. P. 196. https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181cd44df
- Kozoriz M.G., Church J., Ozog M.A., Naus C.C., Krebs C. 2010b. Temporary sequestration of potassium by mitochondria in astrocytes. J. Biol. Chem. V. 285. P. 31107. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082073
- Lagos-Cabré R., Brenet M., Díaz J., Pérez R.D., Pérez L.A., Herrera-Molina R., Quest A.F.G., Leyton L. 2018. Intracellular Ca²⁺ increases and connexin 43 hemichannel opening are necessary but not sufficient for Thy-1-Induced astrocyte migration. Int. J. Mol. Sci. V. 19. P. 2179. https://doi.org/10.3390/ijms19082179
- Lautrup S., Sinclair D.A., Mattson M.P., Fang E.F. 2019. NAD⁺ in brain aging and neurodegenerative disorders. Cell Metab. V. 30. P. 630. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.09.001
- Le H.T., Sin W.C., Lozinsky S., Bechberger J., Vega J.L., Guo X.Q., Sáez J.C., Naus C.C. 2013. Gap junction intercellular communication mediated by connexin43 in astrocytes is essential for their resistance to oxidative stress. J. Biol. Chem. V. 289. P. 1345. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.508390
- Liu X., Sun L., Torii M., Rakic P. 2012. Connexin 43 controls the multipolar phase of neuronal migration to the cerebral cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 109. P. 8280. https://doi.org/10.1073/pnas.1205880109
- Liu Y., Xue Q., Tang Q., Hou M., Qi H., Chen G., Chen W., Zhang J., Chen Y., Xu X. 2013. A simple method for isolating and culturing the rat brain microvascular endothelial cells. Microvasc. Res. V. 90. P. 199. https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.08.004

- Nagy J.I., Li W., Hertzberg E.L., Marotta C.A. 1996. Elevated connexin43 immunoreactivity at sites of amyloid plaques in Alzheimer's disease. Brain Res. V. 717. P. 173. https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01526-4
- Osipova E.D., Semyachkina-Glushkovskaya O.V., Morgun A.V., Pisareva N.V., Malinovskaya N.A., Boitsova E.B., Pozhilenkova E.A., Belova O.A., Salmin V.V., Taranushenko T.E., Noda M., Salmina A.B. 2018. Gliotransmitters and cytokines in the control of blood-brain barrier permeability. Rev. Neurosci. V. 29. P. 567. https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0092
- Ren R., Zhang L., Wang M. 2018. Specific deletion connexin43 in astrocyte ameliorates cognitive dysfunction in APP/PS1 mice. Life Sci. V. 208. P. 175. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.07.033
- Rodríguez-Sinovas A., Ruiz-Meana M., Denuc A., García-Dorado D. 2018. Mitochondrial Cx43, an important component of cardiac preconditioning. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. V. 1860. P. 174. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.06.011
- Sipos E., Kurunczi A., Kasza A., Horvath J., Felszeghya K., Laroche S., Toldi J., Parducz A., Penke B., Penke Z. 2007. Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease. Neurosci. V. 147. P. 28. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.04.011
- Song E.K., Rah S.Y., Lee Y.R., Yoo C.H., Kim Y.R., Yeom J.H., Park K.H., Kim J.S., Kim U.H., Han M.K. 2011. Connexin-43 hemichannels mediate cyclic ADP-ribose generation and its Ca²⁺-mobilizing activity by NAD⁺/cyclic ADP-ribose transport. J. Biol. Chem. V. 286. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.307645
- Swerdlow R.H. 2018. Mitochondria and mitochondrial cascades in Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. V. 62. P. 1403. https://doi.org/10.3233/JAD-170585
- Yi C., Mei X., Ezan P., Mato S., Matias I., Giaume C., Koulakoff A. 2016. Astroglial connexin43 contributes to neuronal suffering in a mouse model of Alzheimer's disease. Cell Death Differ. V. 23. P. 1691. https://doi.org/10.1038/cdd.2016.63

Changes in the Number of CD38 and Cx43-Immunopositive Cells in the Neurovascular Unit of the Brain in Experimental Alzheimer's Disease

E. D. Khilazheva^a, *, A. I. Mosiagina^a, A. V. Morgun^a, N. A. Malinovskaya^a, Ya. V. Gorina^a, E. V. Kharitonova^a, O. L. Lopatina^a, and A. B. Salmina^a, b

^a Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022 Russia

^b Brain Research Department, Research Center of Neurology, Moscow, 125367 Russia *e-mail: elena.hilazheva@mail.ru

It is known that mitochondrial dysfunction can be a trigger or a concomitant mechanism in the development of Alzheimer's disease. It is also known that the restoration of intracellular mitochondrial activity of neurons and cerebral endotheliocytes is possible due to the transfer of intact mitochondria from other brain cells, in particular, astrocytes, and this transfer of mitochondria is mediated by the CD38 protein and functionally associated with it Cx43, which makes these proteins promising for study both in relation to the study of the mechanisms of development of neuro-degeneration, and in relation to the possible modulation of their activity for the correction of neurological deficits. The aim of this work was to study changes in the number of CD38 and Cx43-immunopositive cells in the neurovascular unit and the blood-brain barrier of the brain in experimental Alzheimer's disease. We have shown that the toxic effect of beta-amyloid leads to a significant increase in the number of CD38- and Cx43-positive cells both in the hippocampus of animals in an in vivo experiment and as part of an in vitro blood-brain barrier model. We also showed that the cultivation of isolated astrocytes in the presence of beta-amyloid leads to an increase in the content of Cx43 in cells, and the permeability of these half-channels significantly increases.

Keywords: astrocytes, neurons, endotheliocytes, Alzheimer's disease, mitochondria, CD38, Cx43

УЛК 577.29

МЕТОД ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И СКОПЛЕНИЙ АМИЛОИДА НА СВЕТООПТИЧЕСКОМ УРОВНЕ

© 2021 г. О. И. Носова^{1, *}, В. В. Гусельникова¹, Д. Э. Коржевский¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия *E-mail: nosova@neuro.nnov.ru
Поступила в редакцию 30.06.2021 г.
После доработки 13.07.2021 г.
Принята к публикации 22.07.2021 г.

Тесная пространственная взаимосвязь клеток глии (астроглии и микроглии) с амилоидными бляшками является одним из гистопатологических проявлений болезни Альцгеймера. Цель работы состояла в разработке простого и информативного метода для одновременного выявления амилоидных бляшек и клеток глии, основанного на сочетании гистохимического метода выявления амилоида и нефлуоресцентных иммуногистохимических методов выявления глиальных клеток. Материалом для исследования служили образцы коры головного мозга пожилых людей (n=8) и образцы головного мозга трансгенных мышей линии $5 \times \text{FAD}$ (n = 6). Суть предложенного методического подхода состоит в постановке иммуногистохимической реакции на маркерный белок микроглии или астроглии с последующим окрашиванием срезов фталоцианиновым красителем альциановым синим. Предложенный подход характеризуется простотой и хорошей воспроизводимостью, позволяя выявлять ассоциацию клеток глии с амилоидными бляшками. Было отмечено, что постановка иммуногистохимической реакции на кальций-связывающий белок Iba-1 (маркер микроглии) и глиальный фибриллярный кислый белок GFAP (маркер астроглии) позволяет наиболее эффективно идентифицировать микроглиоциты и астроциты соответственно, а также подходит для оценки функционального статуса этих клеток. Последующая подкраска срезов альшиановым синим по отработанному протоколу позволяет получить высокую интенсивность окраски амилоида, делая амилоидные бляшки хорошо различимыми. По сравнению с альтернативной методикой одновременного выявления клеток глии и амилоидных бляшек, предполагающей постановку двойной иммунофлуоресцентной реакции, разработанный метод прост в реализации и требует наличия только светового микроскопа, что делает его доступным большинству научно-исследовательских и клинико-диагностических дабораторий.

Ключевые слова: амилоидные бляшки, астроциты, микроглия, иммуногистохимия, болезнь Альцгеймера **DOI:** 10.31857/S0041377121060092

Селективная идентификация глиальных клеток астроцитов и микроглиоцитов — затруднительна при использовании классических методов гистологической окраски. Использование современных иммуногистохимических методик позволяет достаточно полно выявлять эти клеточные популяции и дает возможность оценить их функциональное состояние при моделировании патологических процессов. Одним из интенсивно исследуемых патологических процессов является болезнь Альцгеймера (БА) – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое сопровождается снижением когнитивных функций и потерей памяти (Mucke, 2009; Acosta et al., 2017). Основными гистопатологическими признаками, регистрируемыми в головном мозге при развитии БА, являются внутриклеточные нейрофибриллярные клубки, состоящие из гиперфосфорилированного

Принятые сокращения: БА — болезнь Альцгеймера; GFAP — глиальный фибриллярный кислый белок.

тау-белка, и амилоидные бляшки, представляющие собой внеклеточные отложения бета-амилоидных фибрилл (Acosta et al., 2017). Механизм формирования амилоидных отложений, участие глиальных клеток в формировании амилоидных бляшек и потенциальные возможности резорбции амилоида являются актуальными направлениями в изучении данного заболевания, для анализа патогенеза которого разработаны и используются различные экспериментальные модели (Stepanichev et al., 2006; Chumasov et al., 2012; LaFerla, Green, 2012).

В последнее время все более очевидной становится ключевая роль глии в развитии и прогрессировании БА. При этом представления о функциях клеток глии при развитии БА продолжают оставаться противоречивыми (Olabarria et al., 2010; Condello et al., 2015; Kelly et al., 2018; Habib et al., 2020). Многими исследователями отмечается тесная пространственная взаимосвязь клеток астроглии и микроглии с амилоидными бляшками при БА (Rodríguez-Arellano et al.,

Таблица 1. Перечень использованных первичных антител

	Антитела	Фирма, страна	Использованное разведение	Выявляемые клетки/структуры
1.	Кроличьи поликлональные антитела против глиального фибриллярного кислого белка, GFAP	Agilent, CIIIA	Ready-to-use (разведение производителя)	Астроциты (в тканях головного мозга мыши)
2.	Мышиные моноклональные (клон GA5) антитела против GFAP	Monosan, Нидерланды	Ready-to-use (разведение производителя)	Астроциты (в тканях головного мозга человека)
3.	Кроличьи поликлональные антитела против белка S100beta	Agilent, США	1:900	Астроциты
4.	Кроличьи поликлональные антитела против Iba-1	Biocare medical, CIIIA	1:900	Микроглия
5.	Кроличьи поликлональные антитела против глутамат-декарбоксилазы, GAD67	Spring Bioscience, CIIIA	1:300	ГАМК-ергические интернейроны Астроциты (?)

2016; Ferrer, 2017; Hansen et al., 2018; Verkhratsky et al., 2019). Для визуализации такого рода взаимосвязи обычно применяется метод двойного иммунофлуоресцентного маркирования в сочетании с конфокальной микроскопией. Однако, эта методика сложна для использования в масштабных скрининговых исследованиях и не всегда удобна для проведения микроанатомического анализа. В связи с этим, актуальным представляется разработка более простой и доступной методики, позволяющей эффективно визуализировать амилоидные бляшки и глиальные клетки головного мозга.

Целью работы стала разработка простого и информативного метода для одновременного выявления амилоидных бляшек и клеток глии, основанного на сочетании гистохимического метода выявления амилоида и нефлуоресцентных иммуногистохимических методов выявления глиальных клеток.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования проводили с использованием срезов коры головного мозга людей обоих полов (79—98 лет, n=8) и срезов головного мозга трансгенных мышей линии $5\times FAD$ (самцов и самок, n=6) в возрасте 8 мес. Материал получен из архива Отдела общей и частной морфологии ФГБНУ "ИЭМ". Все исследования проведены в полном соответствии с этическими принципами и правилами Европейской Конвенции ET/S 129 (1986) и директивами 2010/63/EU, а также в соответствии с заключениями локального этического комитета № 58-9/1-654 от 11.12.2009 г и № 3/18 от 22.11.2018 г.

Линия 5×FAD (5 Familiar Alzheimer's Disease, MMRC, #34840) является общепринятой моделью наследственной формы БА и представляет собой линию трансгенных мышей с пятью мутациями: три в генах APP-белка (Swedish (K670N/M671L), Florida (I716V), London (V7171)) и две в генах пресенилина 1 (M146L, L286V). Эта линия воспроизводит основ-

ные признаки амилоидоза, характерного для БА. Патологический фенотип включает образование амилоидных бляшек в коре, гиппокампе и стриатуме головного мозга, начиная с 2-х месячного возраста, а также глиоз, нейродегенерацию, нарушения памяти (Oakley et al., 2006).

Образцы коры головного мозга человека были зафиксированы в 10%-ном формалине. Образцы головного мозга мышей 5×FAD были зафиксированы в цинк-этанол-формальдегиде (Korzhevskii et al., 2015) и после стандартной гистологической проводки были залиты в парафин по описанной ранее методике (Носова и др., 2021). С парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 10 мкм, которые наклеивали на предметные стекла с адгезивным покрытием (Thermo Fisher Scientific, США) и высушивали в термостате при 37°С в течение 48 ч.

Для скрининга архивных образцов головного мозга животных и человека на наличие/отсутствие амилоида использовали краситель Конго красный и кроличьи поликлональные ОС-антитела к конформационным эпитопам амилоидных фибрилл (Sigma-Aldrich, США).

В табл. 1 приведен перечень первичных антител, использованных в исследовании.

В качестве вторичных реагентов в случае использования кроличьих первичных антител применяли набор Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (Spring Bioscience, США). В случае использования мышиных моноклональных антител против GFAP, которые были применены только при исследовании коры головного мозга человека, в качестве вторичных реагентов использовали набор MACH2 Universal HRP Polymer Kit for mouse or rabbit (Biocare Medical, США).

Разработанный протокол окраски препаратов:

1. Срезы депарафинировать в ксилолах и регидратировать в спиртах стандартным способом.

- 2. Промыть препараты в дистиллированной воде в течение 5 мин.
- 3. Поместить препараты в предварительно нагретый до 60°С модифицированный цитратный буфер \$1700 (Agilent, США) и нагревать в пароварке в течение 23 мин.
- 4. Остывшие предметные стекла со срезами промыть в дистиллированной воде (5 мин) и поместить в 3%-ный раствор перекиси водорода на 10 мин (для блокировки активности эндогенной пероксидазы).
- 5. Последовательно промыть препараты в дистиллированной воде (5 мин) и 0.01 М фосфатно-солевом буферном растворе (PBS, 5 мин).
- 6. Нанести на срезы блокировочный раствор Protein Block (Spring Bioscience, США) и инкубировать 10 мин при комнатной температуре.
- 7. Удалить блокировочный раствор со срезов и, не промывая препараты, нанести на них раствор первичных антител в необходимом разведении (см. табл. 1). Препараты поместить во влажные камеры и оставить в термостате при температуре 27.5°C на 18 ч.
- 8. Удалить со срезов раствор первичных антител и промыть препараты в PBS в течение 10 мин.
- 9. Нанести на срезы раствор вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, поместить препараты во влажные камеры и инкубировать при температуре 27.5°C в течение 25 мин.
- 10. Удалить со срезов раствор вторичных антител и последовательно промыть препараты в PBS (5 мин) и дистиллированной воде (5 мин).
- 11. Нанести на срезы рабочий раствор 3,3'-диаминобензидина из набора DAB+ (Agilent, США). Контролируя процесс образования коричневого продукта иммуногистохимической реакции под микроскопом, остановить реакцию в момент достижения оптимального соотношения сигнал/фон, удалив раствор DAB со срезов и промыв препараты в двух сменах дистиллированной воды (по 5 мин каждая).
- 12. Нанести на срезы раствор красителя альцианового синего (BioVitrum, Россия) и инкубировать препараты во влажных камерах в термостате при температуре 40°C в течение 40 мин.
- 13. Удалив раствор красителя со срезов, промыть препараты в дистиллированной воде (5 мин), обезводить и просветлить в спиртах и ксилолах по стандартной схеме и заключить в перманентную среду Cytoseal 60 (Thermo Fisher Scientific, США).

Полученные препараты анализировали с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Германия) и фотографировали с использованием фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Анализ полученных изображений проводили в компьютерной программе LAS EZ (Leica, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты применения разработанного протокола представлены на рис. 1—4.

Во всех исследованных образцах головного мозга 5×FAD мышей нами были выявлены скопления амилоида, окрашенные альциановым синим в насыщенный синий цвет (рис. 1—4). Полученная при использовании предложенного протокола интенсивность окраски амилоида позволяет легко визуализировать бляшки, которые четко выявляются на фоне других структур (рис. 1—4). Мы не обнаружили морфологических различий между амилоидными бляшками, локализованными в разных отделах головного мозга 5×FAD мышей. Все выявленные бляшки характеризовались интенсивной окраской и выглядели как компактные образования округлой формы с волокнистой структурой.

Метод одновременного выявления амилоидных бляшек и микроглии. Постановка иммуногистохимической реакции на Iba-1 с последующей подкраской срезов альциановым синим позволяет одновременно выявлять микроглиоциты и амилоидные бляшки в коре и гиппокампе 5×FAD мышей (рис. 1). При анализе препаратов была отмечена пространственная ассоциация Iba-1-иммунопозитивных клеток микроглии со скоплениями амилоида, окрашенными альциановым синим (рис. 1). Клетки микроглии, окружающие амилоидные бляшки, характеризовались наличием признаков активации, среди которых увеличение размеров тел, укорочение и утолщение отростков. Было отмечено, что отростки активированных микроглиоцитов тянутся в направлении амилоидных бляшек и окружают их по периферии, формируя крупные, темноокрашенные расширения на концах (рис. 1). Микроглия вне амилоидных бляшек имела нормальную разветвленную морфологию.

Метод одновременного выявления амилоидных бляшек и астроцитов с применением антител против **GFAP.** При использовании антител против GFAP с последующей подкраской срезов альциановым синим иммунопозитивные клетки с морфологией астроцитов и амилоидные бляшки, окрашенные в синий цвет альциановым синим, были идентифицированы на всех проанализированных препаратах (рис. $2a-\epsilon$). Одновременное окрашивание этих структур позволило выявить пространственную ассоциацию GFAР-иммунопозитивных отростков астроцитов с амилоидными бляшками. На концах отростков, контактирующих с бляшками, часто присутствуют небольшие GFAP-иммунопозитивные утолщения, локализованные по периферии амилоидного скопления (рис. 26, ϵ). Вблизи некоторых амилоидных бляшек обнаруживались тела астроцитов. Было отмечено присутствие морфологических признаков реактивной активации астроцитов, среди которых увеличение размеров тел и утолщение отростков (рис. 2δ , ϵ).

Аналогичные результаты были получены при применении метода GFAP/альциановый синий для

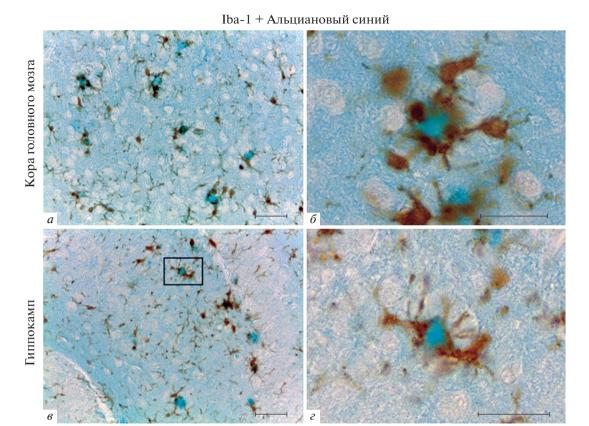


Рис. 1. Одновременное выявление амилоидных бляшек и микроглии в коре (a, δ) и гиппокампе (s, ϵ) головного мозга 5×FAD мышей. *Рамкой* на фрагменте s обозначена зона, которая показана на фрагменте s при большем увеличении. Иммуногистохимическая реакция на Iba-1 с подкраской альциановым синим. Масштабный отрезок равен 50 мкм (a, s) и 20 мкм (δ, ϵ) .

окраски срезов головного мозга человека (рис. 3). Интересно, что в данном случае ассоциация активированных астроцитов с амилоидными бляшками имела более выраженный характер по сравнению с препаратами головного мозга 5×FAD мышей. В коре головного мозга человека на малом увеличении микроскопа (×10) четко просматривается характерная "пятнистость", обусловленная концентрированием GFAР-иммунопозитивных астроцитов вокруг скоплений амилоида (рис. 3а). Астроциты, окружающие амилоидные скопления, характеризуются выраженной гипертрофией тел и отростков и высокоинтенсивной реакцией на GFAP (рис. $36-\epsilon$). В области амилоидных бляшек наблюдается высокая плотность GFAР-иммунопозитивных отростков астроцитов. в то время как в участках ткани между амилоидными бляшками плотность GFAP-иммунопозитивных элементов визуально ниже. Это и создает эффект "пятнистости", наблюдаемый на препаратах коры головного мозга человека после использования метода GFAР/альциановый синий. Ранее нами было отмечено, что постановка иммуногистохимической реакции на GFAP может быть использована для предварительного анализа имеющихся образцов головного мозга человека на наличие или отсутствие амилоидных скоплений (Guselnikova et al., 2019).

Метод одновременного выявления амилоидных бляшек и астроцитов с применением антител против S100beta. Для одновременного выявления астроцитов и амилоидных бляшек также может быть использована иммуногистохимическая реакция на белок S100beta с последующей подкраской срезов альциановым синим. Результаты применения этой методики представлены на рис. 4a, δ . В этом случае выявляются астроциты с признаками активации, ассоциированные с амилоидными бляшками. Активированные астроциты располагаются по периферии скоплений амилоида и характеризуются высоким уровнем экспрессии белка S100beta. При этом контуры S100betaиммунопозитивных тел и отростков астроцитов очерчены нечетко, ветвление отростков плохо прослеживается.

В случае использования антител против S100beta на срезах присутствует небольшое фоновое окрашивание ткани, из-за которого скопления амилоида приобретают более бирюзовый оттенок (рис. 4a, δ). Интенсивность окраски при этом не снижается, что позволяет легко идентифицировать амилоидные бляшки, в том числе на малом увеличении микроскопа.

Метод одновременного выявления амилоидных бляшек и GAD67-иммунопозитивных структур. При

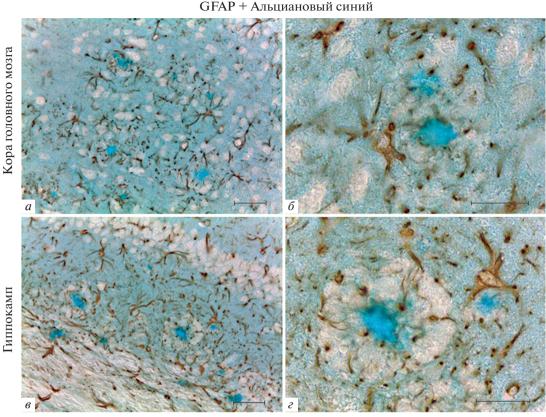


Рис. 2. Одновременное выявление скоплений амилоида и астроцитарного белка промежуточных филаментов GFAP в коре (а,

б) и гиппокампе (ϵ , ϵ) мозга мышей линии 5×FAD. Иммуногистохимическая реакция на GFAP с подкраской альциановым

использовании антител против GAD67 интенсивная реакция на этот белок была выявлена в исследованных отделах мозга $5 \times FAD$ мышей (рис. $4\mathfrak{s}$, \mathfrak{e}). При этом, ни в одном из исследованных случаев нами не было обнаружено иммуноокрашивания отростчатых клеток, которые могли бы быть идентифицированы как астроциты. Продукт иммуногистохимической реакции на GAD67 был распределен в пределах среза в виде мелких дискретных скоплений с концентрированием вокруг сомы нейронов (рис. $4\mathfrak{s}$, \mathfrak{e}). Нами не было выявлено пространственной ассоциации GAD67-иммунопозитивных структур с амилоидными бляшками.

синим. Масштабный отрезок равен 50 мкм (a, e) и 20 мкм (б, e).

ОБСУЖДЕНИЕ

Активация клеток глии (астроглии и микроглии) является важным нейрогистологическим признаком БА (Orellana et al., 2011; Verkhratsky et al., 2016; Hansen et al., 2018). Многочисленными исследователями было отмечено присутствие активированных астроцитов и микроглиоцитов в непосредственной близости от скоплений амилоида, представляющих собой внеклеточные агрегаты нерастворимых белковых фибрилл (Condello et al., 2015; Garwood et al., 2017; Tzioras et al., 2019; Katsouri et al., 2020). Изучение этой пространственной ассоциации является целью многочислен-

ных нейробиологических исследований, что актуализирует проблему поиска новых способов для ее визуализации. В рамках проведенного исследования нами был предложен новый методический подход, позволяющий одновременно выявлять клетки глии и амилоидные скопления с применением только световой микроскопии. Данный подход заключается в иммуногистохимическом выявлении одного из маркерных белков глиальных клеток с последующей подкраской срезов гистохимическим красителем альциановым синим.

Способность альцианового синего окрашивать скопления амилоида известна давно (Ромегапсе et al., 1976). Молекулы этого красителя способны взаимодействовать с полианионами кислых гликозамингликанов, которые вовлечены в процесс агрегации бета-амилоида в нерастворимые фибриллы (Snow et al., 1987). В результате этого взаимодействия в местах присутствия амилоидных фибрилл при реакции с альциановым синим происходит формирование синего осадка (Snow et al., 1994). Ранее нами была продемонстрирована эффективность использования альцианового синего для выявления амилоидных бляшек в коре головного мозга человека (Guselnikova et al., 2019).

GFAP + Альциановый синий

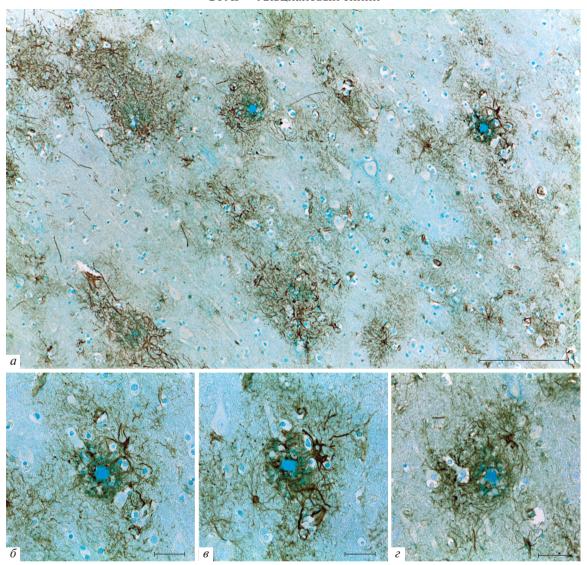


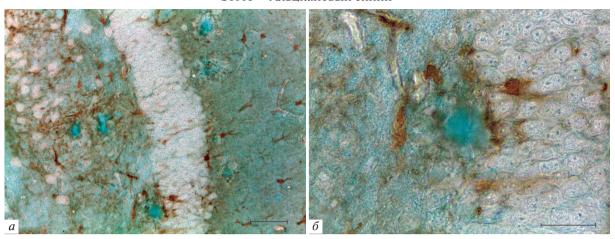
Рис. 3. Одновременное выявление скоплений амилоида и астроцитарного белка промежуточных филаментов GFAP в коре головного мозга человека. Иммуногистохимическая реакция на GFAP с подкраской альциановым синим. Масштабный отрезок равен 200 мкм (a) и 50 мкм (δ –e).

В рамках представленной работы нами был отработан оптимальный режим обработки препаратов альциановым синим, который позволил получить высокую интенсивность окраски амилоидных бляшек, делая их хорошо различимыми. Возможно, наблюдаемая высокая интенсивность окраски амилоида альциановым синим связана с предварительным проведением процедуры тепловой обработки срезов в цитратном буфере. Эта процедура направлена на восстановление нативной структуры белка, измененной в результате коагуляции белков и образования перекрестных сшивок при воздействии альдегидных фиксаторов. Конформационные изменения, которые претерпевают тканевые антигены в процессе фиксации, во многих случаях приводят к маскировке антигенных детерминант, с которыми должны

взаимодействовать антитела. Восстановить антигенные детерминанты, которые были изменены при взаимодействии с формальдегидом, позволяет тепловое демаскирование — высокотемпературная обработка срезов в водных буферных растворах (Коржевский и др., 2014). Вероятно, такая обработка оказывает влияние также на конформацию амилоидных фибрилл, делая их более доступными для взаимодействия с красителем.

Согласно результатам проведенных нами исследований, для одновременного выявления амилоидных бляшек и микроглии может быть рекомендовано использование методики Iba-1/альциановый синий. Кальций-связывающий белок Iba-1 (от англ. Iionized calcium-binding adapter molecule 1) является на сегодняшний день наиболее широко используе-

S100b + Альшиановый синий



GAD67 + Альциановый синий

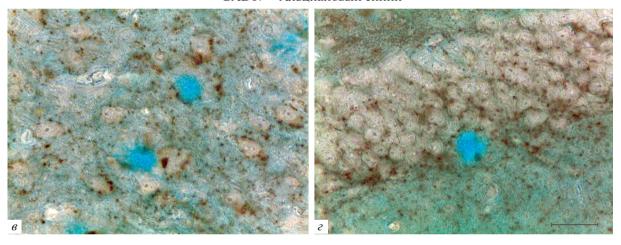


Рис. 4. Одновременное выявление амилоидных бляшек/S100beta-иммунопозитивных астроцитов (a, δ) и амилоидных бляшек/GAD67-иммунопозитивных структур в головном мозге мышей линии 5×FAD. Иммуногистохимическая реакция на белок S100beta (a, δ) и GAD67 (a, ϵ) с подкраской альциановым синим. a, δ, ϵ — Зубчатая фасция гиппокампа, ϵ — участок коры головного мозга. Масштабный отрезок равен 50 мкм (a) и 20 мкм $(\delta-\epsilon)$.

мым маркерным белком микроглиальных клеток. Показано, что Iba-1 играет роль в сшивании актиновых филаментов и регуляции конфигурации плазматической мембраны клеток микроглии, позволяя изучать сложную организацию отростков этих клеток (Alekseeva et al., 2019). Окраска микроглии после постановки иммуногистохимической реакции на Iba-1 характеризуется высокой интенсивностью, позволяя легко идентифицировать эту клеточную популяцию. Присутствие Iba-1 в теле и отростках как покоящейся (рамифицированной), так и активированной (амебоидной) микроглии делает этот белок удобным маркером для проведения морфофункциональных исследований (Kirik et al., 2011; Hopperton et al., 2018). Отсутствие фонового окрашивания ткани обеспечивает высокую контрастность выявления амилоидных бляшек, окрашенных альциановым синим.

Применение методики Iba-1/альциановый синий позволило визуализировать пространственную взаимосвязь активированной микроглии с амилоидными бляшками в коре и гиппокампе мышей линии 5×AD. Функциональное значение ассоциации микроглии с амилоидными бляшками остается в настоящее время предметом дискуссий. С одной стороны, показано, что бета-амилоид постоянно активирует микроглию, что приводит к выработке этими клетками провоспалительных медиаторов, потенциально токсичных для нейронов (Halle et al., 2008). С другой стороны, недавние данные свидетельствуют о том, что микроглия может выполнять протекторную функцию, формируя своеобразный защитный барьер вокруг амилоидных отложений. Так, полагают, что микроглиоциты способны поглощать и утилизировать растворимые формы бета-амилоида, фагоцитировать нерастворимые фибриллярные отложения, уплотнять протофибриллярные формы бетаамилоида в центральный кор бляшки, уменьшая таким образом количество олигомерного бета-амилоида, который оказывает наибольшее токсическое воздействие на нейроны. За счет этого микроглия ограничивает нейротоксичность амилоидных отложений и уменьшает аксональную дистрофию в соседнем нейропиле (Condello et al., 2015; Hansen et al., 2018).

Недостаточная изученность функций микроглии в отношении амилоидных скоплений при БА делает одновременное выявление этих структур актуальной задачей. До настоящего времени единственным способом решения этой задачи была постановка двойной иммунофлуоресцентной реакции на один из маркерных белков микроглии и бета-амилоид (Keren-Shaul et al., 2017). Данная методика является трудоемкой и дорогостоящей. Кроме того, она требует наличия в лаборатории конфокального лазерного микроскопа. Предложенный нами подход для одновременного выявления микроглии и амилоидных бляшек предполагает использование методов гистохимии и световой иммуногистохимии, которые являются значительно более дешевыми и простыми в реализации по сравнению с иммунофлуоресцентным методом. Анализ препаратов после окраски Iba-1/альшиановый синий проводится с применением только светового микроскопа, что делает разработанную нами методику окраски более доступной.

Для одновременного выявления астроцитов и амилоидных бляшек, согласно результатам наших исследований, наиболее подходящей является методика GFAP/альциановый синий. GFAP — главный белок промежуточных филаментов цитоскелета астроцитов. Он обеспечивает стабильность морфологии их тел и отростков, участвует в регуляции объема астроцитов и модуляции их движения (Poliakova et al., 2018; Korzhevskii et al., 2019). GFAP также является важным функциональным маркером астроглии. Увеличение экспрессии этого белка наблюдается при разных патологиях центральной нервной системы, в том числе при нейродегенеративных заболеваниях (Yeh et al., 2011; Kamphuis et al., 2012; Katsouri et al., 2020).

Из данных литературы хорошо известно, что активированные астроциты часто ассоциированы со скоплениями амилоида в мозге 5×FAD мышей и людей с болезнью Альцгеймера (Boom et al., 2004; Orellana et al., 2011). Согласно современным представлениям, астроциты участвуют в удалении и разрушении бета-амилоида (Guénette, 2003; Nicoll, Weller, 2003; Verkhratsky et al., 2010), а также в формировании барьера между нейронами и скоплениями амилоида (Simpson et al., 2010). Исследователи описывают случаи обнаружения бета-амилоида внутри отростков астроцитов, что может свидетельствовать о фагоцитировании амилоидных скоплений этими клетками (Nagele et al., 2003).

Как и в случае с микроглией, существующие методики одновременного выявления астроцитов и амилоидных бляшек основаны на постановке двойной иммунофлуоресцентной реакции и использовании метода конфокальной лазерной микроскопии (Olabarria et al., 2010; Rodríguez-Arellano et al., 2016; Kelly et al., 2018; Katsouri et al., 2020; Li et al., 2020). Разработанный нами метод окраски GFAP/альциановый синий позволяет легко идентифицировать астроциты и скопления амилоида с помощью световой микроскопии.

Методика S100beta/альциановый синий менее эффективна для одновременного выявления астроцитов и амилоидных бляшек. Белок S100beta, еще один широко используемый маркер астроцитов, принадлежит к семейству кальций-связывающих белков и имеет множество внутри- и внеклеточных функций (Brozzi et al., 2009). Внутри астроцитарных клеток S100beta диффузно распределен в цитоплазме и ассоциирован с мембранами и элементами цитоскелета. Он участвует в регуляции состояния сборки микротрубочек и промежуточных филаментов, активности некоторых ферментов и пролиферации клеток (Donato, 2003). Иммуногистохимическая реакция на s100beta позволяет выявлять астроцитарные клетки, однако в этом случае их тела и отростки просматриваются менее четко по сравнению с использованием GFAP. Кроме того, при использовании антител против белка S100beta наблюдается небольшое фоновое окрашивание нервной ткани. Это может быть обусловлено способностью S100-белков секретироваться во внеклеточное пространство, где они проявляют свойства цитокинов и взаимодействуют с особыми рецепторами на поверхности нейронов, микроглиоцитов, астроцитов (Donato, 2003; Steiner et al., 2007). Наконец, помимо астроцитов, S100beta экспрессируется также (в меньшем количестве) в нейронах и олигодендроцитах. Из-за присутствия фонового окрашивания амилоидные бляшки при окраске альциановым синим смотрятся менее контрастно, чем в случае использования метода GFAP/альциановый синий.

В литературе имеются единичные сообщения о присутствии в реактивных астроцитах белка GAD67 (глутаматдекарбоксилаза, изоформа 67) (Jo et al., 2014; Wu et al., 2014). В связи с этим, мы использовали антитела против GAD67 в рамках проведенного исследования с целью решить вопрос о том, могут ли эти антитела применяться для визуализации астроцитов. Протестированная нами методика окраски GAD67/альциановый синий по качеству получаемых препаратов сопоставима с окраской GFAP/альциановый синий и Iba-1/альциановый синий. Однако данный метод оказался неэффективным для одновременного выявления астроцитов и амилоидных бляшек. GAD67 является ферментом, обеспечивающим превращение глутамата в ГАМК (гамма-аминомасляную кислоту), и потому служит маркерным белком ГАМК-ергических интернейронов (Когzhevskii et al., 2015; Dossi et al., 2018). Постановка им-

муногистохимической реакции на GAD67 по предложенному нами протоколу позволяет четко выявиммунопозитивные структуры. вероятно, являются элементами ГАМК-ергических нейронов. Отмеченное нами дискретное распределение продукта иммуногистохимической реакции на GAD67 может быть обусловлено его концентрированием в синаптических терминалях отростков этих клеток (Fong et al., 2005; Разенкова, Коржевский, 2021). Нельзя исключать того, что часть выявляемого GAD67 находится в отростках астроцитов. В литературе имеются данные об экспрессии GAD67 в реактивных астроцитах при БА (Jo et al., 2014; Wu et al., 2014; Garaschuk, Verkhratsky, 2019). Авторы рассматривают этот феномен в качестве возможной компенсации снижения уровня глутаминсинтетазы для переработки излишков глутамата, накапливаемого астроцитами при развитии этого заболевания (Olabarria et al., 2011; Wu et al., 2014; Garaschuk, Verkhratsky, 2019). Однако, при применении антител против GAD67 нами не было обнаружено иммунопозитивных клеток, сходных по морфологии с астроцитами. Это свидетельствует о том, что использование этих антител не позволяет выявлять астроциты и GAD67 не может служить маркерным белком этих клеток.

Таким образом, в рамках представленной работы нами был разработан новый подход, позволяющий одновременно выявлять клетки глии и амилоидные бляшки. Предложенный подход характеризуется простотой и хорошей воспроизволимостью, позволяя выявлять ассоциацию клеток глии с амилоидными бляшками с применением световой микроскопии. Результатом применения разработанной методики является получение препаратов высокого качества, которые, в отличие от препаратов с иммунофлуоресцентой меткой, не выцветают и могут храниться длительное время. Применение разработанных нами методов окраски препаратов позволяет впоследствии проводить их количественную обработку с использованием общедоступной программы обработки изображений ImageJ (США). Это делает возможным получение количественных характеристик изучаемых объектов (амилоидных бляшек и иммунопозитивных структур).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Институт экспериментальной медицины". Работа В.В. Гусельниковой поддержана грантом Президента РФ для поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук (МК-560.2020.7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При работе с животными были соблюдены все применимые международные и национальные принципы гуманного обращения с животными. Исследование одобре-

но Локальным этическим комитетом ФГБНУ "ИЭМ" (протокол № 58-9/1-654 от 11.12.2009 г. и протокол № 3/18 от 22.11.2018 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Петрова Е.С., Карпенко М.Н., Григорьев И.П., Сухорукова Е.Г., Колос Е.А., Гиляров А.В. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии. Под ред. Д. Э. Коржевского. 2-е изд., испр. и доп. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2014. 119 с. (Korzhevskii D.E., Kirik O.V., Petrova E.S., Karpenko M.N., Grigoriev I.P., Sukhorukova E.G., Kolos E.A., Gilyarov A.V. Theoretical foundations and practical application of methods of immunohistochemistry. Ed. D.E. Korzhevsky. 2nd ed., Rev. and add. St. Petersburg: SpetsLit, 2014. 119 p.)
- Носова О.И., Суфиева Д.А., Коржевский Д.Э. 2021. Использование конфокальной микроскопии и программных методов 2d и 3d анализа для изучения стуктурной организации астроцитов. Цитология. Т. 63. № 1. С. 80. https://doi.org/10.31857/S0041377121010077 (Nosova O.I., Sufieva D.A., Korzhevskii D.E. 2021. An astrocyte structural organization analysis based on fluorescent microscopy with 2D and 3D quantitative approaches. Cell Tiss. Biol. V. 15. P. 273. https://doi.org/10.1134/S1990519X21030081)
- Разенкова В.А., Коржевский Д.Э. 2021. ГАМК-ергические аксосоматические синапсы нейронов коры головного мозга крысы. Цитология. Т. 62. № 11. С. 815. https://doi.org/10.31857/S0041377120110097 (Razenkova V.A., Korzhevskii D.E. 2021. GABAergic axosomatic synapses of rat brain cortex. Cell Tiss. Biol. V. 15. P. 267. https://doi.org/10.1134/S1990519X21030093)
- Acosta C., Anderson H.D., Anderson C.M. 2017. Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. J. Neurosci. Res. V. 95. P. 2430. https://doi.org/10.1002/jnr.24075
- Alekseeva O.S., Kirik O.V., Gilerovich E.G., Korzhevskii D.E. 2019. Microglia of the brain: Origin, structure, functions. J. Evol. Biochem. Physiol. V. 55. P. 257. https://doi.org/10.1134/S002209301904001X
- Boom A., Pochet R., Authelet M., Pradier L., Borghgraef P., Van Leuven F., Heizmann C.W., Brion J.-P. 2004. Astrocytic calcium/zinc binding protein S100A6 over expression in Alzheimer's disease and in PS1/APP transgenic mice models. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research. V. 1742. P. 161. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.09.011
- Brozzi F., Arcuri C., Giambanco I., Donato R. 2009. S100B protein regulates astrocyte shape and migration via interaction with Src kinase. J. Biol. Chem. V. 284. P. 8797. https://doi.org/10.1074/jbc.M805897200
- Chumasov E.I., Korzhevskii D.E., Petrova E.S., Kuznetsova N.N., Sapronov N.S. 2012. Glial reaction of the subventricular zone of the telencephalon of the rat brain on modeling of Alzheimer's disease. Neurosci. Behav. Physiol. V. 42. P. 67. https://doi.org/10.1007/s11055-011-9535-1
- Condello C., Yuan P., Schain A., Grutzendler J. 2015. Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar Aβ42 hotspots around plaques. Nature Commun. V. 6.

- P. 6176.
- https://doi.org/10.1038/ncomms7176
- Donato R. 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. Microsc. Res. Techn. V. 60. P. 540. https://doi.org/10.1002/jemt.10296
- Dossi E., Vasile F., Rouach N. 2018. Human astrocytes in the diseased brain. Brain Res. Bull. V. 136. P. 139. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.02.001
- Ferrer I. 2017. Diversity of astroglial responses across human neurodegenerative disorders and brain aging. Brain Pathol. V. 27. P. 645.

https://doi.org/10.1111/bpa.12538

- Fong A.Y., Stornetta R.L., Foley C.M., Potts J.T. 2005. Immunohistochemical localization of GAD67-expressing neurons and processes in the rat brainstem: Subregional distribution in the nucleus tractus solitarius. J. Comp. Neurol. V. 493. P. 274.
 - https://doi.org/10.1002/cne.20758
- Garaschuk O., Verkhratsky A. 2019. GABAergic astrocytes in Alzheimer's disease. Aging. V. 11. P. 1602. https://doi.org/10.18632/aging.101870
- Garwood C.J., Ratcliffe L.E., Simpson J.E., Heath P.R., Ince P.G., Wharton S.B. 2017. Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: A supporting player with a central role. Neuropathol. Appl. Neurobiol. V. 43. P. 281. https://doi.org/10.1111/nan.12338
- Guénette S.Y. 2003. Astrocytes: A cellular player in Aβ clearance and degradation. Trends Mol. Med. V. 9. P. 279. https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00112-6
- Guselnikova V., Antipova M.V., Fedorova E.A., Safray A.E., Rukavishnikova A.A., Mikhailova E.V., Korzhevskii D.E. 2019. Distinctive features of histochemical and immunohistochemical techniques for amyloid plaque detection in the human cerebral cortex. J. Anat. Histopathol. V. 8. P. 91. https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-2-91-99
- Habib N., McCabe C., Medina S., Varshavsky M., Kitsberg D.,
 Dvir-Szternfeld R., Green G., Dionne D., Nguyen L., Marshall J.L., Chen F., Zhang F., Kaplan T., Regev A., Schwartz M.
 2020. Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. Nature Neuroscience. V. 23. P. 701.
 https://doi.org/10.1038/s41593-020-0624-8
- Halle A., Hornung V., Petzold G.C., Stewart C.R., Monks B.G., Reinheckel T., Fitzgerald K.A., Latz E., Moore K.J., Golenbock D.T. 2008. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-β. Nature Immunology. V. 9. P. 857. https://doi.org/10.1038/ni.1636
- Hansen D.V, Hanson J.E., Sheng M. 2018. Microglia in Alzheimer's disease. J. Cell Biol. V. 217. P. 459. https://doi.org/10.1083/jcb.201709069
- Hopperton K.E., Mohammad D., Trépanier M.O., Giuliano V., Bazinet R.P. 2018. Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: A systematic review. Mol. Psychiatry. V. 23. P. 177. https://doi.org/10.1038/mp.2017.246
- Jo S., Yarishkin O., Hwang Y.J., Chun Y.E., Park M., Woo D.H., Bae J.Y., Kim T., Lee J., Chun H., Park H.J., Lee D.Y., Hong J., Kim H.Y., Oh S.J., et al. 2014. GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. Nature Medicine. V. 20. P. 886. https://doi.org/10.1038/nm.3639
- Kamphuis W., Mamber C., Moeton M., Kooijman L., Sluijs J.A., Jansen A.H.P., Verveer M., de Groot L.R., Smith V.D., Rangarajan S., Rodríguez J.J., Orre M., Hol E.M. 2012. GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic

- astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. PLoS One. V. 7. e42823. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042823
- Katsouri L., Birch A.M., Renziehausen A.W.J., Zach C., Aman Y., Steeds H., Bonsu A., Palmer E.O.C., Mirzaei N., Ries M., Sastre M. 2020. Ablation of reactive astrocytes exacerbates disease pathology in a model of Alzheimer's disease. Glia. V. 68. P. 1017.

https://doi.org/10.1002/glia.23759

- Kelly P., Hudry E., Hou S.S., Bacskai B.J. 2018. In vivo two photon imaging of astrocytic structure and function in Alzheimer's disease. Front. Aging Neurosci. V. 10. 219. https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00219
- Keren-Shaul H., Spinrad A., Weiner A., Matcovitch-Natan O., Dvir-Szternfeld R., Ulland T.K., David E., Baruch K., Lara-Astaiso D., Toth B., Itzkovitz S., Colonna M., Schwartz M., Amit I. 2017. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. Cell. V. 169. P. 1276.

https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018

- Kirik O.V., Sukhorukova E.G., Korzhevskii D.E. 2011. Calciumbinding protein Iba-1/AIF-1 in rat brain cells. Neurosci. Behav. Physiol. V. 41. P. 149. https://doi.org/10.1007/s11055-011-9391-z
- Korzhevskii D.E., Grigor'ev I.P., Gusel'nikova V.V., Kolos E.A., Petrova E.S., Kirik O.V., Sufieva D.A., Razenkova V.A., Antipova M.V., Chernysh M.V. 2019. Immunohistochemical markers for neurobiology. Medical Acad. Journal. V. 19. P. 7. https://doi.org/10.17816/MAJ16548
- Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. 2015. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. Eur. J. Histochem. V. 59. P. 5. https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2530
- LaFerla F.M., Green K.N. 2012. Animal models of Alzheimer disease. Cold Spring Harbor Persp. Med. V. 2. a006320. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006320
- Li K.-Y., Gong P., Li J., Xu N., Qin S. 2020. Morphological and molecular alterations of reactive astrocytes without proliferation in cerebral cortex of an APP/PS1 transgenic mouse model and Alzheimer's patients. Glia. V. 68. P. 2361. https://doi.org/10.1002/glia.23845
- *Mucke L.* 2009. Alzheimer's disease. Nature. V. 461. P. 895. https://doi.org/10.1038/461895a
- Nagele R.G., D'Andrea M.R., Lee H., Venkataraman V., Wang H.-Y. 2003. Astrocytes accumulate Aβ42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. Brain Res. V. 971. P. 197.

https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02361-8

- Nicoll J.A.R., Weller R.O. 2003. A new role for astrocytes: β-amyloid homeostasis and degradation. Trends Mol. Med. V. 9. P. 281.
 - https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00109-6
- Oakley H., Cole S.L., Logan S., Maus E., Shao P., Craft J., Guillozet-Bongaarts A., Ohno M., Disterhoft J., Van Eldik L., Berry R., Vassar R. 2006. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, meurodegeneration, and meuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. J. Neurosci. V. 26. P. 10129.
- https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006

 Olabarria M., Noristani H.N., Verkhratsky A., Rodríguez J.J.

 2010. Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease.

 Glia. V. 58. P. 831.
 - https://doi.org/10.1002/glia.20967

- Olabarria M., Noristani H.N., Verkhratsky A., Rodríguez J.J. 2011. Age-dependent decrease in glutamine synthetase expression in the hippocampal astroglia of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model: Mechanism for deficient glutamatergic transmission? Mol. Neurodegeneration. V. 6. P. 55.
 - https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-55
- Orellana J.A., Shoji K.F., Abudara V., Ezan P., Amigou E., Saez P.J., Jiang J.X., Naus C.C., Saez J.C., Giaume C. 2011. Amyloid-induced death in neurons involves glial and neuronal hemichannels. J. Neurosci. V. 31. P. 4962. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6417-10.2011
- Poliakova A.A., Semernin E.N., Sitnikova M.Y., Avagyan K.L., Grozov R. V., Pyko S.A., Krutikov A.N., Davydova V.G., Khmelnitskaya K.A., Shavloskii M.M., Korzhevskii D.E., Gudkova A.Y. 2018. Transthyretin amyloidosis in a cohort of old and very old patients with chronic heart failure. Kardiologiya. V. 58. P. 12. https://doi.org/10.18087/cardio.2390
- Pomerance A., Slavin G., McWatt J. 1976. Experience with the sodium sulphate-Alcian Blue stain for amyloid in cardiac pathology. J. Clin. Pathol. V. 29. P. 22. https://doi.org/10.1136/jcp.29.1.22
- Rodríguez-Arellano J.J., Parpura V., Zorec R., Verkhratsky A. 2016. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. Neuroscience. V. 323. P. 170. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.007
- Simpson J.E., Ince P.G., Lace G., Forster G., Shaw P.J., Matthews F., Savva G., Brayne C., Wharton S.B. 2010. Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. Neurobiol. Aging. V. 31. P. 578. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.015
- Snow A.D., Sekiguchi R.T., Nochlin D., Kalaria R.N., Kimata K. 1994. Heparan sulfate proteoglycan in diffuse plaques of hippocampus but not of cerebellum in Alzheimer's disease brain. Am. J. Pathol. V. 144. P. 337. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8311117
- Snow P., Patel N., Harrelson A., Goodman C. 1987. Neural-specific carbohydrate moiety shared by many surface glycoproteins in Drosophila and grasshopper embryos. J. Neu-

- rosci. V. 7. P. 4137. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-12-04137.1987
- Steiner J., Bernstein H.-G., Bielau H., Berndt A., Brisch R., Mawrin C., Keilhoff G., Bogerts B. 2007. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of \$100B in human brain. BMC Neuroscience. V. 8. P. 2. https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-2
- Stepanichev M.Y., Zdobnova I.M., Zarubenko I.I., Lazareva N.A., Gulyaeva N. V. 2006. Studies of the effects of central administration of β-amyloid peptide (25–35): Pathomorphological changes in the hippocampus and impairment of spatial memory. Neurosci. Behav.l Physiol. V. 36. P. 101. https://doi.org/10.1007/s11055-005-0167-1
- Tzioras M., Davies C., Newman A., Jackson R., Spires-Jones T. 2019. APOE at the interface of inflammation, neurodegeneration and pathological protein spread in Alzheimer's disease. Neuropathol. Appl. Neurobiol. V. 45. P. 327. https://doi.org/10.1111/nan.12529
- Verkhratsky A., Olabarria M., Noristani H.N., Yeh C., Rodriguez J.J. 2010. Astrocytes in Alzheimer's disease. Neurotherapeutics. V. 7. P. 399. https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.05.017
- Verkhratsky A., Rodrigues J.J., Pivoriunas A., Zorec R., Semyanov A. 2019. Astroglial atrophy in Alzheimer's disease. Pflügers Archiv European Journal of Physiology. V. 471. P. 1247.
 - https://doi.org/10.1007/s00424-019-02310-2
- Verkhratsky A., Zorec R., Rodriguez J.J., Parpura V. 2016. Pathobiology of neurodegeneration: The role for astroglia. Opera Medica & Physiologica. V. 1. P. 13. https://doi.org/10.20388/OMP2016.001.0019
- Wu Z., Guo Z., Gearing M., Chen G. 2014. Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzheimer's disease model. Nat. Commun. V. 5. P. 4159. https://doi.org/10.1038/ncomms5159
- Yeh C.-Y., Vadhwana B., Verkhratsky A., Rodríguez J.J. 2011. Early astrocytic atrophy in the entorhinal cortex of a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. ASN Neuro. V. 3. P. 272. https://doi.org/10.1042/AN20110025

Light Microscopy Approach for Simultaneously Identification of Glial Cells and Amyloid Plaques

O. I. Nosova^{a, *}, V. V. Guselnikova^a, and D. E. Korzhevskii^a

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia

*e-mail: nosova@neuro.nnov.ru

The close spatial relationship of glial cells (astroglia and microglia) to amyloid plaques is one of the histopathological features of Alzheimer's disease. The work aimed to develop a simple and informative method for the simultaneous detection of amyloid plaques and glial cells. The suggested method is based on a combination of histochemical staining for amyloid and non-fluorescent immunohistochemical staining of glial cells. The cerebral cortex samples of aged people (n = 8) and brain samples from transgenic $5 \times FAD$ mice (n = 6) were the material for this study. The proposed methodological approach involves immunohistochemical labelling of microglia or astroglia followed by Alcian blue staining. The developed protocol is simple and well reproducible. It is suitable for identifying the association of glial cells with amyloid plaques. It was noted that immunohistochemistry for Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1) and for GFAP (glial fibrillary acidic protein) allows the most effective identification of microgliocytes and astrocytes, respectively. It is also suitable for assessing the functional status of these cells. Amyloid plaques are intensely stained with Alcian blue and are well detected. In comparison with double immunofluorescence staining technique for simultaneous detection of glial cells and amyloid plaques, the developed method is simple to implement and requires only a light microscope, which makes it accessible to most laboratories.

Keywords: amyloid plaques, astrocytes, microglia, immunohistochemistry, Alzheimer's disease

УЛК 577.3

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ДИНАМИКИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ GFP⁺-КЛЕТОК ДОНОРА В ОРГАНАХ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ НАТИВНОГО ИЛИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО КОСТНОГО МОЗГА

© 2021 г. Л. А. Сергиевич^{1, *}, Е. В. Богданенко², А. В. Карнаухов¹, Н. А. Карнаухова¹, И. А. Лизунова¹

¹Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московской обл., 142290 Россия
²НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия
*E-mail: larserg@mail.ru
Поступила в редакцию 22.06.2021 г.
После доработки 14.07.2021 г.

Принята к публикации 19.07.2021 г.

Криоконсервация является единственным способом сохранения собственных стволовых клеток костного мозга (КМ) для использования в регенеративной медицине или перед проведением аблативной терапии злокачественных заболеваний. Трансплантация собственных стволовых клеток КМ (аутотрансплантация) недостаточно изучена в плане взаимодействия пересаживаемых клеток с организмом хозяина (реципиента). В связи с этим, целью данной работы явилась оценка эффективности сингенной трансплантации, как модели аутотрансплантации, нативного или криоконсервированного КМ сублетально облученным мышам-реципиентам. В качестве доноров использовали мышей, несущих ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), разводимых на основе инбредной линии C57BL/6, в качестве реципиентов – мышей линии С57BL/6. С помощью флуоресцентной микроскопии изучали динамику уровня химеризма в органах лимфомиелоидного комплекса системы крови (костного мозга, тимуса, селезенки, крови и кишечника) у мышей-реципиентов в разные сроки после трансплантации им нативных или криосохраненных GFP⁺-клеток донорского цельного сингенного КМ. Различия в способности заселения организма GFP⁺-клетками оценивали по их процентному содержанию в суспензии клеток КМ, селезенки и тимуса реципиента. GFP⁺-клетки у реципиентов, получивших размороженный КМ, появлялись в изученных органах на 7-8 сут позже, чем у реципиентов после трансплантации нативного КМ. Однако уже через 14—21 сут после трансплантации относительное содержание клеток донора в исследованных органах у реципиентов обеих групп достоверно не различалось. В тканях целых органов или их поперечных срезов (КМ, селезенки, тимуса и кишечника) химеризм после трансплантации выявляли на 2-3 сут раньше, чем в суспензии этих органов. Также было показано, что мезенхимальные клетки КМ донора участвуют в восстановлении стромы всех исследованных органов, поврежденных радиацией, о чем свидетельствует присутствие в них фибробластоподобных GFP⁺-клеток, особенно значительное в тимусе реципиентов обеих групп. Таким образом, проведенные нами исследования показали, что клетки КМ, криоконсервированного по используемой методике, оказались достаточно жизнеспособными для эффективного гистогенеза исследованных органов системы крови.

Ключевые слова: аутотрансплантация, костный мозг, селезенка, толстая кишка, тимус, криоконсервирование, флуоресцентная микроскопия, GFP

DOI: 10.31857/S0041377121060109

Стволовые клетки костного мозга (СККМ) имеют клиническое значение как потенциальные источники клеток для трансплантации в регенеративной медицине и терапии рака. Способность к длительному самообновлению и дифференцировке в различных направлениях предлагает большие перспективы для замены нефункциональных или утраченных клеток и регенерации поврежденных тканей. Транс-

Принятые сокращения: ГСК — гематопоэтические стволовые клетки; КМ — костный мозг; МСК — мезенхимальные стромальные клетки; СККМ — стволовые клетки костного мозга; ФСБ — фосфатно-солевой буфер.

плантация собственных СККМ (аутотрансплантация) обеспечивает возможность их использования в регенеративной медицине для замены поврежденных клеток с многократным применением у людей без риска отторжения трансплантата (Карнаухов и др., 2014; Otsu et al., 2014; Богданенко и др., 2015, 2020; Ramaswamy et al., 2018; Kovina et al., 2019). Хотя использование СККМ в медицине имеет большие перспективы, их применение для лечения многих заболеваний находится на стадии разработок и клинических испытаний. Кроме того, терапия на основе СККМ требует регулярного мониторинга процесса регене-

рации ткани в течение периода полного выздоровления пациента (Biasco et al., 2016). Актуальной является оптимизация процедур трансплантации, обеспечивающих функциональную интеграцию, пролиферацию, дифференцировку и миграцию трансплантированных СККМ, необходимых для восстановления и замены поврежденной ткани и их долгосрочной выживаемости в тканевой нише (Нимирицкий и др., 2018; Wei, Frenette, 2018). В то же время для лечения многих заболеваний используют аутологичную и аллогенную трансплантацию цельного КМ, в котором и содержатся указанные СККМ. Преимущества введения цельного КМ, а не его отдельных фракций показаны для процессов восстановительного гистогенеза костной ткани (Деев и др., 2006; Яковлева и др., 2008), а также на модели экспериментального сахарного диабета (Миллер и др., 2016).

Трансплантация сингенного либо совместимого аллогенного КМ необходима для восстановления процессов кроветворения после облучения, являющейся частью терапии онкологических заболеваний (Цуцаева и др., 1988; Shu et al., 2014). При этом криоконсервированный КМ часто является единственным источником СК, доступным для своевременной терапии. Как было показано (Вегг et al., 2007), криоконсервирование цельного КМ является безопасным, поскольку при его трансплантации не наблюдаются значительные неблагоприятные исходы, связанные с его неспособностью к приживлению, недостаточностью его приживления или с развитием реакции "трансплантат против хозяина".

Исследование взаимодействия криоконсервированных трансплантатов с организмом реципиента в посттрансплантационный период является наиболее важным для их практического применения (Цуцаева и др., 1988, 2009). При этом использование в качестве доноров КМ мышей, несущих ген зеленого флуоресцентного белка (GFP⁺-мыши), позволяющего проводить визуализацию восстановления исследуемых органов реципиента и однозначно связать процессы гистогенеза с донорскими клетками (Kawakami et al., 1999), явилось удобным средством оценки эффективности трансплантации КМ. Ранее нами было показано (Сергиевич и др., 2018), что КМ, криоконсервированный по методике, применяемой для аутотрансплантации в клинической практике лечения онкологических больных, оказался достаточно эффективным для выживания сублетально облученных мышей, однако наблюдалась более высокая смертность животных в группе с трансплантацией криосохраненного КМ по сравнению с нативным. Необходимо дальнейшее детальное изучение приживаемости клеток криосохраненного КМ доноров в организме реципиентов, особенно в первые два месяца после облучения, когда наиболее выражены проявления повреждающего действие радиации на кроветворную и иммунную системы. В связи с этим целью данной работы было сравнение динамики уровня химеризма в органах лимфомиелоидного комплекса системы крови (костного мозга, селезенки, тимуса и кишечника) и в крови у сублетально облученных мышей-реципиентов в течение 50 дней после трансплантации им нативных или криосохраненных GFP⁺-клеток донорского цельного сингенного KM.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Экспериментальные животные. Мыши содержались в виварии ИБК РАН по 1–3 мыши в клетке на рационе из гранулированного корма с дополнительной подкормкой зерносмесью. В качестве доноров КМ использовали самок и самцов мышей в возрасте 3-5 мес., несущих ген зеленого флуоресцентного белка (Enhanced Green Fluorescent Protein – EGFP, Tg(ACTB-EGFP)1Osb/J,) разводимых на основе инбредной линии C57BL/6 EGFP-/-. Трансген egfp в клетках донора (GFP⁺-мыши) использовали как витальную метку для определения их приживаемости в организме реципиента, не несущего этот трансген (GFP--мыши). При освещении светом с длиной волны в диапазоне 395—488 нм GFP флуоресцирует в зеленой области спектра с максимумом флуоресценции с длиной волны 508 нм. В качестве реципиентов для трансплантации как нативного, так и размороженного KM использовали GFP--мышей в возрасте 3-6 мес., предварительно подвергшихся действию ионизирующего излучения в дозе 6.5 Гр, что соответствует дозе ЛД50/30 для данной линии мышей. При такой дозе помимо заселения донорскими клетками происходило восстановление органов и собственными клетками хозяина.

В качестве контроля для исследования степени химеризма изучаемых органов использовали GFP^+ мышей, над которыми не проводили никаких манипуляций (интактные GFP^+ -мыши). Всего в эксперименте использовали 120 мышей, по 3-5 животных на каждую экспериментальную точку.

Облучение животных. Облучение мышей проводили сотрудники Группы источников излучений Института биофизики клетки РАН г. Пущино на рентгеновской установке РУТ-250-15-2 (РУМ 17), $I=15~\text{MA},\,U=200~\text{кB},\,c$ фильтрами из меди и алюминия, толщиной по 1мм каждый, мощность излучения 1 Гр/мин. Мышей облучали в дозе 6.5 Гр, после чего в экспериментальных группах мышей через 1 сут проводили трансплантацию нативного или размороженного КМ.

Выделение клеток КМ. Мышей-доноров выводили из эксперимента дислокацией шейных позвонков. КМ выделяли из двух бедренных костей донора путем их измельчения в фарфоровой ступке с раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ) в объеме 600 мкл и последующей фильтрацией через капроновый фильтр с размером пор 70 мкм. Общее количество выделенных ядерных клеток подсчитывали в

камере Горяева. От 2-х бедренных костей получали (5 \pm 1) \times 10 7 клеток.

Методика криоконсервирования. Для криоконсервирования клеток КМ мышей использовали 10%ный раствор криопротектора ДМСО (Panreac, Испания) в 6%-ном растворе декстрана (ОАО "Биохимик", Россия) с молекулярной массой 60000 (полиглюкин). Эквилибрацию проводили в криопробирках на 1.8 мл (ТРР, Швейцария) на ледяной бане в течение 6 мин во избежание гипертермии клеток в соотношении клеточной суспензии и криопротектора 1:1 (по 500 мкл каждого), получая конечную концентрацию криопротектора 5%. Замораживание проводили в тех же пробирках в два этапа: на первом пробирки помещали на 3 ч в контейнер для бесспиртового замораживания клеток CoolCell (Biocision. США), в котором происходило охлаждение со скоростью 1° С/мин в морозильнике при -80° С, на втором пробирки переносили в сосуды Дьюара с жидким азотом. Перед трансплантацией проводили быстрое размораживание клеточной суспензии на водяной бане при 37°C. Жизнеспособность и морфологию клеток до и после криоконсервирования оценивали после окрашивания суправитальным красителем трипановым синим в конечной концентрации 0.07% под микроскопом в проходящем свете с использованием DIC (дифференциального интерференционного контраста) и при освещении светом с длиной волны 488 нм (поврежденные клетки флуоресцировали в красной области спектра).

Трансплантация КМ. Трансплантацию суспензии клеток нативного КМ проводили сразу после выделения, а криосохраненного — непосредственно после размораживания без удаления криопротектора с учетом совпадения пола донора и реципиента. Суспензию клеток в объеме 100 мкл для нативного и 200 мкл для размороженного КМ вводили в боковую вену предварительно разогретого при температуре $40-42^{\circ}$ С хвоста реципиента с помощью инсулинового шприца. В указанных объемах содержалось в среднем $(1.3 \pm 0.2) \times 10^7$ ядерных клеток. До трансплантации КМ хранили в жидком азоте 14-30 сут.

Извлечение органов у реципиентов. Мышей выводили из эксперимента на 1, 3, 6, 7, 11, 14, 22, 30, 40 и 50 сут после трансплантации, извлекали тимус, селезенку и бедренные кости, помещали их в ФСБ, после чего промывали и взвешивали. У кости осторожно срезали эпифизы, диафизальную трубку разрезали вдоль и разворачивали. В образовавшиеся две половинки наносили по нескольку капель ФСБ. Участок толстой кишки длиной около 0.5 см промывали от содержимого и разрезали вдоль. Каплю крови забирали из полости сердца.

Исследование органного химеризма в КМ, селезенке, тимусе и кишечнике. Целые тимус, селезенку, а также участок толстой кишки помещали на предметное стекло и наносили на них ФСБ во избежание высыхания; органы исследовали с 2 сторон. Тимус и се-

лезенку помещали в морозильную камеру на 5 мин при -18° С, а затем делали поперечные срезы толщиной 1-2 мм. Костный мозг исследовали в продольных половинах костей. Флуоресценцию GFP в органах изучали при увеличениях объектива $5\times$, $10\times$, $20\times$ и $40\times$, а в суспензии клеток KM, селезенки и тимуса — при увеличении $40\times$. В работе использовали флуоресцентный микроскоп Axio-ImagerZ1 с цветной цифровой камерой AxioCamMRc5 (CarlZeiss, Германия).

Приготовление суспензии клеток костного мозга, селезенки и тимуса. Тимус и селезенку протирали с помощью скальпеля через капроновый фильтр с размером пор 70 мкм с промыванием ФСБ в объеме 1 мл для тимуса и 2 мл для селезенки. КМ выделяли из одной бедренной кости по методике, описанной выше.

Определение количества GFP⁺ клеток в органах реципиентов. По 10 мкл суспензии KM, тимуса и селезенки помещали на предметные стекла, покрытые полилизином (Thermoscientific, Германия), и накрывали покровными стеклами 20×20 мм. Для определения процента GFP⁺-клеток фотографировали 10-20 полей зрения равномерно по всему препарату; одно и то же поле снимали дважды — в свете флуоресценции и в проходящем свете с использованием DIC, после чего подсчитывали среднее количество клеток в поле зрения (клеточность) и процент флуоресцирующих клеток среди них. Количество клеток на мазках подсчитывали с помощью программы CellAnalyzer-2 (Карнаухов и др., 2010).

Статистическая обработка данных. Данные обрабатывали с использованием программы SigmaPlot 12.1. Доверительную вероятность Р определяли стандартным образом с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты представлены как $M \pm m$, где M — среднее значение, m — стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У используемых нами в качестве доноров КМ гетерозиготных GFP⁺-мышей количество GFP⁺-клеток в суспензии КМ составило $46.1 \pm 5.1\%$, в селезенке $-50.8 \pm 4.8\%$ от общего количества ядерных клеток, т.е. примерно половина ядерных клеток экспрессировала GFP. В то же время в суспензии тимуса доноров присутствовало только $9.5 \pm 1.0\%$ GFP⁺-клеток.

Было обнаружено, что через 1 сут после трансплантации как нативных, так и криосохраненных клеток КМ в крови реципиентов присутствовали немногочисленные донорские GFP⁺ лейкоциты и отдельные тромбоциты. Затем через 5—7 сут их количество в крови мышей, получивших нативный КМ, значительно увеличивалось, появлялись яркие поля, состоящие из тромбоцитов. Позднее, через 11—14 сут, такая же картина наблюдалась и у животных, получивших криосохраненный КМ. Донорские клетки присутствовали в организме обеих групп реципиен-

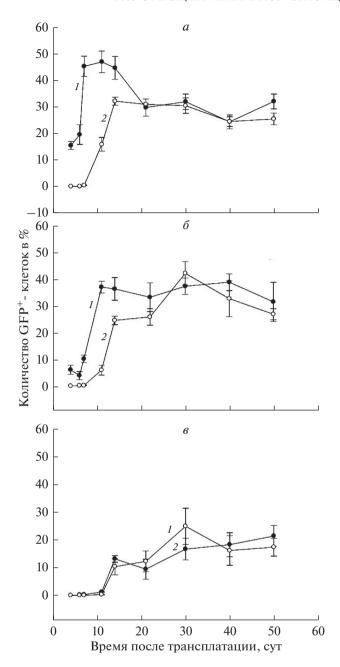


Рис. 1. Динамика процентного содержания ${\rm GFP}^+$ -клеток донора в поле зрения в KM (a), селезенке (b) и тимусе (b) после трансплантации нативного (*кривая 1*) или криосохраненного (*кривая 2*) KM облученным мышам.

тов вплоть до смерти животного (от 4 до 12 мес. после трансплантации KM).

В суспензии клеток КМ реципиентов, получивших нативный КМ (рис. 1a, κ ривая 1), κ 4-м суткам после трансплантации количество донорских GFP+ клеток составляло уже более 15%, в то время как в группе мышей, получивших криосохраненный КМ (рис. 1a, κ ривая 2), количество GFP+-клеток начинало увеличиваться только через 7 сут после трансплантации, однако κ 14 сут их количество возрастало

выше 32%. Далее до конца периода наблюдения количество донорских GFP^+ -клеток в KM животных из обеих групп почти не различалось.

Сходные изменения наблюдали в суспензии клеток селезенки реципиентов обеих групп. Так, заметное увеличение количества GFP^+ -клеток в группе мышей, получивших криосохраненный КМ (рис. 16, кривая 2), примерно на 7-8 сут отставало от такового в группе мышей, получивших нативный КМ (рис. 16, кривая 1). Более низкое процентное содержание GFP^+ -клеток в селезенке по сравнению с КМ у мышей обеих групп в первую неделю после трансплантации объясняется более значительным опустошением КМ у реципиентов после облучения.

Иная динамика изменения количества GFP⁺ клеток отмечалась в суспензии клеток тимуса исследованных реципиентов. В группе мышей, получивших нативный КМ (рис. 1в, кривая 1), незначительное количество GFP⁺-клеток наблюдали, начиная с 6—7-х сут после трансплантации (0.2—0.3%), и только с 11-х сут происходил заметный рост их количества. В то же время в группе реципиентов, получивших криосохраненный КМ (рис. 1в, кривая 2), через 6—11 сут клетки донора в тимусе не обнаруживались, однако с 14-х сут после трансплантации происходило резкое увеличение количества GFP⁺-клеток, достигающее максимума на 30-е сут и несколько превышающее их количество к этому сроку в группе мышей, получивших нативный КМ.

Более высокое количество донорских GFP⁺-клеток в тимусе группы реципиентов с криосохраненным КМ может быть связано с их меньшей иммуногенностью по отношению к организму реципиента. Далее изменение числа донорских клеток в обеих группах было сходным, однако превышающее процентное количество GFP⁺-клеток в тимусе интактных GFP⁺-мышей. Такое явление, вероятно, можно объяснить тем, что у облученных мышей в тимусе после почти полной его инволюции происходило длительное восстановление органа с помощью трансплантированных клеток донора, которые пролиферировали длительное время, сохраняя высокую концентрацию GFP. Тем не менее, восстановление тимуса происходило медленнее, чем КМ и селезенки. Было также обнаружено, что при изменении режима замораживания (уменьшении времени предварительного охлаждения) донорского КМ у облученных реципиентов тимус не восстанавливался, а в КМ и селезенке восстановление происходило в меньшей степени и не достигало уровня восстановления органов у мышей, которым трансплантировали нативный или криосохраненный КМ по используемой в данной работе методике.

Исследование флуоресценции GFP в целых органах и на их поперечных срезах позволило выявить самые ранние этапы заселения органов донорскими клетками, когда в суспензии они присутствовали в

следовых количествах, либо вообще не обнаруживались. Яркая флуоресценция GFP при сканировании органов по всей поверхности с изменением глубины резкости позволила наблюдать за локализацией донорских клеток в органе реципиента.

На рис. 2 приведены флуоресцентные микрофотографии KM (a, δ) селезенки (b), участка толстой кишки (ε) и тимуса (ε) интактных GFP $^+$ -мышей. Так как используемые в качестве доноров GFP⁺-мыши являются гетерозиготами, в тканях исследуемых органов наряду с яркими зелеными колониями клеток, экспрессирующих GFP, присутствуют темные участки, образованные клетками без GFP, причем распределение этих двух типов колоний является неравномерным по органу, что особенно четко просматривается в селезенке и толстой кишке. В тимусе, несмотря на то, что в паренхиме присутствует только $9.5 \pm 1.0\% \ \mathrm{GFP^{+}}$ -клеток, наблюдается самая высокая из исследованных органов интенсивность флуоресценции, обусловленная присутствующими в нем в большом количестве эндотелиоцитами и эпителиоретикулоцитами, образующими строму органа.

В КМ решипиентов после трансплантации нативного КМ уже через сутки на фоне выраженной гипоплазии собственной ткани обнаруживали мигрирующие туда клетки донора (рис. 3а), а через 3-6 сут были заметны многочисленные кроветворные клетки, а также фибробластоподобные клетки донора и образуемые ими волокна стромы (рис. 36). У реципиентов, получивших криосохраненный КМ, небольшое количество донорских клеток в КМ обнаруживали через 7 сут после трансплантации (рис. 3г), а через 11 сут были видны отдельные колонии донорских клеток (рис. 3∂). Через 14 сут после трансплантации (рис. 36, е) флуоресцентная морфология КМ реципиентов, получивших как нативный, так и криосохраненный КМ, почти не отличалась от таковой у интактных GFP+-мышей.

В селезенке реципиентов, получивших нативный КМ, также через сутки после трансплантации обнаруживали GFP^+ -клетки донора (рис. 4a), а через 3-6 сут в селезенке этих животных количество GFP^+ -колоний резко увеличивалось, обнаруживались фибробластоподобные клетки донора (рис. 4δ). У животных, которым трансплантировали криосохраненный КМ, донорские клетки появлялись через 7 сут после трансплантации (рис. 4ϵ), через 11 сут количество колоний также заметно увеличивалось (рис. 4δ), а через 14 сут флуоресцентная морфология селезенки реципиентов была сходна с морфологией селезенки интактных GFP^+ -мышей (рис. 4ϵ , ϵ).

В кишечнике реципиентов через сутки после введения нативного KM обнаруживались отдельные группы клеток KM донора (рис. 5a), а через 3-6 сут на поверхности органа появлялись многочисленные фибробластоподобные GFP⁺-клетки (рис. 56). К 11-м сут после трансплантации уже четко просматривалась яркая ячеистая структура основания ворсин и

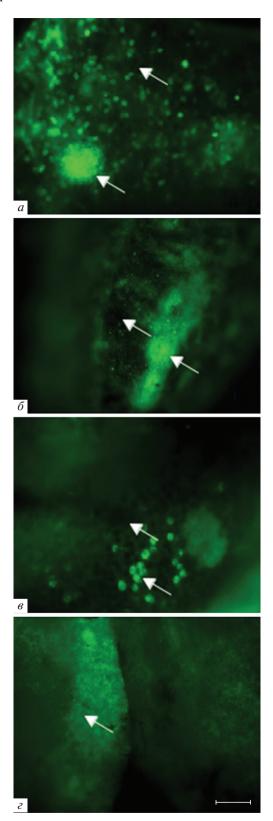


Рис. 2. Распределение GFP⁺-клеток в KM (a), селезенке (δ), кишечнике (ϵ) и тимусе (ϵ) интактных GFP⁺-мышей. Стрелками указаны колонии флуоресцирующих и нефлуоресцирующих клеток. Масштабный отрезок соответствует 50 мкм. Ув. об.: $a-40\times$, δ , $\epsilon-5\times$, $\epsilon-10\times$.

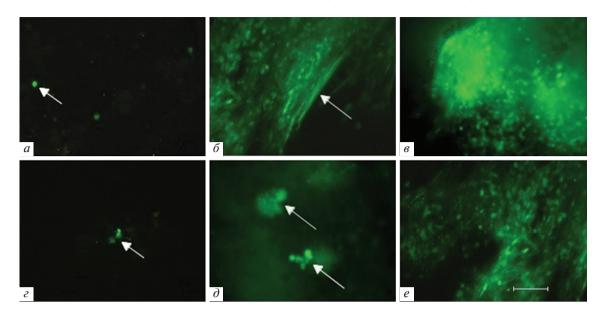


Рис. 3. Распределение GFP $^+$ -клеток в KM облученных мышей-реципиентов после трансплантации нативного (a–e) или криосохраненного (e–e) KM от GFP $^+$ -мышей-доноров. Срок после трансплантации: a – 1 сут, δ –6 сут, e, e –14 сут, e –7 сут, d –11 сут. Стрелками указаны появляющиеся донорские GFP $^+$ -клетки (e, e), флуоресцирующие волокна стромы (e) и колонии донорских GFP $^+$ -клеток (e). Масштабный отрезок соответствует 50 мкм. Ув. об. 40×.

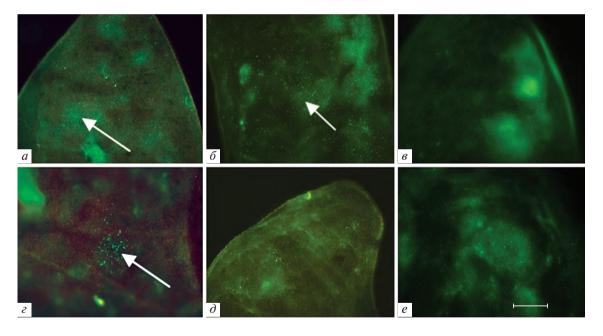


Рис. 4. Распределение GFP $^+$ -клеток в селезенке облученных мышей-реципиентов после трансплантации нативного (a-a) или криосохраненного (e-a) KM от GFP $^+$ -мышей-доноров. Срок после трансплантации: a – 1 сут, a – 6 сут, a, a – 14 сут, a – 7 сут, a – 11 сут. *Стрелками* указаны появляющиеся колонии донорских GFP $^+$ -клеток (a, a) и фибробластоподобные клетки (a). Масштабный отрезок соответствует 50 мкм. Ув. об. 5×.

единичные пейеровы бляшки, состоящие из GFP⁺-клеток донора, а на 14-е сут наблюдали уже многочисленные пейеровы бляшки (рис. $5\mathfrak{s}$). У мышей, получивших криосохраненный КМ, отдельные колонии донорских клеток обнаруживали на 11-е сут после трансплантации (рис. $5\mathfrak{e}$), где также были за-

метны фибробластоподобные клетки. На 14-е сут (рис. 5д) флуоресцентная картина органа почти не отличалась от таковой у реципиентов с трансплантацией нативного КМ и интактных GFP⁺-мышей. Однако обращает на себя внимание тот факт, что у мышей обеих экспериментальных групп количество

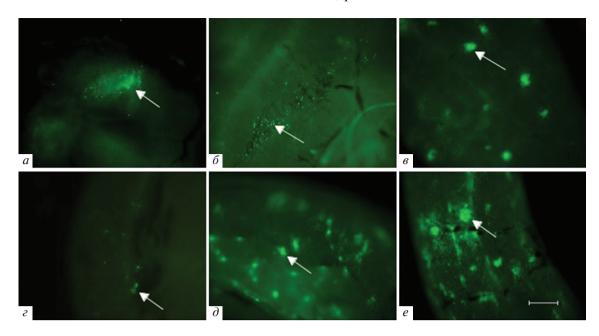


Рис. 5. Распределение GFP $^+$ -клеток в кишечнике облученных мышей-реципиентов после трансплантации нативного (a-e) или криосохраненного (e-e) KM от GFP $^+$ -мышей-доноров. Срок после трансплантации: a-1 сут, b-1 сут, b-

флуоресцирующих пейеровых бляшек было заметно более высоким (рис. 5e), чем у интактных GFP⁺-мышей. Значительное количество пейеровых бляшек оставалось у экспериментальных животных в течение всего периода наблюдения. Это, вероятно, можно объяснить тем, что в организме облученных мышей присутствует большое количество разрушающихся под действием радиации собственных клеток и их фрагментов, что вызывает активацию иммунной системы кишечника.

Так как после облучения происходит почти полная инволюция тимуса, применение GFP⁺ -мышей в качестве доноров КМ позволило проанализировать процессы адгезии и миграции клеток к доле тимуса на самых ранних стадиях восстановления органа. У облученных животных наблюдали выраженную аплазию лимфоидной ткани, повреждение стромы и жировое замещение органа. На 6-е сут после трансплантации в группе реципиентов с нативным КМ среди жировой ткани обнаруживали малочисленные дольки тимуса с мигрирующими туда клетками донора, располагающимися около кровеносных сосудов, и представленными как лимфоидными, так и фибробластоподобными клетками (рис. 6а). К 11 сут количество долек с заселившимися GFP⁺-клетками донора заметно увеличивалось, с их участием начинали восстанавливаться строма и корковое вещество органа (рис. 66). На 14-е сут после трансплантации в этой группе мышей восстанавливалась типичная форма тимуса, он уже состоял из двух долей, на поверхности органа были видны многочисленные GFP⁺-эпителиоретикулоциты, формирующие стро-

му тимуса (рис. 6в). Однако дольки тимуса были заполнены лимфоидными клетками еще не полностью. К 30-м сут увеличивалась плотность заполнения долек тимуса лимфоидными клетками и наблюдалась их незначительная гиперплазия. У животных, получивших криосохраненный КМ, на 11-е сут после трансплантации в тимусе наблюдали только отдельные небольшие вкрапления клеток донора (рис. 6г). Однако к 14-м сут после трансплантации структура тимуса уже состояла из двух долей (рис. 6∂), в которых происходило восстановление отдельных долек, немного менее интенсивное, чем в группе животных, получивших нативный КМ. Далее восстановление продолжалось и к 30-м сут (рис. 6е) у этой группы мышей плотность заполнения долек тимуса клетками донора даже несколько превысила таковую у мышей, получивших нативный КМ. К 40-50-м сут наблюдения структура тимуса в обеих группах экспериментальных животных восстанавливалась и имела флуоресцентную морфологию, сходную с тимусом интактных GFP⁺-мышей.

Итак, исследование суспензии клеток паренхимы КМ, селезенки и тимуса реципиентов дало возможность оценить вклад клеток донора в регенерацию органов по степени химеризма (доле флуоресцирующих клеток) и показало, что появление GFP⁺-клеток доноров у реципиентов, получивших размороженный КМ, на 7—8 сут отставало от такового у реципиентов с нативным КМ. Тем не менее, через 14—21 сут после трансплантации количество клеток донора в исследованных органах у реципиентов обеих групп достоверно не различалось.

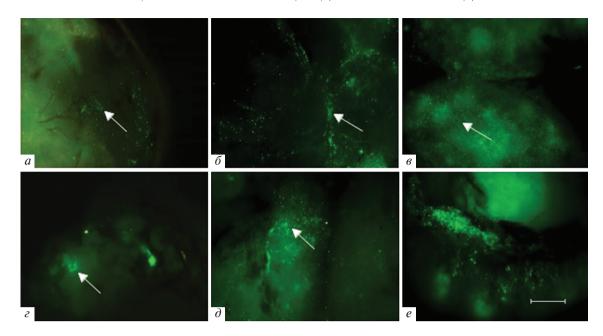


Рис. 6. Распределение GFP $^+$ -клеток в тимусе облученных мышей-реципиентов после трансплантации нативного (a-e) или криосохраненного (z-e) KM от GFP $^+$ -мышей-доноров. Срок после трансплантации: a-6 сут, δ , $\epsilon-11$ сут, ϵ , $\delta-14$ сут, $\epsilon-30$ сут. *Стрелками* указаны появляющиеся колонии донорских GFP $^+$ -клеток (a,ϵ) , флуоресцирующие строма долек (δ) и эпителиоретикулоциты (ϵ,δ) . Масштабный отрезок соответствует 50 мкм. Ув. об. $5\times$.

Исследование флуоресценции в целых органах (КМ, селезенке, кишечнике и тимусе) позволило обнаружить клетки донора в более ранние сроки после трансплантации, чем в суспензии этих органов. Также было показано, что мезенхимальные клетки КМ донора участвуют в восстановлении стромы органов, поврежденных радиацией, о чем свидетельствует присутствие фибробластоподобных GFP^+ -клеток во всех исследованных органах, особенно значительное в тимусе реципиентов обеих групп.

ОБСУЖДЕНИЕ

Восстановление достаточного количества СККМ после криоконсервации считается ключевым условием успешной трансплантации. На восстановление пула таких клеток могут влиять различные факторы, в том числе недостаточное количество криосохраненных клеток, часть которых может теряться при образовании агрегатов при размораживании и отмывании от криопротектора (Stiff at al., 1987; Цуцаева и др., 1988; Бабийчук, Землянских, 2001; Костяев и др., 2016; Моhammed et al., 2020). И хотя в настоящее время развиваются новые технологии удаления криопротектора без центрифугирования размороженной суспензии КМ, разработка оптимальных (быстрых. безопасных, простых, управляемых, эффективных и недорогих) методов и устройств для удаления криопротектора с минимальными потерями и повреждениями клеток остается нерешенной проблемой (Shu et al., 2014). Применение нами методики с использованием непроникающего криопротектора полиглюкина в сочетании с 5% ДМСО без отмывания от криопротектора позволило в значительной степени устранить проблему агрегации размораживаемых клеток (Сергиевич и др., 2018).

Как нами было показано в данной работе, к 14— 21 сут после трансплантации криосохраненный КМ по успешности восстановления органов не уступал нативному КМ, и донорские клетки присутствовали в организме реципиентов до конца его жизни, что свидетельствует о приживаемости ранних (longterm) предшественников СККМ (Randall, Weissman, 1997; Thanyaphong et al., 2002). Более высокая смертность облученных животных в группе с криосохраненным КМ, вероятно, связана с низкой концентрацией пула именно короткоживущих (short-term) СККМ, состоящих из общих миелоидных и мегакариоцито-эритроидных предшественников, присутствие достаточного количества которых необходимо для восстановления организма после облучения (Sawai et al., 2016). Помимо гибели части клеток, при замораживании у оставшихся клеток могут возникать нелетальные обратимые холодовые повреждения, что сказывается на пролиферации, дифференцировке и созревании различных популяций клеток КМ. Именно обратимость таких изменений, а также повышенная скорость накопления отдельных функционально полноценных популяций клеток по сравнению с нативным КМ (Цуцаева и др., 1988) приводит к быстрому заселению органов реципиента криосохранными клетками донора и высокой степени химеризма, что показано в нашем исследовании, где клетки хранились в жидком азоте 14-30 сут. Это согласуется с данными о том, что клетки, хранившиеся в жидком азоте до 3—6 мес., сохраняли стабильный кариотип (Гринчук, Шилина, 2021). Одним из возможных решений проблемы более высокой смертности животных в группе с криосохраненным КМ может быть введение, наряду с криосохраненными клетками КМ, также криосохраненных, нативных или модифицированных лимфоидных клеток, что, как показано ранее (Цуцаева и др., 1988; Мауbury et al., 2016), приводило к увеличению продолжительности жизни облученных реципиентов. В медицинской практике также проводится переливание компонентов крови (эритроцитарная масса, тромбомасса, плазма) совместно с криосохраненным КМ.

Более высокое, чем у интактных GFP⁺-мышей, процентное содержание GFP+-клеток, обнаруженное нами в тимусе мышей-реципиентов после трансплантации обоих вилов КМ, может объясняться тем, что СККМ при трансплантации в облученный организм пролиферируют более активно, чем в физиологических условиях (Sawen et al., 2016). Под воздействием радиации происходит не только опустошение органов системы крови реципиента, но и разрушение стромы органов, что препятствует размножению, миграции и дифференцировке гематопоэтических стволовых клеток (ГСК). В то же время в суспензии клеток донорского цельного КМ наряду с ГСК находятся и мезенхимальные стромальные клетки (МСК), которые принимают участие в процессах гистогенеза стромы органов и способствуют восстановлению их морфофункциональных свойств, что и было обнаружено нами при исследовании флуоресценции GFP в целых органах или на их поперечных срезах у животных после трансплантации как нативного, так и криосохраненного КМ. Так, было показано, что клетки доноров образуют строму в виде ретикулярной сети в KM (рис. 7a), селезенке, кишечнике и тимусе реципиентов, четко видную уже при увеличении объектива 5×. а при увеличениях 20-40× в органах можно наблюдать отдельные фибробластоподобные GFP⁺-клетки различной формы и размеров (рис. $76-\partial$). В настоящее время общепризнано, что МСК являются основной составляющей ниши ГСК в КМ и основным компонентом многих известных в настоящее время факторов ниш (Ding, Morrison, 2013; Cordeiro et al., 2016). В литературе (Нимирицкий и др., 2018; Wei, Frenette 2018) обсуждаются данные о том, как ГСК и их потомство регулируются взаимозависимой сетью МСК, нервных волокон, сосудистой системы, а также других кроветворных клеток. Облучение, как и другие миелоаблативные технологии, повреждает строму и приводит к опустошению и разрушению клеточных ниш (Abbuehl et al., 2017). Мы полагаем, что после трансплантации происходила регенерация ниш во всех исследованных нами органах, что можно заключить из наблюдаемого процесса восстановления стромы

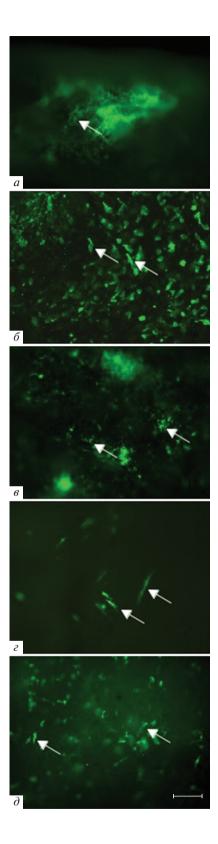


Рис. 7. Фибробластоподобные GFP $^+$ -клетки в KM (a, δ) , селезенке (s), кишечнике (ϵ) и тимусе (∂) облученных мышейреципиентов после трансплантации KM от GFP $^+$ -мышейдоноров. *Стрелками* указаны флуоресцирующие волокна стромы (a) и фибробластоподобные клетки донора $(\delta - \partial)$. Масштабный отрезок соответствует 50 мкм.

органов и полноценного их заполнения паренхимальными GFP^+ -клетками донора.

Таким образом, проведенные нами в модельных экспериментах сравнительные исследования динамики уровня химеризма GFP^+ -клеток мышей-доноров посредством их флуоресцентной визуализации в органах реципиентов показали, что клетки KM, криоконсервированного по методике, используемой в клинической практике для аутотрансплантации при лечении онкологических больных, оказались достаточно жизнеспособными для эффективного гистогенеза исследованных органов системы крови.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность коллеге Карнауховой Е.В., активному участнику этой многолетней работы, безвременно ушедшей из жизни.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках бюджетной темы № 59.1 учреждения ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биофизики клетки РАН "Механизмы дифференцировки клеток беспозвоночных и позвоночных животных под действием физических и химических факторов. Роль стрессовых белков и ферментов-антиоксидантов в формировании резистентности клеток к внешним воздействиям, в миграции и инвазии опухолевых клеток. Молекулярные механизмы модуляции иммунного ответа".

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные принципы использования лабораторных животных. Работы с животными проводились с разрешения Этического комитета ИБК РАН. Выведение животных из эксперимента проводили в соответствии с инструкцией American Physiological Society (1995 г).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г. 2001. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500. Проблемы криобиологии. № 1. С. 35. (Babiychuk L.A., Zemlyanskikh N.G. 2001. Optimization and advantages of the flushless method of cryopreservation of red blood cells with PEO-1500. Problems of cryobiology. № 1. P. 35.)
- Богданенко Е.В., Карнаухов А.В., Карнаухова Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухова Н.А., Манохина Й.А., Карнаухов В.Н. 2015. Изучение возможностей клеточной терапии для продления женской половой функции в модельных экспериментах на мышах. Патогенез. Т. 13. № 3. С. 13. (Bogdanenko E.V., Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V.,

- Sergievich L.A., Karnaukhova N.A., Manokhina I.A., Karnaukhov V.N. 2015. Study of cell therapy possibilities for renewal of feminine sexual function on mouse model experiments. Patogenes. V. 13. № 3. P. 13.)
- Богданенко Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухов А.В., Карнаухов В.Н. 2020. Изучение регенеративного потенциала стволовых клеток цельного костного мозга для лечения механических травм кожи в модельных экспериментах на мышах. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. Т. 64. № 1. С.31. (Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova I.A., Karnaukhov V.N. 2020. The regenerative potential of stem cells from the whole bone marrow for the treatment of skin mechanical trauma in a murine model. V. 64. № 1. Р. 31.)
- Гринчук Т.М., Шилина М.А. 2021. Влияние криоконсервации на стабильность кариотипа трансформированных фибробластов легкого китайского хомячка *in vitro*. Цитология. Т. 63. № 1. С. 63. (*Grinchuk T. M.*, *Shilina M. A.* 2021. The effect of cryopreservation on the karyotype stability of transformed Chinese hamster lung fibroblasts *in vitro*. Tsitologiya. V. 63. № 1. P. 63.)
- Деев Р.В., Цупкина Н.В., Сергеев В.С., Сериков В.Б., Гололобов В.Г., Пинаев Г.П. Особенности физиологического и репаративного остеогенеза после трансфузии ядросодержащих клеток костного мозга. 2006. Гены и Клетки. Т. 1. № 3. С. 54. (Deev R.V., Tsupkina N.V., Sergeev V.S., Serikov V.B., Gololobov V.G., Pinaev G.P. 2006. Features of physiological and reparative osteogenesis after transfusion of nucleated bone marrow cells. Genes and Cells. V. 1. № 3. P. 54.)
- Карнаухов А.В., Карнаухова Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухова Н.А., Смирнов А.А., Богданенко Е.В., Манохина И.А., Карнаухов В.Н. 2014. Информационная теория старения: изучение влияния трансплантации костного мозга на продолжительность жизни мышей. Биофизика. Т. 59. № 4. С. 790. (Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Sergievich L.A., Karnaukhova N.A., Bogdanenko E.V., Smirnov A.A., Manokhina I.A., Karnaukhov V.N. 2014. Information theory of ageing: studying the effect of bone marrow transplantation on the life span of mice. Biophysics. V. 59. № 4. P. 646.)
- Карнаухов В.А., Карнаухова Н.А., Сергиевич Л.А., Карнаухов В.Н. 2010. Двухволновый микрофлуориметр нового поколения ДМФ-3. В сб.: III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии. М. Т. 4. С. 43. (Karnaukhov V.A., Karnaukhova N.A., Sergievich L.A., Karnaukhov V.N. 2010. Two-wave microfluorimeter of the new generation DMF-3. In: The III Eurasian Congress on Medical Physics and Engineering. M. V. 4. P. 43.)
- Костяев А.А., Утёмов С.В., Андреев А.А., Полежаева Т.В., Мартусевич А.К., Исаева Н.В., Шерстнев Ф.С., Ветошкин К.А., Калинина Е.Н., Князев М.Г. 2016. Анналы криобиологии. Классификации криопротекторов и криоконсервантов для клеток крови и костного мозга. Вестник гематологии. Т. 12. № 3. С. 36. (KostyaevA.A., Utyomov S.V., Andreev A.A., Polezhaeva T.V., Martusevich A.K., Isaeva N.V., Sherstnyov P.S., Vetoshkin K.A., Kalinina E.N., Knyazev M.G. 2016. Annals of cryobiology. Classifications of cryoprotectants and cryoconservants for blood cells and bone marrow. The bulletin of hematology. V. 12. P. 36.)

- Миллер Т.В., Повещенко А.Ф., Лыков А.П., Повещенко О.В., Бондаренко Н.А., Петровская И.Ф., Завьялов Е.Л., Дементьева Е.В., Захарова И.С., Грицык О.Б., Шурлыгина А.В., Коненков В.И. 2016. Сравнительный анализ миграционной активности популяций клеток костного мозга в лимфоидные и нелимфоидные органы в норме и на модели экспериментального сахарного диабета. Современные проблемы науки и образования. № 2. C. 137. (Miller T.V., Poveshchenko A.F., Lykov A.P., Poveshchenko O.V., Bondarenko N.A., Petrovskaya I.F., Zavyalov E.L., Dementieva E.V., Zakharova I.S., Gritsyk O.B., Shurlygina A.V., Konenkov V.I. 2016. Comparative analysis of the migration activity of bone marrow cell populations to lymphoid and non-lymphoid organs in normal and experimental diabetes mellitus models. Modern problems of science and education. № 2. P. 137.)
- *Нимирицкий П.П., Сагарадзе Г.Д., Ефименко А.Ю., Мака- ревич П.И., Ткачук В.А.* 2018. Ниша стволовой клетки. Цитология. Т. 60. № 8. С. 575. (*Nimiritsky P.P., Saga- radze G.D., Efimenko A.Yu., Makarevich P.I., Tkachuk V.A.* 2018. The stem cell niche. Tsitologiya. V. 60. № 8. P. 575.)
- Сергиевич Л.А., Карнаухова Е.В., Карнаухов А.В., Карнаухова Н.А., Богданенко Е.В., Лизунова И.А., Карнаухов В.Н. 2018. Влияние криоконсервирования клеток костного мозга мышей-доноров, несущих ген egfp, на продолжительность жизни мышей при сингенной трансплантации. Биофизика. Т. 63. № 3. С. 517. (Sergievich L.A., Karnaukhova E.V., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Bogdanenko E.V., Lizunova I.A., Karnaukhov V.N. 2018. The effect of cryopreservation of bone marrow cells from donor mice that carry the egfp gene, on the lifespan of mice after syngeneic transplantation. Biophysics. V. 63. № 3. P. 393.)
- *Цуцаева А.А., Гольцев А.Н., Попов Н.Н., Останкова Л.В., Лобасенко Н.П., Микулинский Ю.Е.* 1988. Криоиммунология. Киев: Наукова думка. (*Tsutsaeva A.A., Goltsev A.N., Popov N.N., Ostankova L.V., Lobasenko N.P., Mikulinsky Yu.E.* 1988. Krioimmunologiya. Kiev: Naukova dumka.)
- *Пуцаева А.А.*, *Черноусова С.С.*, *Глушко Т.А.*, *Шатилова Л.Е.*, *Волина В.В.*, *Сокол Л.В.*, *Ивахненко Л.Ю.*, *Чернышенко Л.Г.*, *Бровко Е.В.* 2009. Влияние трансплантации криоконсервированного костного мозга на динамику восстановления морфофункциональных свойств лимфоидных, миелоидных и эндокринных органов у летально облученных реципиентов. Проблемы криобиологии. Т. 19. № 1. С. 71. (*Tsutsayeva A.A.*, *Chernousova S.S.*, *Glushko T.A.*, *Shatilova L.E.*, *Volina V.V.*, *Sokol L.V.*, *Ivakhnenko L.Yu.*, *Chernyshenko L.G.*, *Brovko E.V.* 2009. Effect of cryopreserved bone marrow transplantation on dynamics of recovery of morphofunctional properties of lymphoid, myeloid and endocrine organs in lethally irradiated recipients. Problems of cryobiology. V. 19. № 1. P. 71.)
- Яковлева Ю.А., Цаур Г.А., Вержбицкая Т.Ю., Попов А.М., Игуменьщев А.А., Вахонина Л.В., Вяткин И.Н., Шориков Е.В., Савельев Л.И., Фечина Л.Г. 2008. Выбор оптичальной стратегии криоконсервирования гемопоэтических стволовых клеток. Вестник Уральской медицинской академической науки. Т. 22. № 4. С. 86. (Yakovleva Yu.A., Tsaur G.A., Verzhbitskaya T.Yu., Popov A.M., Igumenshev A.A., Vakhonina L.V., Vyatkin I.N., Shorikov E.V., Savelyev L.I., Fechina L.G. 2008. Selection of the optimal strategy for cryopreservation of hematopoietic stem cells. Bulletin of the Ural Medical Academic Science. V. 22. № 4. P. 86.)

- Abbuehl J-P., Tatarova Z., Held W., Huelsken J. 2017. Longterm engraftment of primary bone marrow stromal cells repairs niche damage and improves hematopoietic stem cell transplantation. Cell Stem Cell. V. 21. P. 241.
- Berz D., McCormack E., Winer E., Colvin G., Quesenberry P. 2007. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. American Journal of Hematology. V. 82. P. 463.
- Biasco L., Pellin D., Scala S., Di Serio C., Naldini L., Aiuti A. 2016. In Vivo tracking of human hematopoiesis reveals patterns of clonal dynamics during early and steady-state reconstitution phases. Cell Stem Cell. V. 19. P. 107.
- Cordeiro Gomes A., Hara T., Lim V.Y., Herndler-Brandstetter D., Nevius E., Sugiyama T., Tani-Ichi S., Schlenner S., Richie E., Rodewald H.R., Flavell R.A., Nagasawa T., Ikuta K., Pereira J.P. 2016. Hematopoietic stem cell niches produce lineage-instructive signals to control multipotent progenitor differentiation. Immunity. V. 45. P. 1219.
- Ding L., Morrison S. 2013. Haematopoietic stem cells and earlylymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. Nature. V. 495. P. 231.
- Kawakami N., Sakane N., Nishizawa F., Iwao M., Fukada S I., Tsujikawa K., Kohama Y., Ikawa M., Okabe M., Yamamoto H. 1999. Green fluorescent protein-transgenic mice: immune functions and their application to studies of lymphocyte development. Immunol. Lett. V. 70. P. 165.
- Kovina M.V., Karnaukhov A.V., Krasheninnikov M.E., Kovin A.L., Gazheev S.T., Sergievich L.A., Karnaukhova E.V., Bogdanenko E.V., Balyasin M.V., Khodarovich Y.M., Dyuzheva T.G. and Lyundup A.V. 2019. Extension of maximal lifespan and high bone marrow chimerism after nonmyeloablative syngeneic transplantation of bone marrow from young to old mice. Frontiers in Genetics. V. 10. P. 310. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00310
- Maybury B., Cook G., Pratt G., Yong K., Ramasamy K. 2016. Augmenting autologous stem cell transplantation to improve outcomes in myeloma. Biol. Blood Marrow Transplant. V. 22. P. 1926.
- Mohammed R., Ahmad D., Khoshnaw N., Hassan D., Abdulrahman H., Vacca M., Possenti M., Faruq D., Harem O., Muhamad S., Majolino I., Othman D. 2020. Leukapheresis cell concentration adjustment required for a successful recovery of HSC after cryopreservation. Cryobiology. V. 92. P. 21.
- Otsu K., Kumakami-Sakano M., Fujiwara N., Kikuchi K., Keller L., Lesot H., Harada H. 2014. Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects. Front. Physiol. V. 5. P. 36.
- Randall T., Weissman I. 1997. Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. Blood. V. 89. P. 3596.
- Ramaswamy Reddy SH., Reddy R., Babu N., Ashok G. 2018. Stem-cell therapy and platelet-rich plasma in regenerative medicines: A review on pros and cons of the technologies. J. Oral Maxillofac. Pathol. V. 22. P. 367.
- Sawai C., Babovic S., Upadhaya S., Knapp D., Lavin Y., Colleen M. Lau C., Goloborodko A., Feng J., Fujisaki J., Ding L., Mirny L., Merad M., Eaves C., Reizis B. 2016. Hematopoietic stem cells are the major source of multilineage hematopoiesisin adult animals. Immunity. V. 45. P. 597.
- Sawen P., Lang S., Mandal P., Rossi D., Soneji S., Bryder D. Mitotic history reveals distinct stem cell populations and their contributions to hematopoiesis. 2016. Cell Reports. V. 14. P. 2809.

- Shu Z., Heimfeld S., Gao D. 2014. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. Bone Marrow Transplant. V. 49. P. 469.
- Stiff P.J., Murgo J.A., Zarolus C.G. 1987. Unfractionated human marrow cells cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch. Cryobiology. V. 20. P. 17.
- Thanyaphong N., Traver B., Weissman I., Akashi K. 2002. Myeloerythroid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S. J. Clin. Invest. V. 109. P. 1579.
- Wei Q., Frenette P. 2018. Niches for hematopoietic stem cells and their progeny. Immunity. V. 48. P. 632.

Fluorescent Visualization of the Dynamics of Donor GFP⁺-Cells Distribution in Mouse Organs after Native or Cryopreserved Bone Marrow Transplantation

L. A. Sergievich^{a, *}, E. V. Bogdanenko^b, A. V. Karnaukhov^a, N. A. Karnaukhova^a, and I. A. Lizunova^a

^a Institute of Cell Biophysics Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow reg., 142290 Russia
 ^b Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia
 *e-mail: larserg@mail.ru

Cryopreservation is the only way to preserve host's bone marrow stem cells (BM) for use in regenerative medicine or before ablative therapy of malignant diseases. The transplantation of BM own stem cells (autotransplantation) has not been sufficiently studied in terms of the interaction of the transplanted cells with the host (recipient) organism. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effectiveness of syngeneic transplantation, as a model of autotransplantation, native or cryopreserved BM in sublethally irradiated recipient mice. Mice carrying the green fluorescent protein (GFP) gene, bred on the basis of the C57BL/6 inbred strain, were used as donors, and C57BL/6 mice were used as recipients. The dynamics of the chimerism level in the organs of the lymphomyeloid complex of the blood system (bone marrow, thymus, spleen, blood and large intestine) in recipient mice at different terms after transplantation of native or cryopreserved GFP+-cells of the donor's whole syngeneic BM was studied by the fluorescence microscopy. Differences in the ability to engraft the organism with GFP⁺-cells were estimated by their percentage value in the suspension of BM, spleen, and thymus cells of the recipient. GFP⁺-cells in recipients who received thawed BM appeared in the studied organs 7–8 days later than in recipients after native BM transplantation. However, 14-21 days later after transplantation, the relative number of the donor cells in the studied organs of the recipients of both groups did not significantly differ. The chimerism was detected in the tissues of whole organs or their cross-sections (BM, spleen, thymus, intestine) earlier than in the suspension of these organs after transplantation. It was also shown that the mesenchymal cells of the donor BM are involved in the stroma repair of all studied organs damaged by radiation, as evidenced by the presence of fibroblast-like GFP+-cells in them, especially significant in the thymus of the recipients of both groups. Thus, our studies have shown that the BM cells cryopreserved according to the used method were sufficiently viable to achieve the effective histogenesis of the investigated organs of the blood system.

Keywords: autotransplantation, bone marrow, spleen, large intestine, thymus, cryopreservation, fluorescence microscopy, GFP

УЛК 599.323:616.716.4-001.5:616.441-002:612.017.2

ВЛИЯНИЕ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА НА СТРУКТУРУ И ПРОЦЕСС ВОССТАНОВЛЕНИЯ ОБЛАСТИ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ КРЫС В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

© 2021 г. И. В. Городецкая¹, Т. Н. Маркевич^{1, *}

¹Кафедра нормальной физиологии Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета, Витебск, 210009 Белоруссия

*E-mail: tanya.markevich86@mail.ru
Поступила в редакцию 18.08.2021 г.
После доработки 28.08.2021 г.
Принята к публикации 30.08.2021 г.

На 130 белых беспородных крысах-самцах изучена роль йодсодержащих тиреоидных гормонов в процессе постфрактурной репарации костной ткани в условиях стресса. Показано, что стресс (свободное плавание в клетке) ухудшает процесс восстановления области перелома нижней челюсти (отверстия диаметром 2.0 мм), в частности на 14-е сут уменьшается количество островков хрящевой и незрелой костной ткани на фоне увеличения количества плотной неоформленной соединительной ткани, коллагеновых волокон и площади гаверсовых каналов. Все это свидетельствует о торможении фаз репаративного ответа в области повреждения. Экспериментальный гипотиреоз (25 мг/кг мерказолила внутрижелудочно в течение 20 сут) негативно воздействует на трофику костной ткани сам по себе и замедляет заживление костного дефекта. L-тироксин, напротив, в близких к физиологическим дозах (1.5—3.0 мкг/кг внутрижелудочно в течение 28 дней), способствует интенсификации указанного процесса как после изолированного травматического повреждения мандибулярной кости, так и после сочетания его со стрессом. Полученные результаты открывают новый взгляд на антистрессорное действие йодсодержащих гормонов щитовидной железы — их участие в постфрактурной остеорегенерации на фоне стресса. Обсуждаются механизмы полученного эффекта, которые связаны с геномным и негеномным действием йодсодержащих тиреоидных гормонов.

Ключевые слова: йодсодержащие гормоны, щитовидная железа, стресс, перелом нижней челюсти **DOI:** 10.31857/S0041377121060055

Исследование механизмов постфрактурных репаративных процессов, связанных, в частности, с гормональной регуляцией, обеспечивающей реализацию пролонгированных ответных реакций является актуальной задачей медицинской науки. Это объясняется, с одной стороны, их недостаточной изученностью, а с другой — ростом бытового и дорожно-транспортного травматизма и многообразием клинических форм переломов (Кадыков, Морозов, 2020).

Около 3% всех повреждений скелета человека приходится на долю травм челюстно-лицевой области (Аверьянов и др., 2019), при этом чаще всего страдает нижняя челюсть (около 80% пациентов с травмами этой области) (Ефимов и др., 2019). В отличие от повреждения других отделов костной системы, травма челюстно-лицевой области затрагивает функционирование практически всех систем организма вследствие нарушения процесса питания.

Принятые сокращения: $\Gamma K - \Gamma$ аверсовы каналы; $\dot{\Pi} T - \ddot{\Pi} C$ одсодержащие тиреоидные гормоны; $KT - \kappa$ остная ткань; ΠHC -ткань — плотная неоформленная соединительная ткань; $XT - \kappa$ хрящевая ткань.

Наблюдающаяся тенденция к увеличению числа переломов костей лицевого черепа (Храмова и др., 2020) диктует необходимость поиска новых способов стимуляции репаративных процессов, индуцированных травмами челюстно-лицевой области, с целью оптимизации их лечения и снижения экономических потерь, связанных с этим процессом.

На заживление костной раны влияет множество факторов. Одним из ключевых является стресс (Иванов, Александровская, 2018). Вместе с тем, доказано, что важное значение в антистрессовой защите организма имеют йодсодержащие тиреоидные гормоны (Городецкая, Гусакова, 2021). Однако их протекторная роль, заключающаяся в ограничении влияния стресса на процесс репарации костной раны в области травматического дефекта, до сих пор не обсуждалась. На возможность такой защиты указывает, во-первых, установленное под влиянием ЙТГ снижение интенсивности стрессовой реакции, сопровождающей повреждающее воздействие (Городецкая, Гусакова, 2021), а во-вторых, геномное действие ЙТГ (Віапсо et al., 2019). Оно может привести к сти-

муляции синтеза факторов, которые, с одной стороны, способствуют новообразованию костной ткани, а именно остеопротегерина — природного антагониста рецептора-активатора ядерного транскрипционного фактора (Wright et al., 2009), а также щелочной фосфатазы (маркерного фермента остеобластов) (Желнин, 2015). С другой стороны, геномное действие ЙТГ ограничивает активность механизмов резорбции, снижающих ее интенсивность — маркерного фермента остеокластов кислой фосфатазы (Желнин, 2015), катепсинов Д и К (Fasanya, Siemann, 2021) и матриксных металлопротеиназ (Ярмолинская и др., 2012).

Наше предположение о возможности ЙТГ ограничивать негативное влияние стресса на формирование костной мозоли после травматического повреждения основывается на данных об изменении активности или содержания факторов, указанных выше, при изменении тиреоидного статуса у пациентов при лечении (Черных и др., 2016; Degertekin et al., 2016) и в экспериментах на крысах (Маянская и др., 2013; Здор и др., 2016) в отсутствии стрессовых воздействий.

Цель настоящего исследования — изучить воздействие ЙТГ на процесс остеорепарации области перелома нижней челюсти крыс в условиях стресса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объект исследования. Работа выполнена на 130 белых беспородных крысах-самцах массой 180-230 г в осенне-зимний период. Крыс содержали на диете вивария с соблюдением стандартных условий в соответствии с нормами содержания лабораторных животных (СанПиН 2.1.2.12.-18-2006 "Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)"). В эксперимент брали только здоровых крыс. При проведении экспериментов соблюдали требования гуманного обращения с животными, изложенные в методических указаниях "Положение о порядке использования лабораторных животных в научно-исследовательских работах и педагогическом процессе учреждения образования "Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет" и мерах по реализации требований биомедицинской этики" (2010).

Модель стресса. Стрессом служило свободное плавание в клетке (группа "Стресс"). Для этого крыс по 5 особей помещали в пластиковую клетку размером $50 \times 30 \times 20$ см, заполненную водой на высоту 15 см. Процедуру проводили по 30 мин ежедневно в течение 14 сут (Бондаренко, Манухина, 1999).

Модель перелома. Животное фиксировали за 4 конечности на деревянном столике в положении на спине. Под эфирным наркозом минимально инвазивно скальпелем делали разрез кожи по краю нижней челюсти. Обеспечивали доступ к внешней по-

верхности тела мандибулярной кости путем частичного отслоения передне-нижнего края жевательной мышцы. Шаровидным твердосплавным бором, используя портативную бормашину (УС-01 Селена-2000, Россия), производили дефект — отверстие диаметром 2.0 мм. Рану послойно ушивали (группа "Перелом). На следующие сутки после перелома нижней челюсти крыс подвергали процедуре свободного плавания в клетке, сочетая травматическое повреждение мандибулярной кости со стрессом (группа "Перелом + стресс").

Контролем служили животные, получавшие внутрижелудочно 1%-ный крахмальный клейстер в течение такого же срока, что и опытные крысы, получавшие препараты, модулирующие тиреоидный статус.

Животных выводили из эксперимента на 14 день свободного плавания (через 1 ч после последней процедуры) (группа "Стресс"), на 15 день после травматического повреждения нижней челюсти — изолированного (группа "Перелом") и комбинированного со стрессом (группа "Перелом + стресс").

Моделирование тиреоидного статуса. Экспериментальный гипотиреоз у крыс вызывали внутрижелудочным введением животным мерказолила (ООО "Фармацевтическая компания "Здоровье", Украина) в дозе 25 мг в 1%-ном крахмальном клейстере на 1 кг веса животного с помощью зонда с шаровидным наконечником в течение 20 сут (группа "Мерказолил). Введение L-тироксина (L-T4) (Berlin-Chemie AG, "Менарини Групп", Германия) осуществляли аналогичным способом в течение 28 сут в постепенно нарастающих дозах (от 1.5 до 3.0 мкг/кг; группа "Тироксин"), которые, как было установлено ранее, не оказывали влияния на прирост массы тела крыс, частоту сердечных сокращений и уровень ЙТГ в крови, что позволило классифицировать их как малые, близкие к физиологическим.

Для исключения влияния на изучаемые параметры самой процедуры введения мерказолила или Lтироксина (внутрижелудочно жестким зондом), животным всех групп за исключением интактных ("Контроль", "Стресс", "Перелом", "Перелом + стресс") также вводили 1%-ный крахмальный клейстер таким же способом и в течение такого же времени. Все воздействия на крыс (стресс, перелом) осуществляли на следующий день после окончания введения препаратов и установления моделированного тиреоидного статуса.

Гистология. Для приготовления гистологических препаратов нижнюю челюсть фиксировали в забуференном 10%-ном нейтральном формалине. Затем материал подвергали декальцинации в 5%-ном растворе муравьиной кислоты, проводили через батарею спиртов для обезжиривания и заливали в парафин. Готовили срезы толщиной 5—7 мкм. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Для получения сопоставимых данных строго выдержи-

вали продолжительность фиксации, декальцинации, заливки, толщину срезов и технологию окрашивания. Обработку полученного от животных материала с момента фиксации и до заключения в парафин проводили параллельно. Фотодокументирование гистопрепаратов проводили с использованием фотооборудования Leica Microsystems (Германия).

В каждом препарате исследовали 5 полей зрения. Наличие плотной неоформленной соединительной ткани оценивали следующим образом: 0 (не наблюдается ни в одном поле зрения), 1 (визуализируется в 1-2-х полях), 2 (в 3-4-х) и 3 (во всех полях зрения). Наличие островков хрящевой и незрелой костной ткани оценивали как 0 (нет во всех полях), 1 (1-2 островка во всех 5 полях), 2 (3-4 во всех 5 полях) и 3(5 и более островков во всех 5 полях).

Количество коллагеновых волокон оценивали с помощью измерительной сетки для цитогистостереометрических исследований (Автандилов, 1990), представляющей собой вырезанный из плотной прозрачной пленки прямоугольник, разделенный на два квадрата, один из которых разделен на 4 более мелких квадрата. В каждом из этих малых квадратов имеется по 25 точек. Подсчет производили во всех 4 квадратах (100 точках). Учитывали количество волокон, имеющих контакт с точками, и выражали его в %.

Все вышеприведенные исследования проводили в области костного дефекта (перелома). Площадь SГаверсовых каналов изучали в ткани, прилежащей к ней, и рассчитывали по формуле: $S = \pi ab$, где S площадь эллипса, $\pi - 3.1415$, a - длина большой полуоси, b — длина малой полуоси. Длины полуосей измеряли в мм с помощью изготовленной самостоятельно сетки, представляющей собой квадрат из плотной прозрачной пленки размером стороны 5 см, в центре которой типографским способом нанесены две перпендикулярные линии, имеющие миллиметровые деления. Точку их пересечения помещали на середину длинной полуоси канала. Для стандартизации расчетов производили перерасчет мм в мкм с помощью помещенной на каждом препарате линейки с масштабом 10 мкм. На каждом препарате измеряли самый крупный и самый мелкий каналы и рассчитывали среднюю площадь.

Статистическая обработка данных. Результаты анализировали с применением пакета прикладных "STATISTICA 10.0" программ (StatSoftinc., STA999K347156-W). Для выбора методов статистического анализа сначала определяли характер распределения признака, используя тест Шапиро-Уилка. Поскольку было выявлено, что характер распределения признака в наших экспериментах не соответствовал нормальному, для обработки данных использовали методы непараметрической статистики. При межгрупповом сравнении и проведении анализа различий по количественным параметрам использовали U-критерий Манна-Уитни. Критическим уровнем значимости был принят p < 0.05. Наличие (количество) КТ, ПНС-ткани и ХТ выражали в баллах, коллагеновых волокон и площадь $\Gamma K - в$ виде медиан и границ нижнего (25) и верхнего (75) квартилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У контрольных животных нами определялась только площадь Гаверсовых каналов (в связи с отсутствием дефекта нижней челюсти), которая составила 0.31 (0.19; 0.49) мкм². Введение крысам 1%-ного крахмального клейстера (группа "Контроль") и свободное плавание крыс в клетке (группа "Стресс") не оказали влияния на этот показатель (p > 0.05) (табл. 1).

Новообразование костной ткани после перелома. После воспроизведения дефекта нижней челюсти (группа "Перелом") в области травматического повреждения на 14-е сут визуализировался процесс репаративной регенерации, который характеризовался следующими параметрами: количество плотной неоформленной соединительной ткани (ПНСткань) — 1 балл у 60% и 2 балла у 40% крыс; количество островков хрящевой ткани (XT) -1 балл у 20%, 2 балла у 60%, 3 балла у 20% крыс; количество островков незрелой костной ткани (КТ) оценивалось в 1 балл (20%) или в 2 балла (тоже 20% крыс); количество коллагеновых волокон -16 (10; 20)%; площадь Гаверсовых каналов (ГК) -0.69 (0.59; 0.75) мкм². Показатель ГК по сравнению с группами "Контроль" и "Стресс" был больше в 3 (p < 0.01) и 1.8 раза (p < 0.05) соответственно. В целом, полученные данные отражают перестройку костной ткани для осуществления процесса постфрактурного ремоделирования и свидетельствуют об окончании образования тканевого регенерата в области перелома, что соответствует концу 2-ой стадии заживления костной ткани.

Влияние стресса на формирование костной мозоли. Стрессовое воздействие на животных, подвергнутых травматическому повреждению мандибулярной кости (группа "Перелом + стресс"), негативно повлияло на восстановление костного дефекта: количество ПНС-ткани, оцениваемое в 1 балл, наблюдали у 20% крыс, а в 2 и 3 балла — у 40%; количество островков XT — в 1 балл у 80%, в 2- у 10%, а у 10% крыс их не выявили; количество островков незрелой КТ оценили в 1 балл у 40% животных, а у остальных не обнаружили (рис. 1).

Количество коллагеновых волокон в группе "Перелом + стресс" составило 24 (15; 31)%, а площадь ГК 0.95 (0.76; 1.23) мкм². По сравнению с величиной показателя ГК в группах "Контроль" и "Стресс" его значение в группе "Перелом + стресс" было больше в 2.5 и 4.1 раза (p < 0.01 в обоих случаях) соответственно.

По отношению к группе "Перелом" процесс заживления костной раны в группе "Перелом + стресс" был

Таблица 1. Влияние тиреоидного статуса на гистоструктуру костной ткани нижней челюсти после ее экспериментального перелома без и в сочетании со стрессом (плавание)

Пистиан Островки кт, обадины Островки ктольков, обадины Остр	HOI	ного перелома оез и в сочетании со стрессом (плавание)							
Контраль 10			ПНС-ткань,	Островки XT,	Островки незрелой	Количество			
Контроль 10 - - 10 - - 10 - - - 0.38 (0.23; 0.51)	No	Группа животных	баллы	баллы	КТ, баллы	коллагеновых	Площадь ГК, мкм 2		
2 Стресс 10 - - 10 - - - 10 - - - - - - 0.23 (0.19 0.38) p > 0.05 (1 и 2) p > 0.05 (1 и 3) p > 0.05 (1 и 3) p < 0.05 (1 и 4) p < 0.05 (1 и 5) p > 0.05 (1 и 6) p > 0.05 (1 и 7) p > 0.01 (1 и 7) p > 0.01 (1 и 7) p > 0.01 (1 и 7) p > 0.05 (1 и 7) p > 0.01 (1 и 7) p > 0.05 (1 и 8) p			0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	волокон, %			
2 Стресс 10 - - 10 - - - 10 - - - - - - 0.23 (0.19 0.38) p > 0.05 (1 и 2) p > 0.05 (1 и 3) p > 0.05 (1 и 3) p < 0.05 (1 и 4) p < 0.05 (1 и 5) p > 0.05 (1 и 6) p > 0.05 (1 и 7) p > 0.01 (1 и 7) p > 0.01 (1 и 7) p > 0.01 (1 и 7) p > 0.05 (1 и 7) p > 0.01 (1 и 7) p > 0.05 (1 и 8) p	1	Контроль	10	10	10	_	0.38 (0.23: 0.51)		
Перелом	2					_			
3 Перелом	_	Стресс				_			
4 Перелом + стресс P < 0.01 (2 н 3)	3	Передом			- ' '	16 (10: 20)			
4 Перелом + стресс	3	перелом				10 (10, 20)			
4 Перелом + стресс						_	* '		
P < 0.01 (2 и 4) P < 0.01 (2 и 4) P < 0.05 (3 и 5) P < 0.05 (3 и 6) P > 0.05 (3 и 7) P > 0.05 (4	Парадом + страсс			= -	24 (15: 31)			
P < 0.05 (3 и 4) P < 0.05 (-	перелом гетреес							
S Мерказолил P O O O O O O O O O						n < 0.05 (3 M 4)			
5 Мерказолил 10 - - - 10 - - 10 - - 0.21 (0.18; 0.32) p > 0.05 (1 и 5) p > 0.05 (1 и 5) p < 0.05 (1 и 5)						p < 0.05 (5 n 4)	• ,		
6 Мерказолил + + стресс	5	Мерказопил				_			
6 Мерказолил + + стресс	3	Мерказолил				_			
+ стресс p > 0.05 (5 и 6) p > 0.05 (5 и 6) p > 0.05 (1 и 6) p > 0.05 (2 и 6) p > 0.05 (1 и 7) p > 0.01 (6 и 7) p > 0.01 (6 и 7) p > 0.01 (6 и 7) p > 0.05 (1 и 7) p > 0.05 (1 и 7) p > 0.05 (1 и 7) p > 0.01 (3 и 7)	6	Матугаралия	. ,			_			
P > 0.05 (1 и 6)	U	_				_			
7 Мерказолил + + перелом − − − − − − − − − − − − − −		+ crpecc	• '			_			
7 Мерказолил + + перелом			. ,		. ,	_			
+ перелом р < 0.01 (5 и 7)	7	Managara				21 (26, 29)			
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	/	_				31 (20, 38)			
8 Мерказолил + $- - 1 9 $ 6 $ 4 - - $ 10 $ - - - $ 25 $ 5 $ 12 $ 5 $ 10 $ - $ 20.01 (3 и 7) $ 5 $ 20.01 (1 и 7) $ 5 $ 20.01 (3 и 7) $ 5 $ 20.01 (5 и 8) $ 5 $ 20.05 (5 и 8) $ 5 $ 20.05 (6 и 8) $ 5 $ 20.05 (7 и 8) $ 5 $ 20.05 (7 и 8) $ 5 $ 20.05 (1 и 18) $ 5 $ 20.05 (1 и 19) $ 5 $ 20.05 (1 и 1		т перелом		-		_			
8 Мерказолил + + перелом + + стресс - - 1 9 0 6 4 - - 0 - 10 - - - 0 0.05(5 и 8) р < 0.05 (5 и 8) p > 0.05 (5 и 8) р > 0.05 (5 и 8) p > 0.05 (6 и 8) - p < 0.01 (3 и 7) 35 (29; 39) 1.28 (1.12; 1.53) - стресс р < 0.01 (6 и 8) p < 0.05 (7 и 8) p < 0.05 (7 и 8) p < 0.05 (7 и 8)						_			
8 Мерказолил +						- (0.01 (2 7)			
$ \begin{array}{c} + \text{ перелом} + \\ + \text{ стресс} \\ + \text{ стресс} \\ \end{array}{c} \begin{array}{c} p < 0.01 (5 \text{ if } 8) \\ p < 0.05 (6 \text{ if } 8) \\ p < 0.05 (6 \text{ if } 8) \\ p > 0.05 (7 \text{ if } 8) \\ p > 0.05 (7 \text{ if } 8) \\ p > 0.05 (7 \text{ if } 8) \\ p > 0.05 (7 \text{ if } 8) \\ p > 0.05 (7 \text{ if } 8) \\ p > 0.05 (7 \text{ if } 8) \\ p > 0.05 (1 \text{ if } 8) \\ p > $	0	3.6			= ' ' '				
$ \begin{array}{c} + \mathrm{ctrpecc} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ $	8	_				35 (29; 39)			
Р > 0.05 (7 и 8) $p > 0.05 (7 и 8) p > 0.05 (1 и 9) p > 0.05 (1 и 10) p > 0.05 (2 и 10) p > 0.05 ($		•	• , ,			_			
Реголов (1 и 8) $p < 0.05$ (4 и 8) $p < 0.05$ (1 и 9) $p > 0.05$ (1 и 9) $p > 0.05$ (1 и 10) $p > 0.05$ (2 и 10) $p > 0.05$ (3 и 11) $p < 0.01$ (10 и 11) $p < 0.05$ (3 и 11) $p < 0.05$ (11 и 12) $p < 0.01$ (10 и 12) $p < 0.05$ (11 и 12) $p > 0.05$		+ стресс				- > 0.05 (7 0)			
Тироксин $ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$						р > 0.03 (7 и 8)			
9 Тироксин $10 \mid - \mid - \mid - \mid$ $10 \mid - \mid - \mid - \mid$ $10 \mid - \mid - \mid - \mid$ $p > 0.05 (1и 9)$ 10 Тироксин + + стресс $10 \mid - \mid - \mid - \mid$ $10 \mid - $						- (0.05 (4 0)			
Тироксин + + стресс $\begin{vmatrix} p > 0.05 (1и 9) \\ 10 - - - \\ p > 0.05 (9 и 10) \\ p > 0.05 (9 и 10) \\ p > 0.05 (9 и 10) \\ p > 0.05 (1 и 10) \\ p > 0.05 (1 и 10) \\ p > 0.05 (2 и 10) \\ p > 0.05 (1 и 11) \\ p > 0.05 (1 и 12) \\ p > 0.05 (11 и 12) \\ p > 0.0$	0	T	-		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	р < 0.05 (4 и 8)			
10 Тироксин + + стресс $10 \mid - \mid - \mid$ $00 \mid - \mid - \mid$ $0005 (9 и 10)$ $0005 (9 и 10)$ $0005 (9 и 10)$ $0005 (1 и 10)$ $0005 (2 и$	9	Тироксин				_	, , ,		
+ стресс $p > 0.05 (9 \text{ и 10}) p > 0.05 (1 \text{ и 10}) p > 0.05 (1 \text{ и 10}) p > 0.05 (1 \text{ и 10}) p > 0.05 (2 \text{ и 10}) p > 0.05 (9 \text{ и 11}) p > 0.05 (9 \text{ и 11}) p > 0.05 (9 \text{ и 11}) p > 0.05 (1 \text{ и 11}) p > 0.05 (3 \text{ и 11}) p > 0.05 (9 \text{ и 12}) p > 0.05 (9 $	10		-			_			
Тироксин + + перелом $p > 0.05 (1 \text{ и } 10) p > 0.05 (2 \text{ и } 10) p > 0.05 (3 \text{ и } 11) p < 0.01 (10 \text{ и } 11) p < 0.05 (3 \text{ и } 11) p < 0.05 (3$	10	•				_			
Тироксин + + перелом $p > 0.05 (2 \text{ и } 10)$ $p > 0.05 (9 \text{ и } 11)$ $p > 0.05 (3 \text{ и } 11)$ $p > 0.05 (9 \text{ и } 12)$ $p > 0.05 (11 \text{ и } 1$		+ стресс				_	* '		
Тироксин + + перелом						_			
$egin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	11					- ((1, 11)			
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	11	*	1 1 1 1			6 (1; 11)	, , ,		
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		+ перелом				_			
Тироксин + + перелом + + стресс $p < 0.05 (3 \text{ и 11})$ $p < 0.05 (9 \text{ и 12})$ $p < 0.01 (9 \text{ и 12})$ $p < 0.01 (10 \text{ и 12})$ $p < 0.01 (10 \text{ и 12})$ $p < 0.01 (10 \text{ и 12})$ $p < 0.05 (11 \text{ и 12})$ $p > 0.05 (11 \text{ и 12})$ $p < 0.025 (11 \text{ и 12})$						_			
Тироксин + $\begin{pmatrix} - & 6 & 4 & - & - & 5 & 3 & 2 \\ + & перелом + & + & стресс \end{pmatrix}$ $p < 0.01 (9 и 12)$ $p < 0.01 (10 и 12)$ $p < 0.01 (10 и 12)$ $p < 0.025 (11 и 12)$ $p < 0.01 (1 и 12)$ $p <$						-			
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	10								
$ \begin{vmatrix} + \text{ crpecc} & p < 0.01 (10 \text{ M } 12) & p < 0.01 (10 \text{ M } 12) & p < 0.01 (10 \text{ M } 12) \\ p < 0.05 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p > 0.05 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.01 (1 \text{ M } 12) & p < 0.01 (1 \text{ M } 12) & p < 0.01 (1 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.01 (1 \text{ M } 12) & p < 0.01 (1 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) & p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 \text{ M } 12) \\ p < 0.025 (11 $	12	_				12 (/; 18)			
$ \begin{vmatrix} p < 0.05 & (11 \text{ u } 12) & p < 0.025 & (11 \text{ u } 12) \\ p < 0.01 & (1 \text{ u } 12) & p < 0.01 & (1 \text{ u } 12) \end{vmatrix} $						_			
p < 0.01 (1 и 12) $p < 0.01 (1 и 12)$ $p < 0.01 (1 и 12)$ — $p < 0.025 (1 и 12)$		+ стресс			• '	-			
						p > 0.05 (Пи 12)			
$p < 0.05 (4 \text{ M } 12) \mid p < 0.05 (4 \text{ M } 12) \mid p < 0.05 (4 \text{ M } 12) \mid p < 0.01 (4 \text{ M } 12) \mid p < 0.05 (4 \text{ M } 12)$						-			
			р < 0.05 (4 и 12)	р < 0.05 (4 и 12)	р < 0.05 (4 и 12)	р < 0.01 (4 и 12)	р < 0.05 (4 и 12)		

Примечание. Наличие (количество) ткани выражено в баллах по визуальной оценке гистологических срезов. Для коллагеновых волокон и площади Γ K указаны медианы и границы нижнего (25) и верхнего (75) квартилей; число животных в каждой группе n=10; p — достоверность различий между группами сравнения (указаны в скобках рядом).

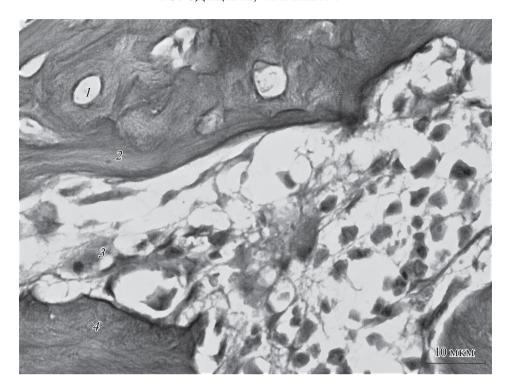


Рис. 1. Гистологическая картина области посттравматического восстановления мандибулярной костной ткани в группе крыс "Перелом + стресс" Здесь и на рис. 2 и 3: I — Гаверсов канал, 2 — хрящевая ткань, 3 — коллагеновые волокна, 4 — незрелая костная ткань. Увел. об.: $63 \times$.

замедлен: доля животных, имеющих количество ПНС-ткани с оценкой в 1 балл, была на 40% меньше, а у 40% крыс появилась ПНС-ткань с оценкой 3 балла. У 10% животных группы этой группы островки XT вообще не визуализировались, островков с оценкой в 1 балл было больше на 60%, а в 2 балла — напротив, меньше на 50%, чем в группе "Перелом". Отсутствовали крысы, имевшие количество островков XT с оценкой 3 балла. Количество островков незрелой KT в 1 балл было больше на 20%, и не было животных с их количеством в 2 балла. Количество коллагеновых волокон было больше на 8% (p < 0.05), а площадь ГК была выше в 1.4 раза (p < 0.025).

Следовательно, стресс значительно ухудшает процесс остеорегенерации, индуцированный экспериментальным моделированием перелома нижнечелюстной кости, о чем свидетельствует снижение скорости образования тканевого регенерата в области дефекта. Это привело к тому, что в группе "Перелом + стресс" в отличие от группы "Перелом" за 14 сут не завершилась 2-ая стадия образования костной мозоли, т.е. образование и дифференцирование тканевых структур (Волотовский и др., 2010).

Влияние гипотиреоза на гистоструктуру костной ткани нижней челюсти. После введения мерказолила (группа "Мерказолил") в микропрепаратах определяли только площадь ГК (в связи с отсутствием дефекта), которая составила $0.21~(0.18;~0.32)~\text{мкм}^2$. По сравнению с аналогичным параметром у контроль-

ных крыс она была меньше в 1.8 раза (p < 0.05). Следовательно, экспериментальный гипотиреоз *per se* приводит к сужению просвета ГК. Такая деформации остеонов может являться признаком развития остеопороза.

Влияние гипофункции щитовидной железы на вызванные стрессом морфологические изменения мандибулярной кости. После стресса у животных, которым вводили тиреостатик (группа "Мерказолил + стресс"), визуализировались еще более значительные изменения микроструктуры костной ткани: площадь ГК составила $0.14~(0.11; 0.19)~\text{мкм}^2$, т.е. была в 1.5~ раза меньше по отношению к таковой в группе "Мерказолил" (p < 0.05). По сравнению с аналогичными значениями в контроле и после стресса у эутиреоидных крыс (с нормальным уровнем ЙТГ) площадь ГК была меньше в 2.7~(p < 0.01)~и~1.6~раза~(p < 0.05) соответственно. Следовательно, стресс ускоряет вызванный гипофункцией щитовидной железы процесс развития остеопорозных изменений в мандибулярной костной ткани.

Влияние гипотиреоза на образование остеорегенерата в области травматического повреждения нижней челюсти. Моделирование перелома нижнечелюстной кости у животных, получивших мерказолил (группа "Мерказолил + перелом"), значительно снижало скорость заживления костной раны: количество ПНС-ткани в 1 балл визуализировали у 10% крыс, в 2 балла — у 30%, в 3 балла — у 60%; количество островков ХТ в 1 балл — у 70% а у остальных крыс

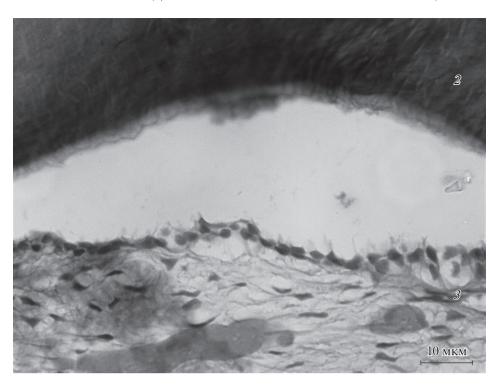


Рис. 2. Область репарации дефекта костной ткани нижней челюсти у крыс в руппе "Мерказолил + перелом + стресс". Увел. об.: 63×.

они не выявлялись; островки незрелой КТ отсутствовали у всех животных; количество коллагеновых волокон составило 31 (26; 38)%; площадь ГК 0.97 (0.68; 1.31) мкм². По отношению к величине ГК в группах "Мерказолил" и "Контроль" этот показатель был выше в 4.6 и 2.5 раза (p < 0.01 в обоих случаях) соответственно.

По сравнению с группой "Перелом" скорость постфрактурного восстановления кости нижней челюсти была снижена: доля животных, имевших количество ПНС-ткани в 1 балл, была меньше на 50%, а в 2 балла — на 10%. Появились крысы с количеством ПНС-ткани в 3 балла (60%) и без островков ХТ в области костного дефекта (30%). Число последних в 1 балл было на 50% больше, отсутствовали крысы, имевшие количество островков ХТ, соответствующее 2 и 3 баллам, а также имевшие островки незрелой КТ. Количество коллагеновых волокон было больше на 15% (p < 0.01), а площадь ГК больше в 1.4 раза (p < 0.05).

Следовательно, гипотиреоз существенно замедляет процесс регенерации в мандибулярной кости: гистологическая картина постфрактурной области соответствует лишь началу 2-ой стадии заживления перелома, тогда как у эутиреоидных животных аналогичной группы она достигает завершения.

Влияние гипофункции щитовидной железы на репаративную реакцию костной ткани в области дефекта нижнечелюстной челюсти в условиях стресса. Сочетание травматического повреждения мандибулярной ко-

сти со стрессовым воздействием у гипотиреоидных крыс (группа "Мерказолил + перелом + стресс") привело к наиболее выраженному ухудшению репаративных процессов в области костного дефекта: количество ПНС-ткани, оцениваемое в 2 балла, наблюдали у 10% животных, в 3 балла — у 90%; количество островков XT с оценкой в 1 балл наблюдали у 40%, а у остальных крыс они отсутствовали. Островки незрелой КТ не визуализировались ни в одном препарате. Число коллагеновых волокон составило 35 (29; 39)%, площадь Γ K по сравнению со значением в группах "Мерказолил", "Контроль" и "Мерказолил + стресс" была больше в 6.1, 3.4 и 9.1 раза (p < 0.01 во всех случаях).

По отношению к группе "Мерказолил + перелом" количество ПНС-ткани в 2 балла было меньше на 20%, в 3 балла, напротив, больше на 30% (p < 0.01), оценка 1 балл отсутствовала. Количество островков XT, оцениваемое в 1 балл, стало меньше на 30%, а доля животных, не имеющих островков XT в остеорегенерате, выросла на 30% (p < 0.05).

По сравнению с группой "Перелом + стресс" репаративный процесс, протекающий в области костной раны нижней челюсти, значительно замедлился: доля крыс с количеством ПНС-ткани в 2 балла была на 30% меньше, тогда как с оценкой в 3 балла — на 50% больше; отсутствовали животные с числом ПНС-ткани в дефекте в 1 балл и имевшие островки незрелой КТ в его области. Крысы без островков ХТ в остеорегенерате встречались в 2 раза чаще, количество

островков XT в 1 балл было на 40% меньше. Число коллагеновых волокон было выше на 11% (p < 0.05), площадь ГК выросла в 1.3 раза (p < 0.05).

Следовательно, гипотиреоз значительно ухудшает процесс восстановления костного дефекта нижней челюсти не только в отсутствие стресса, но и в его условиях, в связи с чем остеорегенерация достигает только лишь окончания 1-ой стадии (первичная бластома). Вместе с тем, у эутиреоидных крыс группы "Перелом + стресс" она доходит до завершения.

Таким образом, гипофункция щитовидной железы сама по себе вызывает сужение Гаверсовых каналов мандибулярной костной ткани, провоцирует его при стрессе и тормозит процесс образования регенерата на старте 2-ой стадии заживления после перелома нижней челюсти. При моделировании дефекта у гипотиреоидных животных, подвергнутых стрессу, образование костной мозоли тормозится уже на первой стадии процесса.

Следует обратить внимание на тот факт, что у крыс с интактным тиреоидным статусом стресс способствовал увеличению количества ПНС-ткани и, напротив, уменьшению островков ХТ в области дефекта кости. В целом, эти данные могут быть оценены как ухудшение заживления области травматического повреждения мандибулярной кости в условиях стресса. Отсутствие влияния стресса на число островков незрелой КТ, по нашему мнению, объясняется тем, что консолидация перелома у животных как подвергнутых стрессу, так и у нестрессированных, достигла в период исследования только стадии образования хрящевой мозоли.

У гипотиреоидных крыс группы "Мерказолил + + перелом + стресс" все оцененные нами параметры гистоструктуры образовавшегося регенерата достоверно не отличались от параметров в группе "Мерказолил + перелом" (за исключением площади ГК, которая была больше), однако на большинстве гистологических срезов наблюдали формирование грануляционной ткани в очаге повреждения, что говорит о торможении процесса заживления. Иными словами, стресс оказывает негативное воздействие на восстановление КТ, наблюдавшееся и у эутиреоидных животных, однако менее выраженное. Мы полагаем, что этот факт связан с тем, что моделирование травматического повреждения у крыс, получавших мерказолил, само по себе вызвало глубокие изменения микроструктуры в области дефекта.

Влияние L-T4 в малых дозах на гистологическую картину ткани нижней челюсти крыс без и в условиях стресса. Введение L-T4 (группа "Тироксин") не привело к изменению строения мандибулярной костной ткани. Стресс у животных, получавших L-T4 (группа "Тироксин + стресс"), как это имело место и после аналогичного воздействия без препарата, не повлиял ни на один из исследованных нами показателей, вследствие чего их величина не отличалась от групп "Контроль" и "Стресс".

Влияние L-Т4 в дозах, близких к физиологическим, на процесс созидания и развития костной ткани после механического повреждения нижней челюсти. При воспроизведении перелома мандибулы у крыс после курса L-Т4 (группа "Тироксин + перелом") визуализировали значительное улучшение развития постфрактурной костной мозоли: количество ПНС-ткани, соответствующее 1 баллу, наблюдали у 60% животных, 2 баллам — у 10%, а у остальных животных ее не выявляли; число островков XT с оценкой 2 балла было у 40% крыс, 3 балла — у 60%; количество островков незрелой КТ с оценкой 1, 2 и 3 балла наблюдали у 50, 40 и 10% животных соответственно. Количество коллагеновых волокон составило 6 (1; 11)%, площадь $\Gamma K - 0.57$ (0.49; 0.67) мкм². По сравнению с группами "Тироксин" и "Контроль" площадь ГК выросла в 1.3 (p < 0.05) и 1.5 (p < 0.025) раза соответственно.

По сравнению с группой "Перелом" процесс репаративной регенерации, происходящий в области костного дефекта нижней челюсти, был значительно ускорен: крыс с количеством ПНС-ткани в 2 балла, было на 30% меньше и появились животные без ПНСТ в области регенерата (30%). Не было выявлено препаратов с количеством островков ХТ в области костной раны в 1 балл, с двумя баллами встречались реже на 20%, с тремя — напротив, на 40% чаще. Во всех срезах остеорегенератов были обнаружены островки незрелой КТ, причем их количество с оценкой 1 и 2 балла было больше на 30 и 20% соответственно, а у 10% крыс образовались островки незрелой KT в количестве, соответствующем 3 баллам. Количество коллагеновых волокон было ниже на 10%, площадь ГК меньше в 1.2 раза (p < 0.05 в обоих случаях).

Следовательно, близкие к физиологическим дозы тироксина способствуют интенсификации процесса заживления костной раны, индуцированному экспериментальным моделированием перелома нижнечелюстной кости, вследствие чего происходит значительное увеличение скорости образования тканевого регенерата в области дефекта. Полученные нами данные позволяют сделать заключение о том, что в группе "Тироксин + перелом" остеоцитарная регенерация достигла 3-ей стадии (образование ангиогенных костных структур), тогда как в группе "Перелом" — лишь окончания второй.

Влияние малых доз L-T4 на постфрактурное ремоделирование ткани нижней челюсти на фоне стресса. L-T4 в малых дозах оказал защитное действие и при сочетании перелома нижнечелюстной кости со стрессом (свободным плаванием в клетке). Так, количество ПНС-ткани, характеризующееся 1 и 2 баллами, визуализировалось у 60 и 40% животных соответственно; число островков XT с оценкой в 1, 2 и 3 балла наблюдали у 50, 30 и 20% животных соответственно; количество островков незрелой КТ в 1 и 2 балла — у 60 и 20% крыс, а у остальных их не выявили. Количе-

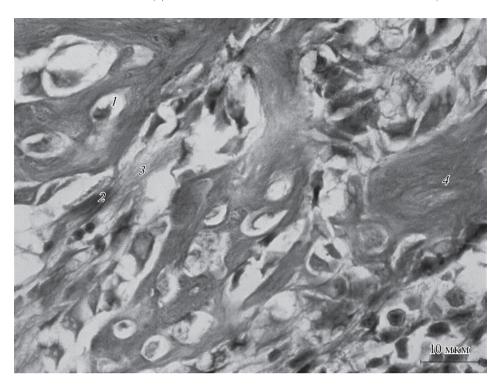


Рис. 3. Регенерация костной раны нижней челюсти у крыс в группе "Тироксин + перелом + стресс". Увел. об.: 63×.

ство коллагеновых волокон составило 12 (7; 18)%, площадь ГК — 66 (0.48; 0.91) мкм² (рис. 3). По сравнению с показателем в группах "Тироксин", "Контроль" и "Тироксин + стресс" площадь ГК была больше в 1.5, 1.7 и 2 раза соответственно (p < 0.05, p < < 0.025 и p < 0.025).

По отношению к группе "Тироксин + перелом" число крыс в группе "Тироксин + перелом + стресс" с количеством ПНС-ткани в 2 балла было на 30% больше, отсутствие ПНС-ткани не регистрировали ни в одном препарате. На гистологических срезах появились островки ХТ с количеством в 1 балл (50%), а с количеством в 2 и в 3 балла они встречались реже на 10 и 40% соответственно. Островки незрелой КТ в области перелома не обнаружили у 20% животных и ни на одном препарате не визуализировали их количество в 3 балла. Площадь ГК была меньше в 1.4 раза (p < 0.05).

По сравнению с группой "Перелом + стресс" скорость репаративной регенерации нижней челюсти в группе "Тироксин + перелом + стресс" была выше: в области костной раны доля крыс с количеством ПНС-ткани в 1 балл была на 40% больше, отсутствовали препараты с количеством ПНС-ткани и островков ХТ в 3 балла. Количество островков ХТ в 1 балл было меньше на 30%, в 2 балла, напротив, больше на 20%. Было обнаружены срезы с количеством островков ХТ в 3 балла (у 20% животных). Число островков незрелой КТ в области дефекта в 1 балл было больше на 20%, появилось 20% животных, в регенерате которых островки незрелой КТ со-

ставляли 2 балла, а количество крыс с их отсутствием на гистопрепаратах уменьшилось на 40%. Число коллагеновых волокон было ниже на 12% (p < 0.01), площадь ΓK меньше в 1.4 раза (p < 0.05).

Следовательно, тироксин в малых дозах минимизирует негативное воздействие стресса на процесс постфрактурной регенерации нижней челюсти и стимулирует интенсивность процесса восстановления костной раны. Вследствие этого процесс доходит до начала 3-ей стадии остеорегенерации в отличие от эутиреоидных животных с экспериментальным переломом мандибулярной кости, подвергнутых стрессу, у которых он достиг только второй.

В целом, результаты проведенного нами гистологического исследования свидетельствуют о том, что стресс снижает скорость образования тканевого регенерата крыс в области травматического повреждения нижнечелюстной кости и препятствует завершению 2-ой стадии образования костной мозоли. Экспериментальный гипотиреоз per se приводит к сужению просвета Гаверсовых каналов и нарушению трофики костной ткани и интенсифицирует этот процесс при стрессе, а также замедляет постфрактурную репаративную регенерацию. Вследствие этого при сочетанном воздействии гипотиреоза и стресса образование костной мозоли тормозится уже на 1-ой стадии процесса. Введение близких к физиологическим доз тироксина способствует восстановлению травматического дефекта нижней челюсти и ограничивает негативное воздействие стресса на протекание гистологических стадий репаративной реакции.

Полученные результаты доказывают, что реализация фаз восстановления котной ткани в области повреждения, изолированного и комбинированного со стрессом, зависит от тиреоидного статуса — замедляется при гипофункции щитовидной железы и, напротив, интенсифицируется при введении тироксина в дозах, близким к физиологическим. Наши морфологические данные подтверждают высказанное нами предположение об участии ЙТГ в процессе постфрактурной остеорегенерации, в том числе в условиях стресса, обусловленном стимуляцией стресс-лимитирующих механизмов и фундаментальным воздействием ЙТГ на клеточный геном (Bianco et al., 2019). В реализации обсуждаемого эффекта, возможно, имеет значение и негеномное действие ЙТГ, заключающееся в повышении проницаемости клеточных мембран и стимуляции энергетических процессов в митохондриях (Cavrol et al., 2019), что создает условия для создания и эффективного использования ресурсов материнского запаса для формирования костного регенерата.

Результаты работы представляют интерес не только фундаментальный интерес для науке о человеке, но и для практической медицины в связи с широкой распространенностью патологии щитовидной железы (https://www.endocrincentr.ru/news/25-maya-vsemirnyy-den-shchitovidnoy-zhelezy) и серьезностью ее последствий для всех систем организма, в том числе для костной.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках бюджетной темы Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и (или) институциональные принципы ухода и использования животных в эксперименте были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аверьянов С.В., Галиева Э.И., Рябых Л.А., Мингазева А.З. 2019. Травмы челюстно-лицевой области. Уфа: ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. (Averyanov S.V., Galieva E.I., Ryabykh L.A., Mingazeva A.Z. 2019. Travmy chelyustno-licevoj oblasti. Ufa: FGBU VO BDMU MinZdrava Rossii. (Russ.))
- *Автандилов Г.Г.* 1990. Медицинская морфометрия. М.: Медицина. (*Avtandilov G.G.* 1990. Medical morphometry. M.: Medicina. (Russ.).

- Бондаренко С.Н., Манухина Е.Б. 1999. Влияние различных методик стрессирования и адаптации на поведенческие и соматические показатели у крыс. Бюл. экспер. биол. мед. Т. 128. № 8. С. 157. (Bondarenko S.N., Manukhina E.B. 1999. The influence of various methods of stress and adaptation on behavioral and somatic indicators in rats. Bull. Exp. Biol. Med. (Russ.) V. 128. № 8. P. 157.)
- Волотовский А.И., Макаревич Е.Р., Чирак В.Э. 2010. Регенерация костной ткани в норме и при патологии. Минск: БГ-МУ. (Volotovsky A.I., Makarevich E.R., Chirak V.E. 2010. Regeneraciya kostnoj tkani v norme i pri patologii. Minsk: BGMU.)
- Городецкая И.В., Гусакова Е.А. 2021. Влияние малых доз Lтироксина на устойчивость к стрессу животных с экспериметально вызванным дефицитом симпатических нервных влияний. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 107. № 3. С. 352. (Gorodetskaya I.V., Gusakova E.A. 2021. The effect of low doses of L-thyroxine on the resistance to stress of animals with experimentally induced deficiency of sympathetic nervous influences. J. Evol. Biochem. Physiol (Russ.). V. 107. № 3. P. 352.)
- Ефимов Ю.В., Стоматов Д.В., Ефимова Е.Ю. Долгова И.В., Стоматов А.В. 2019. Лечение больных с односторонним косым переломом нижней челюсти. Мед. вестн. Северного Кавказа. Т. 14. № 1.1. С. 94. (Efimov Y.V., Stomatov D.V., Efimova E.Y. Dolgova I.V., Stomatov A.V. 2019. Lechenie bol'nyh s odnostoronnim kosym perelomom nizhnej chelyusti. Med. Vestnik Severnogo Kavkaza (Russ). V. 14. № 1.1. P. 94.)
- Желнин Е.В. 2015. Динамика активности кислой и щелочной фосфатаз в ротовой жидкости при амбулаторных хирургических вмешательствах по поводу одонтогенных воспалительных заболеваниях челюсти и затрудненном прорезывании зубов мудрости. Усп. совр. естествознания. № 1—4. С. 561. (Zhelnin E.V. 2015. Dinamika aktivnosti kisloj i shchelochnoj fosfataz v rotovoj zhidkosti pri ambulatornyh hirurgicheskih vmeshatel'stvah po povodu odontogennyh vospalitel'nyh zabolevaniyah chelyusti i zatrudnennom prorezyvanii zubov mudrosti. Uspekhi Sovremennogo Estestvoznaniya. № 1—4. P. 561.)
- Здор В.В., Маркелова Е.В., Гельцер Б.И. 2016. Новые участники нарушения толерантности к антигенам щитовидной железы: к концепции иммунопатогенеза аутоиммунных заболеваний щитовидной железы. Мед. иммунол. Т. 18. № 3. С. 209. (Zdor V.V., Markelova E.V., Geltser B.I. 2016. New participants in thyroid antigen tolerance disorders: towards the concept of immunopathogenesis of autoimmune thyroid diseases. Med. Immunol. (Russ.) V. 18. № 3. Р. 209.)
- Иванов Д.Г., Александровская Н.В. 2018. Влияние социальной изоляции на стрессоустойчивость и резорбцию костной ткани крыс при термическом стрессе. Биомедицина. № 1. С. 71. (Ivanov D.G., Alexandrovskaya N.V. 2018. The effect of social isolation on stress resistance and bone resorption in rats under thermal stress. Biomed. (Russ.) № 1. P. 71.)
- Кадыков В.А., Морозов А.М. 2020. Хирургия повреждений. М.: Юрайт. (Kadykov V.A., Morozov A.M. 2020. Surgery of injuries (Russ.). Moscow: Yurayt.)
- Маянская Н.Н., Рымарь С.С., Маянская С.Д. 2013. Особенности течения воспалительного процесса у крыс с экспериментальным гипо- и гипертиреозом. Казан. мед. журн. Т. 94. № 5. С. 726. (Mayanskaya N.N., Rymar S.S.,

- *Mayanskaya S.D.* 2013. Features of the course of the inflammatory process in rats with experimental hypo and hyperthyroidism. Kazan Med. J. (Russ.) V. 94. № 5. P. 726.)
- Храмова Н.В., Тураханов С.В., Махмудов А.А., Рахимов М.М. 2020. Тактика лечения больных с переломами лицевых костей. Мед. новости. № 11. С. 58. (Khramova N.V., Turakhanov S.V., Makhmudov А.А., Rakhimov М.М. 2020. Taktika lecheniya bol'nyh s perelomami licevyh kostej. Med. Novosti. (Russ.). № 11. Р. 58.)
- Черных Т.М., Волынкина А.П., Горшков И.П., Захарченко А.В. 2016. Нарушение метаболизма костной ткани у пациентов с нарушениями функции щитовидной железы. Остеопороз и остеопатия. Т. 19. № 2. С. 59. (Chernykh T.M., Volynkina A.P., Gorshkov I.P., Zakharchenko A.V. 2016. Narushenie metabolizma kostnoj tkani u pacientov s narusheniyami funkcii shchitovidnoj zhelezy. Osteoporoz i Osteopatiya (Russ.) V. 19. № 2. P. 59.)
- Ярмолинская М.И., Молотков А.С., Денисова В.М. 2012. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия. Журн. акуш. и женск. бол. Т. 59. Вып. 1. С. 113. (Yarmolinskaya M.I., Molotkov A.S., Denisova V.M. 2012. Matrix metalloproteinases

- and inhibitors: classification, mechanism of action. Zhurnal Akusherstva i Zhenskikh Bolezney. V. 59. Iss. 1. P. 113.)
- Bianco A.C., Dumitrescu A., Gereben B., Ribeiro M.O., Fonseca T.L., Fernandes G.W., Bocco B.M.L.C. 2019. Paradigms of dynamic control of thyroid hormone signaling. Endocr. Rev. V. 40 № 4. P. 1000.
- Cayrol F., Sterle H.A., Flaqué M.C.D., Arcos M.L.B., Cremaschi G.A. 2019. Non-genomic actions of thyroid hormones regulate the growth and angiogenesis of T cell lymphomas. Front. Endocrinol. V. 10. P. 63.
- Degertekin C.K., Iyidir O.T., Yılmaz B.A., Elbeg S., Pasaoglu O.T., Pasaoglu H., Cakır N., Arslan M. 2016. RANKL/Osteoprotegerin system and bone turnover in Hashimoto thyroiditis. Calcif. Tissue Int. V. 99. P. 365.
- Fasanya H.O., Siemann D.W. 2021. The role of cathepsins in the growth of primary and secondary neoplasia in the bone. Osteol. V. 1. P. 3.
- Wright H.L, McCarthy H.S., Middleton J., Marshall M.J. 2009. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. Curr. Rev. Musculoskelet. Med. V. 2. P. 56.

Influence of the Thyroid Status on the Structure and Process of Restoration of the Rat's Lower Jaw Traumatic Damage Area under Stress

I. V. Gorodetskaya^a and T. N. Markevich^{a, *}

^a Department of Normal Physiology of Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, 210009 Belarus *e-mail: tanva.markevich86@mail.ru

The role of iodine-containing thyroid hormones in the process of postfracture repair of bone tissue under stress conditions was studied on 130 white outbred male rats. It has been shown that stress (free swimming in the cage) worsens the process of restoration of the fracture area of the lower jaw (holes with a diameter of 2.0 mm), in particular, on the 14th day, the number of islets of cartilaginous and immature bone tissue decreases against the background of an increase in the number of dense loose connective tissue, collagen fibers and the area of the Havers canals. All this indicates inhibition of the phases of the reparative response in the area of damage. All this indicates inhibition of the phases of the reparative response in the area of damage. Experimental hypothyroidism (25 mg/kg of mercazolil intragastrically for 20 days) negatively affects the trophism of the bone tissue itself and slows down the healing of the bone defect. L-thyroxine, on the other hand, in doses close to physiological (1.5–3.0 μ g/kg intragastrically for 28 days) intensifies this process both after an isolated traumatic injury of the mandibular bone and after its combination with stress. In general, the results obtained reveal a new aspect of the anti-stress effect of iodine-containing thyroid hormones — their participation in post-fractural osteoregeneration under stress. The mechanisms of the obtained effect, which may be associated with the genomic and non-genomic action of iodine-containing thyroid hormones, are discussed.

Keywords: iodine-containing thyroid hormones, stress, fracture of the lower jaw

УЛК 57.085.23

УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ И БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ СОЛОДКИ *GLYCYRRHIZA GLABRA* L.

© 2021 г. А. Н. Акулов^{1, *}, Ю. А. Костюкова¹

¹Казанский институт биохимии и биофизики Федерального исследовательского центра Казанского научного центра Российской академии наук, Казань, 420111 Россия

> *E-mail: akulov_anton@mail.ru Поступила в редакцию 01.08.2021 г. После доработки 15.08.2021 г. Принята к публикации 17.08.2021 г.

Подобраны условия индукции и периодического культивирования каллусной культуры из корневых эксплантов солодки $Glycyrrhiza\ glabra\ L$. Основным отличием подобранной среды от уже описанных в литературе являлось применение смеси фитогормонов — кислот индолилуксусной (ИУК, 1.5 мг/л) и нафтилуксусной (НУК, 1.5 мг/л), а также кинетина (1 мг/л). Полученный каллус сложно организован и обладает способностью к синтезу вторичных соединений. Сферообразные клеточные комплексы, составляющие каллус, рассматриваются как ксилемные нодулы. Гистохимическое изучение локализации флавонолов и терпенов позволило выявить клетки каллуса и клеточные органеллы локализации вторичных метаболитов. Содержание в каллусе (на 1 г сухого веса) к завершению пассирования составляло: глицирризиновой кислоты — 74.65 мг/г, фенольных соединений — 19.65 \pm 0.8 мг/, флавонолов — 3.46 \pm 0.07 мг/г. Полученная каллусная культура $Glycyrrhiza\ glabra\ L$. может найти применение для получения ценных биологически активных веществ.

Ключевые слова: солодка голая *Glycyrrhiza glabra*, каллусная культура, глицирризиновая кислота, фенольные соединения, флавонолы, DPBA, NADI

DOI: 10.31857/S004137712106002X

Солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L.) — ценное растение, находящее применение в медицине, пищевой промышленности, косметике. Экстракты растений обладают противовоспалительными, анальгезирующими, жаропонижающими, иммуностимулирующими, противовирусными свойствами (Толстиков и др., 2007; Бычкова и др., 2011). В качестве исходного сырья для производства как фармакологической, так и пищевой продукции используют корни 4—6-летних растений солодки (Шретер, 1972; Шретер и др, 2004). Основными ценными биологически активными вторичными метаболитами солодки голой являются фенольные соединения и глицирризиновая кислота.

Содержание глицирризиновой кислоты в растениях носит сезонный характер и зависит от почв и условий произрастания (Яницкая, 2015), что вносит определенные сложности в получение достаточного количества однородного качественного сырья. Наряду с традиционным источником сырья, альтернативным источником может быть культура клеток, позволяющая получать растительное сырье в доста-

Принятые сокращения: БАВ — биологически активное вещество; 6-БАП — 6-бензиламинопурин; 2,4-Д — 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; ИУК — индолилуксусная кислота; НУК — нафтилуксусная кислота; ЭВ — экстраклеточные выделения.

точных количествах в короткие, по сравнению с выращиванием в естественных условиях, сроки, а также в экологически безопасных условиях.

В настоящее время разработаны методы микроклонального размножения *Glycyrrhiza glabra* L. верхушечными меристемами и почками боковых корней (Badkhane et al., 2014; Pandey, Ayangla, 2018). Описана методика получения эмбриогенного каллуса из гипокотильных эксплантов *G. glabra* L. (Fu et al., 2010). Подобраны условия для индукции и поддержания каллусных и суспензионных культур, обладающих синтезом фенольных соединений (Hayashi et al., 1988).

В 70-е гг. годы прошлого века были опубликованы противоречивые сведения о синтезе глицирризиновой кислоты в каллусных культурах *G. glabra* L. В более поздней работе Хаяши (Науаshi, 1988) в каллусной культуре и суспензионной культуре *G. glabra* L. была обнаружена лишь бетулиновая кислота, глицирризиновая кислота не синтезировалась. По мнению исследователей, синтез глицирризиновой кислоты в условиях *in vitro* может происходить в клеточных культурах *G. glabra* L., имеющих какую-либо дифференцировку. В условиях *in vitro*, дифференциация — формирование тканей и органов — регулируется экзогенными фитогормонами и условиями культивирования (Halder, Jha, 2020).

Несмотря на многочисленные опубликованные работы по клеточным культурам различных видов солодки (Pandey, Ayangla, 2018), детальные гистологические исследования каллусных культур этого растения не известны.

Цель нашей работы заключалась в получении длительно пассируемой и способной к синтезу вторичных соединений каллусной культуры солодки голой. Задачами исследования являлись подбор оптимального состава питательной среды для индукции и поддержания каллуса, морфологический и гистологический анализ полученной культуры, а также оценка содержания в ней вторичных соединений. Полученные результаты могут служить основой для дальнейших исследований по подбору условий культивирования каллусов солодки с целью получения продуцентов биологически активных соединений.

МАТЕРИАЛ МЕТОДИКА

Объект исследования. Для индукции каллусогенеза использовали корневые экспланты корней асептически выращиваемых растений солодки голой Glycyrrhiza glabra L. в возрасте 30 сут с хорошо развитой корневой системой. Растения выращивали из семян солодки голой, полученных из питомника редких и лекарственных растений Г.А. Анисимова (Томск, Россия). Семена стерилизовали в 10%-ном растворе гипохлорита натрия и переносили на агаризованную среду MS (Murashige, Skoog, 1962) без фитогормонов. Появившиеся проростки, а затем и растения выращивали на агаризованной среде MS (Murashige, Skoog, 1962) без фитогормонов (фотопериод: 16 ч день, 8 ч ночь; температура 24–25°С). Для получения и поддержания культуры клеток применяли разные питательные среды на основе среды MS (Murashige, Skoog, 1962). Описание использованных сред дано ниже в разделе "Результаты". Величину рН всех питательных сред доводили до 5.5-5.6, используя 1 н соляную кислоту. Среды автоклавировали в течение 1 ч при давлении 0.8 атм. Полученная и используемая в работе каллусная культура поддерживается нами на подобранной питательной среде при регулярных пересадках уже в течение 2 лет.

Гистологическая характеристика каллусных культур. Материал фиксировали в 2.5%-ном глутаровом альдегиде (Fluca, Швейцария), приготовленном на 0.1 М фосфатном буферном растворе (рН 7.3). Образцы промывали 0.1 М фосфатным буфером в течение 1 ч. Постфиксацию образцов осуществляли в течение 3 ч в 1%-ном растворе OsO_4 (Alfa Aesar, США), приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.3), содержащем сахарозу (25 мг/мл). Объекты обезвоживали в спиртах с постепенным возрастанием их концентрации, ацетоне и пропилене (Acros, США). Далее объекты заключали в эпоксидную смолу Ероп 812 (Sigma-Aldrich, Германия). Полутонкие срезы толщиной 3 мкм изготавливали на ультрамикротоме UltracutE (Reichert-Jung, Австрия) и окрашивали 0.5%-ным раствором толуидинового синего (Serva, Германия) в 0.1%-ном растворе Na_2CO_3 (ОТК Экос-1, Россия) (рН 11.1) с нагреванием при 60°С на предметном столике Slides Warmer XH-2002 (CfA and Scientific Co., Inc, США) в течение 1—6 мин (Trump et al., 1961). Срезы изучали с помощью микроскопа Jenamed (Carl Zeiss, Германия), изображения получали с помощью цифровой камеры AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия).

Определение содержания глицирризиновой кислоты. Определение проводили согласно методике фармакопеи РФ для корней солодки (Государственная фармакопея РФ. 2018: ФС 2.5.0040.15: http://femb.ru/ femb/pharmacopea.php). Для этого 0.05 г предварительно растертой сухой каллусной ткани помещали в плотно закрывающуюся пластиковую пробирку и заливали 0.5 мл 3%-ного раствора азотной кислоты в ацетоне (ОТК Экос-1, Россия). Инкубировали 10 мин в ультразвуковой ванне при 20°C. Оставляли на 50 мин при интенсивном встряхивании. Центрифугировали 5 мин при 12000 g. Супернатант отбирали, а осадок заливали 0.75 мл ацетона и помещали на водяную баню при 60°C на 5 мин. Охлаждали и центрифугировали 5 мин при 12000 g. Супернатант отделяли, а осадок заливали 0.25 мл ацетона и встряхивали. Центрифугировали 5 мин при 12000 g и отбирали супернатант. Все супернатанты объединяли и доводили ацетоном до 5 мл. К полученному экстракту по каплям добавляли 10%-ный водный раствор аммиака до образования желтого творожистого осадка. При этом контролировали уровень рН с помощью индикаторной бумаги. Титровали до рН 8.5. Осадок собирали центрифугированием в течение 10 мин при 3000 д. Супернатант сливали, а осадок заливали 1 мл дистиллированной воды (V_1) . Из этого раствора отбирали 0.5 мл (V_2) и добавляли 4.5 мл дистиллированной воды (V₃). Получали кривую поглощения в диапазоне длин волн от 200 до 500 нм, используя спектрофотометр Lambda 25 (Perkin Elmer, США). Измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 258 нм и толщине слоя 1 см. Содержание глицирризиновой кислоты Q (мг на 1 г сухого веса) определяли по формуле: $Q = (D \cdot V_1 \cdot V_3)/(V_2 \cdot M \times 10^6)$ где, D - оптическая плотность, M - масса навески.

Определение суммы растворимых фенольных соединений. Клеточную массу отделяли от среды культивирования, лиофильно высушивали и растирали в порошок. К навеске 25 мг добавляли 500 мкл 80%ного метанола и инкубировали на водяной бане при температуре 80°C в течение 30 мин. Полученный экстракт центрифугировали при 12000 д в течение 10 мин. Определение содержания растворимых фенольных соединений проводили по методу Фолина-Чокальтеу в модификации Синглетона-Росси (Singleton, Rossi, 1965). К 0.1 мл спиртового экстракта фенольных соединений добавляли 0.5 мл реактива Фолина-Чокальтеу (Folin-Ciocalteu; PanReac Appli-Chem, Германия), через 3 мин приливали 0.4 мл водного раствора Na_2CO_3 (75 г/л) (ОТК Экос-1, Россия). В контрольные пробирки вместо экстракта вносили

0.1 мл 80%-ного метанола. Пробирки с реакционной смесью хорошо встряхивали и оставляли на 2 ч в темноте. Измерение оптической плотности проводили в микрокюветах на спектрофотометре при длине волны 765 нм. Содержание фенольных соединений в экстракте определяли с помощью калибровочной кривой, построенной по галловой кислоте. Содержание фенольных соединений выражали в мгэкв галловой кислоты (Acros Organics, США) на 1 г сухого веса. Для расчета общего содержания в образце внутриклеточных фенольных соединений (ФС, мг-экв галловой кислоты на 1 г сухого веса) использовали формулу: $\Phi C = (CV_{\text{экстракта}})/(M \times 1000)$, где C – концентрация фенольных соединений, полученная по калибровочной кривой на основе оптической плотности образцов; $V_{\text{экстракта}}$ — общий объем экстракта, мл; M — масса навески, г; 1000 — коэффициент перевода л в мл (объема экстракта).

Определение содержания флавоноидов. Для определения суммарного содержания флавоноидов к 150 мкл спиртового экстракта фенольных соединений добавляли 450 мкл 80%-ного этанола и 30 мкл 5%-ного раствора AlCl₃ (Компонент-Реактив, Россия) в 2%-ном спиртовом растворе уксусной кислоты (ОТК Экос-1, Россия). Перемешивали и оставляли на 30 мин. Затем измеряли оптическую плотность раствора при 425 нм, используя спектрофотометр Lambda 25 (Perkin Elmer, США). Калибровочную кривую строили по известным концентрациям кверцетина (Alfa Aesar, США).

Гистохимическое выявление терпенов. Для определения терпенов в каллусной культуре готовили свежие срезы каллусной ткани толщиной 25 мкм на микротоме с вибрирующим лезвием VT1000 S (Leica, Германия). Срезы окрашивали реактивом NADI, состоящим из 0.5 мл 1%-ного раствора нафтола (ОТК Экос-1, Россия), приготовленного в 40%-ом этиловом спирте, 0.5 мл 1%-ного водного раствора N,Nдиметил-п-фенилендиамина солянокислого (ОТК Экос-1, Россия) и 49 мл 0.05 М фосфатного буфера (pH 7.2) (Pasqua et al., 2002). Срезы помещали в реактив на 1 ч при комнатной температуре. Окрашенные срезы отмывали 0.1 М фосфатным буфером (рН 7.2). Согласно данным литературы, реактивом NADI терпены окрашиваются в фиолетовый цвет (Pasqua et al., 2002), а эфирные масла — в голубой (Machado et al., 2006). Срезы изучали с помощью микроскопа Jenamed (Carl Zeiss, Германия), фотографировали цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия).

Гистохимическое выявление крахмала. Присутствие крахмала в клетках каллуса определяли с помощью реактива Люголя (раствор йода в йодиде калия по методу Грама): навеску 2 г йодистого калия (Компонент-Реактив, Россия) растворяли при нагревании в 5 мл дистиллированной воды, добавляли 1 г кристаллического йода и доводили объем раствора до 300 мл (Барыкина и др., 2004). На давленые препараты каллусной ткани наносили раствор Люголя на 5 мин. Крахмал окрашивался в черный цвет. Препараты изучали с помощью микроскопа Jenamed

(Carl Zeiss, Германия), фотографировали цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия).

Гистохимическое выявление флавонолов. Локализацию флавонолов определяли прижизненно на срезах каллусной ткани приготовленных с помощью микротома с вибрирующем лезвием VT1000 S (Leica, Германия). Срезы окрашивали 0.25%-ным раствором красителя DPBA (Sigma-Aldrich, Германия) в 25%-ном растворе этанола (Peer et al., 2001). Окрашенные срезы просматривали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 510 МЕТА (Carl Zeiss, Германия) с помощью аргонового лазера в диапазонах длин волн возбуждения и эмиссии 530—615 и 503—600 нм соответственно.

Статистическая обработка данных. Каждый эксперимент проводили в трех биологических повторностях. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета статистического анализа программы Microsoft Office Excel 2007. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего при доверительной вероятности 95%.

Реактивы. Использовали: азотную кислоту (ОТК Экос-1, Россия), ацетон (ОТК Экос-1, Россия), AlCl₃ (Компонент-Реактив, Россия), галловую кислоту (Асгоѕ Organics, США), глутаровый альдегид (Fluca, Швейцария), йодистый калий (Компонент-Реактив, Россия), кверцетин (Alfa Aesar, США), нафтол (ОТК Экос-1, Россия), Na₂CO₃ (ОТК Экос-1, Россия), OsO₄ (Alfa Aesar, США), N,N-диметил-п-фенилендиамин солянокислый (ОТК Экос-1, Россия), пропилен (Асгоѕ, США), реактив Фолина-Чокальтеу (РапReac AppliChem, Германия), толуидиновый синий (Serva, Германия), уксусную кислоту (ОТК Экос-1, Россия), Ероп 812 (Sigma—Aldrich, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения каллусной культуры *G. glabra* L. были выбраны корневые экспланты выращиваемых в асептических условиях растений солодки голой. Индукцию каллусогенеза проводили на средах, в основе которых лежала среда MS с известным минеральным составом, в которую добавляли различные фитогормоны (табл. 1).

Корневые экспланты размером 5—7 мм помещали на питательные среды и культивировали в темноте, фиксируя образование и морфологию появляющегося каллуса. Появление каллуса на эксплантах было отмечено уже на 7-е сут. Каллусогенез удалось индуцировать только на средах, содержащих НУК (Н), ИУК (И) и кинетин (К) в следующем их соотношении (мг/л): 0.75 : 0.75 : 0.5 (среда H/И/K(0.75/0.75/0.5); табл. 2), а частота индукции была существенно выше на среде с соотношением гормонов НУК, ИУК и кинетина (мг/л) 1.5 : 1.5 : 1 (среда H/И/K(1.5/1.5/1)) и составляла 86.5% (табл. 2).

Первичный каллус представлял собой округлые клеточные образования светло-желтого или серого цветов на поверхности эксплантов или на месте сре-

Таблица 1. Состав сред культивирования каллусов *G. glabra* L.

Компоненты,	Содержание, мг/л в среде				
добавленные к среде MS	Б/И(0.5/2)	Д/Н/И/К(0.5/0.5/0.5/0.1)	Н/И/К(0.75/0.75/0.5)	Н/И/К(1.5/1.5/1)	
Мезоинозитол	100.0	100.0	100.0	100.0	
Тиамин (B_1)	2.0	2.0	2.0	2.0	
Пиридоксин (B_6)	1.0	1.0	1.0	1.0	
Никотиновая кислота (В3)	1.0	1.0	1.0	1.0	
2,4-дихлорфенокси-уксусная кислота (2,4-Д)	0	0.5	0	0	
Индолилуксусная кислота (ИУК)	0.5	0.5	0.75	1.5	
Нафтилуксусная кислота (НУК)	0	0.5	0.75	1.5	
6-бензиламинопурин (БАП)	2	0	0	0	
Кинетин	0	0.1	0.5	1	
Сахароза	25000.0	25000.0	25000.0	25000.0	
Агар-агар	7500.0	7500.0	7500.0	7500.0	

Примечание к табл. 1 и 2. В названии питательных сред буквы обозначают добавленные фитогормоны: Б-6-БАП; Д-2,4-Д; И- ИУК; H- HУК; K- кинетин; числа — содержание в мг/л, косая черта — соотношение.

зов. При дальнейшем культивировании были отобраны каллусы сферообразной морфологии, состоящие из белых или желтоватых популяций клеток. Последующее поддержание отобранной каллусной культуры проводили на среде H/И/K(1.5/1.5/1) переносом части клеточной культуры на свежую питательную среду каждые 30 сут.

Морфология и особенности роста каллусной культуры солодки голой. Полученный каллус G. glabra L. в течение пассажа изменял свой цвет и был представлен тремя популяциями клеток белого, желтого и коричневого оттенков (рис. 1), в дальнейшем называемых белый, желтый и коричневый каллусы. Белый и желтый каллусы были более рыхлые по структуре, чем коричневый (рис. 1a, δ). Для выяснения особенностей роста и строения каждого из трех каллусов были проведены эксперименты по их раздельному культивированию.

При высаживании на свежую питательную среду белого каллуса (рис. 1в) клетки интенсивно наращивали биомассу. Через 14 сут культивирования наблюдали изменение цвета каллуса на желтый, а через 30 сут на поверхности желтого каллуса формировались небольшие очаги коричневого каллуса (рис. 1г). Жел-

Таблица 2. Индукция каллусогенеза на эксплантах *G. glabra* L.

Среда	Частота образования каллуса, %	
Б/И(0.5/2)	H.o.	
Д/Н/И/К(0.5/0.5/0.5/0/1)	H.o.	
Н/И/К(0.75/0.75/0.5)	2.1 ± 0.32	
Н/И/К(0.5/0.5/1)	86.5 ± 1.84	

H.o. — не определяли.

тый каллус можно рассматривать как переходный вариант между белым и коричневым каллусами.

Отобранный в конце пассажа и высаженный на свежую питательную среду коричневый каллус медленно наращивал биомассу. На 7-е сут на части исходного коричневого каллуса формировались очаги белого каллуса (рис. 16), которые активно пролиферировали и к 30-тым сут начинали желтеть с формированием коричневых очагов. Отмечено, что каллус, сформированный на отдельно высаженном коричневом каллусе, отличался от каллуса, появившегося из отдельно высаженного белого каллуса, большей гетерогенностью (рис. 1e).

Биохимический анализ каллусной культуры солодки голой. Для биохимического анализа были взяты каллусы белого, желтого и коричневого цветов, сформированные на определенные сутки культивирования: на 7-е сут — белый каллус, на 14-е сут желтый каллус, на 35-е сут – коричневый каллус. Проведенный биохимический анализ каллуса солодки выявил наличие БАВ, характерных для корней этого растения. Среди них определены фенольные соединения, такие как флавоноиды, а также терпены, представленные глицирризиновой кислотой. При анализе отдельных каллусов было отмечено, что основная часть вторичных соединений находится в клетках коричневого каллуса. Содержание глицирризиновой кислоты на 1 г сухого веса составляло в белом каллусе 4.04, в желтом -3.04 и в коричневом – 74.65 мг/г. Содержание фенольных соединений составляло в белом каллусе 11.71, в желтом – 5.72 и в коричневом — 19.65 мг/г (табл. 3).

Гистологические особенности каллусной культуры. Для выяснения строения полученной каллусной культуры нами был проведен детальный гистологический анализ белого, желтого и коричневого каллусов. Белый каллус был представлен неплотно приле-

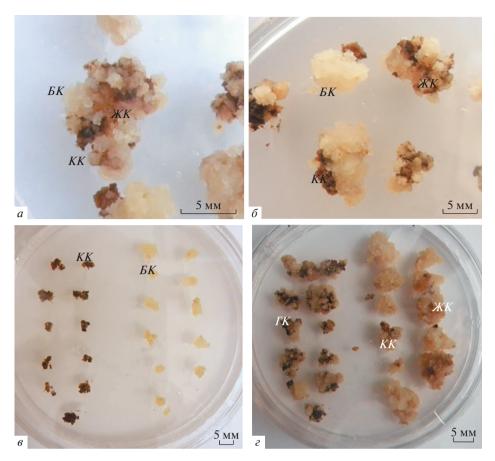


Рис. 1. Морфология каллусной культуры солодки G. glabra L. a — Гетерогенный каллус (ΓK) солодки состоит из популяций белых, желтых и коричневых клеток, которые в дальнейшем рассматривали как белый (E K), желтый (E K) и коричневый (E K) каллус. E K — Формирование E K из эксплантов E K и E K и E K на каллусогенной среде. E K — Формирование E K солодки из E K и E K на E

гающими друг к другу округлыми комплексами. Округлые комплексы были образованы клетками разных типов (рис. 2a, δ). Центр комплекса состоял из меристематических клеток, ближе к поверхности небольшими очагами были расположены прокамбиальные клетки, поверхность комплекса была покрыта клетками паренхимного типа (рис. 2a). В течение пассажа комплексы увеличивались в размере, происходила дифференцировка сосудов (рис. 2δ), возрастало количество паренхимных клеток в центральной части комплекса (рис. 2δ), сосуды дифференцировались не только в центре комплекса, но и в верхних клеточных слоях (рис. 2δ).

Клеточные комплексы, обнаруженные в белом каллусе, обладают клеточным строением, аналогичным ксилемным нодулам. Нодулы — это округлые клеточные структуры, имеющие какую-либо дифференцировку (Fortes et al., 2010). Нодулы, в которых происходит дифференцировка сосудов рассматриваются как ксилемные нодулы (Savona et al., 2011). Ксилемные нодулы описаны для растений родов *Populus* (McCown et al., 1988), *Taxus* (Ellis et al., 1996), *Cyclamen* (Savona et al., 2012), *Gyoscyamus* (Абделазиз и др., 2019). Формирование нодул белого каллуса со-

лодки происходило из клеток инициалей, обнаруженных в коричневом каллусе (рис. 2ε , ∂)

Желтый каллус имел глобулярную морфологию (рис. 3a). Так же, как и белый, желтый каллус состоял из нодул, но в отличие от белого, в желтом каллусе визуальноотмечалиувеличениеколичествапаренхимных клеток между нодулами (рис. 3a). На прижизненных неокрашенных срезах былообнаружено, чтоотдельные нодулы покрыты слоем экстраклеточных выделений (ЭВ) желтого цвета (рис. 3δ), поверхностные клетки паренхимного типа нодул имели утолщенные клеточные стенки, окрашенные в темно-желтый цвет (рис. 3δ , δ). В поверхностных клетках паренхимного типа многочисленны амилопласты (рис. 3ε , δ). Обработка поверхностных клеток реактивом Люголя формировала темно-коричневое окрашивание, характерное для крахмальных зерен (рис. 3δ).

На гистологических срезах желтого каллуса $\ni B$ представлены в виде тяжей (рис. $\exists \epsilon$). В вакуолях поверхностных клеток нодул желтого каллуса многочисленны включения желтого и зеленоватого цветов (рис. $\exists \epsilon$).

Нодулы в желтом каллусе были образованы клетками меристематического типа (рис. 3e), среди них

Каллус	Содержание, мг на 1 г сухого веса					
Калус	фенольные соединения	флавоноиды	глицирризиновая кислота			
Белый	11.71 ± 0.93	0.39 ± 0.05	4.04 ± 0.05			
Желтый	5.72 ± 0.13	0.21 ± 0.04	30.04 ± 0.35			
Коричневый	19.65 ± 0.82	3.46 ± 0.07	74.65 ± 1.53			

Таблица 3. Содержание вторичных соединений в каллусной культуре *G. glabra* L.

хорошо визуализировались слои прокамбиальных клеток (рис. 3e, ж). Дифференцировка сосудов была отмечена как в центре, так и в верхних слоях клеток нодулы (рис. 36, ж). В редких случаях на срезах нодулы в верхних слоях клеток наблюдали дифференцировку элементов флоэмы (рис. 33).

Коричневый каллус имел глобулярную морфологию и состоял из плотно прилегающих многочисленных нодул. Нодулы были покрыты густым слоем ЭВ (рис. 46). На поверхности нодулы присутствовали многочисленные погибающие клетки паренхимного типа с крупными крахмальными зернами в амилопластах, покрытые ЭВ (рис. 46, ϵ). Формирование экстраклеточных выделений, вероятно, связано с разрывом тонопласта и выделением содержимого вакуолей во внеклеточное пространство (рис. 4ϵ). Нодулы образованы клетками меристематического типа, прокамбиальными клетками и сосудами (рис. 4d).

Гистохимическое изучение локализации терпенов в каллусе солодки. Локализацию фенольных соединений изучали с помощью реактива NADI в белом, желтом и коричневом каллусах солодки. Гистохимическое окрашивание свежеприготовленных срезов каллусов показало, что в белом каллусе коньюгаты реактива и терпенов, формирующие фиолетовые капли в цитоплазме клеток редки (рис. 5a, δ). Кроме фиолетовых капель в цитоплазме были обнаружены более мелкие капли голубого цвета, которые могут свидетельствовать о присутствии эфирных масел в каллусных клетках солодки (рис. 5δ) (Machado et al., 2006).

В желтом каллусе интенсивность окрашивания реактивом клеточных включений значительно увеличивалась (рис. 5e, ϵ). Насыщенность окраски цитоплазматических включений возрастала в клетках, расположенных около сосудов (рис. 5e, ϵ). В клетках желтого каллуса были обнаружены многочисленные капли фиолетового цвета различного размера (рис. 5d), тогда как в клетках сосудов терпены отсутствовали (рис. 5d). В некоторых клетках желтого каллуса наблюдали окрашивание цитоплазмы, обусловленное, возможно, разрушением целостности клеток при приготовлении срезов (рис. 5e, d).

В коричневом каллусе фиолетовое окрашивание наблюдали в клетках паренхимного типа, находящихся по периметру нодул (рис. 5e, ∞). Наибольшая интенсивность окрашивания была отмечена в клеточных стенках (рис. 5∞). В клетках, составляющих центральную часть нодулы, накопление терпенов было выявлено в цитоплазме клеток в виде отдельных капель фиолетового и голубого цветов (рис. 5∞).

Гистохимическое изучение локализации фенольных соединений в каллусах солодки. Краситель DPBA находит применение для визуализации флавонолов в тканях растений (Ogo et al., 2015). Благодаря различным спектральным свойствам коньюгатов флавонолов с реактивом DPBA можно визуально определить место аккумуляции отдельных флавонолов. Конъюгаты кверцетина с DPBA обладают более длинноволновой эмиссией и имеют желтую флуоресценцию, тогда как коньюгаты кемпферола с DPBA обладают желтой-зеленой флуоресценцией (Saslowsky et al., 2001; Lewis et al., 2011).

В белом каллусе желтое свечение флавонолов было обнаружено в клеточных стенках клеток паренхимного типа, клеточных стенках сосудов и ядрах (рис. 66, ϵ). В желтом каллусе локализацию флавонолов наблюдали в цитоплазме и клеточных стенках отдельных клеток паренхимного типа, в ядрах, клеточных стенках сосудов (рис. 63). В коричневом каллусе флавоноиды накапливались в клеточных стенках поверхностных клеток, расположенных в верхних слоях нодул, ядрах клеток, клеточных стенках сосудов (рис. 6κ , m).

ОБСУЖДЕНИЕ

Характерная особенность растительной клетки тотипотентность и высокая пластичность (Fehér, 2019). Одним из следствий пластичности является способность растений продуцировать каллус, массу недифференцированных клеток, способных проявить биосинтетическую тотипотентность и синтезировать вторичные метаболиты, идентичные исходному растению (Colin, 2001; Matsuura et al., 2018). Клетка растений потенциально способна продуцировать весь спектр соединений, синтезирующихся в родительском организме (Colin, 2001). Правильно подобранные компоненты среды культивирования позволяют создать оптимальные условия для поддержания роста, и способствовать дифференцировке специализированных структур необходимых для синтеза вторичных метаболитов.

Согласно данным литературы, микро и макроэлементы, входящие в среду Мурасиге—Скуга (Murashige, Skoog, 1962) наиболее оптимальны для индукции и поддержания каллусных культур солодки голой (Khan et al., 2016), а в качестве гормонов предпочтительны НУК в сочетании с 6-БАП (Pandey, Ayangla, 2018).

Необходимо отметить, что для клеточных культур солодки в большинстве случаев используют фитогормон 6-БАП в сочетании с ауксинами (Pandey, Ayan-

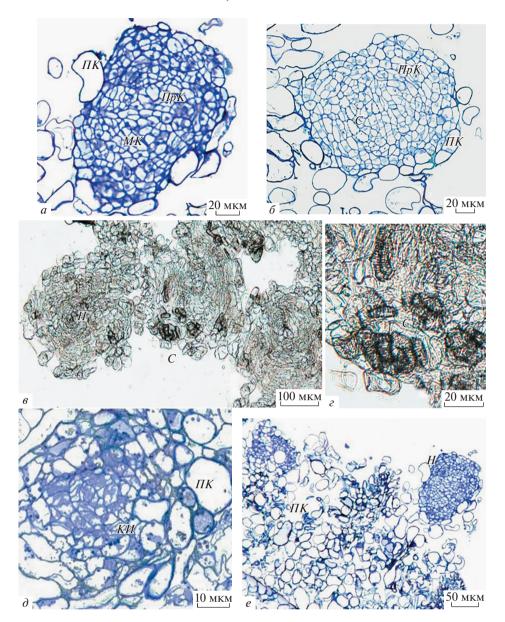
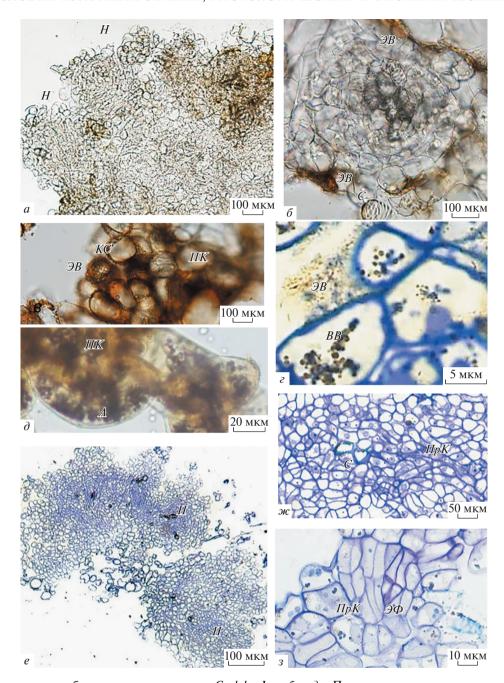


Рис. 2. Гистологические особенности белого каллуса G. glabra L. a, b — На постоянных препаратах, окрашенных толуидиновым синим, белый каллус состоит из округлых структур — нодул (H); центр H образован меристематическими клетками (MK), в верхних слоях клеток визуализируются прокамбиальные клетки (ΠpK), поверхность H покрыта клетками паренхимного типа (ΠK). b — В более зрелых H происходит дифференцировка сосудов (C). b, c — Прижизненные неокрашенные срезы: в течение пассажа H увеличиваются в размере, происходит дифференцировка многочисленных C. b, c — Постоянные препараты, окрашенные толуидиновым синим: b — формирование b происходит из клеток инициалей (b0), обнаруженных в коричневом каллусе, b0 — гистологический срез каллуса с формированными b1.

gla, 2018). Основными отличиям подобранной нами среды, от уже описанных ранее, являлось использование кинетина (6-фурфруриламинопурина), и применение смеси фитогормонов ИУК (1.5 мг/л), НУК (1.5 мг/л) и кинетина (1 мг/л). Известно, что тип и концентрация ауксина и цитокинина, их соотношение в среде культивирования оказывают значительное влияние на рост клеточной культуры и синтез вторичных метаболитов. Например, цитокинины могут оказывать влияние на синтез вторичных метаболитов, в том числе на синтез фенольных соедине-

ний. Так, на среде культивирования, содержащей кинетин и 2,4-Д в среде MS, клеточная культура *Citrullus colocynthi* синтезировала больше фенолов и флавонолов, чем на среде MS, содержащей НУК и 6-БАП (El-Baz et al., 2010). Было показано, что кинетин может стимулировать синтез антоцианов в клеточной культуре *Haplopappus gracilus*, но ингибировать синтез антоцианов в культуре клеток тополя (Seitz, Hinderer, 1988).

Подобранная среда для индукции каллусной культуры из корневых эксплантов солодки голой и



последующая селекция позволили получить каллус, способный к синтезу как флавоноидов, так и терпенов. В клетках белого каллуса содержание фенольных соединений и глицирризиновой кислоты меньше по сравнению с клетками желтого и коричневого каллусов (табл. 3). Гистохимический анализ выявил, что в

белом каллусе терпены присутствуют лишь в единичных клетках паренхимного типа (рис. 5a, δ), а флавоноиды в клеточных стенках клеток и сосудов (рис. 6δ , ϵ). Незначительное содержание глицирризиновой кислоты и фенольных соединений в клетках нодул белого каллуса, состоящих в основном из

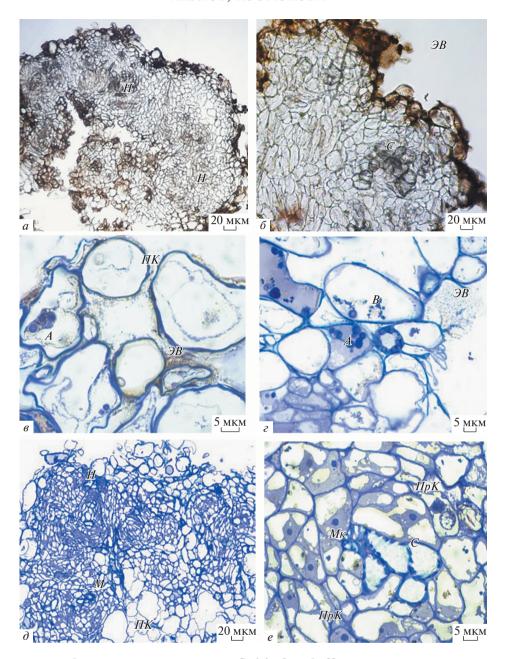


Рис. 4. Гистологические особенности коричневого каллуса G. glabra L. a, b — На прижизненных неокрашенных срезах многочисленные нодулы (H) плотно прилегают друг к другу; b — поверхность H покрыта густыми экстраклеточными выделениями ($\mathcal{B}B$) желтого цвета, в центральной части H визуализируются сосуды (C). b, c, d, e — Постоянные препараты, окрашенные толуидиновым синим: b — d покрыты погибающими клетками паренхимного типа (d) с крупными крахмальными зернами в амилопластах (d), на поверхности клеток визуализируются d0 желтого цвета; d0 — формирование d0 происходит в результате выделения содержимого вакуолей (d0) клеток после их гибели; d0 — на гистологических срезах в d0 визуализируются тяжи меристематических (d0) и d1 d1 клеток; d2 — d3 меристематических клеток (d1), прокамбиальных клеток (d1), наблюдается дифференцировка d2.

меристематических клеток согласуется с исследованиями, проведенными на корнях G. glabra L. в которых было показано, что флавоноиды и глицирризиновая кислота полностью отсутствовали в камбиальных слоях корней (Li et al., 2014).

Цитохимическое (рис. $56-\partial$, 6e, 3) и биохимическое (табл. 3) изучение желтого каллуса демонстрирует увеличение синтеза и накопления вторичных

метаболитов в этом каллусе. В клетках паренхимного типа желтого каллуса было отмечено значительное количество вакуолей, накапливающих терпены (рис. $56-\partial$). Окрашивание реактивом DPBA выявило интенсивное свечение клеточных стенок клеток паренхимного типа, составляющих каллус (рис. 6e, 3). Увеличение синтеза фенольных соединений и глицирризиновой кислоты в желтом каллусе может быть

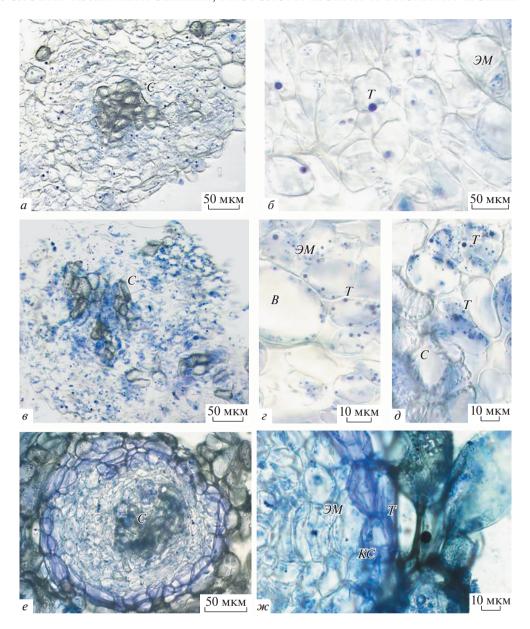


Рис. 5. Гистохимическая локализация терпенов в каллусной культуре солодки на прижизненных срезах G. glabra L. a, δ — На срезах белого каллуса фиолетовые капли конъюгата реактива NADI и терпенов (T) обнаружены в цитоплазме клеток, эфирные масла ($\mathcal{I}M$) представлены более мелкими каплями голубого цвета. s — Синтез и накопление T в желтом каллусе визуально значительно превышает накопление в белом каллусе. s — В цитоплазме клеток желтого каллуса обнаружены многочисленные капли фиолетового цвета различного размера. s — В некоторых клетках желтого каллуса наблюдали окрашивание цитоплазмы, обусловленное разрушением целостности клеток при приготовлении срезов, в сосудах не обнаружено s — В нодулах коричневого каллуса фиолетовое окрашивание (конъюгаты NADI и s) наблюдали в клетках, находящихся по периметру нодул. s — Наибольшая интенсивность окрашивания наблюдается в клеточных стенках клеток (s), в субповерхностных клет-ках нодул обнаружены капли s0, окрашенные в голубой цвет.

обусловлено дифференцировкой части клеток белого каллуса в клетки, способные к синтезу вторичных метаболитов.

Дифференцировка включает этапы, связанные с изменениями скорости и типа делений клеток, субклеточной организации, метаболизма и приобретением компетенции к синтезу вторичных соединений (Lindse, Yeoman 1983). Одним из признаков цито-

дифференцировки может служить значительный синтез крахмала в поверхностных клетках.

Характерной особенностью желтого каллуса является формирование густых ЭВ на поверхности нодул. Формирование ЭВ, возможно, происходит в результате гибели поверхностных паренхимных клеток и выделения вакуолярного содержимого в межклеточное пространство и на поверхность каллуса. Из литературных источников известно, что

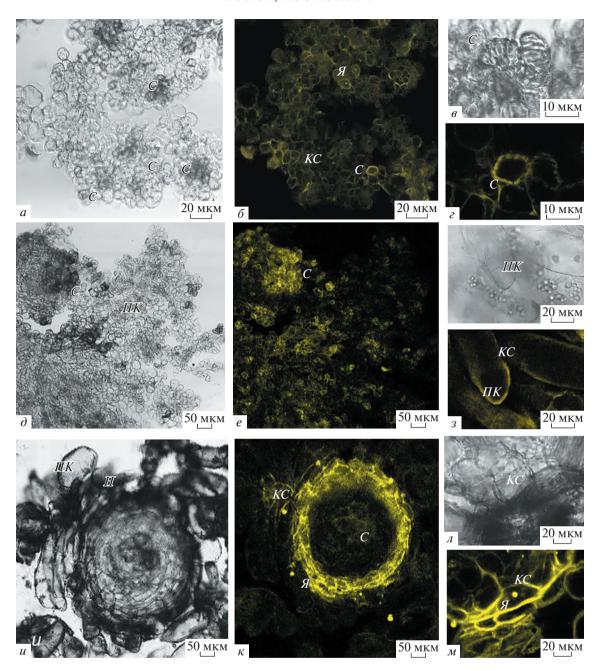


Рис. 6. Гистохимическая локализация фенольных соединений на прижизненных срезах каллусах G. glabra L., выявленная с помощью реактива DPBA. a, a — гистологический срез белого каллуса. δ — Окрашивание среза белого каллуса реактивом DPBA обнаружило желтое свечение флавонолов в ультрафиолетовом диапазоне в клеточных стенках (KC) и ядрах (B). C — Желтое свечение клеточных стенок сосудов (C). C0, C0, C0 — Гистологический срез желтого каллуса с клетками паренхимного типа (D1). C1 — Окрашивание среза желтого каллуса реактивом DPBA, желтое свечение флавонолов обнаружено в D2 — Желтое свечение флавонолов в цитоплазме D3, D4, D6, D6, D7, D8, желтое свечение флавонолов в D8, калтое свечение флавонолов в D8, келтое свечение флавонолов в D8, келтое свечение флавонолов в D8, келтое свечение флавонолов в D9, келтое свечение флавонолов в D1, коричневого каллуса.

желтый цвет корней лакричных определяют флавоноиды и халконы (Asl, Hosseinzadeh, 2008). Зеленоватое окрашивание вакуолярных включений также может свидетельствовать о накоплении фенольных соединений в вакуолях (Trump et al., 1961). Вероятно, накопление ЭВ на поверхности каллусной культуры и в клеточных стенках, приводит к изменению

цвета каллусной культуры с белого на желтый. Биохимические исследования показали, что наибольшее количество вторичных метаболитов обнаружено в коричневом каллусе (табл. 3). Содержание глицирризиновой кислоты в коричневом каллусе составляет 74.65 мг/г (7.46%), что соответствует данным для культур клеток солодки других авторов (Pandey, Ayangla, 2018), а также удовлетворяет требования фармакопеи к качеству исходного сырья. Согласно требованиям Государственной фармакопеи РФ (http:// femb.ru/femb/pharmacopea.php), в корнях, используемых в качестве сырья, содержание глицирризиновой кислоты не должно быть ниже 6% (ФС 2.5.0040.15, 2018). В ряде работ показано, что содержание глицирризиновой кислоты в корнях может быть и выше, например, до 12.49% (Яницкая и др., 2014). По некоторым источникам, содержание глицирризиновой кислоты в корнях может достигать 23% от сухого веса (Путырский, Прохоров, 2000). Однако содержание глицирризиновой кислоты в экстрактах корней солодки существенно зависит от времени сбора сырья. Так, содержание глицирризина в корнях солодки, собранных в разные месяцы года, варьировало от 41 до 114 мг на 1 г сухого веса (Cheel et al., 2013).

Содержание растворимых фенольных соединений в полученном нами каллусе (на сухой вес) было наибольшим в коричневом каллусе (19.82 мг/г) и сопоставимо с их средним содержанием в корнях растений (29.2 мг/г, вес сухой) (Cai et al., 2004). Одна из групп фенольных соединений в полученном каллусе флавоноиды, содержание которых в коричневом каллусе составляло 3.46 мг/г. Необходимо отметить, что как и для глицирризина, содержание фенольных соединений в корнях растений может зависеть от времени сбора сырья и варьировать от 72 до 108 мг/г, а флавоноидов — от 18 до 44 мг/г (на сухой вес) (Cheel et al., 2013). Вероятно, одной из причин меньшего, по сравнению с корнями, содержания фенольных соединений в полученном каллусе может быть их полимеризация и образование комплексов с белками и полисахаридами. Так, для ряда фенольных соединений, прежде всего танинов, показано окисление и (или) полимеризация фенольных соединений, накапливающихся на поверхности клеток (Hiltunen et al., 2008; Moya et al., 2012).

Танины являются группой фенольных соединений, характерной для клеток корней солодки (Sharma et a., 2013) и вероятно могут присутствовать и в полученном нами каллусе. Возможно, присутствие окисленных и (или) полимеризованных танинов в клетках коричневого каллуса способствует формированию коричневой окраски к завершению пассажа. Потемнение окраски каллуса может быть также связано с накоплением тритерпеновых гликозидов в клеточных стенках. На клеточной культуре Dioscorea deltoidea с помощью электронно-микроскопического анализа было обнаружено депонирование стероидных гликозидов в периплазматическом пространстве - клеточной стенке и межклетниках (Князьков и др., 1994). Возможно поэтому, на гистологических срезах коричневого каллуса солодки голой мы наблюдали окрашивание клеточных стенок реактивом NADI (рис. 5e, w).

Независимо от цвета популяции клеток, окрашивание живых препаратов реактивом DPBA обнаружило локализацию флавоноидов в цитоплазме, в ядре удлиненных паренхимных клеток и в трахеидах.

Аккумуляция флавоноидов в клеточной стенке и ядре описана для многих растений (Hutzler et al., 1998; Peer et al., 2001). Флавоноиды были обнаружены в клеточных стенках игл ели и сосны и были представлены, главным образом, кемферол-3-*O*-гликозидом (Hutzler et al., 1998).

Локализация флавоноидов в ядре клеток может быть обусловлена защитными и регуляторными функциями этих соединений. Флавоноиды в клетках растений защищают ДНК клеток от ультрафиолетового излучения, а также прямо или опосредованно контролируют экспрессию ряда генов (Grandmaisin, Ibrahim, 1996).

Также необходимо отметить возможное регуляторное влияние фенольных соединений на строение и рост каллусных культур. Предполагается, что фенольные соединения, особенно флавоноиды, принимают активное участие в формировании органогенных нодул через регулирование транспорта ауксина (Fortes et al., 2008). На каллусной культуре *Нимиlus lupulus* L. было показано, что в период, предшествующий формированию органногенных нодул в каллусе происходит активная транскрипция генов, кодирующих ферменты фенилпропаноидного пути синтеза фенольных соединений: цинамат-4-гидролазу, флавонолсинтазу, фенилаланинаммиаклиазу (Fortes et al., 2010).

Вероятно, преобладающим классом фенольных соединений в каллусе солодки является кверцетин или другие негликозилированные флавоноиды, так как лишь конъюгаты DPBA и флавоноидов солодки обладают желтой флуоресценцией (Saslowsky et al., 2001; Lewis et al., 2011), а флавоноиды могут быть представлены характерными для солодки соединениями: ликвиритином, ликвиритигенином, формонетином кверцетином, лютеолином (Vlaisavljevića et al., 2018). Возможно, возрастание количества нодул в коричневом каллусе связано с регуляторным влиянием фенольных соединений на процесс роста каллусной культуры.

Проведенные биохимические и гистохимические исследования позволяют предположить, что изменения цвета каллуса солодки может быть следствием накопления вторичных метаболитов, а возрастание синтеза вторичных метаболитов к завершению пассажа, возможно, как и в целом растении, определяется возрастом культуры и степенью дифференцировки клеток (Khan et al., 2016).

Исследования синтеза глицирризиновой кислоты в культуре столонов *G. glabra* L. обнаружили, что взрослые коричневые столоны (28 сут) синтезируют в 10 раз больше глицирризиновой кислоты (1.9 мг/г), чем молодые желто-зеленые (14 сут) (0.19 мг/г) (Кhan et al., 2016). Аналогичную картину наблюдали в корнях. Молодые культивируемые корни солодки содержат в два раза меньше глицирризиновой кислоты, чем старые (0.15 мг/г и 0.37 мг/г соответственно). Исследователи предполагают, что существует тесная связь между клеточной дифференцировкой ткани и синтезом глицирризиновой кислоты в куль-

турах G. glabra L. (Khan et al., 2016). По мнению Хаяши (Науаshi et al., 1988), отсутствие синтеза глицирризиновой кислоты в каллусной и суспензионной культурах G. glabra L., возможно, является следствием отсутствия синтеза ферментов, осуществляющих биохимические преобразования β -амирина в глицирризиновую кислоту. Необходимость клеточной дифференцировки для синтеза вторичных метаболитов была показана для клеточных культур многих видов растений (De Luca, St. Pieere, 2000; Кунах, Кацан, 2004; Smetanska, 2008; Halder et al., 2020).

Проведенные гистологические исследования показали, что каллус солодки сложно организован. Сферообразные клеточные комплексы, составляющие каллусы различного цвета, рассматриваются как ксилемные нодулы.

Формирование ксилемных нодул характерно для органогенных каллусов (Fortes et al., 2010; Savona et al., 2011) и каллусов, синтезирующих вторичные метаболиты (McCown et al., 1988; Ellis et al., 1996).

Дифференцировка сосудов ксилемы и сферообразная морфология, по-видимому, являются характерными особенностями ксилемных нолул независимо от вида растения. Тогда как степень дифференцированности клеток, составляющих нодулу, может варьировать у различных видов растений и может определяться уровнем зрелости нодулы. Например, ксилемные нодулы, формирующиеся в органогенном каллусе цикламена состояли из центрально расположенных сосудов ксилемы, окруженных прокамбиальными клетками (Savona et al., 2012). Тогда как нодулы тиса имеют более сложное строение (Ellis et al., 1996) и состоят из внутренне локализованных элементов ксилемы, покрытых клетками сосудистого камбия, и элементов флоэмы, расположенных снаружи. Созревание нодул тиса сопровождалось дифференцировкой элементов вторичной ксилемы, вторичной флоэмы и формированием слоя камбиальных клеток, обволакивающих флоэму.

В отличие от описанных выше ксилемных нодул, в каллусе солодки в течение культивирования мы наблюдали хаотичную дифференцировку сосудов. Дифференцировка сосудов обнаруживалась как в центре нодул, так и в поверхностных слоях клеточных комплексов. Подобное отличие, возможно, объясняется очаговым заложением элементов прокамбия и, возможно, является признаком инициирования дифференцировки полицентрических нодул, которые описаны для видов рода *Populus* (McCown et al., 1988).

Формирование нодул в каллусной культуре солодки и поддержание ее анатомической структуры может быть результатом подобранных нами концентраций НУК и кинетина в среде культивирования, являющихся синтетическими аналогами природных ауксинов и цитокининов (Miller et al., 1956; Agusti et al., 1996; Imin et al., 2005). При получении каллусной культуры люцерны было показано, что добавление кинетина в среду для инициации каллуса также позволяло получить каллусные культуры, имеющие нодулярный морфотип (Wan et al., 1988).

Таким образом, подобранная нами питательная среда позволила получить длительно поддерживаемую каллусную культуру солодки голой, которая является дифференцированной и способной синтезировать различные группы БАВ в количестве, сопоставимом с целыми растениями. Дальнейшая оптимизация условий культивирования каллусной культуры солодки с целью увеличения выхода интересующих БАВ может позволить применить ее для биотехнологического получения глицирризиновой кислоты и фенольных соединений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Н.И. Румянцевой (Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ "Казанский научный центр РАН") за плодотворное обсуждение работы и полезные замечания, а также М.В. Агеевой (Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ "Казанский научный центр РАН") за предоставленную возможность проведения флуоресцентного анализа каллусов.

ФИНАНИСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания Казанского института биохимии и биофизики ФИЦ Казанского научного центра РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Абделазиз В.М.А., Костюкова Ю.А., Хуснетдинова Л.З., Тимофеева О.А. 2019. Гистологический анализ каллусной культуры белены египетской (Hyosciamus muticus L.). Цитология. Т. 61. № 7. С. 571. (Abdelaziz V.M.A., Kostyukova Y.A., Khusnetdinova L.3., Timofeeva O.A. 2019. Histological analysis of the callus culture Belena Egyptian (Hyosciamus muticus L.). Tsitologiya. V. 61. № 7. P. 571.) https://doi.org/10.1134/S0041377119070022

Барыкина Р., Веселова Т., Девятов А., Джалилова Х., Ильина Г., Чубатова Н. 2004. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Московский университет. С. 99. (Barykina R., Veselova T., Ninth A., Jalilova H., Ilyina G., Chubatova N. 2004. Handbook on botanical microtechnics. Basics and methods. M.: Moscow University. P. 99.)

Бычкова О.С., Картелишев А.В., Коколина В.Ф., Кузетченко И.Н. 2011. Современные принципы диагностики и лечения папилломавирусной инфекции аногенитальной области у детей и подростков. Педиатрия. Т. 90. № 3. С. 55. (Bychkova O.S., Cartelishev A.V., Kokoolina V.F., Kusetchenko I.N. 2011. Modern principles of diagnosis and treatment of papillomaviral infection in the anogenital re-

- gion in children and adolescents. Pediatriya. V. 90. № 3. P. 55.)
- Князьков И., Лобокова Е., Носов А. 1994. Определение локализации стероидных гликозидов в культуре клеток Dioscorea deltoidea на основе изучения их ультраструктуры. Физиология растений. Т. 41. № 6. С. 896. (Knyazkov I., Lobokova E., Nosov A. 1994. Definition of localization of steroid glycosides in cell culture Dioscorea deltoidea based on study of their ultraperformance. Plant physiol. V. 41. № 6. P. 896.)
- *Кунах В.А., Кацан В.А.* 2004. Биосинтез изохинолиновых алкалоидов мака в природе и культуре *in vitro*. Укр. bioxim. журн. Т. 76. № 5. С. 29. (*Kunakh A.A., Katsan V.A.* 2004. Biosynthesis of poppy isoquinoline alkaloids in nature and *in vitro* culture Ukr. Biochim. J. V. 75. № 5. Р. 29.)
- Путырский И.Н., Прохоров В.Н. 2000. Универсальная энциклопедия лекарственных растений. М.: Махаон. (*Putyrsky I.N.*, *Prokhorov V.N.* 2000. Universal encyclopedia of medicinal plants. М.: Маһаоп.)
- Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Гранкина В.П., Кондратенко Р.М., Толстикова Т.Г. 2007. Солодка: биоразнообразие, химия, применение в медицине. М.: Издательский дом Гео. (Tolstikov G.A., Baltina L.A., Grankin V.P., Kondratenko R.M., Tolstikova T.G. 2007. Liduorice: biodiversity, chemistry, medical applications. M.: Publishing House Geo.)
- Шретер Г.К. 1972. Лекарственные растения и растительное сырье, включенные в отечественные фармакопеи. М.: Медицина. 122 с. (Shrether G.K. 1972. Medicinal plants and plant raw materials included in the national pharmacopoeia. Moscow: Medicine. 122 p.)
- Шретер А.И., Валентинов Б.Г., Наумова Э.М. 2004. Природное сырье китайской медицины. Справочник. Т. 1. М.: Теревинф. (Shreter A.I., Valentinov B.G., Naumova E.M. Natural raw materials of chinese medicine. Handbook. V. 1. M.: Tervinf.)
- Яницкая А.В., Землянская И.В., Недилько О.В. 2015. Выявление основных анатомических диагностических признаков травы солодки голой. Вестник ВГУ. Химия. Биология. Фармация. № 3. С. 103. (Janitskaya A.V., Earthenskaya I.V., Nedilko O.V. 2015. Identification of the basic anatomical diagnostic features of the grass with bare straw. Vestnik VGU. Chimiya. Biologiya. Pharmaciya. № 3. Р. 103.)
- Agusti M., Almela V., Zaragoza S., Primo-Milo E., El-Otmani M. 1996. Recent findings on the mechanisms of action of the synthetic auxins used to improve fruit size of Citrus. Proceeding International Society of Citriculture, V. 2. P. 922. http://www.crec.ifas.ufl.edu/academics/classes/hos6546/materials/ ISC 2 1996 922-928.
- Asl M., Hosseinzadeh H. 2008. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. Phytoyherapy Res. Phytother. Res. V. 22. P. 709. https://doi.org/10.1002/ptr.2362
- Badkhane Y., Yadav A.S., Bajaj A., Sharma A.K., Raghuwanshi D.K. 2014. Glycyrrhiza glabra L. a miracle medicinal herb. Indo-American J. Pharm. Res. V. 4. P. 5808.
- Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sci. V. 74. P. 2157. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047
- Cheel J., Tumova L., Areche C., Van Antwerpen P., Neve J., Zouaoui-Boudjeltia K., San Martin A., Vokral I., Wsol V., Neugebauerova J. 2013. Variations in the chemical profile and biological activities of licorice (Glycyrrhiza glabra L.), as influenced by harvest times. Acta Physiol Plant. V. 35.

- P. 1337. https://doi.org/10.1007/s11738-012-1174-9
- Collin H.A. 2001. Secondary product formation in plant tissue cultures. Plant Growth Regulation. V. 34. P. 119.
- Ellis D.D., Zeldin E.L., Brodhagen M., Russin W.A., McCown B.H. 1996. Taxol1 production in nodule cultures of taxus. J. Nat. Prod. V. 59. P. 246.
- El-Baz F.K., Mohamed A.A., Ali S.A. 2010. Callus formation, phenolic content and related antioxidant activities in tissue culture of a medicinal plant Colocynth (*Citrullus colocynthis*). Nova Biotechnologica. V. 10-2. P. 79.
- De Luca V., St. Pierre B. 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. Trends Plant Sci. V. 5. P. 168.
- Fehér A. 2019. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? Front. Plant Sci. V. 10. Article 536. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536
- Fortes A.M., Santos F., Choi Y.H., Silva M.S., Figueiredo A., Sousa L., Pais M.S. 2008. Organogenic nodule development in hop (Humulus lupulus L.): Transcript and metabolic responses. BMC Genomics. V. 9. P. 445. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-445
- Fortes A.M., Santos F., Pais M.S. 2010. Organogenic nodule formation in hop: A tool to study morphogenesis in plants with biotechnological and medicinal applications. J. Biomed. Biotechnol. V. 2. P. 1. https://doi.org/10.1155/2010/583691
- Fu C., Lei C., Gan L., Li M., Yang Y., Yu L. 2010. Optimization of embryogenic-callus induction and embryogenesis of Glycyrrhiza glabra. African J. Biotechnol. V. 9. P. 5823
- Grandmaison J., Ibrahim R.K. 1996. Evidence for nuclear protein binding of flavonol sulfate esters in Flaveria chloraefolia. J. Plant Physiol. V. 147. P. 653. https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81474-4
- Halder M., Jha S. 2020. Morphogenesis, genetic stability, and secondary metabolite production in untransformed and transformed cultures. P. 1. In: Plant cell and tissue differentiation and secondary metabolites. Cham: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11253-0 15-2
- Hayashi H., Fukui H., Tabata M. 1988. Examination of triterpenoids produced by callus and cell suspension cultures of Glycyrrhiza glabra. Plant Cell Reports. V. 7. P. 508.
- Hiltunen E., Mononen K., Alvila L., Pakkanen T.T. 2008. Discolouration of birch wood: Analysis of extractives from discoloured surface of vacuum-dried European white birch (Betula pubescens) board. Wood Sci. Technol. V. 42. P. 103. https://doi.org/10.1007/s00226-007-0143-8
- Hutzler P., Robert Fischbach R., Werner Heller W., Jungblut T., Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weissenbock G., Schnitzler J. 1998. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser microscopy. J. Exper. Botany. V. 49. P. 953.
 - https://doi.org/10.1093/jexbot/49.323.953
- Imin N., Nizamidin M., Daniher D., Nolan K.E., Rose R.J., Rolfe B.G. 2005. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Medicago truncatula explants culture grown under 6 benzylaminopurine and 1-naphthaleneacetic acid treatments. Plant Physiol. V. 137. P. 1250. https://doi.org/10.1104/pp.104.055277
- Khan S., Pandotra P., Manzoor M., Kushwaha M., Sharma R., Jain S., Ahuja A., Amancha V., Bhushan S., Guru S., Gupta A., Vishwakarma R., Gupta S. 2016. Terpenoid and flavonoid spectrum of in vitro cultures of Glycyrrhiza glabra revealed high chemical heterogeneity: platform to understand biosynthesis. Plant Cell Tiss. Organ Cult. V. 124.

- P. 507. https://doi.org/10.1007/s11240-015-0910-4
- Li B., Bhandari D., Janfelt C., Rompp A., Spengler B. 2014. Natural products in *Glycyrrhiza glabra* (licorice) rhizome imaged at the cellular level by atmospheric pressure matrix assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry imaging. Plant J. V. 80. P. 161.
- Lindsey K., Yeoman M. 1983. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. J. Exper. Botany. V. 34. P. 1055.
- Lewis D.R., Ramirez M.V., Miller N.D., Vallabhaneni P., Ray W.K., Helm R.F., Muday G.K. 2011. Auxin and ethylene induce flavonol accumulation through distinct transcriptional networks. Plant Physiol. V. 156. P. 144. https://doi.org/10.1104/pp.111.172502
- Machado M., Santoro G., Sousa M.C., Salgueiro L., Cavaleiro C. 2010. Activity of essential oils on the growth of Leishmania infantum promastigotes. Flavour Frag. J. V. 25. P. 156.
- Matsuura H., Sonia Malik S., Fernanda de Costa, Yousefzadi M., Mirjalili M., Arroo R., Bhambra A., Strnad M., Bonfll M., Fett-Neto A. 2018. Specialized plant metabolism characteristics and impact on target molecule biotechnological production. Mol. Biotechnol. V. 60. P. 169. https://doi.org/10.1007/s12033-017-0056-1
- McCown B.H., Zeldin E.L., Pinkalla H.A., Dedolph R.R. 1988. Nodule culture a developmental pathway with high potential for regeneration, automated micropropagation, and plant metabolite production from woody plants. In: Genetic manipulation of woody plants. Springer. V. 2. P. 149.
- Miller C.O., Skoog F., Okumura F.S., Von Saltza M.H., Strong F.M. 1956. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. Journal of the American Chemical Society. 1956. V. 78. P. 1375. https://doi.org/10.1021/ja01588a032
- Moya R., Fallas R.S., Bonilla P.J., Tenorio C. 2012. Relationship between wood color parameters measured by the CIELab system and extractive and phenol content in Acacia mangium and Vochysia guatemalensis from fast-growth plantations. Molecules. V. 17. P. 3639. https://doi.org/10.3390/molecules17043639
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. V. 15. P. 473.
 - https://doi.org/10.1007/s11240-014-0467-7
- Ogo Y., Mori T., Nakabayashi R., Saito K., Takaiwa F. 2016. Transgenic rice seed expressing flavonoid biosynthetic

- genes accumulate glycosylated and/or acylated flavonoids in protein bodies. J. Exper. Bot. V. 67. P. 95. https://doi.org/10.1093/jxb/erv429
- Pandey D.K., Ayangla N.W. 2018. Biotechnological aspects of the production of natural sweetener glycyrrhizin from Glycyrrhiza sp. Phytochem Rev. V. 17. P. 397. https://doi.org/10.1007/s11101-017-9540-2
 Pasqua G., Monacelli B., Manfredini C., Loreto F., Perez G.
- Pasqua G., Monacelli B., Manfredini C., Loreto F., Perez G. 2002. The role of isoprenoid accumulation and oxidation in sealing wounded needles of Mediterranean pines. Plant Sci. V. 163. P. 355. https://doi.org/10.1016/s0168-9452(02)00139-5
- Peer W., Brown D., Tague B., Muday G., Taiz L., Murphy A. 2001. Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of Arabidopsis. Plant Physiol. V. 126. P. 536.
- Savona M., Mattioli R., Nigro S., Falasca G., Rovere F., Costantino P., S. De Vries, Ruffoni B., Trovato M., Altamura M. 2012. Two SERK genes are markers of pluripotency in Cyclamen persicum Mill. J. Exper. Botany. V. 63. P. 471. https://doi.org/10.1093/jxb/err295
- Saslowsky D., Winkel-Shirley B. 2001. Localization of avoid enzymes in arabidopsis roots. The Plant J. V. 27. P. 37.
- Seitz H.U., Hinderer W. 1988. Anthocyanins. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants. San Diego: Academic Press. P. 125.
- Sharma V., Agrawal R.C., Pandey S. 2013. Phytochemical screening and determination of anti-bacterial and anti-oxidant potential of *Glycyrrhiza glabra* root extracts. J. Environ. Res. Develop. V. 7. P. 1552.
- Singleton V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phoungstic acid reagent. Am. J. Enol. Vitic. V. 16. P. 144.
- Smetanska I. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. V. 3. P. 187. https://doi.org/10.1007/10 2008 103
- Trump B.A., Smuckler E., Bendit E. 1961. Methods for staining epoxy sections for light microscopy. J. Ultrustruct. Res. V. 5. P. 343.
- Vlaisavljevića S., Šibula F., Sinkab I., Istvan Z., Ocsovszkid I., Jovanović-Šantaa S. 2018. Chemical composition, antioxidant and anticancer activity of licorice from Fruska Gora locality. Industrial Crops & Products. V. 112. P. 217. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.050
- Wan Y., Sorensen E.L., Liang G.H. 1988. The effects of kinetin on callus characters in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Euphytica. V. 39. P. 249.

Cultivation Conditions, Histological and Biochemical Analysis of the Callus Culture of a Liquorice *Glycyrrhiza glabra* L.

A. N. Akulov^{a, *} and Yu. A. Kostyukova^a

^a Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Federal Research Center of Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111 Russia

*e-mail: akulov anton@mail.ru

The conditions of induction and periodic cultivation of callus culture from root explants of *Glycyrrhiza glabra* L. are selected. The main difference between the selected media and those already described in the literature was the application of a mixture of phytohormones IAA (indolilacetic acid) (1.5 mg/L), NAA (naphtilacetic acid). (1.5 mg/L) and kinetin (1 mg/L). The resulting callus was complex and capable of synthesizing secondary compounds. Spherical cellular complexes that make up calluses are considered to be xylems nodules. Histochemical study of the localization of flavonols and terpenes has revealed cells of callus and cellular organelles of secondary metabolites. The glycyrrhic acid content in callus of the end passage was by the. 74.65 mg/g dry weight, phenol compounds 19.65 \pm 0.8 mg/g dry weight, flavonols 3.46 \pm 0.07 mg/g dry weight. The resulting callus culture *Glycyrrhiza glabra* L. can be used to produce valuable biologically active substances.

Keywords: liquorice, callus culture, glycyrrhizic acid, phenolic compounds, flavonols, DPBA, NADI

УЛК 575.174

КАРИОТИП И НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ГЕНА COI CHIRONOMUS SORORIUS WÜLKER, 1973 (DIPTERA, CHIRONOMIDAE) ИЗ ДЕЛЬТЫ р. ПЕЧОРА

© 2021 г. В. В. Большаков^{1, *}, Е. Б. Фефилова², Е. А. Мовергоз¹

¹Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, пос. Борок, 152742 Россия ²Институт биологии Коми научного центра УрО РАН, Сыктывкар, 167982 Россия *E-mail: victorh@ibiw.ru

> Поступила в редакцию 22.06.2021 г. После доработки 13.07.2021 г. Принята к публикации 19.07.2021 г.

Впервые в Европейской части России и за Северным полярным кругом, в дельте р. Печора обнаружена личинка комара-звонца *Chironomus sororius* Wülker 1973. В результате анализа кариотипа обнаружено 9 инверсионных вариантов плеч хромосом: sorAl, sorB2, sorB3, sorC2, sorD1, sorE1, sorF1, sorF2 и sorG1. В-хромосом не обнаружено. Получена нуклеотидная последовательность участка гена *COI* длиной 584 нуклеотида. Байесовский анализ показал, что вид относится к группе видов *Chironomus aberratus*, и наиболее близок с *Ch. sororius* из Западной Сибири (г. Новосибирск). Минимальные генетические дистанции (*p*-distance) получены также при сравнении с *Ch. sororius* (1%) из г. Новосибирск, что значительно меньше предложенного порога (3%) разграничивающего виды *Chironomus*. При анализе двух последовательностей *COI* из Gen-Bank неидентифицированных видов *Chironomus* из Канады, генетические дистанции оказались выше порогового значения (3.8 и 7.8%), и, вероятно, они также относятся к данной группе видов.

Ключевые слова: Diptera, Chironomidae, *Chironomus sororius*, *COI*, ДНК-баркодинг, кариотип, р. Печора **DOI:** 10.31857/S0041377121060031

Вид Chironomus sororius Wülker 1973 был описан из популяций Шварцвальда в Германии и южной Финляндии (Wülker, 1973), позднее был обнаружен в водоемах Швеции, Чехословакии и Норвегии (Wülker, 1991). В России вид ранее был найден в Сибири: г. Новосибирск (недалеко от Академгородка, СНТ "Кристалл" и "Цитолог"); в Республике Алтай, вероятно, река Шебелик, около города Шебалино (в источнике (Kiknadze et al., 2016) указана р. Шарлик, но она находится далеко от указанного города, и ее длина всего 18 км); р. Большой Ильгумень, близ г. Онгудай; оз. Озёрское, Усть-Канский р-н; р. Енисей близ г. Кызыл. Вид относится к группе видов Chironomus aberratus, в которую входят: Ch. fraternus Wülker 1991, Ch. beljaninae Wülker 1991, Ch. jonmartini Lindeberg 1979, Ch. aberratus Keyl 1961 и Ch. sororius. Группа Chironomus aberratus, остается до сих пор слабо изученной (Wülker, 1973, 1991; Ракишева и др., 2001; Kiknadze et al., 2016; Petrova, Zhirov, 2017).

Личинка *Ch. sororius* была обнаружена нами в дельте р. Печора в одной пробе с *Ch.* sp. *Ya3* Kiknadze, Istomina et Salova 1996 (Bolshakov, Fefilova, 2020), и так же является первой находкой для Европейской части России. При наличии лишь одной особи и ограниченного количества материала первоначально определение вида вызвало у нас некоторые труд-

ности. Ранее (2008 и 2010 гг.) при изучении водоемов в устьевом районе р. Печора (Большой и Малый Гусинец) только по морфологическим признакам до вида были определены 33 вида комаров-звонцов, из которых к роду *Chironomus* относились: *Ch. dorsalis* Meigen 1818, Ch. agilis Shobanov, Djomin 1988, Ch. magnificus Shobanov 2000, Ch. albimaculatus Shobanov, Wülker, Kiknadze 1991, при этом часть диагностирована только до рода (Черевичко и др., 2011). Известно, что у хирономид, особенно в роде Chironomus, видовая идентификация по морфологическим признакам личинки сильно затруднена, а порой и невозможна (Кикнадзе и др., 1996). Метод выведения до имаго в условиях экспедиции недоступен. Другим, удобным и относительно точным, методом для установления видовой принадлежности у Chironomus является цитогенетический анализ. Однако и при его использовании иногда возникают трудности, особенно если кариотипы принадлежат близкородственным или слабо изученным видам, в этом случае только высокое качество кариологического препарата позволяет увидеть мельчайшие различия между кариотипами. В нашем случае качество полученного кариологического препарата не позволило нам точно диагностировать вид выращенной личинки, мы лишь установили, что она относится к группе видов *Chironomus* aberratus. Поэтому для дальнейшего уточнения ее таксономического статуса мы выбрали метод баркодинга, основным преимуществом которого является возможность использования на всех стадиях развития организма. Используя стандартный набор праймеров для амплификации фрагмента ДНК митохондриального гена субъединицы І цитохромоксидазы С (*COI*) (Folmer et al., 1994; Hebert et al., 2003) нами была получена видоспецифичная нуклеотидная последовательность ДНК. К сожалению, в базах данных генетической информации GenBank и BOLD содержится только одна запись о нуклеотидной последовательности *COI Ch. sororius* – AF192198.1. Сравнив полученную нами последовательность с другими последовательностями, отобранными для анализа, мы установили, что обнаруженная личинка относится к группе видов Chironomus aberratus, а наиболее близким видом является Ch. sororius, для которого не было превышено пороговое значение (3%), разграничивающее виды рода *Chironomus* (Proulx et al., 2013). По другим 4-м видам группы *Chironomus aber*ratus никакой информации в базах данных нет.

В настоящей статье приводится описание кариотипа и результаты анализа нуклеотидной последовательности участка гена *COI Ch. sororius* из дельты р. Печора.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для работы послужила одна личинка Chironomus sororius, найденная в августе 2016 г. в водоеме на острове в протоке Большой Гусинец дельты реки Печора одновременно с Ch. sp. Ya3 Kiknadze, Istomina et Salova 1996 (Bolshakov, Fefilova, 2020). Koординаты точки сбора: N 68°10′282″; E 53°39′368″. Водоем представлял собой небольшое озерко, зарастающее осокой водной – Carex aquatilis Wahlend, и сообщающееся с рекой в период половодья, площадью около $200 \times 20 \text{ м}^2$, глубиной около 1 м. В период сбора материала температура воды составляла 17.5°C, рН 8.04. Проба донного субстрата (смесь ила с песком) из водоема хранилась без фиксации, герметично упакованная в пакет, в холодильнике при 4°C до января 2017 г. Обнаруженные при разборе пробы личинки (длиной 3-5 мм) доращивались в лаборатории на искусственном субстрате, как было описано ранее (Bolshakov, 2015; Bolshakov, Fefilova, 2020), в результате для анализа оказались пригодны несколько личинок, в их числе и личинка Chironomus sororius.

Изготовление давленных препаратов политенных хромосом проводили по стандартной этилорсеиновой методике (Демин, 1989). Фотографирование хромосом проводили на микроскопе "Микромед-6С" ("ЛОМО", Санкт-Петербург), оснащенным видеоокуляром "ТоирСатб.1" (Китай) и объективами с увеличением 40× и 100×. Для видовой идентификации по кариотипу использовали цитофотокарты (Keyl, 1962; Dévai et al., 1989; Kiknadze et al., 2016).

Из личинки, фиксированной в этаноле (95%), выделяли ДНК с помощью набора реагентов на магнитных частицах "М-сорб-ООМ" (Синтол, Москва) согласно протоколу производителя. Для баркодинга использовали регион гена *COI* (Folmer et al., 1994): праймеры LCO1490: 5'-GGTCAACAATCATA-AAGATATTGG-3' и HCO2198: 5'-TAAACTTCAGG-GTGACCAAAAAATCA-3') (Евроген, Москва).

Реакцию ПЦР проводили в объеме 25 мкл ($1 \times$ буфер, 1.5 мкМ MgCl₂, 0.5 мМ каждого из праймеров, 0.2 мкМ каждого нуклеотида, 1 µМ образца ДНК, 1 а.е. Тар полимеразы (Евроген, Москва)). Цикл ПЦР: 94° С -3 мин, 30 циклов (94° С -15 с, 50° С -45 с, 72° С -60 с), 72° С -8 мин. Очищали ДНК этанолом и 3М ацетатом аммония, и далее секвенировали в обоих направлениях на секвенаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Scientific, США).

Для выравнивания полученных последовательностей ДНК использовали алгоритм MUSCLE из пакета программ MEGA6 (Татига et al., 2013). Генетические дистанции (*p*-distance) рассчитывали также в программе MEGA6. Построение филогенетических деревьев по методу Байеса проводили в программе MrBayes v.3.2.6 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003; Ronquist et al., 2012) с параметрами, предложенными в работе Кармокова (Кагтокоv, 2019; Bolshakov, Prokin, 2021). Визуализацию и редактирование полученных филогенетических деревьев осуществляли в программе FigTree v.1.4.3 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

Для филогенетического анализа использовали последовательности ДНК из базы данных GenBank. Однако последовательности представителей группы *Chironomus aberratus*, кроме *Ch. sororius* — AF192198.1, в свободном доступе отсутствуют. Кроме этого, в GenBank были найдены последовательности неопределенных до вида хирономид из водоемов Канады, относящиеся, вероятно, к данной группе: KR670353.1 (*Chironomus* sp. BOLD-2016 voucher CHU06-COL-371) и KR963693.1 (*Chironomus* sp. BOLD-2016 voucher BIOUG18205-D04).

Номера доступа к использованным последовательностям в базах данных: Chironomus acutiventris Wülker, Ryser, Scholl 1983 – AF192200.1, Ch. annularius Meigen, 1818 – AF192189.1, Ch. aprilinus Meigen, 1830 – KC250746.1, Ch. balatonicus Devai, Wülker, Scholl, 1983 – JN016826.1, Ch. bernensis Wülker et Klötzli, 1973 – AF192188.1, Ch. borokensis Kerkis, Filippova, Schobanov, Gunderina, Kiknadze, 1988 – AB740261, Ch. cingulatus Meigen, 1830 – AF192191.1, Ch. commutatus Keyl, 1960 – AF192187.1, Ch. curabilis Belyanina, Sigareva, Loginova, 1990 – JN016810.1. *Ch. dilutus* Shobanov, Kiknadze, Butler, 1999 – KF278335.1, Ch. entis Shobanov, 1989 – KM571024.1, Ch. heterodentatus Konstantinov, 1956 -AF192199.1, Ch. heteropilicornis Wülker, 1996 – MK795772.1, Ch. luridus Ŝtrenzke, 1959 – AF192203.1, Ch. maturus Johannsen, 1908 – DQ648204.1, Ch. melanescens Keyl, 1961 – MG145351.1, Ch. nipponensis Tokunaga, 1940 – LC096172.1, Ch. novosibiricus Kiknadze, Siirin, Kerkis, 1993 — AF192197.1, *Ch. nuditarsis* Keyl, 1961 — KY225345.1, *Ch. obtusidens* Goetghebuer, 1921 — CHMNO207-15 (http://www.boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=CHMNO207-15); *Ch. piger* Strenzke, 1959 — AF192202.1, *Ch. pilicornis* Fabricius, 1787 — BSCHI736-17, *Ch. plumosus* Linnaeus, 1758 — KF278217.1, *Ch. riparius* Meigen, 1804 — KR756187.1, *Ch. sokolovae* Istomina, Kiknadze, Siirin, 1999 — MW471100, *Ch. tentans* Fabricius, 1805 — AF110157.1, *Ch. tuvanicus* Kiknadze, Siirin et Wulker, 1993 — AF192196.1, *Ch. whitseli* Sublette, Sublette, 1974 — KR683438.1. В качестве вида внешней группы использовали *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 — HQ551913.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кариотип *Ch. sororius* из дельты р. Печора. Диплоидный набор 2n = 8, комбинация хромосомных плеч AB. CD. EF и G – соответствует цитокомплексу "thummi". Хромосомы AB и CD – метацентрические. ЕГ – субметацентрческая. G – телоцентрическая, в нашем случае гомологи всегда не спарены (рис. 1.). В-хромосомы отсутствуют. Ядрышко и два кольца Бальбиани расположены в плече G. Также одно кольцо Бальбиани расположено в плече В. Кариотип Ch. sororius сходен с кариотипом Ch. aberratus (Wülker, 1973), последовательности в плечах A, D, E и F идентичны, отличается фиксированными инверсиями в плечах B, C и G. Кроме этого, центромерные районы у Ch. sororius значительно крупнее Ch. aberratus, но меньше, чем у Ch. melanotus Keyl 1961.

В плече А обнаружена одна последовательность sorA1=abeA1 (Keyl, 1962; Wülker, 1973; Kiknadze et al., 2016).

sorA1 1a-2c 10a-12c 4a-9e 2d-3i 13a-19f C.

В плече В две последовательности sorB2 и sorB3, на настоящий момент не картированы.

В плече C последовательность sorC2=abeC1 (Ki-knadze et al., 2016).

sorC2 1a-6b 11c-8a 15e-11d 6gh 17a-16a 7d-a 6f-c 17b-22g C.

В плече **D** последовательность sorD1=abeD1 (Wülker, 1973; Kiknadze et al., 2016).

sorD1 1a-3g 11a-18f 7d-4a 10e-7e 18g-24g C.

В плече E одна последовательность sorE1=abeE1 (Wülker, 1973; Kiknadze et al., 2016).

sorE1 1a-3e 5a-10b 4h-3f 10c-13g C.

В плече F две последовательности sorF1=abeF1 и sorF2 (Wülker, 1973; Kiknadze et al., 2016).

sorF1 1a-10d 17d-11a 18a-23f C.

sorF2 1a-2f 8f-3a 9a-10d 17d-11a 18a-23f C.

В плече G одна последовательность sor G1, на настоящий момент не картирована.

Первоначально, при идентификации вида как *Ch. sororius* у нас возникли сложности, обусловленные

низким качеством цитологического препарата и высоким сходством последовательностей дисков политенных хромосом у близкородственных видов. В результате цитогенетического анализа было обнаружено 9 последовательностей дисков гомологичных (политенных) хромосом: sorA1=abeA1, sorB2, sorB3, sorC2=abeC1, sorD1=abeD1, sorE1=abeE1, sorF1=abeF1, sorF2 и sorG1. Несмотря на суровые условия обитания и удаленность от мест других находок, значительных особенностей в кариотипе, а также новых последовательностей не обнаружено.

К сожалению, количества изученных личинок недостаточно для оценки цитогенетической структуры популяции.

Молекулярно-генетический анализ участка гена СОІ и филогенетический анализ. В результате молекулярно-генетического анализа был прочитан участок гена *COI* длиной 584 нуклеотида, и размешен в базе данных GenBank под номером MZ324811. Минимальные генетические дистанции (p-distance), pacсчитанные в программе MEGA6, указывают на высокое сходство изучаемой нами личинки из дельты р. Печора с видом *Ch. sororius* из г. Новосибирск – 1%, что значительно выше 3%-ного порога, принятого при разграничении видов Chironomus (Polukonova et al., 2009; Proulx et al., 2013; Karmokov, 2019; Bolshakov, Prokin, 2021). Проведенный на основании сравнения последовательностей СОІ филогенетический анализ по методу Байеса (рис. 2) показывает объединение родственных видов в кластеры (группы): aberratus, riihimakiensis, lacunarius, plumosus, obtusidens, и piger, ранее выделенные по морфологическим и цитогенетическим признакам. Обнаруженная нами личинка с высоким уровнем достоверности относится к группе Chironomus aberratus и является видом *Ch. sororius* (99%).

При анализе двух последовательностей участка гена *COI* из GenBank неидентифицированных видов *Chironomus* (из Канады) генетические дистанции оказались выше 3% порогового значения, и составили 3.8% и 7.8% для *Chironomus* sp. (KR963693.1) и *Chironomus* sp. (KR670353.1) соответственно; высокие значения prob. в узлах веток на филогенетическом дереве указывают, что эти последовательности, вероятно, также относятся к группе видов *Chironomus aberratus*.

Таким образом, при неоднозначной интерпретации данных морфологического и цитогенетического анализа, мы успешно применили метод баркодинга фрагмента гена *COI*, для идентификации единственной найденной личинки *Ch. sororius* из устья р. Печора, которая оказалась первой находкой для Европейской части России.

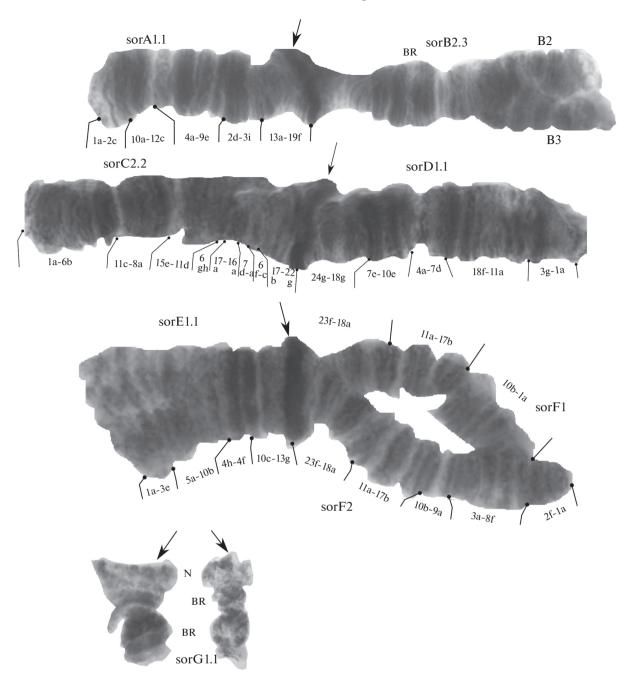


Рис. 1. Кариотип *Ch. sororius* из дельты р. Печора. *Стрелки* указывают на центромеры, sorA1.1, sorB2.3 — сочетания инверсионных вариантов плеч хромосом, BR — кольца Бальбиани, N — ядрышко.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.С. Глотову и С.А. Золотому (заповедник "Ненецкий") за организацию полевых работ в дельте р. Печора и В.К. Чугунову (ИБВВ РАН) за помощь в первичной обработке материала; А.А. Боброву, Б.А. Лёвину (ИБВВ РАН) и М.Х. Кармокову (ИЭГТ РАН) за ценные замечания на всех этапах работы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственных заданий Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН (№ 121050500046-8; 121051100099-5), Института биологии Коми научного центра УрО РАН (АААА-А17-117112850235-2) и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00145).

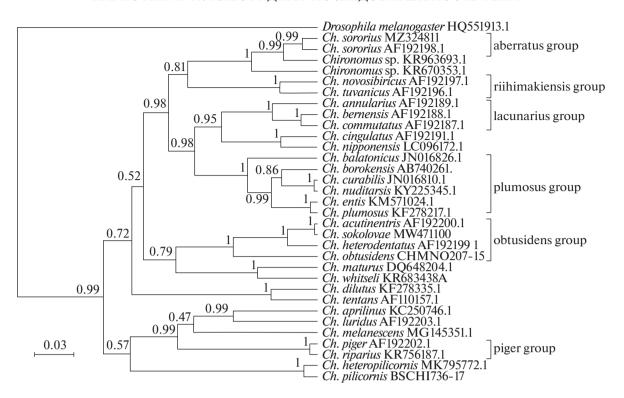


Рис. 2. Филогенетическое дерево *Chironomus* полученное на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов *COI*, построенное по методу Байеса. Числа в узлах показывают уровень поддержки.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит данных, полученных в результате использования позвоночных животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Демин С.Ю. 1989. Изменчивость степени конденсированности политенных хромосом в клетках разных органов личинок *Chironomus plumosus* из природы. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л. 25 с. (*Demin S. Yu.* 1989. The variability of the degree of condensation of polytene chromosomes in the cells of various organs of larvae *Chironomus plumosus* of nature]. Avtoref. kand. dis. Leningrad. 25 p.)

Кикнадзе И.И., Истомина А.Г., Гундерина Л.И., Салова Т.А., Айманова К.Г., Саввинов Д.Д. 1996. Кариофонды хирономид криолитозоны Якутии. Триба Chironomini. Новосибирск: Наука. 166 с. (Kiknadze I.I., Istomina A.G., Gunderina L.I., Salova T.A., Aymanova K.G., Savvinov D.D. 1996. Kariofondy khironomid kriolitozony Yakutii. Triba Chironomini. Novosibirsk: Nauka. 166 p.)

Ракишева А.Ж., Петрова Н.А., Михайлова П.В. 2001. Морфология личинки и особенности кариотипа *Chironomus jonmartini* из краевой южной популяции (Казахстан). Энтомологическое обозрение. Т. 80. № 2. С. 512. (*Rakisheva A.Zh.*, *Petrova N.A.*, *Mikhaylova P.V.* 2001.

Morfologiya lichinki i osobennosti kariotipa *Chironomus jonmartini* iz kraevoy yuzhnoy populyatsii (Kazakhstan). Entomologicheskoe Obozrenie. V. 80. № 2. P. 512.)

Черевичко А.В., Мельник М.М., Прокин А.А., Глотов А.С. 2011. Современное состояние зоопланктона и макрозообентоса низовий р. Печора (Ненецкий АО). Вода: химия и экология. № 9. С. 53. (*Cherevichko A.V., Mel'nik M.M., Prokin A.A., Glotov A.S.* 2011. Sovremennoe sostoyanie zooplanktona i makrozoobentosa nizoviy r. Pechora (Nenetskiy AO). Voda: khimiya i ekologiya. № 9. P. 53.)

Bolshakov V.V. 2015. On techniques of maintenance of *Chironomus dilutus* larvae (Diptera, Chironomidae) on Bacto agar. Entomol. Rev. V. 95. P. 811.

Bolshakov V.V., Fefilova E.B. 2020. Karyotype characteristics and the composition of hemoglobins in *Chironomus* sp. *Ya3* (Diptera, Chironomidae) from the Pechora delta. Entomol. Rev. V. 100. P. 1. https://doi.org/10.1134/S0013873820010017

Bolshakov V.V., Prokin A.A. 2021. Karyotype and COI sequences of *Chironomus sokolovae* Istomina, Kiknadze et Siirin, 1999 (Diptera, Chironomidae) from the bay of Orkhon River, Mongolia. Comp. Cytogen. V. 15. P. 149. https://doi.org/10.3897/compcytogen.v15.i2.66549

Dévai Gy., Miskolczi M., Wülker W. 1989. Standardization of chromosome arms B, C and D in Chironomus (Diptera, Chironomidae). Acta Biologica Debricina. Supplementum Oecologica Hungarica. V. 2. P. 79.

Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan inverte-

- brates. Molecular Marine Biology and Biotechnology. V. 3. P. 294.
- Hebert P., Cywinska A., Shelley L. Ball S. T., de Waard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society London B: Biological Sciences. V. 270. P. 313. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218
- *Karmokov M.K.* 2019. Karyotype characteristics, chromosomal polymorphism and gene *COI* sequences of *Chironomus heteropilicornis* Wülker, 1996 (Diptera, Chironomidae) from the South Caucasus. Comparative Cytogenetics. V. 13. P. 339. https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v13i4.35572
- *Keyl H.-G.* 1962. Chromosomenevolution bei *Chironomus*. II. Chromosomenumbauten und phylogenetische Beziehungen der Arten. Chromosoma. V. 13. P. 464. https://doi.org/10.1007/BF00327342
- Kiknadze I.I., Istomina A.G., Golygina V.V., Gunderina L.I. 2016. Karyotypes of Palearctic and Holarctic species of the genus Chironomus [Electronic resource] / [Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics. Novosibirsk: Academic Publishing House "GEO". 489 p. https://elibrary.ru/item.asp?id=27246690
- Petrova N.A., Zhirov S.V. 2017. Karyotype characteristics of Chironomus fraternus Wülker and Ch. beljaninae Wülker (Diptera, Chironomidae) from Northern Russia. Entomol. Rev. V. 97. P. 730. https://doi.org/10.1134/S0013873817060033
- Polukonova N.V., Djomin A.G., Mugue N.S., Shaikevich A.E. 2009. Comparison of Chironomus usenicus and Chironomus

- *curabilis* with species of the group plumosus (Diptera) inferred from the mitochondrial DNA Gene *COI* and by the polytene chromosomes banding pattern. Russ. J. Genet. V. 45. P. 899.
- https://doi.org/10.1134/S102279540908002X
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, V. 19, P. 1572.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Hohna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic in-ference and model choice across a large model space. Systematic Biology. V. 61. P. 539. https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029
- Proulx I., Martin J., Carew M., Hare L. 2013. Using various lines of evidence to identify Chironomus species (Diptera: Chironomidae) in eastern Canadian lakes. Zootaxa. V. 3741. P. 401.
 - https://doi.org/10.11646/zootaxa.3741.4.1
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. V. 30. P. 2725. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197
- Wülker W.F. 1973. Revision der Gattung *Chironomus* Meig. III. Europäische Arten des thummi-Komplexes. Archiv für Hydrobiologie. V. 72. P. 356.
- Wülker W.F. 1991. Chironomus fraternus sp. n. and C. beljaninae sp. n., sympatric sister species of the aberratus group in Fennoscandian reservoirs. Entomol. Fennica. V. 2. P. 97.

Karyotype and *COI* Gene Sequences of *Chironomus sororius* Wülker 1973 (Diptera, Chironomidae) from the Pechora River Delta

V. V. Bolshakov^{a, *}, E. B. Fefilova^b, and E. A. Movergoz^a

^a Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences, Yaroslavl reg., Nekouz prov., Borok, 152742 Russia

^b Institute of Biology, Komi Scientific Centre, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982 Russia

*e-mail: victorh@ihiw.ru

Larva *Chironomus sororius* Wülker, 1973 was found in the European part of Russia and beyond the Arctic Circle, in the delta of the Pechora River for the first time. Nine inversion variants of chromosome arms determined: sorA1, sorB2, sorB3, sorC2, sorD1, sorE1, sorF1, sorF2 and sorG1. The additional B-chromosomes are absent. A nucleotide sequence of the 584-nucleotide *COI* gene region was obtained. Bayesian inference showed that the species belongs to the group *Chironomus aberratus*, and closely related to *Ch. sororius* from Western Siberia (Novosibirsk). The estimated genetic *p*-distance between obtained sequence and *Ch. sororius* from Novosibirsk was about 1%, which is much lower than the commonly accepted threshold of 3% for species of genus *Chironomus* Meigen, 1803. By analyzing two *COI* sequences from the GenBank of unidentified *Chironomus* species from Canada, the genetic distances were above the threshold value (3.8% and 7.8%), and they probably belong to this group of species.

Keywords: Diptera, Chironomidae, Chironomus sororius, COI, DNA-barcode, karyotype, Pechora river

ПАМЯТИ ОЛЬГИ ВЛАДИМИРОВНЫ ЗАЦЕПИНОЙ (1951-2020)

DOI: 10.31857/S0041377121060080



9 ноября 2020 г. ушла из жизни Ольга Владимировна Зацепина — известный ученый, специалист в области клеточной биологии, цитологии, гистологии, профессор (2006), доктор биологических наук (1990), главный научный сотрудник, и. о. руководителя Лаборатории функциональной организации клеточного ядра Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Ольга Владимировна родилась 10 апреля 1951 г. в Москве, в 1973 г. с отличием закончила Биолого-почвенный факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, а в 1976 г. — аспирантуру при МГУ. Ольга Владимировна успешно защитила сначала кандидатскую диссертацию (1977) "Электронномикроскопическое изучение поведения ядерной оболочки при делении клеток" а потом и докторскую (1990) "Структурные основы линейной дифференцированности хромосом эукариот", внесших значительный вклад в понимание механизмов становления и функционирования ядер в нормальных и патологических условиях.

В 1977—2008 гг. Ольга Владимировна работала в Научно-исследовательском институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, где

прошла путь от младшего научного сотрудника до руководителя лаборатории (1998–2008).

В 2001—2020 гг. профессор Зацепина работала в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, занимая должности ведущего научного сотрудника (2001—2008), руководителя лаборатории (2008—2017), главного научного сотрудника и и. о. руководителя лаборатории (2017—2020).

Профессор Зацепина автор 154 статей в высокорейтинговых научных журналах, 10 патентов РФ на изобретения. Ее вклад в изучение строения и механизмов функционирования соматических и половых клеток млекопитающих как в процессе их нормального развития, так и при патологии, очень велик. Так, заслуженное признание получили работы О.В. Зацепиной, посвященные изучению структуры, свойств и функций ядрышек соматических клеток, а также производных ядрышек в ооцитах и предшественников ядрышек в ранних эмбрионах мыши. Статья, подготовленная научными коллективами под руководством проф. О.В. Зацепиной и проф. А.П. Дыбана "Выявление ядрышкообразующих районов хромосом в одноклеточных зародышах и ооцитах мыши с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*" (Коробова Ф.А., Романова Л.Г., Нониашвили Е.М., Дыбан А.П., Зацепина О.В. 2004. Онтогенез. Т. 35. № 5. С. 336-346) была отмечена дипломом и премией Международной академической издательской компании "Наука/Интерпериодика" как лучшая публикация 2004 г. в издаваемых ею журналах.

Еще при жизни Ольги Владимировны высокий уровень ее научных исследований был по достоинству оценен и поддержан стипендиями Лондонского Королевского общества (The Royal Society of London, Великобритания), Фонда им. Александра фон Гумбольдта (Alexander von Humboldt-Stiftung, Германия), Фонда Wellcome Trust (Wellcome Trust Foundation, Великобритания), Национального института сельскохозяйственных исследований Франции (Institut National de la Recherche Agronomique, INRA; Франция), Института Кюри (Institut Curie, Франция), Национального научного фонда США (National Science Foundation, NSF; США).

В последние годы проф. Зацепина наряду с изучением морфофункциональных особенностей предовуляторных ооцитов и ранних зародышей мышевидных грызунов внедряла результаты своих исследова-

ний в практическое здравоохранение с целью возможного использования их в качестве тест-систем для диагностики некоторых заболеваний.

Профессор Зацепина уделяла большое внимание воспитанию и становлению научного мировоззрения молодых ученых: под ее руководством было выполнено 16 кандидатских диссертаций и более 50 дипломных работ.

Ольга Владимировна была активным членом редколлегии журнала "Цитология", Научного совета по клеточной биологии и иммунологии Отделения биологических наук РАН и диссертационных советов: двух — на базе МГУ им. М.В. Ломоносова и совета на базе Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН; кроме того, она была представителем Рос-

сийской Федерации в Международном оргкомитете совещаний по ядру им. В. Бернхарда (Wilhelm Bernhard Nuclear Workshop).

Ольга Владимировна была не только блестящим ученым, но и подлинным потомственным интеллигентом, с которым было так интересно общаться. Ее требовательность к своим исследованиям была уникальна, а эмоциональные размышления о прозе, науке, модусе развития Академии наук, месте ученого в современном мире, о политике были воистину бесценны и надолго запомнятся всем тем, кому посчастливилось работать вместе с ней — таким удивительным человеком.

П.А. Дыбан, Е.М. Нониашвили, А.В. Зацепин