

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 64, номер 2, 2022

---

---

Лимфопения и механизмы регенерации Т-клеток <i>Е. В. Сайдакова</i>	105
Роль миелоидных супрессорных клеток в процессах формирования иммунной толерантности в период беременности <i>К. Ю. Шардина, С. А. Заморина, М. Б. Раев, В. А. Черешнев</i>	116
Клетки глиобластом человека линий T2 и T98G, резистентные к действию темозоломида <i>А. А. Пиневич, И. И. Бодэ, Н. Л. Вартамян, Л. Н. Киселева, А. В. Карташев, М. П. Самойлович</i>	126
Особенности структуры миокарда левого желудочка преждевременно рожденных крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза <i>В. В. Иванова, И. В. Мильто, О. Н. Серебрякова, И. В. Суходоло</i>	141
Особенности локализации белка LIMCH1 в опухолевых клетках при раке молочной железы <i>В. В. Алифанов, Л. А. Таширева, М. В. Завьялова, В. М. Перельмутер</i>	150
Морфофункциональные изменения нервной ткани мозга трансгенных мышей линии 5xFAD <i>Н. Л. Туманова, Д. С. Васильев, Н. М. Дубровская, Н. Н. Наливаева</i>	159
Морфология мышечной ткани крыс после имплантации системы доставки, состоящей из пористых ватеритов, допированных декстрансульфатом и содержащих доксорубин <i>Н. Н. Сударева, П. В. Попрядухин, О. М. Суворова, Г. Ю. Юкина, Е. Г. Сухорукова</i>	172

---

---

# Contents

---

---

**Vol. 64, No. 2, 2022**

---

---

Lymphopenia and T-cell regeneration mechanisms <i>E. V. Saidakova</i>	105
The role of myeloid suppressor cells in the processes of formation of immune tolerance during pregnancy <i>K. Yu. Shardina, S. A. Zamorina, M. B. Raev, V. A. Chereshev</i>	116
Temozolomide-resistant human T2 and T98G glioblastoma cells <i>A. A. Pinevich, I. I. Bode, N. L. Vartanyan, L. N. Kiseleva, A. V. Kartashev, M. P. Samoilovich</i>	126
Structural features of left ventricle myocardium in premature born rats in the early postnatal ontogenesis <i>V. V. Ivanova, I. V. Milto, O. N. Serebryakova, I. V. Sukhodolo</i>	141
Characteristic of LIMCH1 protein localization in tumor cells II breast cancer <i>V. V. Alifanov, L. A. Tashireva, M. V. Zavyalova, V. M. Perelmuter</i>	150
Morphofunctional changes in the brain tissue of 5xFAD transgenic mice <i>N. L. Tumanova, D. S. Vasiliev, N. M. Dubrovskaya, N. N. Nalivaeva</i>	159
Morphology of rat muscle tissue after implantation of delivery system consisting of porous vaterites doped with dextran sulfate and containing doxorubicin <i>N. N. Sudareva, P. V. Popryadukhin, O. M. Suvorova, G. Y. Yukina, E. G. Sukhorukova</i>	172

---

---

УДК 616.155.394

## ЛИМФОПЕНИЯ И МЕХАНИЗМЫ РЕГЕНЕРАЦИИ Т-КЛЕТОК

© 2022 г. Е. В. Сайдакова\*

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН — филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН (“ИЭГМ УрО РАН”), Пермь, 614081 Россия

\*E-mail: radimira@list.ru

Поступила в редакцию 08.12.2021 г.

После доработки 11.01.2022 г.

Принята к публикации 11.01.2022 г.

Хроническая лимфопения, в частности дефицит Т-лимфоцитов, увеличивает риск смерти от онкологических, сердечно-сосудистых и респираторных заболеваний; служит фактором риска тяжелого течения и неблагоприятного исхода инфекционных болезней, таких как COVID-19. Регенерация Т-лимфоцитов представляет собой сложный многоуровневый процесс, многие вопросы которого пока остаются без ответа. В обзоре рассмотрены два основных пути увеличения численности Т-клеток при лимфопении: продукция в тимусе и гомеостатическая пролиферация на периферии. Суммированы данные литературы о сигналах, регулирующих работу каждого из путей. Проанализирован их вклад в количественное и качественное восстановление пула иммунных клеток. Рассмотрены особенности регенерации Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>.

**Ключевые слова:** лимфопения, регенерация, Т-лимфоциты, тимус, гомеостатическая пролиферация

**DOI:** 10.31857/S0041377122020055

Дефицит Т-лимфоцитов — лимфопения — развивается под действием различных факторов: инфекций вирусной и бактериальной природы, генетических и аутоиммунных заболеваний, доброкачественных и злокачественных опухолей, травм и оперативных вмешательств, лекарственных препаратов и ионизирующей радиации (Вагутин, Ещенко, 2016). Хотя кратковременная лимфопения не представляет опасности для здоровья, приняв хроническую форму, это состояние увеличивает риск смерти от различных причин, в том числе онкологических, сердечно-сосудистых и респираторных заболеваний (Warny et al., 2020). Примечательно, что у пациентов, госпитализированных с COVID-19, лимфопения также является надежным прогностическим маркером тяжелого течения и неблагоприятного исхода заболевания (Lee et al., 2021; Zaboli et al., 2021).

Регенерация Т-лимфоцитов обеспечивается работой сразу двух механизмов (Maskall et al., 1997b). Первый — созревание костномозговых клеток-предшественников в тимусе. Второй — независимое от тимуса деление зрелых Т-лимфоцитов на периферии (так называемая гомеостатическая пролиферация). Два пути регенерации Т-клеток работают одновре-

менно, но их вклад в восстановление иммунной системы различен. В обзоре рассмотрены сигналы, регулирующие работу двух путей регенерации Т-лимфоцитов; вопросы количественного и качественного восстановления пула Т-клеток; особенности выполнения дефицита Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>.

### ПУСКОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГЕНЕРАЦИИ Т-КЛЕТОК ПРИ ЛИМФОПЕНИИ

Вилочковая железа является относительно автономной структурой и слабо реагирует на потребность организма в Т-лимфоцитах (Berzins et al., 1998). В течение суток тимус производит количество наивных Т-клеток, равное приблизительно 1% имеющихся в нем тимоцитов (Scollay et al., 1980). Экспериментально установлено, что присутствие в организме дополнительных тимусов, пересаженных от сингенных животных, не влияет на продуктивную функцию или размер собственной вилочковой железы реципиента (Metcalf, 1963; Berzins et al., 1998). Все приживленные тимусы работают автономно, а количество зрелых Т-лимфоцитов на периферии не скачивается на продукции наивных Т-клеток.

В свою очередь, гомеостатическая пролиферация Т-лимфоцитов запускается не сама по себе. Доля делющихся во вторичных лимфоидных органах Т-клеток непременно увеличивается на фоне снижения их абсолютного количества (Ge et al., 2002; Williams et al., 2007; Митин и др., 2013). При этом сигналы, запус-

**Принятые сокращения:** ИЛ — интерлейкин; ТКР — Т-клеточный рецептор; CFSE — 5(6)-карбоксифлуоресцеиндиацетат-п-сукцинимидиловый эфир, IFN $\gamma$  — интерферон гамма; МНС — главный комплекс гистосовместимости; TREC — эксцизионные кольца Т-клеточного рецептора.

кающие гомеостатическое деление Т-лимфоцитов, не до конца изучены.

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что для запуска процесса гомеостатической пролиферации клеткам необходимы сигналы, поступающие через разные каналы, в том числе Т-клеточный рецептор (ТКР), рецепторы цитокинов и рецепторы костимулирующих молекул. Так, гомеостатическое деление наивных Т-лимфоцитов зависит от взаимодействия их ТКР с пептидами, представленными в составе молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) (Kierer, Jameson, 1999). Важную роль в этом процессе играют белки, обеспечивающие селекцию клеток в тимусе (Goldrath, Bevan, 1999; Min et al., 2005; Epouz et al., 2012). Такие пептиды обладают низким родством к ТКР. В норме обеспечиваемая ими субпотимальная стимуляция поддерживает жизнеспособность зрелых периферических Т-клеток. Однако при лимфопении даже эти слабые взаимодействия могут инициировать митоз Т-лимфоцитов. Кроме того, сигналы, запускающие гомеостатическую пролиферацию, могут поступать от комменсальных микроорганизмов. В экспериментах с сублетально облученными Rag1<sup>-/-</sup> мышами-гнотобионтами было установлено, что отсутствие антигенов нормальной микрофлоры сопровождается снижением интенсивности гомеостатического деления адоптивно перенесенных Т-клеток (Kierer et al., 2005). Примечательно, что, в отличие от наивных Т-лимфоцитов, Т-клетки памяти способны вступать в процесс гомеостатического деления независимо от сигналов, поступающих через ТКР (Geginat et al., 2001, 2003).

Для гомеостатической пролиферации клеток необходимы цитокины с общей  $\gamma$ -цепью, среди которых наибольшим значением для Т-лимфоцитов обладает интерлейкин-7 (ИЛ-7) (Ku et al., 2000; Schluns et al., 2000; Fry, Mackall, 2001; Tan et al., 2001). При лимфопении содержание ИЛ-7 в сыворотке крови увеличивается, что чаще всего связано с дефицитом потребляющих цитокин клеток (Bolotin et al., 1999; Guimond et al., 2009). Высокие концентрации ИЛ-7 снижают порог чувствительности Т-лимфоцитов к активации *in vitro* (Porter et al., 2001). По-видимому, данный феномен способствует пролиферации наивных Т-клеток в ответ на субоптимальную стимуляцию аутологичными пептидами и продуктами комменсальных микроорганизмов. В экспериментах с Rag2<sup>-/-</sup>-животными было показано, что под действием ИЛ-7 в Т-лимфоцитах увеличивается уровень экспрессии антиапоптотических факторов и растет скорость деградации ингибитора клеточного цикла p27Kip1 (Li et al., 2006). Эти факторы способствуют выживанию присутствующих на периферии Т-клеток. ИЛ-7 имеет настолько выраженное действие на Т-лимфоциты, что его введение сопровождается увеличением численности иммунных клеток даже у мышей без лимфопении (Min et al., 2005). В свою очередь, снижение доступности ИЛ-7 при бло-

кировании альфа-цепи цитокинового рецептора (CD127) ограничивает гомеостатическую пролиферацию Т-клеток при их адоптивном переносе сублетально облученным Rag2<sup>-/-</sup> мышам.

В ряде исследований блокирование CD127 не влияло на гомеостатическую пролиферацию адоптивно перенесенных Т-лимфоцитов (Schluns et al., 2000; Min et al., 2003). Это и другие несоответствия результатов экспериментов привели к выводу, что под понятием “гомеостатическая пролиферация” скрываются сразу два процесса, запускающихся в условиях лимфопении: быстрое и медленное деление Т-клеток (Min et al., 2005). Быстрая гомеостатическая пролиферация Т-лимфоцитов, также известная как спонтанная или эндогенная, характерна для глубокой лимфопении. Клетки делятся каждый день; часто по несколько раз в сутки. В свою очередь, медленная гомеостатическая пролиферация Т-лимфоцитов характерна для условий умеренной или физиологической лимфопении. Клетки делятся один раз в течение 2–4 сут или реже. Известные к настоящему времени характеристики каждого из типов гомеостатической пролиферации суммированы в табл. 1 и будут рассмотрены далее.

В запуске гомеостатической пролиферации могут участвовать сигналы, поступающие через костимулирующую молекулу CD28. Большинство исследований свидетельствуют о том, что блокирование взаимодействия CD28 с лигандом снижает интенсивность гомеостатического деления Т-лимфоцитов (Gudmundsdottir, Turka, 2001; Min et al., 2003; Hagen et al., 2004). Вместе с тем, костимулирующие сигналы через CD28 не всегда являются лимитирующим фактором для запуска гомеостатической пролиферации Т-клеток (Prlic et al., 2001). Выявленные различия могут быть связаны с использованием разных моделей лимфопении, в которых большее значение для регенерации Т-клеток имеют быстрая (CD28-зависимая) или медленная (CD28-независимая) гомеостатическая пролиферация.

Таким образом, в условиях Т-лимфопении регенерация иммунной системы включает одновременно два пути: продукцию клеток в тимусе и гомеостатическую пролиферацию лимфоцитов на периферии. Каждый из них регулируется собственным набором сигналов. Следует отметить, что парциальный вклад двух путей может меняться в зависимости от ситуации. При этом увеличение численности Т-клеток посредством того, или иного механизма накладывает свой отпечаток на формируемый пул лимфоцитов.

## КОЛИЧЕСТВЕННАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Тимус играет центральную роль в первоначальном формировании пула Т-лимфоцитов. В 60-х годах прошлого века Жак Миллер (Miller, 1961) пока-

**Таблица 1.** Основные характеристики быстрой и медленной гомеостатической пролиферации Т-лимфоцитов

Параметр	Быстрая пролиферация (спонтанная/эндогенная) при тяжелой лимфопении	Медленная пролиферация при умеренной/физиологической лимфопении
Интенсивность деления	1 раз за 1 сут или чаще	1 раз за 2–4 сут или реже
Зависимость от цитокинов	–	ИЛ-7
Зависимость от взаимодействия с комплексом пептид/МНС	+	+
Зависимость от собственных или пищевых антигенов	+	+
Зависимость от антигенов комменсальных бактерий	+	?
Аффинность ТКР	Высокая	Умеренная или низкая
Зависимость от костимуляции CD28	+	–
Зависимость от разнообразия ТКР периферических клеток	+	–
Предмет конкуренции	Специфический сайт связывания Свойства делящихся клеток	Растворимый неспецифический стимул
Активационные маркеры	CD25 <sup>+/-</sup> CD69 <sup>-</sup>	CD25 <sup>-</sup> CD69 <sup>-</sup>
Дифференцировка	Эффекторы или клетки памяти (CD44 <sup>bright</sup> CD62L <sup>-</sup> ), регуляторные Т-клетки	Клетки наивные или подобные памяти или памяти (CD44 <sup>+/-</sup> CD62L <sup>+</sup> ), которые могут вернуть фенотип наивных лимфоцитов
Продукция цитокинов после стимуляции	IFN $\gamma$ , ИЛ-2	ИЛ-2
Способность к локализации в нелимфоидных тканях	+	–
Склонность к развитию аутоиммунных заболеваний	Увеличивает	Увеличивает

Примечание. ТКР – Т-клеточный рецептор; МНС – молекулы главного комплекса гистосовместимости; IFN $\gamma$  – интерферон гамма, ИЛ-2 – интерлейкин-2.

зал, что тимэктомия в ранний неонатальный период приводит к развитию глубокой лимфопении и серьезных иммунологических дефектов у взрослых животных. Далее в большой серии экспериментов было продемонстрировано, что тимус обеспечивает микроокружение, необходимое костномозговым клеткам-предшественникам для созревания и селекции клонов, способных к низкоаффинным взаимодействиям с собственными пептидами, презентированными в составе МНС (von Boehmer et al., 1989). Другими словами, в новорожденном организме тимус обеспечивает формирование пула CD45RA-позитивных наивных CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, экспрессирующих широкий репертуар Т-клеточных рецепторов.

Эксперименты с пересадкой обедненного Т-клетками костного мозга взрослым, летально облученным эутимическим и бестимульным мышам показали, что вилочковая железа участвует в формировании пула Т-лимфоцитов не только в неонатальный период, но и в более зрелом возрасте (Miller, 1962;

Zinkernagel et al., 1980). На основе этих данных было выдвинуто предположение, что возрастная инволюция тимуса может снижать регенеративный потенциал Т-лимфоцитов. Представленная гипотеза была подтверждена клиническими данными: возраст пациентов отрицательно сказывался на способности пула CD4<sup>+</sup>-Т-клеток к восстановлению. Так, у детей после интенсивной химиотерапии и пересадки костного мозга часто увеличивался тимус, что было сопряжено с относительно быстрым приростом количества наивных CD4<sup>+</sup>-Т-клеток (Mackall et al., 1995; Storek et al., 1995; Weinberg et al., 1995). Напротив, у взрослых восстановительный период был замедлен и не сопровождался увеличением размера вилочковой железы (Forman et al., 1982; Mackall et al., 1995; Moreland et al., 1994; Storek et al., 1995).

В свою очередь, способность Т-лимфоцитов к гомеостатической пролиферации не зависит от возраста. Так, большинство приведенных выше публикаций исследуют вопрос регенерации иммунной системы у взрослых особей. Однако перенос наивных

Т-клеток новорожденным мышам с еще несформированным пулом периферических Т-лимфоцитов также приводит к гомеостатической экспансии клеток (Min et al., 2003): в течение 16–18 сут перенесенные лимфоциты делятся 7 и более раз. Интенсивность гомеостатической пролиферации перенесенных клеток снижается по мере естественного наполнения пула периферических Т-клеток тимическими мигрантами (Mackall et al., 1993, 1997b). Поэтому гомеостатическая, индуцированная лимфопенией, пролиферация — это не только ответ на повреждение пула Т-лимфоцитов, но и важный физиологический процесс, протекающий в здоровом организме любого возраста.

Масштаб вовлеченности Т-клеток в гомеостатическое деление соответствует глубине иммунодефицитного состояния (Dummer et al., 2002). В этой работе авторы адоптивно переносили разные количества клеток B6.PL (Thy1.1<sup>+</sup>) сублетально облученным и интактным мышам C57BL/6 (Thy1.2<sup>+</sup>). На седьмой день после переноса было отмечено, что введение Т-лимфоцитов интактным животным не вызывает клеточного деления. Напротив, у облученных мышей адоптивный перенос приводит к интенсивной гомеостатической пролиферации Thy1.1-позитивных CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов. При этом с увеличением размера инокулята доля пролиферирующих клеток Thy1.1<sup>+</sup> снижалась, уменьшалось количество пройденных лимфоцитами митозов. Через 10 нед. наблюдений абсолютная численность периферических Т-лимфоцитов в крови всех облученных мышей достигала значений, характерных для интактных животных, что свидетельствовало о реконструкции иммунной системы (Dummer et al., 2002). Аналогичные результаты были получены и другими авторами (Min et al., 2004), которые адоптивно переносили Rag2<sup>-/-</sup>-мышам CD4<sup>+</sup>-Т-клетки, количество которых варьировало от 10<sup>4</sup> до 10<sup>7</sup>. Через 1–2 мес, оценивая количество этих лимфоцитов в лимфатических узлах и селезенке животных, авторы отметили, что вне зависимости от размера инокулята количество CD4<sup>+</sup>-Т-клеток было сопоставимо с таковым у интактных здоровых мышей (Min et al., 2004). Так как тимус Rag2<sup>-/-</sup>-животных не производит Т-клеток, увеличение их числа происходит исключительно посредством гомеостатической пролиферации. Было установлено, что делящиеся на периферии зрелые Т-клетки способны увеличить свое количество в 10–800 тысяч раз (Miller, Stutman, 1984; Rocha et al., 1989).

Следует отметить, что гомеостатическая пролиферация не всегда способна полностью восстановить пул Т-лимфоцитов. Так, однократное введение мышам циклофосфана приводит к снижению абсолютного количества Т-клеток в вилочковой железе и селезенке (Гринько и др., 2020). Но, если в тимусе животных численность Т-лимфоцитов восстанавливается уже на 20-е сутки, то в селезенке этот процесс замедлен. Спустя 2 мес. общее количество CD4<sup>+</sup>-

клеток достигает значений, характерных для контрольных животных, однако численность наивной субпопуляции Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> остается сниженной. Эти наблюдения поднимают вопрос о том, насколько пул Т-клеток, формируемый под давлением лимфопении, соответствует таковому в нормально функционирующей иммунной системе.

## КАЧЕСТВЕННАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ Т-КЛЕТОК

Как было отмечено выше, адоптивный перенос наивных Т-клеток новорожденным мышам, у которых еще не сформирован собственный пул периферических Т-лимфоцитов, сопровождается гомеостатическим делением перенесенных клеток (Min et al., 2003). Пролиферирующие в этих условиях наивные Т-лимфоциты не сохраняют свой фенотип, но приобретают характеристики, свойственные клеткам памяти, а именно: экспрессируют соответствующие поверхностные маркеры (CD44) и обретают способность к продукции интерферона гамма (IFN $\gamma$ ). Конверсия фенотипа и изменение функциональности Т-клеток, претерпевших гомеостатическое деление, были отмечены целым рядом исследователей (Oehen, Brduscha-Riem, 1999; Murali-Krishna, Ahmed, 2000; Masopust et al., 2001; Dummer et al., 2002; Ge et al., 2002; Min et al., 2003). В некоторых работах клетки, конвертировавшие фенотип при гомеостатической пролиферации, даже называют “суррогатными” и отличают от “истинных” — сформированных в ответ на антиген — Т-клеток памяти (Lee et al., 2013; White et al., 2016).

Конверсия фенотипа, в большей мере, характерна для Т-клеток, прошедших через быстрое гомеостатическое деление. В свою очередь, медленная гомеостатическая пролиферация эффективно поддерживает пул иммуноцитов с фенотипом и функциональными характеристиками наивных Т-лимфоцитов (Hazenberget al., 2004; Vains et al., 2009). Так, у взрослых людей до 90% наивных Т-клеток формируются посредством их пролиферации на периферии (den Braber et al., 2012). Вследствие этого с возрастом у людей содержание молекул TREC среди наивных Т-лимфоцитов сокращается на 90–99% (Jamieson et al., 1999; Harris et al., 2005; Kilpatrick et al., 2008). Молекулы TREC (от англ.: T-cell receptor excision circles — эксцизионные кольца ТКР) формируются во время реаранжировки сегментов генов Т-клеточного рецептора в вилочковой железе и служат маркерами тимического происхождения лимфоцитов (Douek et al., 1998). Следует отметить, что доля TREC-позитивных клеток снижается как среди CD31-негативных, так и среди CD31-позитивных наивных CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов (Kilpatrick et al., 2008). Можно сделать вывод, что даже так называемые CD31<sup>+</sup> “тимические мигранты”, которые принято считать выходцами из тимуса, частично продуцируются посредством периферического деления наивных Т-клеток.

Важно, что формирование генов, кодирующих цепи ТКР, происходит исключительно в тимусе. У взрослых вилочковая железа производит ограниченное количество новых, разнообразных по специфичности, наивных Т-клеток. Поэтому регенерация пула Т-лимфоцитов, в основном, происходит за счет деления ограниченного количества присутствующих на периферии клонов (Mackall et al., 1996). Логичным итогом такой пролиферации является постепенное искажение и сужение репертуара антигенраспознающих рецепторов пула Т-лимфоцитов. Было показано, что у взрослых ВИЧ-инфицированных субъектов сужен репертуар ТКР (Connors et al., 1997; Gea-Banacloche et al., 1998), что подтверждает происхождение Т-клеток этих больных из малого количества пролиферирующих на периферии лимфоцитов.

Лимфопения, индуцированная применением моноклональных анти-CDw52 антител для лечения ревматоидного артрита, также приводит к формированию пула Т-клеток, характеризующегося низким разнообразием ТКР (Jendro et al., 1995). Аналогичные результаты были получены при анализе репертуара Т-клеток, формируемых при первоначальной (происходящей за счет экспансии зрелых Т-лимфоцитов донора) регенерации, следующей за трансплантацией костного мозга (Gorski et al., 1994; Masuko et al., 1996; Roux et al., 1996). Интересные данные также представлены в работах, выполненных с использованием животных моделей (Min et al., 2004). Исследователи вводили  $10^4$ – $10^7$  CD4<sup>+</sup>-Т-клеток Rag2<sup>-/-</sup>-мышам и отмечали, что после регенерации пулы Т-лимфоцитов животных разных групп существенно отличались по разнообразию ТКР. У мышей, которым перенесли  $10^7$  Т-лимфоцитов, этот показатель был выше, чем у животных, получивших меньшее число клеток. Вместе с тем, абсолютное количество CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов было сопоставимым у мышей разных групп. Сужение репертуара ТКР вследствие гомеостатической пролиферации может снижать эффективность иммунного ответа (Fry et al., 2001). В представленном исследовании тимэктомизированным самкам мышей, более 98% Т-клеток которых было удалено введением анти-CD4 и анти-CD8 антител, трансплантировали кожные лоскуты самцов. В норме такие трансплантаты должны отторгаться из-за несовместимости по H-Y антигену. Однако адоптивный перенос  $10^6$  сингенных Т-лимфоцитов и численная регенерация пула Т-клеток не приводили к функциональной реконструкции иммунной системы мышей: у животных не развивалась реакция отторжения трансплантата вопреки отсутствию лимфопении. Увеличение размера инокулята способствовало более эффективному иммунному ответу, а оптимальный иммунный ответ был достигнут при размере инокулята равном десятой части от общего числа Т-клеток в интактном организме. Представленные данные позволяют прийти к за-

ключению, что в отсутствие тимуса периферическая экспансия может восстановить не только численность Т-лимфоцитов, но и их способность к развитию иммунного ответа на антигены. Вместе с тем, регенерация пула Т-лимфоцитов из состояния глубокой лимфопении в сочетании с отсутствием возможности обогатить репертуар ТКР может приводить к снижению устойчивости организма к патогенам и опухолям, ускорять развитие старческого иммунодефицита (Roux et al., 2000; Козлов, 2014).

Гомеостатическая пролиферация негативно влияет на жизнеспособность Т-клеток. Было отмечено, что у мышей с генетически обусловленной лимфопенией гомеостатическое деление Т-лимфоцитов часто сопровождается их гибелью, что препятствует накоплению клеток и восстановлению иммунной системы (Goldrath et al., 2000). Математическая модель, созданная на основе экспериментов, подтвердила, что вызванное лимфопенией деление Т-лимфоцитов сопровождается активной гибелью этих клеток (Min et al., 2004). Исследователи рассудили, что если всего 1% адоптивно перенесенных Т-клеток совершит 7 митозов, то количество поделившихся лимфоцитов увеличится в 128 раз и существенно сузит репертуар присутствующих в организме клонов. Вместе с тем, пул Т-клеток, формируемый в этих условиях, обычно характеризуется относительно широким разнообразием ТКР. Следовательно, наполняющие его клетки не могут быть потомками малого числа лимфоцитов. Так как регенерация приводит к формированию ограниченного по размеру пула Т-клеток, исследователи считают, что в процессе гомеостатического деления происходит активная гибель Т-лимфоцитов. Действительно, по сравнению с клетками, не принимавшими участие в процессе гомеостатической пролиферации, регенерирующие Т-лимфоциты более склонны к активационно-индуцированному апоптозу (Fry et al., 2001). Следует принять во внимание и то, что интенсивное деление Т-лимфоцитов приводит к уменьшению длины теломер и снижению “запаса” пролиферативной способности клеток. Этот феномен, известный как репликативное старение, был выявлен и у CD4-позитивных, и у CD8-позитивных Т-лимфоцитов, пролиферирующих в условиях лимфопении (Weng, 2008).

Еще один значимый эффект регенерации Т-клеток посредством гомеостатической пролиферации — увеличение вероятности развития аутоиммунных заболеваний. Так как взаимодействие с собственными пептидами является одним из важных этапов запуска гомеостатической пролиферации Т-лимфоцитов, в процесс деления чаще вступают клоны, несущие ТКР с более высокой аффинностью к собственным пептидам. Сужая репертуар ТКР и провоцируя увеличение количества аутореактивных клонов, гомеостатическая пролиферация, индуцированная лимфопенией, постепенно создает благоприятные условия для развития аутоиммунных заболеваний, таких

как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, диабет I типа и др. (Schulze-Koops, 2004; Datta, Sarvetnick, 2009). Эти эффекты были неоднократно отмечены в клинической практике при применении облучения, химиотерапии и иммуносупрессивной терапии (King et al., 2004; Marleau, Sarvetnick, 2005; Vaccala, Theofilopoulos, 2005; Khoruts, Fraser, 2005; Krupica et al., 2006).

Таким образом, тимусзависимый механизм регенерации Т-лимфоцитов обеспечивает полноценное восстановление иммунной системы, благодаря формированию новых Т-клеток разнообразной специфичности. Однако этот путь имеет приоритетное значение лишь в ранний период жизни, а с возрастом его вклад в регенерацию иммунной системы снижается. В свою очередь, гомеостатическая пролиферация поддерживает многочисленный и разнообразный по специфичности ТКР пул Т-лимфоцитов на протяжении всей жизни организма. Вместе с тем, эффективность регенерации иммунной системы посредством гомеостатического деления в значительной мере зависит от состояния и разнообразия сохранившихся на периферии Т-клеток. После глубокой лимфопении гомеостатическая пролиферация формирует пул Т-лимфоцитов с узким репертуаром ТКР, высокой склонностью к ответу на аутоантигены и низкой жизнеспособностью. В связи с этим гомеостатическую пролиферацию иногда рассматривают в качестве негативного феномена (Vaccala, Theofilopoulos, 2005; Козлов, 2006).

#### ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ CD4- И CD8-ПОЗИТИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Примечательно, что в большинстве случаев лимфопения является следствием недостатка численности CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, а избирательный дефицит CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов встречается редко (Societies, 1999). Так, у онкологических больных химиотерапия приводит к кратковременному уменьшению числа CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и естественных киллеров, но к долговременному дефициту CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, число которых не восстанавливается до исходного уровня даже спустя год после завершения лечения (Maskall et al., 1997a). После трансплантации костного мозга (стволовых кроветворных клеток) численность Т-лимфоцитов CD8<sup>+</sup> также восстанавливается значительно быстрее, чем количество CD4<sup>+</sup>-Т-клеток (Atkinson et al., 1982; Forman et al., 1982; Favrot et al., 1983; Guillaume et al., 1998).

В экспериментах с сублетально облученными мышами было показано, что через 4 сут после введения Т-клеток лимфоциты активно пролиферируют в лимфатических узлах и селезенке (Митин и др., 2014). При этом доля делящихся CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов в два раза превосходит соответствующие значения CD4<sup>+</sup>-Т-клеток. Математическое моделирова-

ние процесса регенерации Т-лимфоцитов после химиотерапии также показало, что средняя скорость прироста числа CD8<sup>+</sup>-Т-клеток ( $0.085 \pm 0.035$  кл./сут) в 3.1 раза выше соответствующих значений CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов ( $0.027 \pm 0.007$  кл.к/сут) (Maskall et al., 1997a). Среднее время удвоения количества клеток при регенерации в той же работе составила 12.6 и 28.2 дня для CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов соответственно. Наиболее быстрый прирост количества наблюдали для Т-лимфоцитов CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>. В свою очередь, численность CD28<sup>+</sup>- и CD45RA<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Т-клеток увеличивалась соизмеримо с приростом числа CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов. Примечательно, что в отличие от Т-клеток CD4<sup>+</sup> и их наивной субпопуляции, регенерация которых негативно коррелировала с возрастом пациентов, прирост CD8<sup>+</sup>-Т-клеток и наивных CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов не был связан ни с возрастом больных, ни с размерами их вилочковых желез. Эти данные позволяют сделать вывод, что регенерация CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов при лимфопении в значительной мере зависит от тимуса. В свою очередь, CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоциты, особенно их высокодифференцированные субпопуляции, активно делятся на периферии, чем восполняют утраченные клетки.

Описанные выше особенности гомеостатической пролиферации могут иметь серьезные последствия. Так, субпопуляции Т-лимфоцитов CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> и CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> характеризуются измененной функциональностью, низкой жизнеспособностью и нарушенной пролиферативной активностью после стимуляции через ТКР (Lum et al., 1982; Damle, Engleman, 1983; Autran et al., 1991). Более того, узкий репертуар антигенраспознающих рецепторов, свойственный CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> и CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>-Т-клеткам (Gorochov et al., 1994; Posnett et al., 1994), может ограничивать их функциональность в качестве эффекторов. В совокупности эти факторы снижают способность организма противостоять онкологическим заболеваниям и уменьшают эффективность основанной на стимуляции иммунитета противораковой терапии.

Различия в регенерации CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток в условиях лимфопении могут быть связаны с характеристиками жизнеспособности отдельных субпопуляций лимфоцитов. Было установлено, что у мышей продолжительность жизни наивных CD4<sup>+</sup>-Т-клеток значительно меньше, чем наивных CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов (den Braber et al., 2012). Гибель Т-клеток в процессе гомеостатической пролиферации также повышена среди CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов по сравнению с CD8<sup>+</sup>-Т-клетками (Fortner et al., 2010). Поддержание жизнеспособности Т-клеток — это активный процесс (Raff, 1992). Лимфоциты получают сигналы для выживания, взаимодействуя с клетками, экспрессирующими МНС I или II класса (Brocker, 1997; Kirberg et al., 1997; Tanchot et al., 1997). В отсутствие этих взаимо-

действий, зрелые CD4-позитивные и CD8-позитивные Т-клетки не способны сохраняться в циркуляции более нескольких недель. При этом скорость исчезновения CD4<sup>+</sup>-Т-клеток выше таковой у CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов (Nešić, Vukmanović, 1998). Следует отметить, что условия для получения сигналов на выживание отличны для Т-клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> (Kieper et al., 2004). Так, CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитам необходим прямой тесный контакт с дендритными клетками во вторичных лимфоидных органах (Brocker, 1997), а CD8<sup>+</sup>-Т-клеткам достаточно контакта с любыми клетками даже вне лимфоидных тканей (Dai, Lakkis, 2001).

Не только жизнеспособность, но и гомеостатическая пролиферация Т-лимфоцитов зависит от их взаимодействия с пептидами, представленными в составе МНС (Mackall et al., 1996). Деление CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов может запуститься при контакте с любыми МНС I класса внутри и вне лимфоидных органов, а индукция гомеостатического деления CD4<sup>+</sup>-Т-клеток возможна только при участии МНС II класса на антигенпрезентирующих клетках, располагающихся в Т-зависимых зонах вторичных лимфоидных органов (Dai, Lakkis, 2001). По-видимому, этим можно объяснить тот факт, что CD8<sup>+</sup>-Т-клетки вступают в гомеостатическое деление раньше, чем CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоциты и делятся более интенсивно (Jameson, 2002).

Следует отметить, что субпопуляции CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов занимают схожие ниши, и, следовательно, конкурируют при регенерации (Fregitas, Rocha, 2000; Dummer et al., 2001). При этом избирательный дефицит Т-клеток CD4<sup>+</sup> компенсируется пролиферацией обеих субпопуляций, а дефицит Т-лимфоцитов CD8<sup>+</sup> — преимущественно CD8<sup>+</sup>-Т-клетками (Cosgrove et al., 1991; Rahemtulla et al., 1991; Ge et al., 2001). Внесение в лимфопеничное животное CFSE-меченых Т-лимфоцитов совместно с большим количеством немеченых CD4<sup>+</sup>-Т-клеток приводит к снижению интенсивности гомеостатической пролиферации CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup>, но не CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup>-Т-клеток (Ernst et al., 1999). В свою очередь, такая же ситуация, но с избытком Т-лимфоцитов CD8<sup>+</sup> приводит к подавлению гомеостатического деления всех CFSE<sup>+</sup>-Т-клеток. По-видимому, в условиях лимфопении CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоциты имеют конкурентное преимущество над CD4<sup>+</sup>-Т-клетками.

Таким образом, Т-лимфоциты CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> располагаются в пределах одной ниши иммунной системы. Вместе с тем, эти клетки имеют особенности, оказывающие значительное влияние на их регенерацию в условиях лимфопении. Так, CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоциты по сравнению с CD8<sup>+</sup>-Т-клетками имеют более жесткие требования для получения сигналов, способствующих выживанию и запускающих пролиферацию; характеризуются меньшей жизнеспособностью

в покое и активированном состоянии; не могут столь же продуктивно делиться и увеличивать свою численность за счет гомеостатической пролиферации. Эти особенности делают Т-лимфоциты CD4<sup>+</sup> менее конкурентоспособными, чем CD8<sup>+</sup>-Т-клетки, что, по-видимому, определяет широкую распространенность избирательного дефицита CD4-позитивных, но не CD8-позитивных Т-клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, можно сделать следующее заключение. Для полноценной регенерации Т-лимфоцитов при лимфопении необходимо участие двух механизмов: продукции клеток в тимусе и их гомеостатической пролиферации. Парциальный вклад каждого механизма в восстановление иммунной системы зависит от многих факторов и может существенно отличаться. В тимусе создаются долгоживущие наивные Т-клетки с широким репертуаром антигенраспознающих рецепторов, но, претерпевая инволюцию, этот первичный лимфоидный орган снижает свою продуктивную функцию. Напротив, гомеостатическая пролиферация вне зависимости от возраста организма преумножает имеющиеся на периферии Т-лимфоциты, но может сокращать их разнообразие и снижать жизнеспособность.

Несмотря на многочисленные исследования, процесс регенерации Т-клеток при лимфопении таит в себе много неразрешенных вопросов. Во-первых, существует ли возможность восстановления функциональной активности тимуса у людей старшего возраста? Хотя было показано, что возрастную инволюцию вилочковой железы можно регулировать применением фактора роста кератиноцитов и ряда интерлейкинов (ИЛ-7, ИЛ-12 и ИЛ-15), депривацией стероидных половых гормонов и увеличением уровня экспрессии транскрипционного фактора Foxn1 на эпителиальных клетках (Holland, van den Brink, 2009; Bredenkamp et al., 2014), действенные подходы к восстановлению продуктивной функции железы не разработаны. Во-вторых, какова биологическая роль феномена конверсии фенотипа Т-клеток? Какие молекулярные механизмы запускают дифференцировку наивных Т-лимфоцитов во время гомеостатической пролиферации? Какую роль играют суррогатные Т-клетки памяти и формирующиеся в процессе гомеостатического деления регуляторные Т-лимфоциты в поддержании иммунного гомеостаза организма? В-третьих, существует ли возможность избежать негативных эффектов гомеостатической пролиферации при регенерации иммунной системы из состояния глубокой лимфопении? Какие подходы позволят повысить жизнеспособность делящихся Т-клеток и тем самым увеличить эффективность восстановления иммунной системы? Решение поставленных вопросов откроет новые возможности для поддержания иммунной системы у лиц с лимфо-

пенией различного генеза и позволит перейти к разработке терапевтических подходов, снижающих риск заболеваемости и смертности, а также увеличивающих продолжительность и качество жизни людей.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания «Роль метаболизма CD4<sup>+</sup>-Т-клеток памяти в нарушении регенерации иммунитета у ВИЧ-инфицированных пациентов на фоне антиретровирусной терапии», номер государственной регистрации темы: 121112500044-9.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не участвовали животные или люди в качестве экспериментальных объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Сайдакова Е.В. является единственным автором статьи и не имеет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ватутин Н.Т., Ещенко Е.В.* 2016. Лимфопения: основные причины развития. Архивъ внутренней медицины. Т. 6. С. 22. (*Vatutin N.T., Yeshchenko Y.V.* 2016. Lymphopenia: the main causes. The Russian Archives of Internal Medicine. V. 6 P. 22.)
- Гринько Е.К., Донецкова А.Д., Мухина Е.А., Андреева О.С., Шарова Н.И., Комогорова В.В., Литвина М.М., Марзанова С.Н., Митин А.Н.* 2020. Динамика восстановления Т-лимфоцитов после индукции лимфопении циклофосфаном. Иммунология. Т. 41. С. 285. (*Grinko E.K., Donetskova A.D., Mukhina E.A., Andreeva O.S., Sharova N.I., Komogorova V.V., Litvina M.M., Marzanova S.N., Mitin A.N.* 2020. Dynamics of T-lymphocytes regeneration after lymphopenia induction by cyclophosphane. Immunology. V.41. P. 285.)
- Козлов В.А.* 2006. Гомеостатическая пролиферация лимфоцитов в аспекте иммунопатогенеза различных заболеваний. Иммунология. Т. 27. С. 378. (*Kozlov V.A.* 2006. Homeostatic lymphocyte proliferation in immunopathogenesis aspect of different diseases. Immunology. V. 27. P. 378.)
- Козлов В.А.* 2014. Гомеостатическая пролиферация как основа неизбежного формирования тотального иммунодефицита. Медицинская иммунология. Т. 16. С. 403. (*Kozlov V.A.* 2014. Homeostatic proliferation as a basis for the inevitable formation of total immunodeficiency. Med. Immunol. (Russia). V. 16. P. 403.)
- Митин А.Н., Литвина М.М., Комогорова В.В., Шарова Н.И., Ярилин А.А.* 2013. Вклад гомеостатической пролиферации и связанных с ней процессов в восстановление популяции периферических Т-клеток в условиях лимфопении, индуцированной облучением. Иммунология. Т. 34. С. 242. (*Mitin A.N., Litvina M.M., Komogorova V.V., Sharova N.I., Yarilin A.A.* 2013. Contribution of homeostatic proliferation and related processes to restoration of peripheral T cell population in irradiation induced lymphopenia. Immunology. V. 34. P. 242.)
- Митин А.Н., Литвина М.М., Комогорова В.В., Шевелев С.В., Шарова Н.И., Ярилин А.А.* 2014. Конверсия фенотипа наивных Т-клеток в Т-клетки памяти при адоптивном переносе сублетально облученным мышам. Иммунология. Т. 35. С. 225. (*Mitin A.N., Litvina M.M., Komogorova V.V., Shevelev S.V., Sharova N.I., Yarilin A.A.* 2014. Phenotypic conversion of naive T-cells in central memory T-cells after adoptive transfer to sublethally irradiated mice. Immunology. V. 35. P. 225.)
- Atkinson K., Hansen J.A., Storb R., Goehle S., Goldstein G., Thomas E.D.* 1982. T-cell subpopulations identified by monoclonal antibodies after human marrow transplantation. I. Helper-inducer and cytotoxic-suppressor subsets. Blood. V. 59. P. 1292.
- Autran B., Leblond V., Sadat-Sowti B., Lefranc E., Got P., Sutton L., Binet J.L., Debre P.* 1991. A soluble factor released by CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> lymphocytes from bone marrow transplanted patients inhibits cell-mediated cytotoxicity. Blood. V. 77. P. 2237.
- Baccala R., Theofilopoulos A.N.* 2005. The new paradigm of T-cell homeostatic proliferation-induced autoimmunity. Trends Immunol. V. 26. P. 5.
- Bains I., Antia R., Callard R., Yates A.J.* 2009. Quantifying the development of the peripheral naive CD4<sup>+</sup> T-cell pool in humans. Blood. V. 113. P. 5480.
- Berzins S.P., Boyd R.L., Miller J.F.* 1998. The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. J. Exp. Med. V. 187. P. 1839.
- Bolotin E., Annett G., Parkman R., Weinberg K.* 1999. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. Bone Marrow Transplantation. V. 23. P. 783.
- Bredenkamp N., Nowell C.S., Blackburn C.C.* 2014. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. Development. V. 141. P. 1627.
- Brocker T.* 1997. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. J. Exp. Med. V. 186. P. 1223.
- Connors M., Kovacs J.A., Krevat S., Gea-Banacloche J.C., Sneller M.C., Flanigan M., Metcalf J.A., Walker R.E., Falloon J., Baseler M., Feuerstein I., Masur H., Lane H.C.* 1997. HIV infection induces changes in CD4<sup>+</sup> T-cell phenotype and depletions within the CD4<sup>+</sup> T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies. Nature Medicine. V. 3. P. 533.
- Cosgrove D., Gray D., Dierich A., Kaufman J., Lemeur M., Benoist C., Mathis D.* 1991. Mice lacking MHC class II molecules. Cell. V. 66. P. 1051.
- Dai Z., Lakkis F.G.* 2001. Cutting edge: Secondary lymphoid organs are essential for maintaining the CD4, but not CD8, naive T cell pool. J. Immunol. V. 167. P. 6711.
- Damle N.K., Engleman E.G.* 1983. Immunoregulatory T cell circuits in man. Alloantigen-primed inducer T cells activate alloantigen-specific suppressor T cells in the absence of the initial antigenic stimulus. J. Exp. Med. V. 158. P. 159.
- Datta S., Sarvetnick N.* 2009. Lymphocyte proliferation in immune-mediated diseases. Trends Immunol. V. 30. P. 430.
- den Braber I., Mugwagwa T., Vrisekoop N., Westera L., Mogling R., de Boer A.B., Willems N., Schrijver E.H., Spierenburg G., Gaiser K., Mul E., Otto S.A., Ruiter A.F., Ackermans M.T.,*

- Miedema F., Borghans J.A., de Boer R.J., Tesselaar K. 2012. Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans. *Immunity*. V. 36. P. 288.
- Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H., Gage E.A., Massey J.M., Haynes B.F., Polis M.A., Haase A.T., Feinberg M.B., Sullivan J.L., Jamieson B.D., Zack J.A., Picker L.J., Koup R.A. 1998. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*. V. 396. P. 690.
- Dummer W., Ernst B., LeRoy E., Lee D., Surh C. 2001. Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment. *J. Immunol.* V. 166. P. 2460.
- Dummer W., Niethammer A.G., Baccala R., Lawson B.R., Wagner N., Reisfeld R.A., Theofilopoulos A.N. 2002. T cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity. *J. Clinical Invest.* V. 110. P. 185.
- Enouz S., Carrie L., Merkler D., Bevan M.J., Zehn D. 2012. Autoreactive T cells bypass negative selection and respond to self-antigen stimulation during infection. *J. Exper. Med.* V. 209. P. 1769.
- Ernst B., Lee D.S., Chang J.M., Sprent J., Surh C.D. 1999. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity*. V. 11. P. 173.
- Favrot M., Janossy G., Tidman N., Blacklock H., Lopez E., Bofill M., Lampert I., Morgenstein G., Powles R., Prentice H.G., et al. 1983. T cell regeneration after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin. Exp. Immunol.* V. 54. P. 59.
- Forman S.J., Nocker P., Gallagher M., Zaia J., Wright C., Bolen J., Mills B., Hecht T. 1982. Pattern of T cell reconstitution following allogeneic bone marrow transplantation for acute hematological malignancy. *Transplantation*. V. 34. P. 96.
- Fortner K.A., Bouillet P., Strasser A., Budd R.C. 2010. Apoptosis regulators Fas and Bim synergistically control T-lymphocyte homeostatic proliferation. *Eur. J. Immunol.* V. 40. P. 3043.
- Freitas A.A., Rocha B. 2000. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Ann. Rev. Immunol.* V. 18. P. 83.
- Fry T.J., Christensen B.L., Komschlies K.L., Gress R.E., Mackall C.L. 2001. Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts. *Blood*. V. 97. P. 1525.
- Fry T.J., Mackall C.L. 2001. Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol.* V. 22. P. 564.
- Ge Q., Hu H., Eisen H.N., Chen J. 2002. Different contributions of thymopoiesis and homeostasis-driven proliferation to the reconstitution of naive and memory T cell compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 99. P. 2989.
- Ge Q., Rao V.P., Cho B.K., Eisen H.N., Chen J. 2001. Dependence of lymphopenia-induced T cell proliferation on the abundance of peptide/MHC epitopes and strength of their interaction with T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 98. P. 1728.
- Gea-Banacloche J.C., Weiskopf E.E., Hallahan C., Lopez Bernaldo de Quiros J.C., Flanigan M., Micán J.M., Falloon J., Baseler M., Stevens R., Lane H.C., Connors M. 1998. Progression of human immunodeficiency virus disease is associated with increasing disruptions within the CD4+ T cell receptor repertoire. *J. Infect. Diseases*. V. 177. P. 579.
- Geginat J., Lanzavecchia A., Sallusto F. 2003. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*. V. 101. P. 4260.
- Geginat J., Sallusto F., Lanzavecchia A. 2001. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J. Exper. Med.* V. 194. P. 1711.
- Goldrath A.W., Bevan M.J. 1999. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity*. V. 11. P. 183.
- Goldrath A.W., Bogatzki L.Y., Bevan M.J. 2000. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J. Exper. Med.* V. 192. P. 557.
- Gorochov G., Debre P., Leblond V., Sadat-Sowti B., Sigaux F., Autran B. 1994. Oligoclonal expansion of CD8+ CD57+ T cells with restricted T-cell receptor beta chain variability after bone marrow transplantation. *Blood*. V. 83. P. 587.
- Gorski J., Yassai M., Zhu X., Kissella B., Kissella B., Keever C., Flomenberg N. 1994. Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status. *J. Immunol.* V. 152. P. 5109.
- Gudmundsdottir H., Turka L.A. 2001. A closer look at homeostatic proliferation of CD4+ T cells: costimulatory requirements and role in memory formation. *J. Immunol.* V. 167. P. 3699.
- Guillaume T., Rubinstein D.B., Symann M. 1998. Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. V. 92. P. 1471.
- Guimond M., Veenstra R.G., Grindler D.J., Zhang H., Cui Y., Murphy R.D., Kim S.Y., Na R., Hennighausen L., Kurtulus S., Erman B., Matzinger P., Merchant M.S., Mackall C.L. 2009. Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nature Immunol.* V. 10. P. 149.
- Hagen K.A., Moses C.T., Drasler E.F., Podetz-Pedersen K.M., Jameson S.C., Khoruts A. 2004. A role for CD28 in lymphopenia-induced proliferation of CD4 T cells. *J. Immunol.* V. 173. P. 3909.
- Harris J.M., Hazenberg M.D., Poulin J.F., Higuera-Alhino D., Schmidt D., Gotway M., McCune J.M. 2005. Multiparameter evaluation of human thymic function: Interpretations and caveats. *Clinical Immunol.* V. 115. P. 138.
- Hazenberg M.D., Otto S.A., van Rossum A.M., Scherpbier H.J., de Groot R., Kuijpers T.W., Lange J.M., Hamann D., de Boer R.J., Borghans J.A., Miedema F. 2004. Establishment of the CD4+ T-cell pool in healthy children and untreated children infected with HIV-1. *Blood*. V. 104. P. 3513.
- Holland A.M., van den Brink M.R. 2009. Rejuvenation of the aging T cell compartment. *Curr. Opin. Immunol.* V. 21. P. 454.
- Jameson S.C. 2002. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nature Reviews Immunol.* V. 2. P. 547.
- Jamieson B.D., Douek D.C., Killian S., Hultin L.E., Scripture-Adams D.D., Giorgi J.V., Marelli D., Koup R.A., Zack J.A. 1999. Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity*. V. 10. P. 569.
- Jendro M.C., Ganten T., Matteson E.L., Weyand C.M., Goronzy J.J. 1995. Emergence of oligoclonal T cell populations following therapeutic T cell depletion in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatol.* V. 38. P. 1242.

- Khoruts A., Fraser J.M.* 2005. A causal link between lymphopenia and autoimmunity. *Immunol. Letters*. V. 98. P. 23.
- Kieper W.C., Burghardt J.T., Surh C.D.* 2004. A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J. Immunol*. V. 172. P. 40.
- Kieper W.C., Jameson S.C.* 1999. Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 96. P. 13306.
- Kieper W.C., Troy A., Burghardt J.T., Ramsey C., Lee J.Y., Jiang H.Q., Dummer W., Shen H., Cebra J.J., Surh C.D.* 2005. Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion. *J. Immunol*. V. 174. P. 3158.
- Kilpatrick R.D., Rickabaugh T., Hultin L.E., Hultin P., Hausner M.A., Detels R., Phair J., Jamieson B.D.* 2008. Homeostasis of the naive CD4+ T cell compartment during aging. *J. Immunol*. V. 180. P. 1499.
- King C., Ilic A., Koelsch K., Sarvetnick N.* 2004. Homeostatic expansion of T Cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell*. V. 117. P. 265.
- Kirberg J., Berns A., von Boehmer H.* 1997. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J. Exp. Med*. V. 186. P. 1269.
- Krupica T., Jr., Fry T.J., Mackall C.L.* 2006. Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model. *Clinical Immunol*. V. 120. P. 121.
- Ku C.C., Murakami M., Sakamoto A., Kappler J., Marrack P.* 2000. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science*. V. 288. P. 675.
- Lee J., Park S.S., Kim T.Y., Lee D.G., Kim D.W.* 2021. Lymphopenia as a Biological predictor of outcomes in COVID-19 patients: A nationwide cohort study. *Cancers (Basel)*. V. 13. P. 471
- Lee J.Y., Hamilton S.E., Akue A.D., Hogquist K.A., Jameson S.C.* 2013. Virtual memory CD8 T cells display unique functional properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 110. P. 13498.
- Li W.Q., Jiang Q., Aleem E., Kaldis P., Khaled A.R., Durum S.K.* 2006. IL-7 promotes T cell proliferation through destabilization of p27Kip1. *J. Exp. Med*. V. 203. P. 573.
- Lum L.G., Orcutt-Thordarson N., Seigneuret M.C., Hansen J.A.* 1982. *In vitro* regulation of immunoglobulin synthesis by T-cell subpopulations defined by a new human T-cell antigen (9.3). *Cell. Immunol*. V. 72. P. 122.
- Mackall C.L., Bare C.V., Granger L.A., Sharrow S.O., Titus J.A., Gress R.E.* 1996. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J. Immunol*. V. 156. P. 4609.
- Mackall C.L., Fleisher T.A., Brown M.R., Andrich M.P., Chen C.C., Feuerstein I.M., Horowitz M.E., Magrath I.T., Shad A.T., Steinberg S.M. et al.* 1995. Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *New England J. Med*. V. 332. P. 143.
- Mackall C.L., Fleisher T.A., Brown M.R., Andrich M.P., Chen C.C., Feuerstein I.M., Magrath I.T., Wexler L.H., Dimitrov D.S., Gress R.E.* 1997a. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood*. V. 89. P. 3700.
- Mackall C.L., Granger L., Sheard M.A., Cepeda R., Gress R.E.* 1993. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood*. V. 82. P. 2585.
- Mackall C.L., Hakim F.T., Gress R.E.* 1997b. Restoration of T-cell homeostasis after T-cell depletion. *Seminars Immunol*. V. 9. P. 339.
- Marleau A.M., Sarvetnick N.* 2005. T cell homeostasis in tolerance and immunity. *J. Leuk. Biol*. V. 78. P. 575.
- Masopust D., Vezys V., Marzo A.L., Lefrancois L.* 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*. V. 291. P. 2413.
- Masuko K., Kato S., Hagihara M., Tsuchida F., Takemoto Y., Izawa K., Kato T., Yamamori S., Mizushima Y., Nishioka K., Tsuji K., Yamamoto K.* 1996. Stable clonal expansion of T cells induced by bone marrow transplantation. *Blood*. V. 87. P. 789.
- Metcalf D.* 1963. The autonomous behaviour of normal thymus grafts. *Australian J. Exper. Biol. Med. Sci*. V. 41. P. 437.
- Miller J.F.* 1961. Immunological function of the thymus. *Lancet*. V. 2. P. 748.
- Miller J.F.A.P.* 1962. Immunological significance of the thymus of the adult mouse. *Nature*. V. 195. P. 1318.
- Miller R.A., Stutman O.* 1984. T cell repopulation from functionally restricted splenic progenitors: 10000-fold expansion documented by using limiting dilution analyses. *J. Immunol*. V. 133. P. 2925.
- Min B., Foucras G., Meier-Schellersheim M., Paul W.E.* 2004. Spontaneous proliferation, a response of naive CD4 T cells determined by the diversity of the memory cell repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 101. P. 3874.
- Min B., McHugh R., Sempowski G.D., Mackall C., Foucras G., Paul W.E.* 2003. Neonates support lymphopenia-induced proliferation. *Immunity*. V. 18. P. 131.
- Min B., Yamane H., Hu-Li J., Paul W.E.* 2005. Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. *J. Immunol*. V. 174. P. 6039.
- Moreland L.W., Pratt P.W., Bucy R.P., Jackson B.S., Feldman J.W., Koopman W.J.* 1994. Treatment of refractory rheumatoid arthritis with a chimeric anti-CD4 monoclonal antibody. Long-term followup of CD4+ T cell counts. *Arthritis Rheumatol*. V. 37. P. 834.
- Murali-Krishna K., Ahmed R.* 2000. Cutting edge: Naive T cells masquerading as memory cells. *J. Immunol*. V. 165. P. 1733.
- Nešić D., Vukmanović S.* 1998. MHC Class I is required for peripheral accumulation of CD8+ thymic emigrants. *J. Immunol*. V. 160. P. 3705.
- Oehen S., Brduscha-Riem K.* 1999. Naive cytotoxic T lymphocytes spontaneously acquire effector function in lymphocytopenic recipients: A pitfall for T cell memory studies? *Eur. J. Immunol*. V. 29. P. 608.
- Porter B.O., Scibelli P., Malek T.R.* 2001. Control of T cell development in vivo by subdomains within the IL-7 receptor alpha-chain cytoplasmic tail. *J. Immunol*. V. 166. P. 262.
- Posnett D.N., Sinha R., Kabak S., Russo C.* 1994. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: Tthe T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy". *J. Exper. Med*. V. 179. P. 609.

- Prlic M., Blazar B.R., Khoruts A., Zell T., Jameson S.C. 2001. Homeostatic expansion occurs independently of costimulatory signals. *J. Immunol.* V. 167. P. 5664.
- Raff M.C. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature.* V. 356. P. 397.
- Rahemtulla A., Fung-Leung W.P., Schilham M.W., Kundig T.M., Sambhara S.R., Narendran A., Arabian A., Wakeham A., Paige C.J., Zinkernagel R.M., et al. 1991. Normal development and function of CD8<sup>+</sup> cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature.* V. 353. P. 180.
- Rocha B., Dautigny N., Pereira P. 1989. Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* V. 19. P. 905.
- Roux E., Dumont-Girard F., Starobinski M., Siegrist C.A., Helg C., Chapuis B., Roosnek E. 2000. Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood.* V. 96. P. 2299.
- Roux E., Helg C., Dumont-Girard F., Chapuis B., Jeannet M., Roosnek E. 1996. Analysis of T-cell repopulation after allogeneic bone marrow transplantation: significant differences between recipients of T-cell depleted and unmanipulated grafts. *Blood.* V. 87. P. 3984.
- Schluns K.S., Kieper W.C., Jameson S.C., Lefrancois L. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells *in vivo*. *Nature Immunology.* V. 1. P. 426.
- Schulze-Koops H. 2004. Lymphopenia and autoimmune diseases. *Arthritis Res. Ther.* V. 6. P. 178.
- Scollay R.G., Butcher E.C., Weissman I.L. 1980. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur. J. Immunol.* V. 10. P. 210.
- Societies I.U.o.I. 1999. Primary immunodeficiency diseases. Report of an IUIS Scientific Committee. *Clin. Exper. Immunol.* V. 118 Suppl 1. P. 1.
- Storek J., Witherspoon R.P., Storb R. 1995. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant.* V. 16. P. 413.
- Tan J.T., Dudl E., LeRoy E., Murray R., Sprent J., Weinberg K.I., Surh C.D. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 98. P. 8732.
- Tanchot C., Lemonnier F.A., Perarnau B., Freitas A.A., Rocha B. 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science.* V. 276. P. 2057.
- von Boehmer H., Teh H.S., Kisielow P. 1989. The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol. Today.* V. 10. P. 57.
- Warny M., Helby J., Nordestgaard B.G., Birgens H., Bojesen S.E. 2020. Incidental lymphopenia and mortality: A prospective cohort study. *CMAJ.* V. 192. P. E25.
- Weinberg K., Annett G., Kashyap A., Lenarsky C., Forman S.J., Parkman R. 1995. The effect of thymic function on immunocompetence following bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* V. 1. P. 18.
- Weng N.P. 2008. Telomere and adaptive immunity. *Mech. Age. Devel.* V. 129. P. 60.
- White J.T., Cross E.W., Burchill M.A., Danhorn T., McCarter M.D., Rosen H.R., O'Connor B., Kedd R.M. 2016. Virtual memory T cells develop and mediate bystander protective immunity in an IL-15-dependent manner. *Nature Commun.* V. 7. P. 11291.
- Williams K.M., Hakim F.T., Gress R.E. 2007. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Seminars Immunol.* V. 19. P. 318.
- Zaboli E., Majidi H., Alizadeh-Navaei R., Hedayatzadeh-Omran A., Asgarian-Omran H., Vahedi Larijani L., Khodaverdi V., Amjadi O. 2021. Lymphopenia and lung complications in patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19): A retrospective study based on clinical data. *J. Med. Virol.* V. 93. P. 5425.
- Zinkernagel R.M., Althage A., Callahan G., Welsh R.M., Jr. 1980. On the immunocompetence of H-2 incompatible irradiation bone marrow chimeras. *J. Immunol.* V. 124. P. 2356.

## Lymphopenia and T-Cell Regeneration Mechanisms

E. V. Saidakova\*

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia*

\*e-mail: radimira@list.ru

Chronic lymphopenia, more specifically, T-cell deficiency increases the risk of mortality from cancer, cardiovascular and respiratory diseases; serves as a risk factor for poor outcome in infections, such as COVID-19. Regeneration of T-lymphocytes is a complex multilevel process, many questions of which remain unanswered. The present review addresses two main pathways to increase the number of T-cells during lymphopenia: production in the thymus and homeostatic proliferation in the periphery. The literature data on the signals that regulate each pathway are summarized. Their contribution to the quantitative and qualitative restoration of the immune cell pool is considered. The features of the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocyte regeneration are discussed.

*Keywords:* lymphopenia, regeneration, T-cells, thymus, lymphopenia-induced homeostatic proliferation

УДК 571.27

## РОЛЬ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК В ПРОЦЕССАХ ФОРМИРОВАНИЯ ИММУННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ В ПЕРИОД БЕРЕМЕННОСТИ

© 2022 г. К. Ю. Шардина<sup>1</sup> \*, С. А. Заморина<sup>1</sup>, М. Б. Раев<sup>1</sup>, В. А. Черешнев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, 614081 Россия

\*E-mail: Shardinak@gmail.com

Поступила в редакцию 10.01.2022 г.

После доработки 10.01.2022 г.

Принята к публикации 13.01.2022 г.

Миелоидные супрессорные клетки (MDSC) – это одна из популяций клеток, принимающих участие в регуляции иммунного ответа посредством его угнетения при патологиях, а также во время беременности. В настоящем обзоре собраны имеющиеся данные о воздействии MDSC на разные компоненты врожденного и адаптивного иммунитета с учетом их разнонаправленности в реализации своих иммуносупрессорных функций. Представлен анализ актуальных исследований по изучению механизмов подавления иммунного ответа MDSC, а также проведена оценка роли MDSC в поддержании иммунной толерантности во время беременности. В частности, проанализированы сведения об MDSC при различных патологических состояниях в период беременности, содержании MDSC в пуповинной крови, рассмотрена взаимосвязь между этими клетками и иммунным статусом.

**Ключевые слова:** аутоиммунные заболевания, беременность, иммунная толерантность, иммуносупрессия, миелоидные супрессорные клетки, преэклампсия, экстракорпоральное оплодотворение

DOI: 10.31857/S0041377122020067

В период нормальной беременности в материнском организме формируется состояние динамической иммунной толерантности, направленное на предотвращение отторжения плода. При этом иммунная система матери должна одновременно защищать организм эмбриона, а также собственный организм от агентов, вызывающих различные патологические состояния, в том числе вирусные и бактериальные инфекции. Исходя из этого очевидно, что для успешного протекания беременности необходим тонкий иммунный баланс, а его сдвиг может вызывать ряд нарушений: недостаточность имплантации, преждевременные роды, преэклампсию, задержку роста плода (Negishi et al., 2018).

Адаптивная иммунная система играет решающую роль в поддержании иммунной толерантности, однако врожденный иммунитет, а именно дендритные клетки (DC), макрофаги, естественные киллерные клетки (NK), NKT-лимфоциты (NKT) также вносят

свой вклад в сохранение баланса между защитой организма и толерантностью к эмбриону (Negishi et al., 2018). В 2009 г. был идентифицирован новый тип клеток врожденного иммунитета, так называемые миелоидные супрессорные клетки (myeloid-derived suppressor cells, MDSC), представленные незрелыми дендритными клетками, нейтрофилами и моноцитами. Исходя из названия, очевидно, что основная функция MDSC – подавлять иммунный ответ, в том числе опухоли (Gabrilovich et al., 2009; Ostrand-Rosenberg, Sinha, 2009). В русскоязычной литературе для этих клеток используют термин “миелоидные супрессоры” (МС).

К настоящему времени известно, что опухоль защищается от иммунной системы посредством различных механизмов, в том числе через MDSC. MDSC позволяют новообразованию быть устойчивым к иммунотерапии, однако индуцированная элиминация MDSC из опухолевого микроокружения повышает выживаемость больных онкологическими заболеваниями (Tesi, 2019). С момента открытия MDSC вырос объем данных о функциях, механизмах и фенотипе MDSC. Определено, при каких условиях происходит увеличение этой популяции клеток. Тем не менее, большинство исследований посвящено изучению MDSC при онкологических

**Принятые сокращения:** Arg1 – аргиназа 1; DC – дендритные клетки; MDSC – миелоидные супрессорные клетки; e-MDSC – ранние MDSC; IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа; iNOS – индуцибельная NO-синтаза; M-MDSC – моноцитарные MDSC; NK – естественные киллерные клетки; PBMС – моноциты периферической крови; PMN-MDSC – полиморфноядерные MDSC; ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение.

процессах. В настоящее время известно, что уровень MDSC повышается при многих патологических состояниях, таких как травматический шок, сепсис, аутоиммунные заболевания, воспаление, рак. Не так давно стало известно, что уровень MDSC возрастает и при беременности (Goedegebuure et al., 2011).

MDSC принято разделять на 2 основные субпопуляции: полиморфноядерные (PMN-MDSC, их также называют гранулоцитарные – G-MDSC) и моноцитарные (M-MDSC). Кроме того, некоторые авторы выделяют 3-й тип MDSC – ранние или e-MDSC. Известно, что PMN-MDSC присутствуют в пуповинной крови, что свидетельствует об их участии в модуляции иммунной системы не только матери, но и плода. В то же время известно, что при спонтанных абортах уровень MDSC в плаценте значительно снижен (Rieber et al., 2013). Помимо этого было показано, что MDSC модулируют поляризацию клеток в Т-хелперы, с преобладанием Th2-ответа и ингибированием Th1-ответа (Kostlin et al., 2016). Кроме того, есть исследования, демонстрирующие, что PMN-MDSC способствуют образованию регуляторных Т-лимфоцитов (Kang et al., 2016). В совокупности все эти факты являются достаточно убедительным свидетельством того, что MDSC могут способствовать поддержанию толерантности к фетоплацентарным антигенам.

Цель настоящего обзора – обобщить представления о механизмах действия MDSC на клеточное звено иммунной системы и анализ актуальной информации о роли MDSC в поддержании иммунной толерантности во время беременности.

### ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОСУПРЕССИИ, ОПОСРЕДОВАННЫЕ MDSC

Для реализации своих иммуносупрессивных функций MDSC используют как межклеточные взаимодействия, так и короткоживущие медиаторы (Kumar et al., 2016). По-видимому, MDSC в первую очередь ингибируют защитные функции Т-лимфоцитов, однако другие клетки иммунной системы также подвержены их воздействию (рис. 1). Ниже описаны основные пути воздействия на нормальное функционирование и жизнедеятельность Т-лимфоцитов.

### MDSC И Т-КЛЕТКИ. ИСТОЩЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Основная мишень MDSC для ингибирования Т-лимфоцитов – это метаболизм аргинина и триптофана. Для реализации своей активности MDSC используют аргиназу 1 (Arg1) и индуцибельную NO-синтазу (iNOS). Arg1 – это фермент, который участвует в финальном цикле мочевины, превращая L-аргинин в L-орнитин и мочевины. iNOS – фермент,

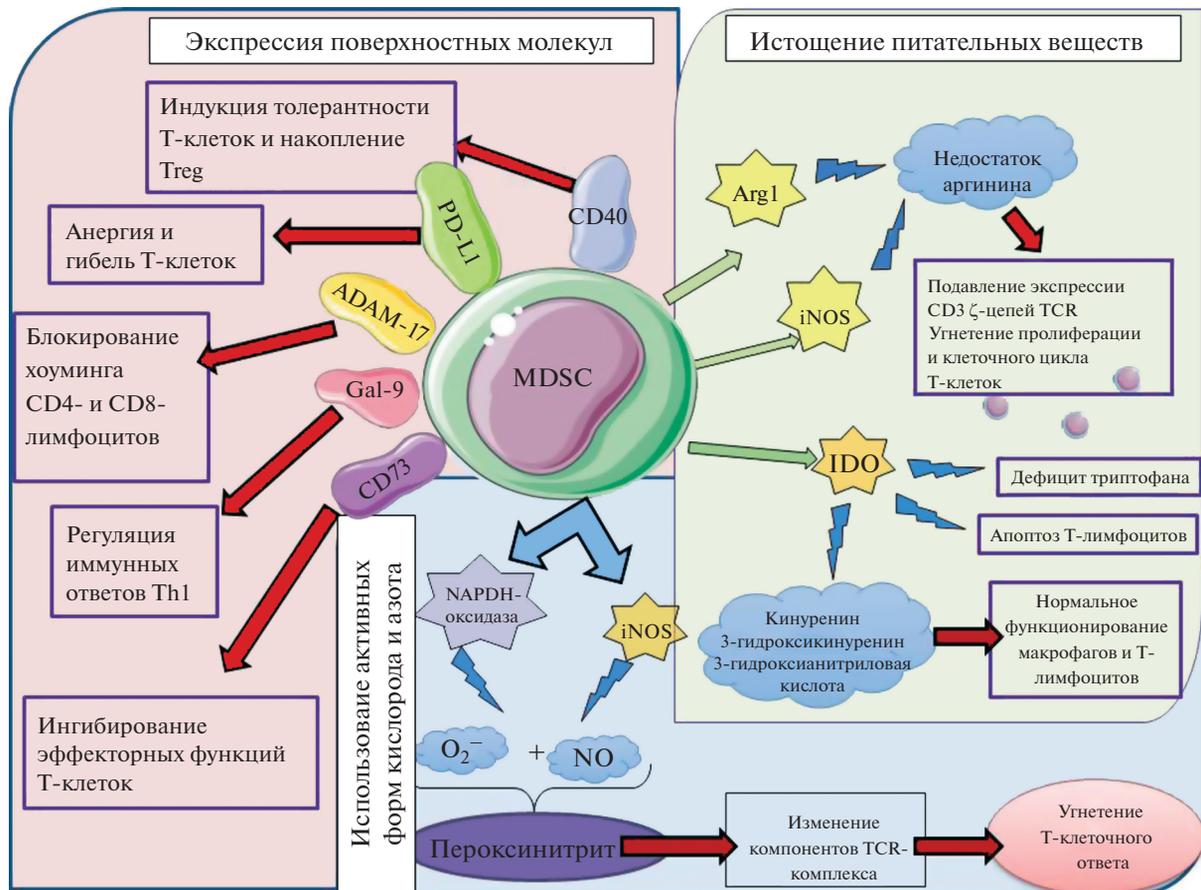
который участвует в образовании оксида азота и цитрулина из аргинина. Повышенная концентрация этих ферментов приводит к недостатку аргинина в месте иммунного ответа, что в свою очередь подавляет экспрессию CD-3- $\zeta$ -цепей TCR (Rodriguez et al., 2007). Также известно, что недостаточное потребление L-аргинина блокирует пролиферацию и клеточный цикл Т-лимфоцитов, а также индуцирует накопление MDSC (Fletcher et al., 2015).

Аналогичный механизм иммуносупрессии MDSC заключается в нарушении метаболизма триптофана. Происходит это за счет STAT3-зависимой индукции фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), повышенная продукция которого и приводит к дефициту триптофана (Medzhitov et al., 2011). Помимо этого, повышение уровня IDO приводит к апоптозу Т-лимфоцитов (Yu et al., 2014). Кроме того, есть данные, которые показывают, что активность IDO приводит к выделению побочных продуктов (кинуренина, 3-гидроксикинуренина, 3-гидроксиантраниловой кислоты), влияющих на нормальное функционирование макрофагов и Т-лимфоцитов (Fallarino et al., 2002).

Таким образом, Arg1, iNOS и IDO создают условия недостаточности питательной среды за счет истощения незаменимых аминокислот триптофана и аргинина, что приводит к подавлению Т-клеточной активности.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И АЗОТА

Следующий механизм, который используют MDSC для подавления иммунного ответа, – это продукция активных форм кислорода и азота. MDSC содержат на своей поверхности NADPH-оксидазу – мультимолекулярный ферментативный комплекс, который окисляет NADP<sup>+</sup>, образуя на поверхности клетки супероксидный анион-радикал O<sub>2</sub><sup>-•</sup>. Как говорилось ранее, iNOS в ходе окисления аргинина образует оксид азота (NO), обладающий противомикробной активностью. Однако O<sub>2</sub><sup>-•</sup> начинает реактивно взаимодействовать с оксидом азота, образуя пероксинитрит (Pacher et al., 2007). Сам пероксинитрит является одним из сильнейших окислителей, который может напрямую взаимодействовать с различными биологическими мишенями. Пероксинитрит также может изменять структуру белка посредством реакции с различными аминокислотами в пептидной цепи. Так, было показано, что пероксинитрит способен изменять компоненты TCR-комплекса (Т-клеточного рецептора) посредством нитрования тирозина, модифицируя его взаимодействие с молекулами МНС (главного комплекса гистосовместимости), что приводит к ингибированию Т-клеточного ответа (Nagaraj et al., 2007).



**Рис. 1.** Механизмы подавления активности Т-клеток, опосредованные миелоидными супрессорными клетками (MDSC). Arg1 – аргиназа 1, ADAM17 – домен 17 металлопептидазы ADAM, Gal-9 – галектин-9, iNOS – индуцибельная NO-синтаза, IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа, PD-L1 – лиганд рецептора PD1, TCR – Т-клеточный рецептор.

### ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ, СНИЖАЮЩИХ АКТИВНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Присутствие определенных молекул на поверхности MDSC – это еще один путь к проявлению их иммуносупрессивных функций. Известно, что MDSC экспрессируют на своей мембране галектин-9 (Gal-9), который является лигандом для TIM-3. TIM-3 экспрессируется терминально дифференцированными Th1-клетками, которые впоследствии повышают экспрессию Gal-9 посредством продукции IFN- $\gamma$ . Таким образом, MDSC способны регулировать Th1-иммунный ответ, используя путь TIM-3/Gal-9 (Sakuishi et al., 2011).

Молекула CD73 (экто-5'-нуклеотидаза), которая катализирует разложение АТФ до аденозина, экспрессируется на MDSC. В свою очередь, аденозин способен ингибировать эффекторные функции Т-клеток за счет взаимодействия с аденозиновым рецептором Т-лимфоцитов (A2A, A2AR) (Ohta et al., 2006).

Кроме того, MDSC имеют на своей поверхности домен 17 металлопептидазы ADAM (ADAM17), которая индуцирует расщепление эктодомена L-селек-

тина (CD62L) на Т-клетках. CD62L – это мембранная молекула адгезии, действующая как хоминговый рецептор периферических лимфоузлов. Таким образом, CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-клетки становятся неспособными мигрировать в лимфатические узлы или участки воспаления, где должна происходить их активация (Hanson et al., 2009).

На поверхности MDSC также может экспрессироваться PD-L1 (лиганд рецептора программируемой клеточной гибели). Взаимодействие PD-L1 с PD-1, экспрессируемым на Т-лимфоцитах, приводит к анергии или даже гибели клеток (Noman et al., 2014).

В 2010 г. было продемонстрировано, что MDSC также экспрессируют иммуностимулирующий рецептор CD40, с помощью которого они способны индуцировать толерантность Т-клеток и накопление регуляторных Т-лимфоцитов (Treg). В данном исследовании было показано, что IFN- $\gamma$  стимулирует миелоидные супрессорные клетки на выработку IL-10 и TGF- $\beta$ , которые необходимы для индукции Treg (Pan et al., 2010).

### КЛЕТКИ MDSC И Treg

В дополнение к прямому супрессивному действию, MDSC могут оказывать не прямое действие на ингибирование пролиферации Т-лимфоцитов через влияние на развитие индуцибельных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>-клеток (Treg) (Huang et al., 2006). Развитие именно таких Treg зависит от продукции IL-10 и TGF- $\beta$ , а не от классических механизмов, связанных с метаболизмом аргинина или триптофана. Другое исследование, подтверждающее механизм MDSC, связанный с высокой продукцией IL-10 и TGF- $\beta$ , показало, что MDSC могут активировать Treg как *in vitro*, так и *in vivo*. Происходит это посредством стимуляции MDSC цитокином IFN- $\gamma$ . Позднее эти же авторы обнаружили, что IFN- $\gamma$  регулирует экспрессию CD40 на MDSC, влияя на межклеточное взаимодействие MDSC и Т-клеток в присутствии IL-10 и TGF- $\beta$ , что приводит к экспансии Treg (Pan et al., 2010).

### КЛЕТКИ MDSC И НК-КЛЕТКИ

В настоящее время известно, что подавление функции естественных киллерных (NK) клеток коррелирует с увеличением количества MDSC. В частности, MDSC уменьшают цитотоксичность NK-клеток, продукцию IFN- $\gamma$  и экспрессию трансмембранного белка NKG2D (natural-killer receptor group 2, member D) через мембраносвязанный TGF $\beta$  (Li et al., 2009). Так как NKG2D служит активирующим рецептором на NK-клетках, который сам по себе способен вызывать цитотоксичность, то MDSC угнетают активность этих клеток.

### MDSC И В-КЛЕТКИ

Хотя MDSC-опосредованная иммуномодуляция В-лимфоцитов находится на ранней стадии изучения, тем не менее, предполагается, что MDSC регулируют В-лимфоцитоз, продукцию, пролиферацию и функцию антител. Производные адипоцитов (жирные кислоты, свободный холестерин, церамиды, кристаллы липидов) способны увеличивать продукцию IL-1 $\beta$  MDSC (Kennedy, Knight, 2015). Кроме того, основные факторы супрессии MDSC, такие как Arg1, PD-1, IDO, iNOS, подавляют ответы В-клеток так же, как и Т-лимфоцитов. Помимо косвенных путей, MDSC способны действовать на В-клетки непосредственно, снижая продукцию IgM и IgG через трансмембранный белок VISTA (V-домен Ig супрессор активации Т-клеток) (Green et al., 2015).

Регуляторные В-клетки (Breg) являются относительно новой описанной субпопуляцией В-лимфоцитов, которая обладает регуляторными функциями по отношению к В-клеткам. Эта регуляция достигается за счет угнетения синтеза антител эффекторными В-лимфоцитами (Özkan et al., 2018). В исследовании, проведенном на LP-BM5-инфицированных мышцах, М-MDSC уменьшали количество IL-10,

продуцируемого Breg в ответ на стимуляцию ЛПС (Özkan et al., 2018). В другой работе авторы использовали мышиную модель системной красной волчанки и пришли к выводу, что MDSC вызывают экспансию Breg через iNOS, подавляя аутоиммунитет (Park et al., 2016). Таким образом, можно сказать, что MDSC способны косвенно подавлять ответы В-лимфоцитов через экспансию Breg.

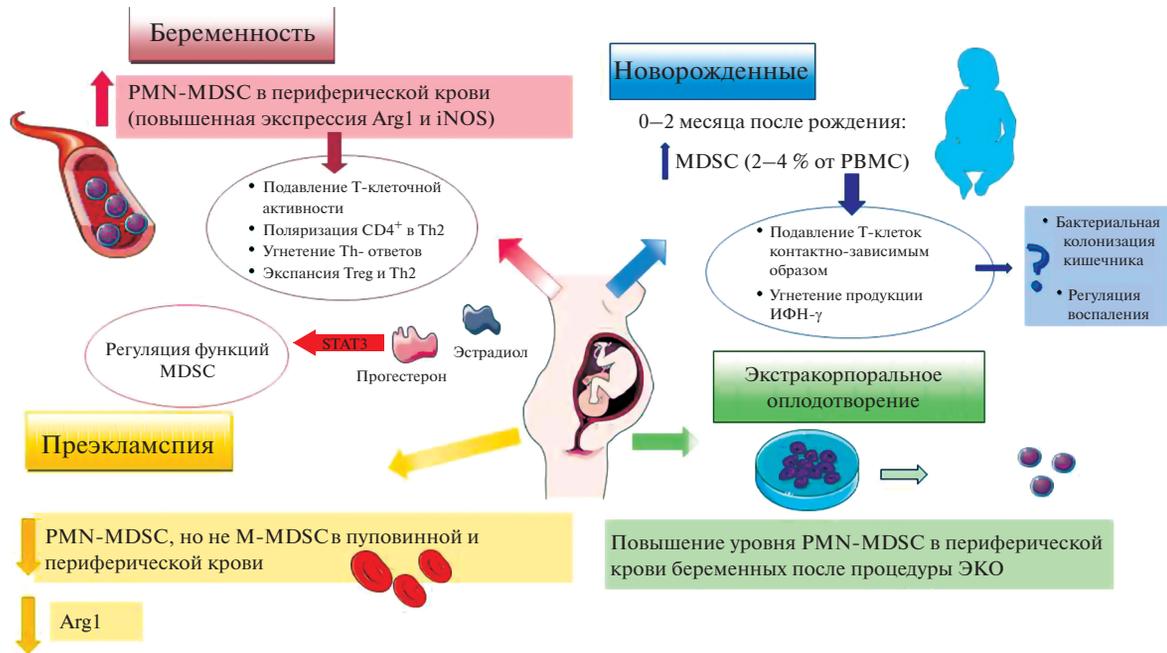
### MDSC И МИЕЛОИДНЫЕ КЛЕТКИ

К настоящему времени существует не так много работ по исследованию механизмов влияния MDSC на миелоидные клетки. Тем не менее, есть некоторые данные о взаимодействии MDSC с макрофагами. В 2007 г. на модели рака у мышей группой исследователей было показано, что MDSC способны индуцировать поляризацию макрофагов 2-го типа через секрецию IL-10. При этом снижалась продукция IL-12 и прогрессировал рост опухоли (Sinha et al., 2007). Поскольку при онкологии MDSC направляют дифференцировку макрофагов по 2-му типу, то в опухолевом микроокружении нарушается баланс между IL-12 и IL-10. Изменение этого баланса приводит к формированию Т-клеточного иммунного Th2-ответа и происходит уменьшение созревания дендритных клеток (Ostrand-Rosenberg et al., 2012).

Помимо взаимодействия с макрофагами, было продемонстрировано воздействие MDSC на DC в условиях *in vitro*. В 2012 г. показали, что при увеличении MDSC пропорционально уменьшается количество зрелых DC (Ostrand-Rosenberg et al., 2012). В опухолевом микроокружении, в состав которого входят MDSC, вырабатываются цитокины VEGF, M-CSF, GM-CSF, IL-6, IL-10, которые также препятствуют созреванию DC, что приводит к накоплению незрелых DC. Это накопление в итоге приводит к тому, что цитотоксические Т-лимфоциты не активируются, тем самым поддерживая ускользание опухоли от иммунной защиты организма (Gabrilovich, 2004).

### MDSC И БЕРЕМЕННОСТЬ

С иммунологической точки зрения состояние организма будущей матери при беременности является парадоксальным, поскольку плод защищен от атаки материнской иммунной системы. Иммунная толерантность, которая возникает во время беременности, включает определенный комплекс механизмов, направленных на сохранение беременности. Для объяснения такого неспецифического действия иммунной системы учеными была предложена концепция "Th1/Th2/Th17/Treg", которая предполагает доминирование Th2- и Treg-клеток над Th1- и Th17-лимфоцитами (Saito et al., 2010). При нарушении этого баланса происходит риск неблагоприятного исхода беременности. Согласно статистике ВОЗ, около 20% беременностей заканчиваются самопро-



**Рис. 2.** Схематическое представление роли миелоидных супрессорных клеток (MDSC) во время беременности. PBMC — моноциты периферической крови, PMN-MDSC — полиморфноядерные миелоидные супрессорные клетки, Arg1 — аргиназа 1, iNOS — индуцибельная NO-синтаза.

извольными выкидышами. Основной причиной ранних спонтанных аборт являются генетические anomalies эмбриона. Однако значительная часть спонтанных аборт связана с аутоиммунными и иммунными нарушениями (Kwak-Kim, 2010).

В процессе изучения MDSC было обнаружено, что во время беременности в периферической, децидуальной и пуповинной крови их уровень повышается (рис. 2). На основании уже имеющихся данных о локализации MDSC во время беременности, можно предположить, что эти клетки способны модулировать иммунную систему не только матери, но и плода, поддерживая, таким образом, иммунную толерантность. В 2011 г. в экспериментах на мышах было показано, что MDSC накапливаются в плаценте, а к моменту родов их уровень снижается (Fainaru et al., 2011). Затем было продемонстрировано повышение уровня MDSC в периферической крови у беременных мышей (Pan et al., 2016). В 2017 г. стало известно, что MDSC аккумулируются в кровотоке и матке беременных мышей, а намеренное снижение MDSC антителами против Gr1 затрудняло нормальную имплантацию и привело к проникновению в матку активированных Т-клеток. В противоположность этому, восстановление общего пула MDSC с помощью G-CSF приводило к успешной беременности, подавляя при этом Т-клеточные ответы (Ostrand-Rosenberg et al., 2017).

В 2014 г. стало известно, что в периферической крови беременных повышается уровень PMN-MDSC ( $CD66b^+/CD14^-/HLA-DR^{low/-}$ ), при этом ко-

личество M-MDSC остается неизменным. Примечательно, что эти гранулоцитарные MDSC обладают повышенной экспрессией Arg-1 и iNOS, что отражает их выраженную иммуносупрессивную активность. Исследователям удалось подтвердить, что высокий уровень MDSC в организме женщин держится на протяжении всей беременности и только после родов резко снижается (Kostlin et al., 2014). Известно, что уровень MDSC растет в течение I триместра беременности и значительно снижается к III триместру (Nair et al., 2015).

Снижение уровня MDSC в периферической крови, эндометрии и плаценте у человека ассоциировано с ранним выкидышем (Nair et al., 2015), а низкий уровень аргинина и пониженная экспрессия NO-синтазы 2 (NOS2) в тканях плаценты были обнаружены у женщин с преэклампсией (Kim et al., 2007). Установлено, что плацентарные PMN-MDSC, подавляя Т-клеточный ответ, поляризуют CD4-лимфоциты в Th2-фенотип (Köstlin-Gille et al., 2019). Одновременно с этим PMN-MDSC пуповинной крови ингибируют Th1-ответ и индуцируют развитие Th2- и Treg-клеток. В этой ситуации MDSC используют свои основные механизмы подавления Т-лимфоцитов за счет экспрессии Arg1, IDO, NOS2 и образования активных форм кислорода (Kumar et al., 2016).

Раннее самопроизвольное прерывание беременности сопровождается снижением уровня MDSC и Th2-цитокинов. Остается вопросом для обсуждения, как при этом гормональная среда организма ре-

гулирует экспансию MDSC и баланс Th1-/Th2-цитокинов. В нескольких исследованиях была описана роль STAT3 в регуляции функций MDSC во время беременности. Показано, что STAT3 участвует в экспансии MDSC через эстрадиол и прогестерон (Pan et al., 2016). Кроме того, исследование на мышах продемонстрировало, что отсутствие индуцируемого гипоксией фактора транскрипции  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ), приводит к снижению накопления MDSC во время беременности и нарушению супрессорной активности (Köstlin-Gille et al., 2019). Пациентки с самопроизвольным абортom имеют пониженные уровни прогестерона и эстрадиола, что коррелирует со снижением уровня MDSC, а также с нарушением баланса Th1/Th2 в сторону преобладания Th1. При изучении экспрессии рецептора эстрогена- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ), STAT-3/pSTAT-3 и каспазы-3 в децидуальном эндометрии у таких пациенток было выявлено снижение экспрессии ER- $\alpha$  и pSTAT-3, но повышение экспрессии каспазы-3 (Verma et al., 2019). Учитывая то, что STAT3 регулирует пролиферацию и дифференцировку MDSC, низкая экспрессия pSTAT3 в эндометрии пациенток с ранним самопроизвольным абортom приводит к нарушению процессов, связанных с накоплением MDSC. Таким образом, подобная ситуация приводит к нарушению иммунной толерантности во время беременности и прерыванию беременности.

Недавние исследования показали, что у мышей со спонтанным прерыванием беременности уровень MDSC значительно снижен по сравнению с контрольной группой. Кроме того, уровни Arg1, iNOS, IL-10 и TGF $\beta$  в MDSC были также снижены. Авторы связывают истощение MDSC с повышенной цитотоксичностью децидуальных NK-клеток (Ren et al., 2019).

## БЕРЕМЕННОСТЬ И ПРЕЭКЛАМПСИЯ

Преэклампсия – это мультисистемное патологическое состояние, которое возникает после 20 нед. гестации. Преэклампсия встречается у 3–7% беременных. На сегодняшний день есть данные только одного исследования по изучению функционирования MDSC при преэклампсии. Было показано, что уровни PMN-MDSC, но не M-MDSC, были снижены в пуповинной и периферической крови у пациенток с преэклампсией по сравнению с группой сравнения (женщины с нормально протекающей беременностью). При этом частота встречаемости популяции Treg у женщин с преэклампсией и в группе сравнения была примерно одинакова. Кроме того, сывороточные уровни Arg1 были значительно ниже у пациенток с преэклампсией (Wang et al., 2018). Авторы предполагают, что отсутствие экспансии PMN-MDSC является важнейшей особенностью изменения функционирования иммунитета, связанного с данной патологией, что позволяет говорить о возможном потенциале терапии преэклампсии посредством восстановления PMN-MDSC.

## БЕРЕМЕННОСТЬ У ПАЦИЕНТОК С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Аутоиммунные заболевания распространены среди женщин в большей степени, чем среди мужчин, и процессы, связанные с беременностью, такие как гормональная модуляция и микрохимеризм плода, могут вызывать риск развития аутоиммунных патологий у матери. Для женщин с аутоиммунными заболеваниями, которые планируют беременность, оптимизация репродуктивного здоровья является обязательной процедурой. Именно поэтому важно более пристально изучать механизмы иммуносупрессии во время беременности. Так, метаанализ, проведенный недавно, показал, что введение преднизолона улучшает результаты беременности у женщин с идиопатическим рецидивом невынашивания (Dan et al., 2015). Интересно отметить, что применение дексаметазона и преднизона при наличии аутоиммунных нарушений или при трансплантации, могут вызывать экспрессию MDSC, активно вырабатывающих iNOS, а также прямую экспансию Treg (Liao et al., 2014). Таким образом, можно предположить, что контроль активности MDSC может стать одним из механизмов подавления патологического иммунного ответа во время беременности.

## MDSC У НОВОРОЖДЕННЫХ

Накопление MDSC у новорожденных является удивительным фактом, поскольку подавление иммунной системы не считается благоприятным для младенца. Однако в первые недели жизни наблюдается повышенный уровень MDSC (Kostlin et al., 2014).

Известно, что повышение уровня MDSC быстро прекращается у женщин после родов. У новорожденных содержание MDSC повышено в течение первых 6 нед. жизни, варьируя от 2 до 4% от РВМС, а на 2-м месяце она достигает уровня взрослого человека; работа показала, что у новорожденных повышены главным образом PMN-MDSC, подавляющие Т-клетки контактно-зависимым способом и уменьшающие продукцию IFN- $\gamma$  (Gervasi et al., 2014).

В масштабном исследовании было продемонстрировано, что MDSC, которые присутствуют в первые недели жизни новорожденного, обладают выраженной Т-супрессорной активностью (He et al., 2018). Эта подавляющая активность MDSC запускается лактоферрином и опосредуется NO, PGE2, белками S100A9 и S100A8. Интересно, что MDSC новорожденных имеют транскриптом, схожий с транскриптомом MDSC опухоли, но с выраженной активацией антимикробных генов. Авторы предположили, что временное присутствие MDSC может иметь решающее значение в регуляции воспаления у новорожденных. Младенцы с очень низким весом, склонные к НЭК (некротизирующий энтероколит), имели более низкие уровни MDSC с более низкой

супрессорной активностью, чем дети с нормальным весом (He et al., 2018). Предполагаемым механизмом является способность MDSC подавлять экспрессию Toll-подобного рецептора 4 (TLR4), что приводит к снижению чувствительности кишечной микрофлоры (Kostlin et al., 2018). На сегодняшний день трудно говорить о биологической роли MDSC у новорожденных. Вероятно, экспансия MDSC связана с неким механизмом, который ограничивает воспаление при бактериальной колонизации кишечника (Veglia et al., 2018).

Еще меньше сведений об уровне MDSC у недоношенных детей. Однако работа 2018 г. показала, что содержание PMN-MDSC увеличивается в пуповинной крови независимо от гестационного периода, остается повышенным у недоношенных детей в неонатальный период, а после 28-х сут снижается до нормального уровня (Schwarz et al., 2018). Интересно, что в случае перинатальной или постнатальной инфекции PMN-MDSC и дальше продолжают накапливаться, а их уровень также коррелирует с показателями основных маркеров воспаления: С-реактивного белка и количества лейкоцитов (Schwarz et al., 2018). Авторы считают, что полученные результаты указывают на важность экспансии PMN-MDSC в контексте иммунорегуляции у недоношенных детей, что делает их потенциальной мишенью для клеточной терапии инфекций у этих пациентов.

### MDSC И ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЕ

Бесплодие выявляется у миллионов людей репродуктивного возраста во всем мире. По данным ВОЗ, бесплодием страдают от 48 до 186 млн человек в мире. Одной из самых популярных процедур, решающих данную проблему, является экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО). Существует не так много исследований взаимосвязи между уровнем MDSC и результатами ЭКО. Тем не менее, было показано, что уровень циркулирующих в периферической крови PMN-MDSC, но не M-MDSC, был значительно увеличен в группе беременных по сравнению с группой небеременных после ЭКО женщин. Авторы исследования связывают высокий уровень PMN-MDSC с повышенной частотой клинической беременности и предполагают, что гранулоцитарная популяция MDSC может стать новой терапевтической мишенью для улучшения результатов ЭКО (Zhu et al., 2017). Позже эти данные были подтверждены другим исследованием (Hu et al., 2019). Помимо этого, авторы (Hu et al., 2019) показали, что эстрадиол 2 (E2) в зависимости от его концентрации может играть двойственную роль во влиянии на MDSC путем регулирования экспрессии VEGF. У пациенток после ЭКО повышенный уровень MDSC в периферической крови явно коррелировал с беременностью независимо от эффектов E2, что может дать новое представление о неудачных результатах ЭКО (Hu et al., 2019).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время существует уже довольно большой объем исследований, направленных на изучение роли MDSC при таких патологических процессах, как рак, воспаление, аутоиммунные заболевания и др. Известно, что, помимо отрицательного воздействия при патологиях, MDSC являются мощными регуляторами критических иммунологических процессов во время беременности, а также в неонатальный период. Становится очевидным, что поиск новых мишеней, обладающих способностью регулировать MDSC и формировать толерантность между матерью и ребенком, будет иметь большой потенциал для их использования при патологиях беременности. Помимо этого, учитывая двойственную природу этих клеток, ингибирование MDSC может стать одним из механизмов противораковой терапии. Однако до сих пор существует ряд вопросов, связанных с изучением фундаментальных аспектов понимания биологической роли MDSC.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-315-90001).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не было экспериментов с участием животных и людей.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ВКЛАД АВТОРОВ

К.Ю. Шардина, С.А. Заморина: сбор и обработка материала, написание; В.А. Черешнев, М.Б. Раев: редактирование.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dan S., Wei W., Yichao S., Hongbo C., Shenmin Y., Jiaxiong W., Hong L. 2015. Effect of prednisolone administration on patients with unexplained recurrent miscarriage and in routine intracytoplasmic sperm injection: A meta-analysis. *Am. J. Reprod. Immunol.* V. 74. P. 89. <https://doi.org/10.1111/aji.12373>
- Fainaru O., Hantisteanu S., Hallak M. 2011. Immature myeloid cells accumulate in mouse placenta and promote angiogenesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* V. 204. P. 18. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.01.060>
- Fallarino F., Grohmann U., Vacca C., Bianchi R., Orabona C., Spreca A., Fioretti M.C., Puccetti P. 2002. T-cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* V. 9. P. 1069.
- Fletcher M., Ramirez M.E., Sierra R.A., Raber P., Thevenot P., Al-Khami A.A., Sanchez-Pino D., Hernandez C., Wyczechowska D.D., Ochoa A.C., Rodriguez P.C. 2015. l-Argi-

- nine depletion blunts antitumor T-cell responses by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* V. 75. P. 275.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-14-1491>
- Gabrilovich D.* 2004. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat. Rev. Immunol.* V. 4. P. 941.  
<https://doi.org/10.1038/nri1498>
- Gabrilovich D.I., Nagaraj S.* 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* V. 9. P. 162.  
<https://doi.org/10.1038/nri2506>
- Gervasi A., Lejarcegui N., Dross S., Jacobson A., Itaya G., Kidzereu E., Gantt S., Jaspán H., Horton H.* 2014. Myeloid derived suppressor cells are present at high frequency in neonates and suppress *in vitro* T cell responses. *PLoS One.* V 9. e107816 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107816>
- Goedegebuure P., Mitchem J.B., Porembka M.R., Tan M.C.B., Belt B.A., Wang-Gillam A., Gillanders W.E., Hawkins W.G., Linehan D.C.* 2011. Myeloid-derived suppressor cells: General characteristics and relevance to clinical management of pancreatic cancer. *Curr. Cancer Drug Targets.* V. 11. P. 734.
- Green K.A., Wang L., Noelle R.J., Green W.R.* 2015. Selective involvement of the checkpoint regulator VISTA in suppression of B-cell, but not T-cell, responsiveness by monocytic myeloid-derived suppressor cells from mice infected with an immunodeficiency-causing retrovirus. *J. Virol.* V. 89. P. 9693.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.00888-15>
- Hanson E.M., Clements V.K., Sinha P., Ilkovitch D., Ostrand-Rosenberg S.* 2009. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.* V. 183. P. 937.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804253>
- He Y.M., Li X., Perego M., Nefedova Y., Kossenkov A.V., Jensen E.A., Kagan V., Liu Y.F., Fu S.Y., Ye Q.J., Zhou Y.H., Wei L., Gabrilovich D.I., Zhou J.* 2018. Transitory presence of myeloid-derived suppressor cells in neonates is critical for control of inflammation. *Nat. Med.* V. 24. P. 224.  
<https://doi.org/10.1038/nm.4467>
- Hu C., Zhen Y., Pang B., Lin X., Yi H.* 2019. Myeloid-derived suppressor cells are regulated by estradiol and are a predictive marker for IVF outcome. *Front. Endocrinol.* V. 10.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00521>
- Huang B., Pan P.Y., Li Q., Sato A. I., Levy D.E., Bromberg J., Divino C.M., Chen, S.H.* 2006. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* V. 66. P. 1123.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-1299>
- Kang X., Zhang X., Liu Z., Xu H., Wang T., He L., Zhao A.* 2016. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells maintain feto-maternal tolerance by inducing Foxp3 expression in CD4+CD25-T cells by activation of the TGF-beta/beta-catenin pathway. *Mol. Hum. Reprod.* V. 22. P. 499.  
<https://doi.org/10.1093/molehr/gaw026>
- Kennedy D.E., Knight K.L.* 2015. Inhibition of B lymphopoiesis by adipocytes and IL-1-producing myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol.* V. 195. P. 2666.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500957>
- Kostlin N., Hofstadter K., Ostermeir A.L. et al.* 2016. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells accumulate in human placenta and polarize toward a Th2 phenotype. *J. Immunol.* V. 196. P. 1132.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500340>
- Kostlin N., Kugel H., Spring B., Leiber A., Marme A., Henes M., Rieber N., Hartl D., Poets C.F., Gille C.* 2014. Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. *Eur. J. Immunol.* V. 44. P. 2582.  
<https://doi.org/10.1002/eji.201344200>
- Kostlin N., Schoetensack C., Schwarz J., Spring B., Marme A., Goelz R., Brodbeck G., Poets C.F., Gille C.* 2018. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells (GR-MDSC) in breast milk (BM); GR-MDSC accumulate in human BM and modulate T-cell and monocyte function. *Front. Immunol.* V. 9. P. 1098.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01098>
- Köstlin-Gille N., Dietz S., Schwarz J., Spring B., Pauluschke-Fröhlich J., Poets C.F., Gille C.* 2019. HIF-1 $\alpha$ -deficiency in myeloid cells leads to a disturbed accumulation of myeloid derived suppressor cells (MDSC) during pregnancy and to an increased abortion rate in mice. *Front. Immunol.* V. 10. P. 161.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00161>
- Kumar V., Patel S., Tcyganov E., Gabrilovich D.I.* 2016. The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* V. 37. P. 208.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>
- Kwak-Kim J., Park J.C., Ahn H.K., Kim J.W., Gilman-Sachs A.* 2010. Immunological modes of pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* V. 63. P. 611.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00847.x>
- Li H., Han Y., Guo Q., Zhang M., Cao X.* 2009. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK-cells through membrane-bound TGF-b1. *J. Immunol.* V. 182. P. 240.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.1.240>
- Liao J., Wang X., Bi Y., Shen B., Shao K., Yang H., Lu Y., Zhang Z., Chen X., Liu H., Wang J., Chu Y., Xue L., Wang X., Liu G.* 2014. Dexamethasone potentiates myeloid-derived suppressor cell function in prolonging allograft survival through nitric oxide. *J. Leukoc. Biol.* V. 96. P. 675.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.2HI1113-611RR>
- Medzhitov R., Shevach E.M., Trinchieri G., Mellor A.L., Munn D.H., Gordon S., Libby P., Hansson G.K., Shortman K., Dong C., Gabrilovich D., Gabrysova L., Howes A., O'Garra A.* 2011. Highlights of 10 years of immunology in *Nature Reviews Immunology*. *Nat. Rev. Immunol.* V. 11. P. 693.  
<https://doi.org/10.1038/nri3063>
- Nagaraj S., Gupta K., Pisarev V., Kinarsky L., Sherman S., Kang L., Herber D.L., Schneck J., Gabrilovich D.I.* 2007. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T-cell tolerance in cancer. *Nat. Med.* V. 13. P. 828.  
<https://doi.org/10.1038/nm1609>
- Nair R.R., Sinha P., Khanna A., Singh K.* 2015. Reduced myeloid-derived suppressor cells in the blood and endometrium is associated with early miscarriage. *Am. J. Reprod. Immunol.* V. 73. P. 1046.  
<https://doi.org/10.1111/aji.12351>

- Negishi Y., Takahashi H., Kuwabara Y., Takeshita T.* 2018. Innate immune cells in reproduction. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* V. 44. P. 2025. <https://doi.org/10.1111/jog.13759>
- Noman M.Z., Desantis G., Janji B., Hasmin M., Karray S., Desse P. et al.* 2014. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 $\alpha$ , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J. Exp. Med.* V. 211. P. 781. <https://doi.org/10.1084/jem.20131916>
- Ohta A., Gorelik E., Prasad S.J., Ronchese F., Lukashev D., Wong M.K., Huang X., Caldwell S., Liu K., Smith P., Chen J.F., Jackson E.K., Apasov S., Abrams S., Sitkovsky M.* 2006. A2A adenosine receptor protects tumors from anti-tumor T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 103. P. 13132. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605251103>
- Ostrand-Rosenberg S., Sinha P.* 2009. Myeloid derived suppressor cells: Linking inflammation and cancer. *J. Immunol.* V. 182. P. 4499. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802740>
- Ostrand-Rosenberg S., Sinha P., Beury D.W., Clements V.K.* 2012. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Semin. Cancer Biol.* V. 22. P. 275. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer>
- Ostrand-Rosenberg S., Sinha P., Figley C., Long R., Park D., Carter D., Clements V.K.* 2017. Frontline Science: Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) facilitate maternal-fetal tolerance in mice. *J. Leukoc. Biol.* V. 101. P. 1091. <https://doi.org/10.1189/jlb.1H11016-306RR>
- Özkan B., Lim H., Park S.* 2018. Immunomodulatory function of myeloid-derived suppressor cells during B cell-mediated immune responses. *Int. J. Mol. Sci.* V. 19. P. 1468. <https://doi.org/10.3390/ijms19051468>
- Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L.* 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* V. 87. P. 315. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
- Pan P.Y., Ma G., Weber K.J., Ozao-Choy J., Wang G., Yin B., Divino C.M., Chen S.H.* 2010. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T-regulatory cell activation mediated by myeloid – derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res.* V. 70. P. 99. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1882>
- Pan T., Zhong L., Wu S., Cao Y., Yang Q., Cai Z., Cai X., Zhao W., Ma N., Zhang W., Zhang H., Zhoucorresponding J.* 2016. 17 $\beta$ -Oestradiol enhances the expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells via signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 signaling in human pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.* V. 185. P. 86. <https://doi.org/10.1111/cei.12790>
- Park M.J., Lee S.H., Kim E.K., Lee E.J., Park S.H., Kwok S.K., Cho M.L.* 2016. Myeloid-derived suppressor cells induce the expansion of regulatory B cells and ameliorate autoimmunity in the sanroque mouse model of systemic lupus erythematosus. *Arthr. Rheumatol.* V. 68. P. 2717. <https://doi.org/10.1002/art.39767>
- Ren J., Zeng W., Tian F. Zhang S., Wu F., Qin X., Zhang Y., Lin Y.* 2019. Myeloid-derived suppressor cells depletion may cause pregnancy loss via upregulating the cytotoxicity of decidual natural killer cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* V. 81. P. 1. <https://doi.org/10.1111/aji.13099>
- Rieber N., Gille C., Kostlin N., Schafer I., Spring B., Ost M., Spieles H., Kugel H.A., Pfeiffer M., Heininger V., Alkhaled M., Hector A., Mays L., Kormann M., Zundel S. et al.* 2013. Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune response. *Clin. Exp. Immunol.* V. 174. P. 45. <https://doi.org/10.1111/cei.12143>
- Rodriguez P.C., Quiceno D.G., Ochoa A.C.* 2007. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood.* V. 109. P. 1568. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-031856>
- Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M.* 2010. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Amer. J. Reprod. Immunol.* V. 63. P. 601. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x>
- Sakuishi K., Jayaraman P., Behar S.M., Anderson A.C., Kuchroo V.K.* 2011. Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity. *Trends Immunol.* V. 32. P. 345. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.05.003>
- Schwarz J., Scheckenbach V., Kugel H., Spring B., Pagel J., Härtel C., Pauluschke-Fröhlich J., Peter A., Poets C.F., Gille C., Köstlin N.* 2018. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells (GR-MDSC) accumulate in cord blood of preterm infants and remain elevated during the neonatal period. *Clin. Exp. Immunol.* V. 191. P. 328. <https://doi.org/10.1111/cei.13059>
- Sinha P., Clements V.K., Bunt S., Albelda S., Ostrand-Rosenberg S.* 2007. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J. Immunol.* V. 179. P. 977. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.977>
- Tesi R. J.* 2019. MDSC: the most important cell you have never heard of. *Trends. Pharm. Sci.* V. 40. P. 4. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.10.008>
- Veglia F., Perego M., Gabrilovich D.* 2018. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat. Immunol.* V.19. P. 108. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0022-x>
- Verma P., Verma R., Nair R.R., Budhwar S., Khanna A., Agrawal N.R., Sinha R., Birendra R., Rajender S., Singh K.* 2019. Altered crosstalk of estradiol and progesterone with Myeloid-derived suppressor cells and Th1/Th2 cytokines in early miscarriage is associated with early breakdown of maternal-fetal tolerance. *Am. J. Reprod. Immunol.* V. 81. P. 1. <https://doi.org/10.1111/aji.13081>
- Wang Y., Liu Y., Shu C., Wan J., Shan Y., Zhi X., Sun L., Yi H., Yang Y.G., He J.* 2018. Inhibition of pregnancy-associated granulocytic myeloid-derived suppressor cell expansion and arginase-1 production in preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.* V. 127. P. 48. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2018.05.002>
- Yu J., Wang Y., Yan F., Zhang P., Li H., Zhao H., Yan C., Yan F., Ren X.* 2014. Noncanonical NF- $\kappa$ B activation mediates STAT3-stimulated IDO upregulation in myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *J. Immunol.* V. 193. P. 2574. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400833>
- Zhu M., Huang X., Yi S., Sun H., Zhou J.* 2017. High granulocytic myeloid-derived suppressor cell levels in the peripheral blood predict a better IVF treatment outcome. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med.* V. 27. P. 1. <https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1400002>

## The Role of Myeloid Suppressor Cells in the Processes of Formation of Immune Tolerance During Pregnancy

K. Yu. Shardina<sup>a, \*</sup>, S. A. Zamorina<sup>a</sup>, M. B. Raev<sup>a</sup>, and V. A. Chereshnev<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences ("IEGM UB RAS") – A Branch of the Institution of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia*

*\*e-mail: Shardinak@gmail.com*

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are one of the main cell populations involved in the regulation of the immune response by suppressing it in pathologies, as well as during pregnancy. Taking into account the multidirectionality of MDSC in the implementation of its immunosuppressive functions, the article collects the available data on the impact of MDSC on various components of innate and adaptive immunity. This review presents an analysis of current studies on the mechanisms of suppression of the immune response of MDSCs, as well as an assessment of the role of MDSCs in maintaining immune tolerance during pregnancy. In particular, the study provides data on MDSC in various pathological conditions during pregnancy, analyses of MDSC in peripheral and umbilical cord blood, and the correlation between these cells and the immune status.

*Keywords:* autoimmune disorders, pregnancy, immune tolerance, immunosuppression, myeloid-derived suppressor cells, preeclampsia, *in vitro* fertilization

## КЛЕТКИ ГЛИОБЛАСТОМ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИЙ T2 И T98G, РЕЗИСТЕНТНЫЕ К ДЕЙСТВИЮ ТЕМОЗОЛОМИДА

© 2022 г. А. А. Пиневи<sup>1, 2, \*</sup>, И. И. Бодэ<sup>2</sup>, Н. Л. Вартанян<sup>1</sup>, Л. Н. Киселева<sup>1</sup>,  
А. В. Карташев<sup>1</sup>, М. П. Самойлович<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова,  
Санкт-Петербург, 197758 Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра цитологии и гистологии,  
Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*E-mail: agniapinevich@gmail.com

Поступила в редакцию 25.11.2021 г.

После доработки 12.01.2022 г.

Принята к публикации 14.01.2022 г.

Появление в процессе химио- и лучевой терапии опухолей резистентных к этим воздействиям клеток является одной из нерешенных проблем онкологии. Исследование условий и механизмов формирования резистентности к темозоломиду, препарату первой линии в терапии глиобластом, проводят на культивируемых клеточных линиях. Учитывая гетерогенность глиобластом, представляет интерес изучение реакций различных клеточных линий на темозоломид. Целью работы были получение и характеристика резистентных в отношении темозоломида клеток линий T2 и T98G. Источником темозоломида служил препарат Темодал® в форме лиофилизата для приготовления инфузионного раствора. Известно, что клетки T98G высоко устойчивы к темозоломиду, реакция на препарат клеток T2 не исследована. Однократное воздействие темозоломида в дозе 1 мМ приводило к изменению состава клеточных популяций линии T2 – увеличению доли гигантских одноядерных клеток и клеток с фрагментированными ядрами. В результате воздействия снижалось количество клеток в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> фазах цикла, при этом содержание полиплоидных клеток возрастало в 4 раза. Клетки, которые после возобновления пролиферации были во второй и в третий раз подвергнуты воздействию темозоломида в дозе 2 мМ, отличались по морфологическому составу и пролиферативной активности от клеток, испытывавших однократное действие препарата, по многим признакам приближаясь к интактным клеткам. Так, клетки T2 после однократной инкубации с 2 мМ темозоломида восстанавливали 90% монослоя через 48 сут, после второй инкубации – через 13 сут, а после третьей экспозиции – через 2 сут. Формирование резистентности клеток T2 к темозоломиду не сопровождалось изменениями исходно высокого уровня активности генов множественной лекарственной устойчивости *ABCC1*, *ABCG2* и *ABCBI*, а также гена *MGMT*. Формирование резистентности к темозоломиду в культуре глиобластомы T2 скорее всего обусловлено действием других механизмов. Таким образом, линия T2 может служить источником клеток, резистентных в отношении темозоломида, и может быть использована в качестве модели рецидивирующей глиобластомы. Клетки T98G, как и ожидалось, показали чрезвычайно высокий уровень резистентности к темозоломиду. Препарат в дозе ниже 5 мМ не оказывал на них заметного действия.

**Ключевые слова:** глиобластома, T2, T98G, резистентные клетки, темозоломид, Темодал®, *MGMT*, *ABCC1*, *ABCG2*, *ABCBI*

**DOI:** 10.31857/S0041377122020043

### ВВЕДЕНИЕ

Формирование резистентных к химиотерапии опухолевых клеток считается одной из основных причин появления рецидивов в процессе лечения онкологических заболеваний. Несмотря на достигнутые успехи в области изучения механизмов воз-

никновения резистентности опухолевых клеток, разработка способов ее преодоления является далеко не решенной задачей онкологии.

Глиобластомы представляют собой чрезвычайно гетерогенную группу злокачественных новообразований головного мозга. Злокачественные клетки глиобластом проявляют неоднородность как у разных пациентов, так и в пределах одной опухоли, то есть обладают интер- и интраопухолевой гетерогенностью. Одно из следствий гетерогенности глиобластом – значительные различия проявлений резистентности опухолевых клеток к химиотерапии. Химиопре-

**Принятые сокращения:** ДМСО – диметилсульфоксид; ASAH1 – кислая церамидаза; HGF – гепатоцитарный ростовой фактор; SASP – “секреторный фенотип, ассоциированный со старением”; TNC – тенасцин; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

паратом, широко применяемым после хирургического лечения глиобластом, является темозоломид, цитостатический противоопухолевый препарат алкилирующего типа действия (Клинические рекомендации Ассоциации онкологов России, Ассоциации нейрохирургов России и Российского общества клинической онкологии (<https://oncology-association.ru/clinical-guidelines>); Weller et al., 2021). Формирование резистентности опухолей к этому препарату наблюдается в значительном числе случаев его использования.

Для создания клеточной модели, позволяющей исследовать формирование резистентности опухолевых клеток к действию темозоломида, были выбраны две линии глиобластом человека: T98G и T2. Линия T98G используется в лабораторной практике с 70-х годов прошлого века. В ряде работ показано, что ее клетки имеют высокий уровень устойчивости к темозоломиду (Kanzawa et al., 2003; Hermisson et al., 2006; Kinashi et al., 2020). Линия T2 была получена и охарактеризована в последнее десятилетие (Киселева и др., 2017). Чувствительность клеток линии T2 к темозоломиду не изучена. Ранее показано, что обе эти линии проявляли высокую устойчивость к действию фотемустина, химиопрепарата второй линии терапии, являющегося производным нитрозомочевины. Резистентность клеток T98G и T2 проявлялась в высоком дозовом пороге фотемустина, останавливающем клеточную пролиферацию, а также в формировании популяций переживающих клеток, которые оставались живыми и метаболически активными после воздействия высоких доз препарата (Киселева и др., 2018).

Цель работы заключалась в получении и характеристике резистентных в отношении темозоломида клеток глиобластом линий T98G и T2. В качестве источника темозоломида был использован препарат Темодал® в лекарственной форме лиофилизата для приготовления инфузионного раствора.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клеточные линии.** Клеточная линия T2 была выделена из операционного материала пациентов в ФГБУ “Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова национального исследовательского центра “Курчатовский институт” (Санкт-Петербург, Россия) и любезно предоставлена М.В. Филатовым. Клетки линии T98G были получены из коллекции клеточных культур ФГБУ “Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева” МЗ РФ (Санкт-Петербург, Россия). Основные характеристики клеток этих двух линий были описаны ранее (Киселева и др., 2016, 2017).

**Культивирование клеточных линий.** Клетки линий T2 и T98G культивировали в вентилируемых пластиковых флаконах площадью 12.5 см<sup>2</sup> (Jet Biofil, Китай) в среде  $\alpha$ MEM (БиолоТ, Россия) с добавлением

5% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) и 0.5% гентамицина (БиолоТ, Россия). Культивирование проводили при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (6% CO<sub>2</sub> в атмосфере) до образования 80–90%-ного конфлюэнтного монослоя, после чего клетки пересеивали с помощью раствора 0.25% трипсина с версеном (БиолоТ, Россия). Для экспериментов использовали клетки на 7-ом пассаже культивирования после поступления в лабораторию.

**Воздействие темозоломида на клеточные линии.** Для обработки клеток был использован Темодал® (Baxter Oncology GmbH, Германия), представляющий собой водорастворимый препарат, содержащий, помимо действующего вещества темозоломида, ряд вспомогательных веществ. При приготовлении раствора для внесения в клеточные культуры навеску Темодала® брали из расчета молярности темозоломида в конечном растворе и растворяли в деионизированной воде непосредственно перед внесением. Клетки глиобластом в логарифмической фазе роста культивировали в ростовой среде, содержащей Темодал®, в течение 24 ч. По завершении обработки клетки дважды отмывали ростовой средой. После удаления препарата каждые 3–4 сут проводили полную замену ростовой среды.

Для первичной обработки клеток линии T2 использовали темозоломид в дозах 0.5, 1, 2 и 3 мМ. Клетки T2, первично обработанные темозоломидом в дозе 1 мМ, по достижении 80–90%-ного конфлюэнтного монослоя пересеивали, после чего подвергали повторному воздействию темозоломида в дозах 2, 4 и 6 мМ. Для первичной обработки клеток линии T98G применяли темозоломид в дозах 0.5, 1, 2, 3 и 5 мМ.

**Морфологические исследования.** Живые клетки фотографировали с помощью инвертированного микроскопа со встроенной камерой Primo Vert (Carl Zeiss, Германия). Для морфологического анализа клетки фиксировали ледяным карбинолом, окрашивали по Май-Грюнвальду–Гимзе и фотографировали с помощью инвертированного микроскопа Nikon Diaphot, оборудованного камерами Nikon D60 и Nikon D5600 (Nikon, Япония). Изображения анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ (пакет Fiji) и ручного подсчета. Морфологическими параметрами служили размер клеток, количество и размер ядер, а также площадь клеток, которую определяли с помощью программного выделения (Thresholding) с ручным контролем и вычислением с использованием алгоритма ImageJ. В каждом образце анализировали не менее 1000 клеток, за исключением интактных образцов (10000 клеток) и образцов, в которых происходила массовая гибель клеток (100 клеток). Для графического представления данных (violin plot) использовали программу GraphPad Prism 9.

**ДНК-цитометрия.** Для анализа распределения по фазам клеточного цикла клетки, достигшие 80–90% конфлюэнта, снимали с поверхности культуральных

**Таблица 1.** Соотношение различных популяций клеток T2 в интактной культуре и культурах, одно- и многократно обработанных темозоломидом

Доза темозоломида, мМ	Доля клеток, %			
	маленькие одноядерные клетки	гигантские одноядерные клетки	многоядерные клетки	клетки с фрагментированными ядрами
0 (Контроль)	91.24 ± 0.64	4.37 ± 0.52	3.71 ± 0.38	0.68 ± 0.14
1	76.34 ± 3.61	14.10 ± 3.07	3.68 ± 0.65	5.88 ± 1.19
1 + 2	74.93 ± 3.07	16.34 ± 2.22	7.46 ± 1.21	1.28 ± 0.43
1 + 2 + 2	87.13 ± 1.26	7.24 ± 0.92	3.77 ± 0.39	1.86 ± 0.12
3	18.62 ± 4.53	51.39 ± 8.02	22.33 ± 4.86	7.67 ± 2.65

Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Знак “+” при указании дозы темозоломида означает повторную обработку клеток после достижения культурой, обработанной препаратом, 80–90%-ного конфлюэнтного монослоя и пересева.

флаконов с помощью раствора 0.25% трипсина с версеном (БиолоТ, Россия), дважды отмывали фосфатно-солевым буферным раствором (БиолоТ, Россия) и окрашивали с помощью Hoechst 33342 (Sigma, США) в концентрации 2 мкг/мл.

**Исследование активности генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени** проводили после восстановления клетками 80–90%-ного конфлюэнтного монослоя. Этапы анализа и последовательности использованных праймеров описаны ранее (Киселева и др., 2016). В реакцию обратной транскрипции брали 500 нг РНК. Уровень активности экспрессии генов представляли в виде разницы ( $\Delta\text{CT}$ ) между пороговым циклом исследуемого гена и гена сравнения GAPDH.

**Статистический анализ** проводили при помощи программного обеспечения Microsoft Excel, IBM SPSS Statistics 22 и GraphPad Prism 9. Для оценки морфологических параметров использовали критерий Краскела–Уоллиса, так как при предварительной проверке согласно одновыборочному критерию Колмогорова–Смирнова распределения не являлись нормальными ( $p < 0.05$ ).

**Использованные реактивы:** среда  $\alpha$ MEM, гентамицин, раствор 0.25% трипсина с версеном, деионизированная вода, фосфатно-солевой буферный раствор (БиолоТ, Россия), эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, США), Темодал® (Baxter Oncology GmbH, Германия), карбинол (Вектон, Россия), Май-Грюнвальд Гимза (BioVitrum, Россия), Hoechst 33342 (Sigma, США).

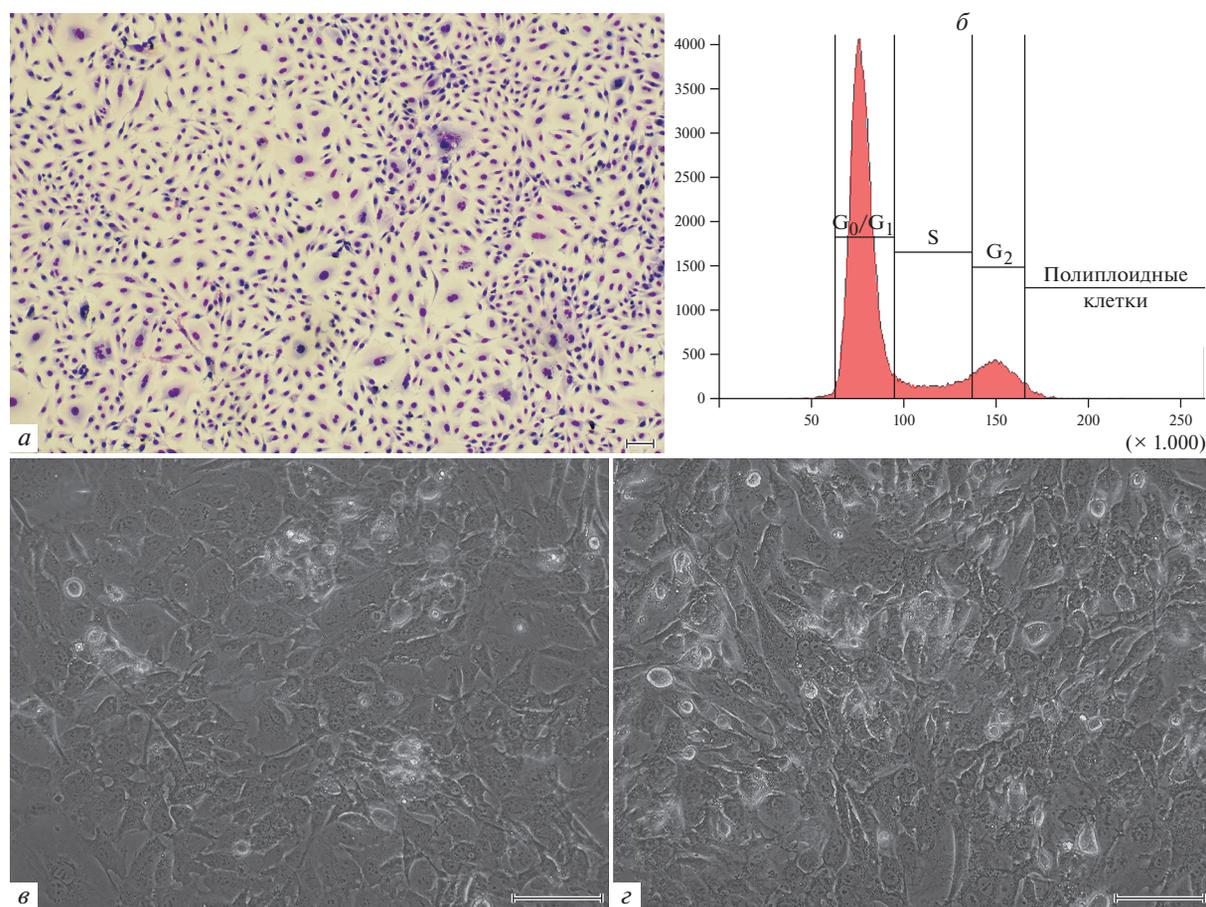
## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Характеристика интактных клеток линии T2.** Интактная линия T2 представляла собой гетерогенную клеточную культуру, более чем на 90% состоявшую из веретеновидных и фибробластоподобных одноядерных клеток (рис. 1а). В ходе морфологического исследования по размеру и количеству ядер клетки были условно разделены на четыре популяции:

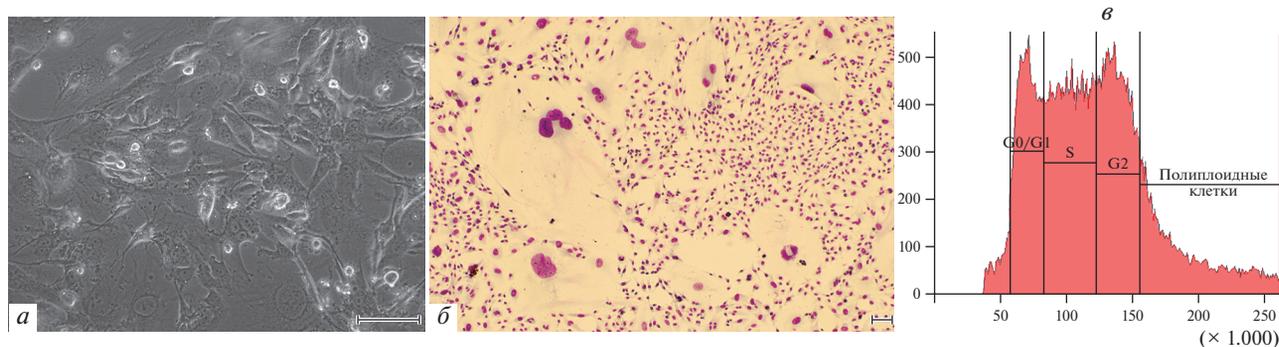
(1) маленькие одноядерные клетки основной популяции, (2) крупные (гигантские) одноядерные клетки, размер которых превышал размер клеток основной популяции, (3) клетки с двумя и более ядрами (многоядерные) и (4) клетки с фрагментированными ядрами (табл. 1). В интактной культуре T2 доля гигантских одно- и многоядерных клеток составляла  $8.08 \pm 0.62\%$ . Менее одного процента культуры представляли клетки с фрагментированными ядрами. Анализ клеточного цикла показал, что большая часть интактных клеток T2 (69.8%) находилась в фазе  $G_0/G_1$ , количество клеток в S-фазе составляло 10.4%, а в фазе  $G_2$  – 12.3% соответственно. Около 6.1% клеток были полиплоидными (рис. 1б).

**Однократное воздействие темозоломида на клетки T2.** Воздействие темозоломида в дозе 0.5 мМ на клетки глиобластомы T2 не приводило к изменению морфологических характеристик клеток (рис. 1в, г). После обработки препаратом пролиферация клеток замедлилась по сравнению с интактной культурой. Обработанные клетки культивировали в течение 14-ти сут до достижения 90%-ного конфлюэнтного монослоя.

Воздействие темозоломида в дозе 1 мМ приводило к увеличению размера клеток T2 и изменению их формы (рис. 2а). Начиная с 7-ми сут после обработки препаратом, в культуре преобладали клетки астроцитарной формы с длинными ветвящимися отростками, увеличилось число гигантских одноядерных клеток и клеток с фрагментированными ядрами (табл. 1). Непосредственно после обработки препаратом происходила временная остановка пролиферации, а в дальнейшем наблюдалось существенное ее замедление по сравнению с интактной культурой. Отдельные пролиферирующие клетки были выявлены в культуре через 9 сут, однако 90%-ного конфлюэнтного монослоя клетки достигли лишь на 23-е сут культивирования. Следует отметить, что мы не наблюдали признаков пролиферации гигантских клеток, однако при пересеве такие клетки сохраняли жизнеспособность и прикреплялись к поверхности



**Рис. 1.** Общий вид культуры клеток T2 глиобластомы человека: интактная при окраске по Май-Грюнвальду–Гимзе (а), интактная в фазовом контрасте (б) и через 13 сут после воздействия темозоломидом в дозе 0.5 мМ (в, фазовый контраст). Масштабные отрезки: 100 мкм. д – Распределение клеток интактной культуры T2 по фазам клеточного цикла (проточная цитометрия); по горизонтали – флуоресценция DAPI (окраска ядер), усл. ед.; по вертикали – число клеток.



**Рис. 2.** Общий вид культуры клеток T2 глиобластомы человека после воздействия темозоломидом в дозе 1 мМ через 13 сут (а, фазовый контраст) и через 34 сут (б, окраска по Май-Грюнвальду–Гимзе); масштабные отрезки: 100 мкм. в – распределение клеток T2 по фазам клеточного цикла (проточная цитометрия) через 5 сут после того же воздействия; по горизонтали – флуоресценция DAPI (окраска ядер), усл. ед.; по вертикали – число клеток.

культуральных флаконов наравне с пролиферирующими клетками (рис. 2б). Эффекты воздействия темозоломида на выживаемость и пролиферацию клеток в культурах глиобластом суммированы в табл. 2.

Распределение клеток T2, обработанных 1 мМ темозоломида, по фазам клеточного цикла изменилось по сравнению с интактными клетками (рис. 2в). Наибольшее число клеток находилось в фазе S

**Таблица 2.** Одно- и многократное действие темозоломида на пролиферацию и выживаемость клеток линий глиобластом

Доза темозоломида, мМ	Линия глиобластом	
	T2	T98G
Первое воздействие		
0.5	Пролиферация (14)	Пролиферация (2)
1	Пролиферация (23)	Пролиферация (2)
2	Пролиферация (48)	Пролиферация (2)
3	Непролиферирующие клетки	Пролиферация (2)
5	Н.о.	Пролиферация (9)
Второе воздействие <sup>а</sup>		
2	Пролиферация (13)	Н.о.
Третье воздействие <sup>б</sup>		
2	Пролиферация (2)	Н.о.
4	Пролиферация (10)	Н.о.
6	Гибель культуры	Н.о.

Примечание. В скобках указано время (сут) от момента окончания воздействия темозоломида до достижения культурой 80–90%-ного конфлюентного монослоя. Н.о. — не определяли. <sup>а</sup> — клетки после первого воздействия 1 мМ темозоломида после достижения 80–90%-ного конфлюентного монослоя пересевали и подвергали второму воздействию. <sup>б</sup> — клетки после второго воздействия 2 мМ темозоломида после достижения 80–90%-ного конфлюентного монослоя пересевали и подвергали третьему воздействию.

(29.5%), возросло содержание клеток в фазе G<sub>2</sub> (24.7%), в то время как число клеток в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> снизилось почти в 4 раза по сравнению с исходными клетками (18.7%). В то же время, существенно увеличилось количество полиплоидных клеток; их содержание в культуре составило 24.2%, то есть в 4 раза больше, чем в интактной культуре клеток линии T2.

Воздействие темозоломида в дозе 2 мМ также приводило к преобладанию в культуре T2 клеток астроцитарной формы с ветвящимися отростками (рис. 3а) и увеличению числа гигантских клеток (табл. 1, рис. 3б). На 20-е сут культивирования произошла гибель более 90% клеток. На 27-е сут культивирования появились единичные колонии пролиферирующих клеток. К 41-м сут культивирования количество колоний пролиферирующих клеток существенно увеличилось (рис. 3б), и на 48-е сут клетки достигли 90%-ного конфлюентного монослоя (табл. 2). После пересева соотношение различных морфологических типов клеток оставалось неизменным, причем гигантские клетки сохраняли жизнеспособность, хотя не было выявлено признаков их пролиферации.

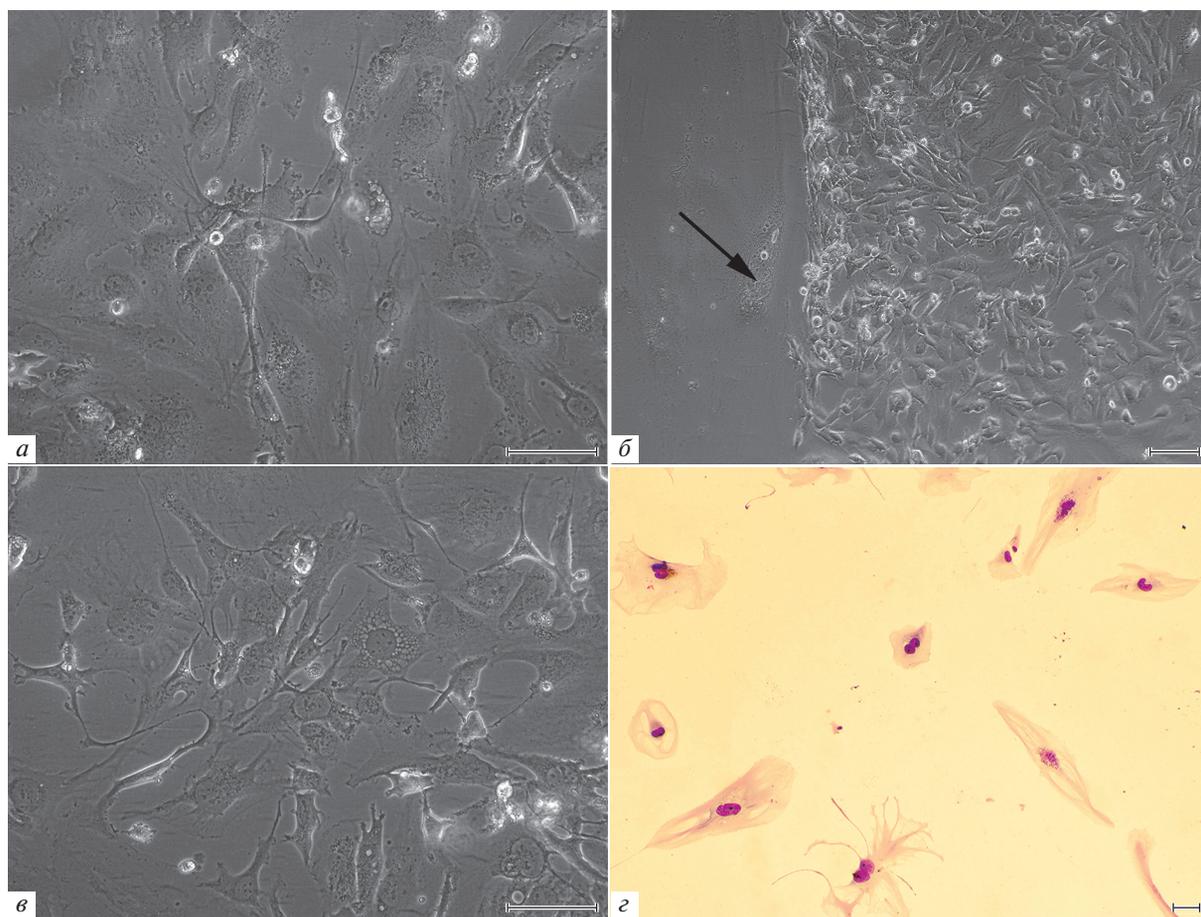
Воздействие темозоломида в дозе 3 мМ приводило к изменениям формы клеток T2, описанным для дозы 2 мМ (рис. 3в). На 20-е сут культивирования произошла гибель более 90% клеток. Сохранившая жизнеспособность популяция почти полностью состояла из гигантских и многоядерных клеток, а мелкие одноядерные клетки составляли в ней менее 20% (табл. 1). Пролиферация клеток после обработки препаратом прекратилась и в дальнейшем не возобновилась. Наблюдение за клетками проводили в те-

чение 34-х сут после завершения обработки темозоломидом (рис. 3г, табл. 2).

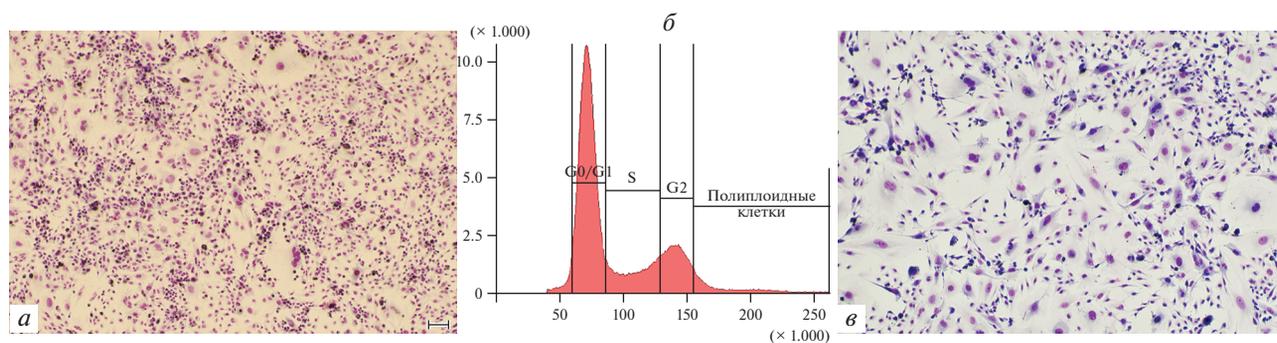
**Повторное воздействие темозоломида на клетки T2.** Клетки, сохранившие способность к пролиферации после воздействия темозоломида в дозах 1 или 2 мМ, были обозначены как резистентные. Резистентные клетки, перенесшие первое воздействие темозоломида в дозе 1 мМ, повторно обрабатывали 2 мМ темозоломида. Повторная обработка не приводила к массовой гибели клеток или остановке пролиферации (табл. 2). Число клеток астроцитарной формы и гигантских одноядерных клеток сохранилось практически неизменным, по сравнению с клетками, перенесшими однократную обработку 1 мМ темозоломида (рис. 4а). Вдвое увеличилось число многоядерных клеток, а доля клеток с фрагментированными ядрами вернулась к значениям, характерным для интактных клеток (табл. 1).

Распределение клеток, повторно обработанных темозоломидом, по фазам клеточного цикла было ближе к норме по сравнению с клетками, подвергнутыми однократному воздействию препарата (рис. 4б). Так, наибольшее количество клеток находилось в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (51%), а численность клеток в фазах S (14.9%) и G<sub>2</sub> (15.3%) была сопоставимой. Однако, по сравнению с интактными клетками, количество полиплоидных клеток все еще было значительно больше (15.9%).

Резистентные клетки, перенесшие первое воздействие темозоломида в дозе 1 мМ и второе воздействие в дозе 2 мМ, пересевали и повторно обрабатывали темозоломидом в концентрациях 2, 4 и 6 мМ (табл. 2). Третья обработка резистентных клеток те-



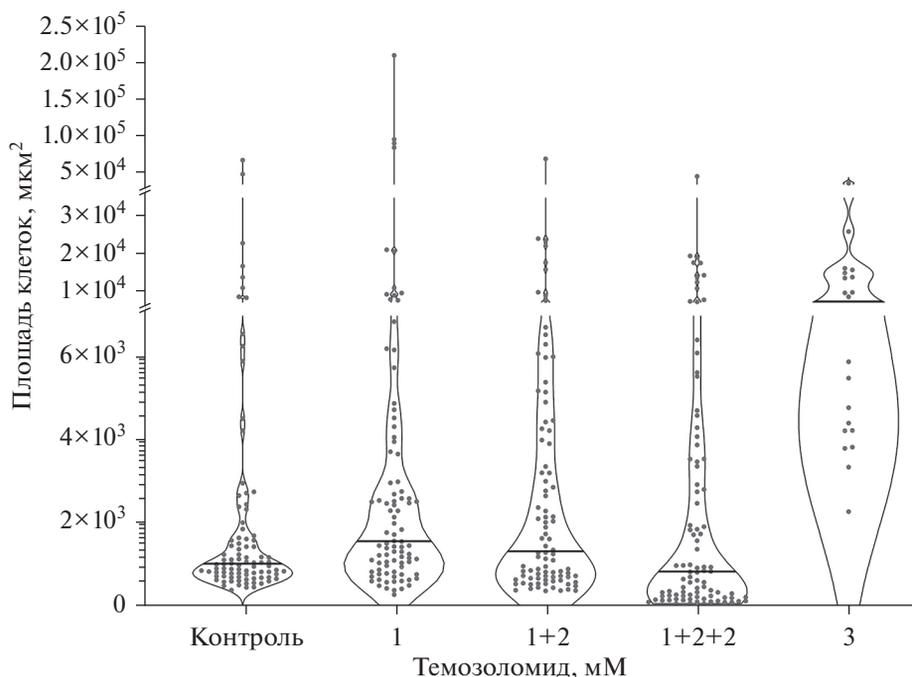
**Рис. 3.** Общий вид культуры клеток T2 глиобластомы человека после воздействия темозоломидом в дозе 2 мМ через 13 (а) и 41 сут (б), а также в дозе 3 мМ через 13 (в) и 34 сут (г). Стрелка указывает на ядро гигантской клетки. а–в: фазовый контраст. г – окраска по Май-Грюнвальду–Гимзе. Масштабные отрезки: 100 мкм.



**Рис. 4.** Общий вид культуры клеток T2 глиобластомы человека, перенесших первое действие темозоломидом (1 мМ), а затем второе воздействие в дозе 2 мМ через 23 сут (а) и третье воздействие в дозе 2 мМ через 11 сут (в). Окраска по Май-Грюнвальду–Гимзе; масштабные отрезки: 100 мкм. б – Распределение клеток T2 по фазам клеточного цикла (проточная цитометрия) через 20 сут после второго воздействия темозоломидом (2 мМ); по горизонтали – флуоресценция DAPI (окраска ядер), усл. ед.; по вертикали – число клеток.

мозоломидом в дозе 2 мМ не приводила ни к массовой гибели клеток, ни к остановке клетками пролиферации, при этом в культуре сохранялись как активно пролиферирующие клетки, так и гигантские

непроделирующиеся клетки (рис. 5в). Число клеток астроцитарной формы и многоядерных клеток возвращалось к показателям, выявленным для интактных клеток. Содержание гигантских одноядерных



**Рис. 5.** Площадь клеток линии T2 интактных и обработанных одно- и многократно темозоломидом. Точки — значения для индивидуальных клеток, горизонтальные линии — медианы. Здесь и на рис. 8, 9, 10 знак “+” на горизонтальной оси при указании концентрации темозоломида означает повторную обработку клеток после достижения культурой, обработанной препаратом, 80–90%-ного конфлюэнтного монослоя и пересева.

клеток также уменьшалось, по сравнению с клетками, перенесшими однократное воздействие темозоломида, но превышало таковое в культуре интактных клеток линии T2 (табл. 1). Третья обработка резистентных клеток темозоломидом в дозе 4 мМ приводила к временной остановке пролиферации, которая возобновилась на 6-е сут после завершения обработки. Наконец, третья обработка резистентных клеток 6 мМ темозоломида привела к гибели всех клеток. Таким образом, резистентные клетки линии T2 отличались меньшей чувствительностью к воздействиям темозоломида в концентрациях, превышающих использованные при первичной обработке интактных клеток.

**Определение площади клеток T2, интактных и обработанных темозоломидом.** Для оценки морфологических изменений клеток T2 после обработки темозоломидом было проведено измерение площади клеток (рис. 5). Площадь интактных клеток основной популяции (маленьких одноядерных клеток) варьировала в пределах 450–2000 мкм<sup>2</sup> в зависимости от формы клеток. Площадь гигантских одноядерных интактных клеток также варьировала, в основном находясь в пределах  $(2-4) \times 10^3$  мкм<sup>2</sup>. Наконец, площадь гигантских многоядерных клеток составляла в среднем  $(10-15) \times 10^3$  мкм<sup>2</sup>. Таким образом, средняя площадь интактных клеток T2 составила  $3463 \pm 962$  мкм<sup>2</sup>.

При однократной обработке 1 мМ темозоломида средняя площадь клеток увеличивалась по сравне-

нию с интактными образцами ( $8124 \pm 2854$  мкм<sup>2</sup>), что во многом отражало уменьшение числа мелких клеток и увеличение доли гигантских клеток (табл. 1). Обработка клеток T2 3 мМ темозоломида приводила к еще более существенному увеличению площади клеток по сравнению с контролем ( $10300 \pm 1922$  мкм<sup>2</sup>) (рис. 5).

Повторная обработка 2 мМ темозоломида клеток T2, подвергнутых однократному воздействию 1 мМ темозоломида, привела к уменьшению средней площади клеток ( $4028 \pm 894$  мкм<sup>2</sup>) по сравнению с однократно обработанными клетками. Наконец, вследствие третьей обработки клеток 2 мМ темозоломида произошло дальнейшее уменьшение площади клеток, причем средняя площадь клеток T2, подвергнутых трехкратному воздействию препарата ( $3319 \pm 673$  мкм<sup>2</sup>), была ниже таковой у интактных клеток (рис. 5).

Таким образом, в ответ на первоначальное воздействие темозоломида средняя доля клеток T2 с увеличенной площадью возрастала по сравнению с интактными клетками, причем степень увеличения площади клеток зависела от дозы препарата. Повторные воздействия темозоломида приводили к возвращению показателя средних размеров клеток к значениям, характерным для интактных клеток.

**Характеристика интактных клеток линии T98G.** Морфологическая характеристика интактной культуры T98G была проведена ранее (Киселева и др., 2016). В настоящей работе при морфологическом

**Таблица 3.** Соотношение различных популяций клеток T98G в интактной культуре и культуре, однократно обработанной темозоломидом

Концентрация темозоломида, мМ	Доля клеток, %			
	маленькие одноядерные клетки	гигантские одноядерные клетки	многоядерные клетки	клетки с фрагментированными ядрами
0 (Контроль)	88.21 ± 1.81	4.99 ± 1.53	6.67 ± 0.67	0.02 ± 0.02
5	92.83 ± 1.70	3.96 ± 1.05	1.74 ± 0.33	1.80 ± 0.46

Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего.

анализе клетки линии T98G были условно разделены на четыре популяции, аналогичные описанным выше для глиомы линии T2. Показано, что в интактной культуре T98G преобладали маленькие одноядерные клетки (табл. 3), также были выявлены гигантские одно- и многоядерные клетки, в то время как клетки с фрагментированными ядрами практически отсутствовали.

**Воздействие темозоломида на клетки T98G.** Обработка клеток T98G темозоломидом в дозах 0,5, 1, 2, 3 и 5 мМ не приводила ни к изменению морфологии клеток, ни к прекращению клетками пролиферации (рис. 6, табл. 3). При обработке клеток 5 мМ темозоломида было выявлено замедление скорости пролиферации клеток по сравнению с интактной культурой. В культуре клеток T98G, обработанных 5 мМ темозоломида, число маленьких одноядерных клеток увеличивалось по сравнению с контролем, в то время как доля гигантских клеток уменьшалась. Число клеток с фрагментированными ядрами также незначительно увеличивалось (табл. 3).

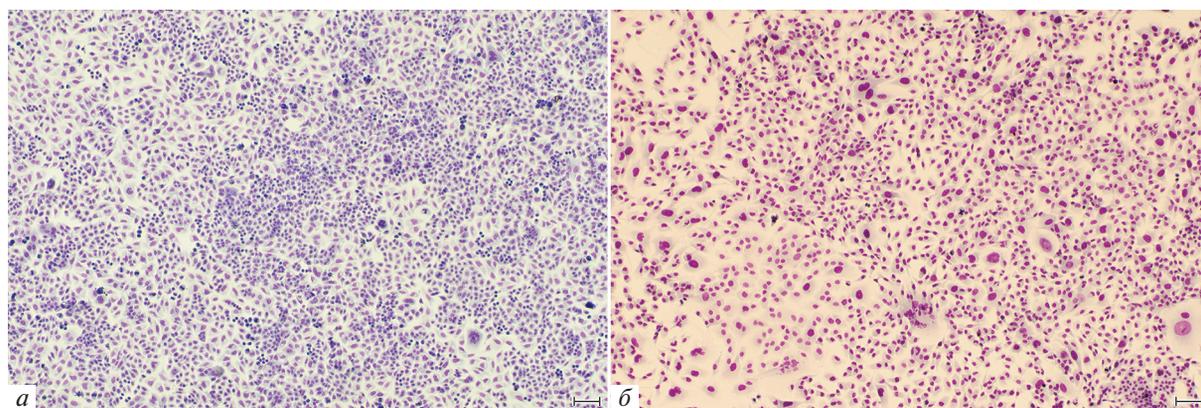
**Определение площади клеток T98G, интактных и обработанных темозоломидом.** Площадь интактных клеток основной популяции (маленьких одноядерных клеток) составляла 240–800 мкм<sup>2</sup> (рис. 7). Площадь гигантских одноядерных клеток находилась в пределах 2000–3500 мкм<sup>2</sup>. Площадь многоядерных клеток широко варьировала и составляла 700–13300 мкм<sup>2</sup>.

При обработке клеток линии T98G 5 мМ темозоломида размерные характеристики клеток оставались практически неизменными по сравнению с контролем (рис. 7).

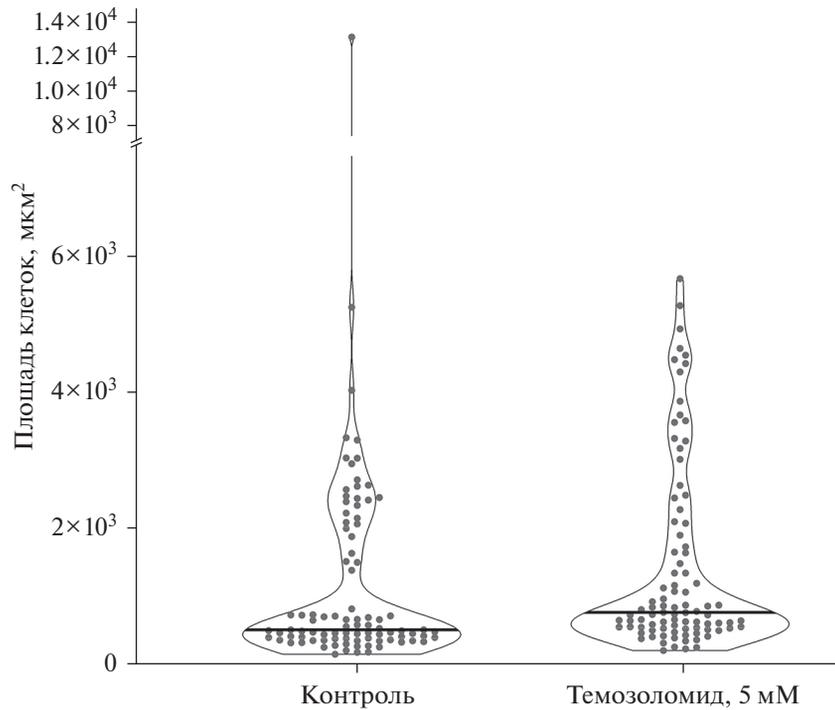
**Определение уровня экспрессии генов в клетках T2 и T98G.** В клетках T2 и T98G была исследована экспрессия генов, связанных с множественной лекарственной устойчивостью: *ABCC1*, *ABCG2* и *ABCB1* (рис. 8a). Интактные клетки T98G отличались высокой экспрессией генов *ABCC1* и *ABCG2*, существенно превышавшей таковую в интактных клетках T2, однако клетки T2 характеризовались более высокой активностью гена *ABCB1* по сравнению с клетками T98G.

Темозоломид не оказывал значимого влияния на экспрессию генов множественной лекарственной устойчивости в клетках линии T2, подвергнутых первичной обработке препаратом. Резистентные к действию темозоломида клетки T2 по этому признаку также не отличались от интактных клеток (рис. 8б). В клетках линии T98G, обработанных разными дозами темозоломида, также не было обнаружено изменения экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости (данные не представлены).

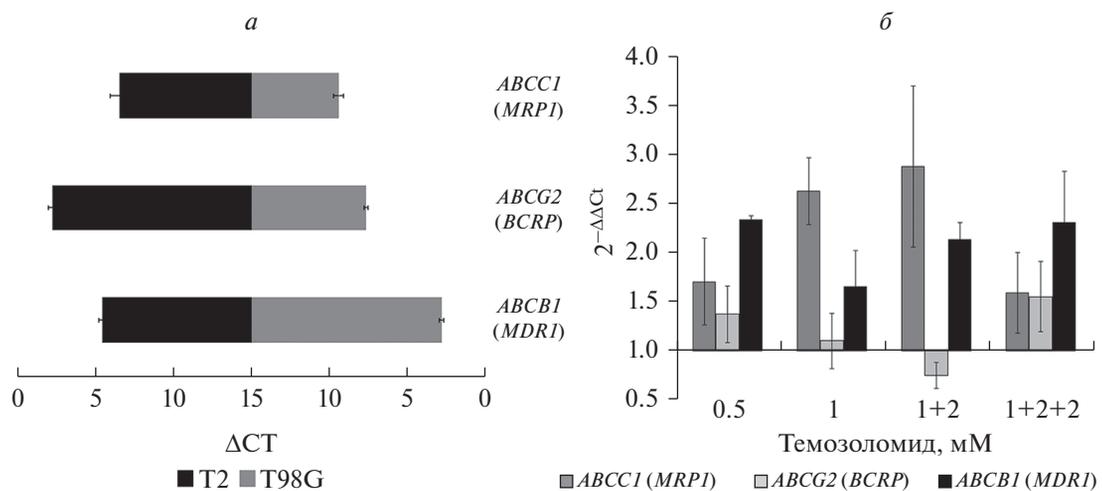
В интактных и резистентных клетках T2 после однократного, двукратного и трехкратного воздействий темозоломида была исследована экспрессия генов фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ге-



**Рис. 6.** Общий вид культуры клеток T98G глиобластомы человека: интактная (a) и после воздействия темозоломидом в дозе 5 мМ через 19 сут (б). Окраска по Май-Грюнвальду-Гимзе. Масштабные отрезки: 100 мкм.



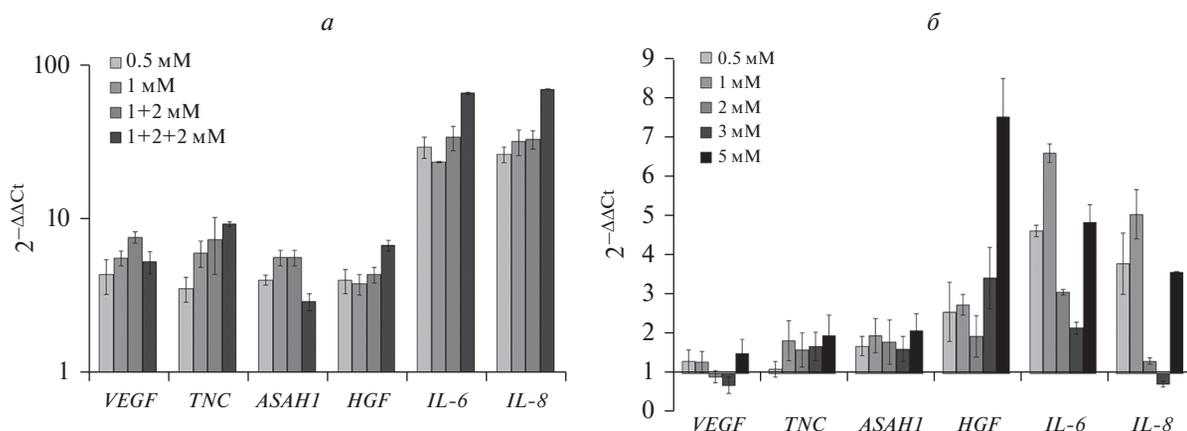
**Рис. 7.** Площадь клеток линии Т98G, интактных и обработанных темозоломидом. Точки — значения для индивидуальных клеток, горизонтальные линии — медианы.



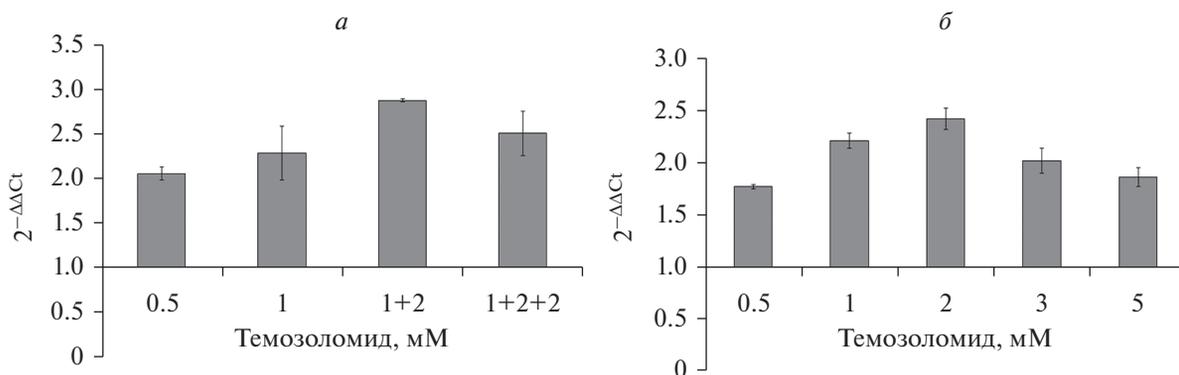
**Рис. 8.** Уровень экспрессии генов (указаны справа) множественной лекарственной устойчивости в интактных клетках Т2 и Т98G (относительный, *а*) и в клетках Т2, обработанных темозоломидом (*б*). ПЦР-анализ в режиме реального времени. *а*: ΔCT — разница между пороговым циклом исследуемого гена и гена сравнения *GAPDH*.

патогенного фактора роста (HGF), теназина (TNC), кислой церамидазы (ASAHI), IL-6 и IL-8 (рис. 9а). По сравнению с исходными клетками резистентные клетки Т2 более активно экспрессировали все исследованные гены. Наибольшее усиление экспрессии было отмечено в отношении генов, кодирующих провоспалительные цитокины IL-6 и IL-8.

Экспрессия генов *VEGF*, *TNC*, *ASAHI*, *HGF*, *IL-6* и *IL-8* была изучена в клетках Т98G после обработки разными дозами темозоломида (рис. 9б). Экспрессия генов *VEGF*, *TNC* и *ASAHI* оставалась практически неизменной. Наиболее существенно увеличивалась экспрессия *HGF* при обработке клеток Т98G 5 мМ темозоломида. Экспрессия провоспалитель-



**Рис. 9.** Уровень экспрессии генов в клетках T2 (а) и T98G (б), обработанных темозоломидом в разных концентрациях. ПЦР-анализ в режиме реального времени. Названия генов указаны по горизонтали.



**Рис. 10.** Уровень экспрессии гена *MGMT* в клетках T2 (а) и T98G (б), обработанных темозоломидом в разных концентрациях. ПЦР-анализ в режиме реального времени.

ных цитокинов IL-6 и IL-8 варьировала вне зависимости от использованной дозы темозоломида.

В клетках линий T2 и T98G, интактных и обработанных темозоломидом, была исследована экспрессия гена *MGMT*, кодирующего белок репарации ДНК (рис. 10). Высокий уровень активности *MGMT* является одним из ключевых факторов, определяющих неудачу лечения темозоломидом. Интактные клетки T2 и T98G обладали сходным уровнем экспрессии *MGMT*. Обработка клеток обеих линий темозоломидом не приводила к значимому изменению экспрессии гена, при этом не было обнаружено зависимости между дозой темозоломида и уровнем экспрессии *MGMT*. Экспрессия *MGMT* в резистентных клетках линии T2, подвергнутых повторным обработкам темозоломидом, также оставалась практически неизменной.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из главных нерешенных проблем современной онкологии является появление рецидивов

новообразований спустя то или иное время после проведения химио- и (или) лучевой терапии. Анализ экспериментальных данных и клинических исследований показал, что источником рецидивов опухолей являются клетки, резистентные к предшествовавшей терапии (Свирновский, 2014; Волков, 2021). До настоящего времени нет четкого определения резистентных опухолевых клеток, а, соответственно, не обозначены маркеры, их идентифицирующие. Опухоли могут исходно содержать клетки, высокоустойчивые ко многим химиопрепаратам и облучению, что обозначается как первичная резистентность опухолевых клеток. В процессе терапии опухолей также формируются популяции резистентных клеток, что обозначается как вторичная или приобретенная резистентность, которая имеет многофакторный характер (Mirzayans, Murray, 2020). При этом отдельные клетки в пределах одной опухоли могут использовать разные механизмы устойчивости к препаратам, такие как длительная задержка пролиферации, активация репаративных систем, парадок-

сальный апоптоз, клеточное слияние и другие (Mirzayans, Murray, 2020).

Для выявления и характеристики резистентных клеток используют различные методические приемы, в том числе оценку жизнеспособности (по проницаемости для витальных красителей, активности клеточных ферментов), которая выполняется в ближайшие дни после применения облучения или химиопрепаратов. Определение колониеобразующих единиц (КОЕ) занимает более длительное время – несколько недель, но, на наш взгляд, является значительно более информативным тестом.

Отличительная особенность нашей работы состояла в том, что наблюдения над клетками линий глиобластом проводили в течение длительного времени (не менее 1 месяца). Для изучения брали клетки, которые выжили после инкубации с темозоломидом в сублетальных дозах, длительное время сохранялись в непролиферирующем (спящем) состоянии, затем возобновляли деление, после чего были однократно пересеяны. Эти резистентные клетки исследовали непосредственно или после следующих аналогичных циклов обработки темозоломидом.

В качестве источника темозоломида в работе был использован препарат Темодал® в лекарственной форме лиофилизата для приготовления инфузионного раствора, что позволило избежать дополнительного токсического действия диметилсульфоксида, стандартно применяемого для растворения темозоломида в экспериментах с клеточными культурами. Наряду с действующим веществом, Темодал® содержит ряд вспомогательных веществ: маннитол, треонин, полисорбат-80, натрия цитрата дигидрат и хлористоводородную кислоту. Это обстоятельство накладывает определенные ограничения на интерпретацию полученных результатов из-за наличия в составе препарата треонина, обладающего протективным действием, в частности способностью снижать интенсивность проапоптотических процессов (Baird et al., 2013). Известно, что клетки T98G имеют изначально высокий уровень устойчивости к темозоломиду (Lee, 2016), однако исследования чувствительности клеток этой линии к темозоломиду в форме Темодала® нам не известны. Влияние темозоломида на клетки линии T2 ранее не было исследовано.

Темозоломид оказывал влияние на морфологические характеристики клеток линии T2 и параметры клеточного цикла, существенно замедляя клеточную пролиферацию. Так, после однократного воздействия темозоломида в дозах 1 или 2 мМ клеткам T2 для достижения 80–90% конфлюентного монослоя требовалось 23 и 48 сут соответственно. Однако при последующих обработках темозоломидом клеток, переживших первое воздействие препарата, время, необходимое для достижения 80–90% конфлюентного монослоя, сокращалось, приближаясь к значениям, характерным для интактных клеток. Формирование популяций клеток T2, более резистентных к

действию темозоломида, чем исходные, происходило уже после однократного воздействия препарата в дозе 1 мМ. Популяции резистентных клеток T2, полученные после одно-, двух- и трехкратного воздействия темозоломида, различались по клеточному составу. После первого воздействия препарата было отмечено снижение числа мелких одноядерных клеток, характерных для интактных культур T2, и увеличение числа крупных одноядерных клеток, а также клеток с фрагментированными ядрами. При повторном воздействии препарата возросло число крупных многоядерных клеток, а количество клеток с фрагментированными ядрами, напротив, уменьшилось. После третьего воздействия темозоломида число мелких одноядерных клеток вновь возрастало, а число крупных клеток, напротив, снижалось. Таким образом, после третьего воздействия препарата клетки смогли восстановить исходный “нормальный” фенотип, одновременно приобретая высокую устойчивость к темозоломиду. Размерные характеристики клеток линии T2 после многократного воздействия темозоломида также возвращались к показателям, характерным для интактных клеток.

Аналогичные тенденции наблюдались и в отношении распределения клеток по фазам клеточного цикла. Так, после первого воздействия темозоломида наибольшее число клеток находилось в фазах S и G<sub>2</sub>, а содержание полиплоидных клеток по сравнению с интактной культурой возрастало. Однако уже после повторной инкубации клеток T2 с темозоломидом распределение их по фазам цикла приближалось к таковому для интактных клеток. Количество полиплоидных клеток при этом оставалось существенно увеличенным. Роль полиплоидных клеток опухоли в формировании устойчивости новообразований к терапевтическим воздействиям рассмотрена нами в обзоре 2020 года (Вартанян и др., 2020).

Ранее мы показали, что линии T2 и T98G имели высокую устойчивость к повреждающему действию фотемустина, препарата второй линии терапии глиобластом. Клетки обеих линий имели высокий дозовый порог, при котором наблюдалось прекращение клеточной пролиферации. Они характеризовались способностью формировать популяции переживающих, непролиферирующих, клеток, которые после воздействия высоких доз препарата долгое время оставались живыми и сохраняли метаболическую активность (Киселева и др., 2018).

Формирование популяции переживающих клеток происходило и в случае действия на клетки T2 высоких доз темозоломида. Популяции клеток этой линии, сохранившиеся после обработки темозоломидом в дозе 3 мМ, состояли преимущественно из крупных одно-, многоядерных клеток и клеток с фрагментированными ядрами, тогда как мелких одноядерных клеток сохранялось менее 20%. После действия темозоломида в такой высокой дозе клетки не смогли восстановить пролиферативную актив-

ность, однако сохраняли жизнеспособность более месяца.

Линия T98G отличалась иным характером ответа на действие темозоломида. Резистентность этих клеток была исходно настолько высока, что лишь максимальная использованная доза 5 мМ смогла снизить их пролиферативную активность, а при более низких дозах препарата антипролиферативный эффект не был отмечен. Морфологические изменения клеток в результате обработки препаратом также были слабо выражены. Наблюдаемый эффект можно объяснить тем, что препарат Темодал®, использованный для обработки клеток, содержал, помимо темозоломида, другие компоненты, концентрация которых существенно возрастала при увеличении концентрации действующего вещества в ходе обработки клеток. При использованных нами дозах темозоломида формирование популяции переживающих клеток линии T98G не наблюдали.

Резистентность опухоли формируется под действием различных молекулярных механизмов. Один из важнейших связан с функционированием транспортных белков – ABC-транспортёров, обеспечивающих эффлюкс химиопрепаратов из клетки против градиента концентрации с затратой энергии АТФ, что приводит к быстрому уменьшению внутриклеточного уровня препарата ниже терапевтической концентрации (Borst et al., 2000; George, 2015; Kathawala et al., 2015). Существенная роль в развитии резистентности к химиопрепаратам принадлежит представителю трех субсемейств данной группы белков. К ним относятся белки ABCB1 (P-гликопротеин), ABCG2 и ABCC1, экспрессируемые на опухолевых и стволовых опухолевых клетках и усиливающие резистентность к химиопрепаратам, в том числе темозоломиду (Peignan et al., 2011; Coyle et al., 2015; Gooijer et al., 2018; Wang et al., 2019).

Клетки линий T2 и T98G имели индивидуальный спектр активности генов белков-транспортёров ABC. Так, в клетках линии T98G экспрессия генов *ABCC1* и *ABCG2* превышала таковую в клетках T2, причем наибольшая активность была характерна для гена *ABCC1*, кодирующего белок множественной лекарственной устойчивости 1 (Mrp1). Высокий уровень экспрессии Mrp1 в клетках линии T98G был описан ранее (Peignan et al., 2011). В клетках T2 наибольшая активность была определена у гена *ABCB1*. Воздействие темозоломида не оказывало существенного влияния на уровень экспрессии этих генов.

Ген *MGMT* кодирует фермент O-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазу, белок репарации ДНК, защищающий клетку от мутагенных и цитотоксических свойств алкилирующих агентов. Высокая экспрессия *MGMT* является одним из ключевых факторов, определяющих устойчивость клеток опухоли к алкилирующим препаратам, в том числе к действию темозоломида (Kitange et al., 2009; Perazzoli et al., 2015; Chen et al., 2018; Oldrini et al., 2020). Известно,

что уровень экспрессии *MGMT* в глиобластомах варьирует в широких пределах. Так, клетки линии T98G характеризуются высоким уровнем активности этого гена в отличие, например, от клеток линии A172 (Hermisson et al., 2006; Kinashi et al., 2020).

В наших исследованиях интактные клетки T2 и T98G обладали сходным уровнем экспрессии гена *MGMT*, кодирующего белок репарации ДНК. Обработка клеток обеих линий темозоломидом не приводила к значимому изменению экспрессии гена *MGMT*, при этом не было обнаружено зависимости между дозой темозоломида и активностью данного гена. Экспрессия *MGMT* в резистентных клетках линии T2, подвергнутых повторным обработкам темозоломидом, также оставалась практически неизменной. Таким образом, наблюдаемые нами изменения в чувствительности клеток T2 к темозоломиду скорее всего обусловлены действием других механизмов, определяющих появление химиорезистентности. Однако следует отметить, что существуют данные в пользу того, что действие темозоломида может приводить к снижению в клетках T98G содержания O-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы, но не к снижению экспрессии гена *MGMT* (Vlachostergios et al., 2013).

В интактных и обработанных темозоломидом клетках T2 и T98G была исследована активность ряда генов, связанных с прогрессией опухолей. В клетках линии T2 наибольшее усиление экспрессии было отмечено в отношении генов, кодирующих провоспалительные цитокины IL-6 и IL-8, являющихся одними из основных компонентов секреторного фенотипа, ассоциированного с клеточным старением (Vaugh et al., 2008; Palena et al., 2012; Ortiz-Montero et al., 2017; Бородкина и др., 2018).

Процесс клеточного старения сопровождается секрецией множества факторов, объединенных названием “секреторный фенотип, ассоциированный со старением” (senescence associated secretory phenotype, SASP). С их помощью стареющие клетки способны оказывать влияние на микроокружение, воздействуя на процессы пролиферации и дифференцировки (Corpe et al., 2010) и создавая условия, благоприятные для роста и размножения клеток, в том числе злокачественных (Chen et al., 2014). Резистентные клетки T2 более активно, чем интактные клетки, экспрессировали ген гепатоцитарного ростового фактора (HGF), также являющегося компонентом SASP и участвующего в процессах регуляции клеточного цикла, дифференцировки, морфогенеза и апоптоза (Lamouille et al., 2014; Inan, Nayran, 2019), ген фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) – основного проангиогенного фактора (Melincovici et al., 2018), ген тенасцина (TNC) – компонента метастатической ниши (Brosicke, Faissner, 2015; Angel et al., 2020) и кислотной церамидазы (ASAH1) – фермента метаболизма сфинголипидов, участвующего в формировании резистентности к терапии и связанного с более агрес-

сивным течением заболевания (Bai et al., 2017; Lee, 2016; Nguyen et al., 2018; Parveen et al., 2019). Активация данных генов в изучаемых популяциях резистентных к темозоломиду клеток может свидетельствовать о наличии у них признаков, характерных для более агрессивных клонов опухолевых клеток.

В клетках T98G экспрессия генов *VEGF*, *TNC* и *ASAH1* после обработки разными дозами темозоломида оставалась практически неизменной. Наиболее существенно увеличивалась экспрессия *HGF* при использовании темозоломида в дозе 5 мМ. Экспрессия провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8 варьировала вне зависимости от использованной дозы темозоломида.

Таким образом, линия T2 может служить источником клеток, резистентных в отношении ряда противоопухолевых препаратов, и быть использована в качестве модели рецидивирующей глиобластомы. В то же время, клетки линии T98G показали чрезвычайно высокий уровень резистентности к темозоломиду, и обработка препаратом даже в очень высоких дозах не оказывала на эти клетки существенного влияния.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания “Изучение резистентных опухолевых клеток на культурах глиобластом при моделировании стереотаксической радиохиргии рецидивирующей глиобластомы”.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют, что у них нет конфликта интересов.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

А.А. Пиневиц, И.И. Бодэ, Н.Л. Вартамян, Л.Н. Киселева, А.В. Карташев, М.П. Самойлович: идея работы, ее планирование. А.А. Пиневиц, И.И. Бодэ, Н.Л. Вартамян, М.П. Самойлович: проведение экспериментов, обработка результатов, написание текста, подготовка иллюстраций. А.А. Пиневиц, И.И. Бодэ, Л.Н. Киселева: культивирование клеток, приготовление препаратов для микроскопических исследований. А.А. Пиневиц: микроскопия, ДНК-цитометрия. Н.Л. Вартамян: выделение РНК и проведение ПЦР. А.А. Пиневиц, И.И. Бодэ: морфологический анализ. И.И. Бодэ: статистический анализ. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бородкина А.В., Дерябин П.И., Грюкова А.А., Никольский Н.Н. 2018. “Социальная жизнь” стареющих клеток: что та-

кое SASP и зачем его изучать? *Acta Naturae*. Т. 10. № 1. С. 4–14. (Borodkina A.V., Deryabin P.I., Grukova A.A., Nikolskiy N.N. 2018. “The social life” of aging cells: what is SASP and why study it? *Acta Naturae*. V. 10. № 1. P. 4–14).

Вартамян Н.Л., Пиневиц А.А., Бодэ И.И., Самойлович М.П. 2020. Полиплоидные гигантские клетки опухоли и их роль в формировании устойчивости к терапевтическим воздействиям. *Современная онкология*. Т. 22. № 3. С. 105–108. (Vartanyan N.L., Pinevich A.A., Bode I.I., Samoylovich M.P. 2020. Polyploid giant cancer cells and their role in the formation of resistance to therapeutic treatment. *J. Mod. Oncol.* V. 22. № 3. P. 105–108).

Волков Н.М. 2021. Резистентности к химиотерапии – исчерпаны ли возможности? *Практическая онкология*. Т. 22. № 2. С. 99–108. (Volkov N.M. 2021. Cancer resistance to chemotherapy – are all possibilities exhausted? *Pract. Oncol.* V. 22. № 2. P. 105–108).

Киселева Л.Н., Карташев А.В., Вартамян Н.Л., Пиневиц А.А., Самойлович М.П. 2016. Характеристика клеточных линий A172 и T98G. *Цитология*. Т. 58. № 5. С. 349–355. (Kiseleva L.N., Kartashev A.V., Vartanyan N.L., Pinevich A.A., Samoilovich M.P. 2016. A172 and T98G cell lines characteristics. *Cell Tiss. Biol.* V. 10. № 5. P. 341–348).

Киселева Л.Н., Карташев А.В., Вартамян Н.Л., Пиневиц А.А., Самойлович М.П. 2018. Действие фотемустина на клетки линий глиобластом человека. *Цитология*. Т. 60. № 1. С. 21–29. (Kiseleva L.N., Kartashev A.V., Vartanyan N.L., Pinevich A.A., Samoilovich M.P. 2018. The effect of fotemustine on human glioblastoma cell lines. *Cell Tiss. Biol.* V. 12. № 2. P. 93–101).

Киселева Л.Н., Карташев А.В., Вартамян Н.Л., Пиневиц А.А., Филатов М.В., Самойлович М.П. 2017. Характеристика новых клеточных линий глиобластом человека. *Цитология*. Т. 59. № 10. С. 669–675. (Kiseleva L.N., Kartashev A.V., Vartanyan N.L., Pinevich A.A., Filatov M.V., Samoilovich M.P. 2017. Characterization of new human glioblastoma cell lines. *Cell Tiss. Biol.* V. 12. № 1. P. 1–6).

Сви́рновский А.И. 2014. Резистентность опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям как медико-биологическая проблема. *Международные обзоры: клиническая практика и здоровье*. Т. 4. С. 15–38. (Svirnovskiy A.I. 2014. Resistance of tumor cells to therapeutic effects as a medical and biological problem. *Int. Rev. Clin. Pract. Health.* V. 4. P. 15–38).

Angel I., Kerman O.P., Rouso-Noori L., Friedmann-Morvinsk D. 2020. Tenascin C promotes cancer cell plasticity in mesenchymal glioblastoma. *Oncogene*. V. 39. P. 6990–7004.

Bai A., Mao C., Jenkins R.W., Szulc Z.M., Bielawska A., Hannun Y.A. 2017. Anticancer actions of lysosomally targeted inhibitor, LCL521, of acid ceramidase. *PLoS One*. V. 12. P. e0177805.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177805>

Baird C.H., Niederlechner S., Beck R., Kallweit A.R., Wischmeyer P.E. 2013. L-Threonine induces heat shock protein expression and decreases apoptosis in heat-stressed intestinal epithelial cells. *Nutrition*. V. 29. P. 1404–1411.

Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. 2000. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* V. 92. P. 1295–1302.

- Brosicke N. and Faissner A.* 2015. Role of tenascins in the ECM of gliomas. *Cell Adh. Migr.* V. 9. P. 131–140.
- Chen F., Qi X., Qian M., Dai Y., Sun Y.* 2014. Tackling the tumor microenvironment: what challenge does it pose to anticancer therapies? *Protein Cell.* V. 5. P. 816–826.
- Chen X., Zhang M., Gan H., Wang H., Lee J.H., Fang D., Kitange G.J., He L., Hu Z., Parney I.F., Meyer F.B., Giannini C., Sarkaria J.N., Zhang Z.* 2018. A novel enhancer regulates MGMT expression and promotes temozolomide resistance in glioblastoma. *Nat. Commun.* V. 9. P. 2949. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05373-4>
- Coppe J.P., Desprez P.Y., Krtolica A., Campisi J.* 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Ann. Rev. Pathol.* V. 5. P. 99–118.
- Coyle B., Kessler M., Sabnis D.H., Kerr I.D.* 2015. ABCB1 in children's brain tumors. *Biochem. Soc. Trans.* V. 43. P. 1018–1022.
- George A.M.* 2015. ABC transporters – 40 years on. Springer.
- Gooijer M.C., de Vries N.A., Buckle T., Buil L.C.M., Beijnen J.H., Boogerd W., van Tellingen O.* 2018. Improved brain penetration and antitumor efficacy of temozolomide by inhibition of ABCB1 and ABCG2. *Neoplasia.* V. 20. P. 710–720.
- Hermisson M., Klumpp A., Wick W., Wischhusen J., Nagel G., Roos W., Kaina B., Weller M.* 2006. O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *J. Neurochem.* V. 96. P. 766–776.
- Inan S., Hayran M.* 2019. Cell signaling pathways related to epithelial mesenchymal transition in cancer metastasis. *Crit. Rev. Oncog.* V. 24. P. 47–54.
- Kanzawa T., Bedwell J., Kondo Y., Kondo S., Germano I.M.* 2003. Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide. *J. Neurosurg.* V. 99. P. 1047–1052.
- Kathawala R.J., Gupta P., Ashby C.R., Chen Z.S.* 2015. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist. Updat.* V. 18. P. 1–17.
- Kinashi Y., Ikawa T., Takahashi S.* 2020. The combined effect of neutron irradiation and temozolomide on glioblastoma cell lines with different MGMT and P53 status. *Appl. Radiat. Isot.* V. 163. P. 109204. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2020.109204>
- Kitange G.J., Carlson B.L., Schroeder M.A., Grogan P.T., Lamont J.D., Decker P.A., Wu W., James C.D., Sarkaria J.N.* 2009. Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. *Neuro Oncol.* V. 11. P. 281–291.
- Lamouille S., Xu J., Derynck R.* 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 15. P. 178–196.
- Lee S.Y.* 2016. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis.* V. 3. P. 198–210.
- Melincovici C.S., Bosca A.B., Susman S., Marginean M., Mihu C., Istrate M., Moldovan I.M., Roman A.L., Mihu C.M.* 2018. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom. J. Morphol. Embryol.* V. 59. P. 455–467.
- Mirzayans R., Murray D.* 2020. Intratumor heterogeneity and therapy resistance: contributions of dormancy, apoptosis reversal (anastasis) and cell fusion to disease recurrence. *Int. J. Mol. Sci.* V. 15. P. 1308. <https://doi.org/10.3390/ijms21041308>
- Nguyen H.S., Shabani S., Awad A.J., Kaushal M., Doan N.* 2018. Molecular markers of therapy-resistant glioblastoma and potential strategy to combat resistance. *Int. J. Mol. Sci.* V. 19. P. 1765. <https://doi.org/10.3390/ijms19061765>
- Oldrini B., Vaquero-Siguero N., Mu Q., Kroon P., Zhang Y., Galan-Ganga M., Bao Z., Wang Z., Liu H., Sa J.K., Zhao J., Kim H., Rodriguez-Perales S., Nam D.H., Verhaak R.G.W., Rabadan R., Jiang T., Wang J., Squatrito M.* 2020. MGMT genomic rearrangements contribute to chemotherapy resistance in gliomas. *Nat. Commun.* V. 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17717-0>
- Ortiz-Montero P., Londono-Vallejo A., Vernot J.P.* 2017. Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell Commun. Signal.* V. 15. P. 17. <https://doi.org/10.1186/s12964-017-0172-3>
- Palena C., Hamilton D.H., Fernando R.I.* 2012. Influence of IL-8 on the epithelial-mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future Oncol.* V. 8. P. 713–722.
- Parveen F., Bender D., Law S.H., Mishra V.K., Chen C.C., Ke L.Y.* 2019. Role of ceramidases in sphingolipid metabolism and human diseases. *Cells.* V. 8. P. 1573. <https://doi.org/10.3390/cells8121573>
- Peignan L., Garrido W., Segura R., Melo R., Rojas D., Carcamo J.G., San Martin R., Quezada C.* 2011. Combined use of anticancer drugs and an inhibitor of multiple drug resistance-associated protein-1 increases sensitivity and decreases survival of glioblastoma multiforme cells in vitro. *Neurochem. Res.* V. 36. P. 1397–1406.
- Perazzoli G., Prados J., Ortiz R., Caba O., Cabeza L., Berdasco M., Gonzalez B., Melguizo C.* 2015. Temozolomide resistance in glioblastoma cell lines: implication of MGMT, MMR, P-glycoprotein and CD133 expression. *PLoS One.* V. 10. P. e0140131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140131>
- Vlachostergios P.J., Hatzidaki E., Papandreou C.P.* 2013. MGMT depletion after treatment of glioblastoma cells with temozolomide and O6-benzylguanine implicates NFκB and mutant p53. *Neurol. Res.* V. 35. P. 879–882.
- Wang D., Wang C., Wang L., Chen Y.* 2019. A comprehensive review in improving delivery of small-molecule chemotherapeutic agents overcoming the blood-brain/brain tumor barriers for glioblastoma treatment. *Drug Deliv.* V. 26. P. 551–565.
- Waugh D.J., Wilson C.* 2008. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* V. 14. P. 6735–6741.
- Weller M., van den Bent M., Preusser M., Le Rhun E., Tonn J.C., Minniti G., Bendszus M., Balana C., Chinot O., Dirven L., French P., Hegi M.E., Jakola A.S., Platten M., Roth P. et al.,* 2021. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* V. 18. P. 170–186.

## **Temozolomide-Resistant Human T2 and T98G Glioblastoma Cells**

**A. A. Pinevich<sup>a, b, \*</sup>, I. I. Bode<sup>b</sup>, N. L. Vartanyan<sup>a</sup>, L. N. Kiseleva<sup>a</sup>,  
A. V. Kartashev<sup>a</sup>, and M. P. Samoilovich<sup>a, b</sup>**

<sup>a</sup>*Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, 197758 Russia*

<sup>b</sup>*Saint Petersburg State University, Department of Cytology and Histology, St. Petersburg, 199034 Russia*

*\*e-mail: agniapinevich@gmail.com*

The generation of tumor cells resistant to chemo- and radiation therapy is one of the unresolved problems of oncology. The study of the conditions and mechanisms of temozolomide (first-line drug in glioblastoma therapy) resistance formation is carried out on cultured cell lines. Considering the heterogeneity of glioblastomas, it is important to study the responses of different cell lines to temozolomide. The aim of this work was to obtain and characterize temozolomide-resistant T2 and T98G cell lines. The source of temozolomide was the drug Temodal® in lyophilized form for preparation of an infusion solution. T98G cells are known to be highly resistant to temozolomide; the response of T2 cells to the drug has not been studied yet. A single exposure to 1 mM temozolomide resulted in changes in T2 cell populations composition – an increase of the proportion of giant mononuclear cells and cells with fragmented nuclei. As a result, the number of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle phases decreased, while the number of polyploid cells increased by four times. The cells that reactivated proliferation and were exposed to 2 mM temozolomide for the second and third times differed morphologically and in proliferation activity from the cells that underwent a single treatment, and approximated to the intact cells in many respects. After a single incubation with 2 mM temozolomide T2 cells recovered 90% monolayer in 48 days, after the second treatment – in 13 days, and after the third exposure – in 2 days only. Temozolomide resistance formation by T2 cells was not accompanied by changes in the initially high levels of multiple drug resistance genes *ABCC1*, *ABCG2*, and *ABCBI* activities, as well as *MGMT* gene activity. The formation of temozolomide resistance in T2 glioblastoma cell culture is most likely due to the action of other mechanisms. Consequently, T2 cell line can provide a source of temozolomide-resistant cells and be used as a model of recurrent glioblastoma. T98G cells, as expected, showed an extremely high level of resistance to temozolomide. The drug at doses lower than 5 mM had no prominent effect on these cells.

*Keywords:* glioblastoma, T2, T98G, resistant cells, temozolomide, Temodal®, *MGMT*, *ABCC1*, *ABCG2*, *ABCBI*

УДК 616.127:616-018:618.396:612.65:599.323

## ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ МИОКАРДА ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА ПРЕЖДЕВРЕМЕННО РОЖДЕННЫХ КРЫС В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ОНТОГЕНЕЗА

© 2022 г. В. В. Иванова<sup>1</sup>, \*, И. В. Мильто<sup>1</sup>, О. Н. Серебрякова<sup>1</sup>, И. В. Суходоло<sup>1</sup><sup>1</sup>Кафедра морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России, Томск, 634050 Россия

\*E-mail: ivvera92@rambler.ru

Поступила в редакцию 08.11.2021 г.

После доработки 10.12.2021 г.

Принята к публикации 23.12.2021 г.

Преждевременное рождение положительно коррелирует с предрасположенностью к развитию во взрослом возрасте заболеваний сердечно-сосудистой системы. Выявление морфофункциональных изменений сердца у преждевременно рожденных детей в раннем постнатальном периоде онтогенеза является приоритетной задачей, так как позволит предупредить или скорректировать развитие у них отдаленных негативных эффектов недоношенности на сердечно-сосудистую систему. Проведен гистологический и морфометрический анализ миокарда левого желудочка сердца крыс линии Вистар, рожденных на 21 и 21.5 сут беременности (полный срок беременности составляет 22 сут). Показано, что преждевременное рождение приводит к увеличению удельного объема стромы миокарда крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза. Преждевременное рождение не приводит к изменению количества и коэффициента дегрануляции тучных клеток в миокарде левого желудочка сердца крыс. Морфологические изменения миокарда преждевременно рожденных крыс более выражены при меньшем сроке беременности (21 сут беременности).

**Ключевые слова:** преждевременное рождение, миокард, структура, фиброз, тучные клетки, крысы

**DOI:** 10.31857/S0041377122020031

В мире преждевременное рождение (ранее 37 полных нед. беременности) встречается в 5–15% случаев (Harrison, Goldenberg, 2016). Совершенствование неонатального ухода позволяет сохранить жизнь детям, рожденным ранее 28 нед. беременности, однако меньший срок гестации ассоциирован с большей структурной и функциональной незрелостью внутренних органов на момент рождения. Рождение является фактором, оказывающим существенное влияние на развитие структурно и функционально незрелых внутренних органов преждевременно рожденных детей. На основании клинических наблюдений можно констатировать, что адаптивное ремоделирование сердца вследствие преждевременного рождения приводит к формированию его структурных и функциональных особенностей, которые определяются с первых месяцев после рождения (Erickson et al., 2019) и на всем протяжении постнатального периода онтогенеза (Cox et al., 2019; Goss et al., 2020; Telles et al., 2020; Barton et al., 2021). Морфологические особенности сердца и функциональные изменения сердечной деятельности преждевременно рожденных детей могут служить предпосылками для развития патологических изменений в сердце (Sullivan et al., 2019). Известно, что преждевременное рождение сочетается со

снижением миокардиального резерва (Huckstep et al., 2018), является риском раннего развития ишемической болезни сердца (Crump et al., 2019), гипертонической болезни и сердечной недостаточности (Carr et al., 2017). Проведение эксперимента, позволяющего изучить влияние преждевременного рождения на строение и функционирование сердца является актуальной задачей.

Для изучения последствий преждевременного рождения на морфофункциональное состояние сердца перспективно проведение исследований на грызунах ввиду их высокой плодовитости и короткой продолжительности жизни. Одной из наиболее популярных моделей недоношенности у крыс является содержание крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза в гипероксических условиях (Bertagnolli et al., 2014; Benni et al., 2020; Cohen et al., 2021). Однако данная модель позволяет оценить, главным образом, влияние окислительного стресса на развитие морфофункциональных особенностей органов недоношенных животных и не воссоздает всех аспектов преждевременного рождения.

Продолжительность пренатального периода онтогенеза контрольных крыс составляет 22 сут, что

соответствует полному сроку беременности крыс Вистар. Период с 18 по 22 сут эмбриогенеза крыс Вистар соответствует третьему триместру беременности у человека. В данный промежуток времени плод крысы стремительно растет, органы претерпевают значительные структурные перестройки (Toyono et al., 1999). Получение потомства крыс, рожденных на 12 или 24 ч ранее полного срока, является экспериментальной моделью преждевременного рождения, применимой для биомедицинских целей (Tanswell et al., 1989; Li et al., 2013; Grases-Pintó et al., 2019).

Целью данного исследования является определение влияния преждевременного рождения на структуру левого желудочка сердца крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза. Для достижения цели сформулированы задачи: изучить гистологическое строение стенки левого желудочка; провести количественный морфометрический анализ миокарда левого желудочка преждевременно рожденных крыс в динамике (1–21 сут постнатального периода онтогенеза).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Дизайн исследования.** В эксперименте использовано 72 крысы Вистар обоего пола, из которых были сформированы 3 группы: контрольная группа (доношенные животные, 22 сут беременности,  $n = 24$ ), группа 1 (недоношенные крысы, 21.5 сут беременности,  $n = 24$ ) и группа 2 (недоношенные крысы, 21 сут беременности,  $n = 24$ ). Для получения потомства, самцов крыс Вистар (2-х месячные весом  $180 \pm 20$  г) подсаживали на ночь к самкам крыс Вистар (3-х месячные весом  $180 \pm 20$  г), находившимся на стадии проэструса полового цикла. Утром следующего дня анализировали влагалищные мазки самок крыс. При обнаружении во влагалищном мазке сперматозоидов, считали этот день первым днем беременности. Индукцию преждевременных родов осуществляли подкожным введением самкам крыс мифепристона (1 мл, 10 мг на 1 кг массы тела; Sigma-Aldrich, США) за 24 ч до предполагаемого срока родов (Dudley et al., 1996). Крыс содержали в стандартных условиях вивария. Беременные крысы получали полнорационный корм для беременных животных ЛБК 120 Р-22 (Дельта Фидс, Россия). Выведение потомства из эксперимента осуществляли на 1, 7, 14 и 21 сут постнатального периода онтогенеза асфиксией  $\text{CO}_2$ . Сердца крыс фиксировали в 10%-ном формалине (рН 7.4) (БиоВитрум, Россия) в течение 24 ч для последующего гистологического и морфометрического исследования.

**Гистологическое исследование.** После фиксации в формалине сердца промывали в проточной воде, проводили через Isoprep (БиоВитрум, Россия) и за-

ливали в парафиновую смесь HISTOMIX (БиоВитрум, Россия). Парафиновые срезы толщиной 5 мкм, полученные на автоматическом микротоме HM355S (Thermo Fisher Scientific, Китай), окрашивали по методу Массона (БиоВитрум, Россия) и метиленовым синим. Анализ гистологических препаратов проводили на световом микроскопе Axioscope 40 (Zeiss, Германия), при увеличении объектива  $\times 40$ , фотосъемку проводили при помощи цифровой камеры CanonG5 (Canon, Китай).

**Морфометрия и статистическая обработка данных.** На продольных срезах стенка левого желудочка может быть условно разделена на три части: базальная треть, средняя треть и верхушечная треть. Морфометрический анализ миокарда проведен в средней трети боковой стенки левого желудочка экспериментальных животных.

На гистологических препаратах сердца крыс, окрашенных по методу Массона, при помощи программы ImageJ 1.48 (NIH, США) измеряли диаметр сократительных кардиомиоцитов, а также методом точечного счета определяли удельный объем коллагеновых волокон в стенке левого желудочка.

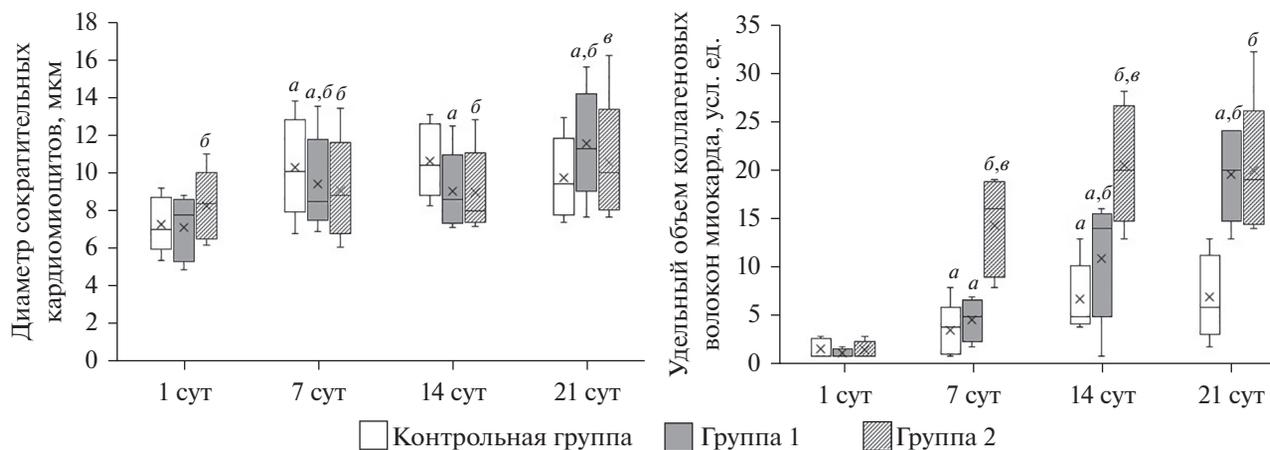
Диаметр измеряли в продольно срезанных кардиомиоцитах на уровне ядра. Для каждого животного на фотографиях миокарда левого желудочка измеряли диаметр 50 кардиомиоцитов, не менее чем в 5 полях зрения.

Для каждого животного удельный объем коллагеновых волокон в миокарде левого желудочка определяли на фотографиях не менее чем в 5 полях зрения.

В случае, когда малые размеры сердца экспериментальных животных не позволяли получить фотографии 5 различных полей зрения средней трети боковой стенки левого желудочка, анализировали серийные срезы.

На окрашенных метиленовым синим препаратах сердца крыс подсчитывали количество тучных клеток в миокарде средней трети боковой стенки левого желудочка. Подсчет количества тучных клеток проводили в 5 различных полях зрения для каждого животного, показатель представлен в перерасчете на  $1 \text{ мм}^2$  среза. Коэффициент дегрануляции определяли как отношение количества тучных клеток с явными признаками дегрануляции к общему количеству подсчитанных тучных клеток на препарате, выраженное в процентах.

Анализ морфометрических показателей проводили при помощи SPSS 16.0 (IBM, США) с использованием критериев Шапиро–Уилка и Манна–Уитни. Данные представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей –  $Me (Q_1; Q_3)$ . Различия между показателями считали достоверными при уровне значимости  $p \leq 0.01$ . Различий рассматриваемых морфометрических показателей между аналогичными параметрами самцов и самок крыс в экспериментальные сроки не обнаружено, поэтому гистологическое описание и морфометрические показатели в таблицах даны без деления по полу крыс.



**Рис. 1.** Динамика диаметра сократительных кардиомиоцитов и удельного объема коллагеновых волокон миокарда левого желудочка доношенных крыс (контрольная группа) и недоношенных, рожденных через 21.5 сут (группа 1) и 21 сут (группа 2), в течение 21 сут постнатального периода онтогенеза. Результаты представлены в виде медианы (Me), нижнего ( $Q_1$ ) и верхнего ( $Q_3$ ) квартилей, крестики показывают среднее значение показателя. Различия достоверны при  $p < 0.01$  при сравнении с соответствующим показателем (а) на предыдущем сроке, (б) в контрольной группе и (в) в группе 1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Получение преждевременно рожденного потомства.

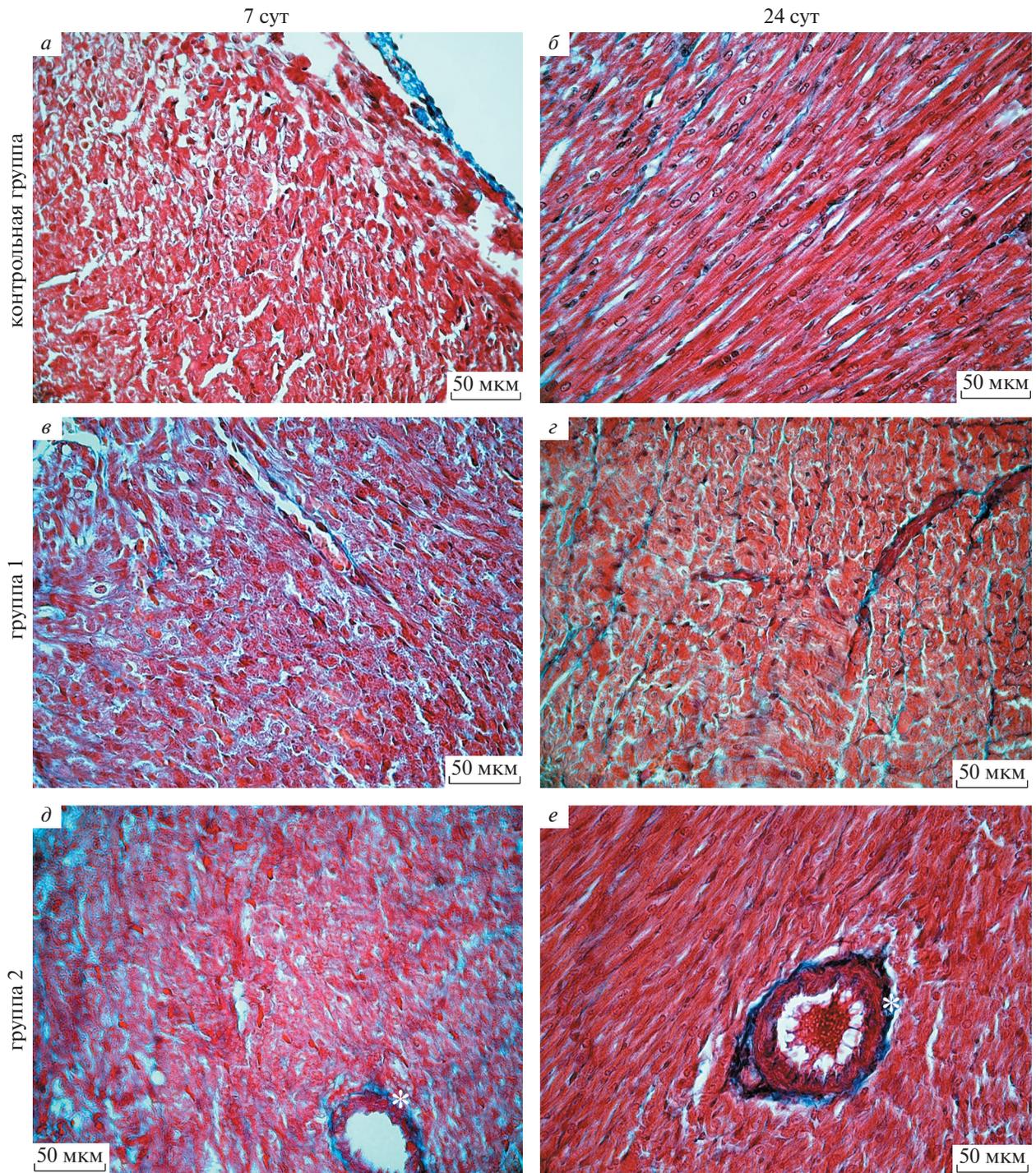
Подкожное введение беременным крысам Вистар на 20 или 20.5 сут от начала беременности мифепристон приводит к преждевременным родам на 21 или 21.5 сут соответственно. Помет составляет в среднем  $12 \pm 2$  особей. Среди крыс контрольной группы и группы 1 (недоношенные крысы, 21.5 сут беременности) гибели в исследуемые сроки не наблюдается. Среди крыс группы 2 (недоношенные крысы, 21 сут беременности) в первые сутки постнатального периода онтогенеза наблюдается гибель 1–2 животных в помете.

**Анализ сократительных кардиомиоцитов в стенке левого желудочка крыс.** Толщина стенки левого желудочка сердца крыс во всех исследованных группах визуально увеличивается в ходе эксперимента. Диаметр сократительных кардиомиоцитов левого желудочка крыс всех исследуемых групп также возрастает в ходе эксперимента (рис. 1). На 1 сут постнатального периода онтогенеза диаметр сократительных кардиомиоцитов левого желудочка крыс группы 2 превосходит таковой у крыс контрольной группы. Диаметр сократительных кардиомиоцитов левого желудочка крыс группы 1 и группы 2 меньше соответствующего показателя контрольных животных на 7 и 14 сут постнатального периода онтогенеза. На 21 сут постнатального периода онтогенеза исследуемый показатель у крыс группы 1 выше, чем у крыс группы 2 и крыс контрольной группы.

**Удельный объем коллагеновых волокон в миокарде левого желудочка крыс.** Строму миокарда составляют прослойки соединительной ткани — эндомизий и перимизий. Строма миокарда несет в своем составе сосуды и нервы, помимо этого соединительная ткань замещает погибшие кардиомиоциты. Основ-

ным компонентом стромы миокарда в постнатальном периоде онтогенеза являются коллагеновые волокна, образованные коллагенами I и III типов. Окрашивание гистологических срезов сердца по методу Массона позволяет селективно выявлять на препаратах коллагеновые волокна. В ходе эксперимента у крыс всех исследуемых групп в стенке левого желудочка наблюдается увеличение удельного объема коллагеновых волокон (рис. 2), которое носит диффузный, а не очаговый характер. У преждевременно рожденных животных удельный объем коллагеновых волокон в миокарде левого желудочка превышает аналогичный показатель сердца крыс контрольной группы с 14 сут (группа 1) и с 7 сут (группа 2) постнатального периода онтогенеза (рис. 1). Удельный объем коллагеновых волокон в стенке левого желудочка преждевременно рожденных крыс остается повышенным, по сравнению с таковым у животных контрольной группы, до конца эксперимента. Стоит отметить, что удельный объем коллагеновых волокон в строме миокарда левого желудочка быстрее увеличивается в группе 2, чем в группе 1.

**Количество тучных клеток в стенке левого желудочка крыс.** Тучные клетки в миокарде левого желудочка локализируются в периваскулярной соединительной ткани, а также между кардиомиоцитами (рис. 3). Тучные клетки в миокарде крыс всех исследуемых групп на 1 и 7 сут постнатального периода онтогенеза практически не определяются (табл. 1). Количество тучных клеток в  $1 \text{ мм}^2$  площади миокарда левого желудочка крыс контрольной, 1-ой и 2-ой групп увеличивается в ходе постнатального периода онтогенеза (табл. 1). В исследуемые сроки не обнаружено отличий количества тучных клеток и показателя коэффициента дегрануляции тучных клеток в



**Рис. 2.** Стенка левого желудочка крысы на 7 и 21 сут постнатального периода онтогенеза. *а, б* – Контрольная группа (животные, рожденные на 22 сут беременности); *в, г* – группа 1 (животные, рожденные на 21.5 сут беременности); *д, е* – группа 2 (животные, рожденные на 21 сут беременности). Окраска по методу Массона. Наблюдается увеличение выраженности диффузного фиброза миокарда левого желудочка у преждевременно рожденных крыс, в сравнении с доношенными животными, а также периваскулярный фиброз (*д, е*). Коллагеновые волокна окрашены анилиновым синим. *Звездочками* отмечены зоны развития периваскулярного фиброза.

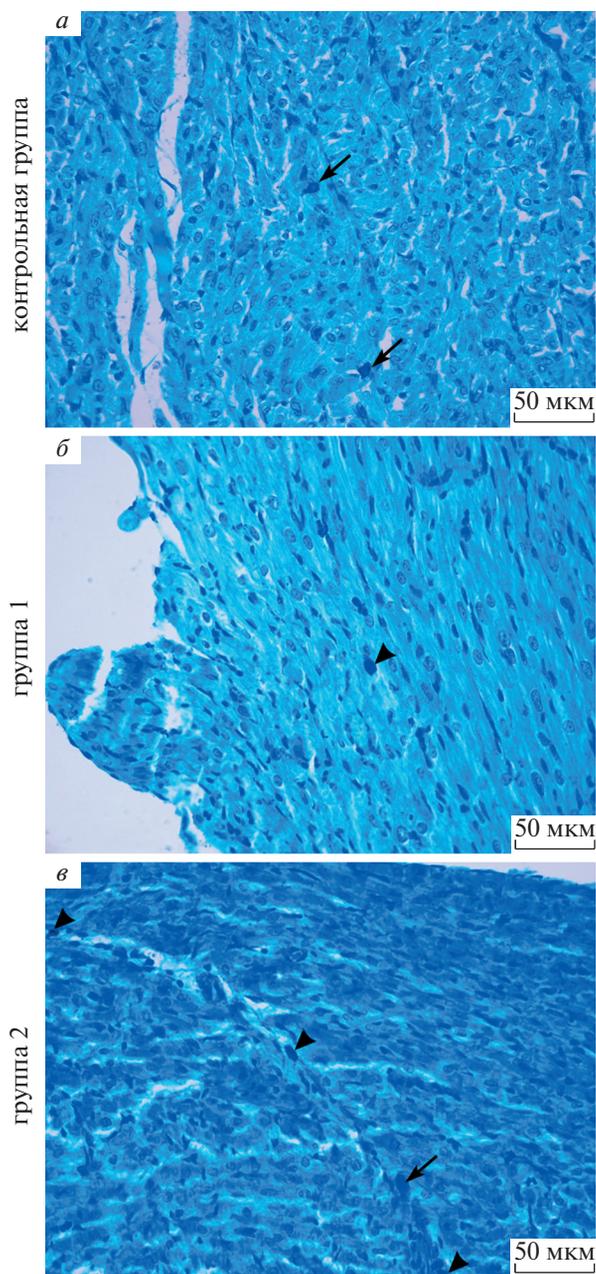
миокарде левого желудочка доношенных и преждевременно рожденных крыс (табл. 1).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Недоношенность характеризуется низкой массой тела при рождении и структурной незрелостью внутренних органов, что оказывает влияние на процесс постнатальной адаптации сердца и кровеносных сосудов (Филюшкина и др., 2014). Структурные изменения сердца, вызванные преждевременным рождением, носят персистирующий характер: определяются в детском, подростковом и взрослом возрасте (Bensley et al., 2010; Telles et al., 2020). Морфологические особенности сердца преждевременно рожденных детей, такие как увеличение толщины стенки и массы левого желудочка, меньший объем полостей сердца, смещение верхушки сердца (Lewandowski et al., 2021), могут служить предпосылкой более раннего развития у этой категории людей заболеваний сердечно-сосудистой системы (Bensley et al., 2010). Установление морфофункциональных изменений сердца у преждевременно рожденных детей в раннем постнатальном периоде онтогенеза является приоритетной задачей, так как позволит предупредить или скорректировать развитие у них отдаленных негативных эффектов недоношенности на сердечно-сосудистую систему.

Адаптация сердца к возрастающим нагрузкам в ходе раннего постнатального периода онтогенеза заключается как в клеточных реакциях, так и в перестройке межклеточного вещества. В ходе постнатального периода онтогенеза показано увеличение удельного объема стромы миокарда крыс, что согласуется с данными (Carver et al., 1993). Распространение стромы между кардиомиоцитами в ходе увеличения размеров сердца обусловлено, в том числе, развитием сосудов и происходит одновременно с переходом кардиомиоцитов от гиперплазии к гипертрофии (Carver et al., 1993). Известно, что компоненты межклеточного вещества выполняют не только структурную, но и морфогенетическую функцию. Увеличение после рождения ригидности межклеточного вещества стромы миокарда, обусловленное накоплением коллагенов I и III типов, коррелирует с увеличением упорядоченности организации миофибрилл кардиомиоцитов, а также со снижением пролиферативной активности кардиомиоцитов и их переходом в  $G_0$  период клеточного цикла (Carver et al., 1993; Yahalom-Ronen et al., 2015; Silva et al., 2021).

Изменение удельного объема коллагеновых волокон в строме миокарда левого желудочка у преждевременно рожденных крыс развивается уже к 7–14 сут постнатального периода онтогенеза. Аналогично, содержание крыс в гипероксических условиях с 3 по 10 сут после рождения (модель преждевременного рождения) приводит к фиброзу миокарда, а также увеличению массового индекса левого желудочка и активации ренин-ангиотензиновой системы в воз-



**Рис. 3.** Стенка левого желудочка крысы на 21 сут постнатального периода онтогенеза. *a* – Контрольная группа (животные, рожденные на 22 сут беременности); *б* – группа 1 (животные, рожденные на 21,5 сут беременности); *в* – группа 2 (животные, рожденные на 21 сут беременности). Окраска метиленовым синим. Стрелки указывают на тучные клетки с признаками дегрануляции. Головками стрелок показаны тучные клетки без признаков дегрануляции.

расте 1 мес (Bertagnolli et al., 2014; Mian et al., 2019). Структурные изменения миокарда сопровождаются снижением фракции выброса и индекса сердечного выброса и носят персистирующий характер (Mian et al., 2019). Напротив, Голдинг с соавторами (Golding et al., 2020) сообщают, что содержание крыс с 1 по 14 сут

**Таблица 1.** Динамика морфофункциональных показателей тучных клеток в миокарде левого желудочка крыс контрольной группы (рожденных на 22 сут беременности) и преждевременно рожденных на 21.5 сут беременности (группа 1) и на 21 сут беременности (группа 2).

Группа	Срок эксперимента, сут			
	1	7	14	21
Количество тучных клеток на 1 мм <sup>2</sup> срезов миокарда левого желудочка, Ме (Q <sub>1</sub> ; Q <sub>3</sub> )				
Контрольная	0.0 (0.0; 0.0)	0.0 (0.0; 0.0)	0.0 (0.0; 9.4)	9.4 (0.0; 18.8)
1	0.0 (0.0; 0.0)	0.0 (0.0; 1.6)	6.3 (4.7; 18.8) <sup>a</sup>	6.3 (0.0; 20.3)
2	0.0 (0.0; 0.0)	0.0 (0.0; 0.0)	6.3 (0.0; 14.1) <sup>a</sup>	15.6 (0.0; 23.4)
Коэффициент дегрануляции тучных клеток, %, Ме (Q <sub>1</sub> ; Q <sub>3</sub> )				
Контрольная	—	—	48.0 (35.0; 63.5)	40.0 (36.0; 60.0)
1	—	—	40.0 (34.7; 52.0)	64.7 (45.0; 67.5) <sup>a</sup>
2	—	—	50.0 (40.0; 65.0)	50.0 (43.5; 58.5)

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Ме), нижнего (Q<sub>1</sub>) и верхнего (Q<sub>3</sub>) квартилей. (<sup>a</sup>) Различия с соответствующим показателем на предыдущем сроке достоверны при  $p < 0.01$ .

после рождения в условиях гипероксии не только не приводит к 21 сут постнатального периода онтогенеза к фиброзу миокарда левого желудочка, но и сопряжено с уменьшением удельного объема соединительной ткани в миокарде правого желудочка.

Увеличение удельного объема межклеточного вещества за счет повышения экспрессии коллагена клетками стромы миокарда желудочков и межжелудочковой перегородки продемонстрировано в раннем постнатальном периоде онтогенеза (2 мес) у преждевременно рожденных овец (Bensley et al., 2010; Le et al., 2020). Наше исследование не выявило корреляции между изменением диаметра сократительных кардиомиоцитов и увеличением удельного объема стромы миокарда, тогда как другие авторы (Bensley et al., 2010) установили, что фиброз миокарда преждевременно рожденных животных сопровождается гипертрофией кардиомиоцитов.

Полученные в эксперименте сведения, вероятно, повторяют закономерности морфогенеза сердца в ответ на преждевременное рождение у человека. На основании косвенных данных, сделан вывод о развитии диффузного фиброза миокарда левого желудочка у преждевременно рожденных детей (Lewandowski et al., 2021). Ввиду того, что гадолиний медленнее накапливается в межклеточном веществе, магнитно-резонансная томография с использованием гадолиний-содержащих контрастных агентов позволяет оценить удельный объем межклеточного вещества в миокарде. Показано, что у преждевременно рожденных детей к 22–23 годам определяется больший удельный объем межклеточного вещества в миокарде левого желудочка, а также снижены конечный диастолический объем и ударный объем левого желудочка, по сравнению с аналогичными показателями у доношенных сверстников (Lewandowski et al., 2021). Интересным представляется изучение удельного объема межклеточного вещества миокарда при

помощи магнитно-резонансной томографии у преждевременно рожденных детей более ранних возрастных групп, так как известно, что уже в возрасте 6 лет у преждевременно рожденных детей наряду с изменением формы и размера левого желудочка наблюдается повышенная жесткость стенки левого желудочка, по сравнению с таковой у доношенных сверстников (Mohlkert et al., 2018).

Показано, что тучные клетки, посредством секреции триптазы, химазы, TGF- $\beta$ 1, TNF и IL-1 $\beta$ , могут быть вовлечены в развитие фиброза в различных органах, в том числе в сердце (Bradding, Pejler, 2018; Гриценко и др., 2020). Результаты настоящего исследования не позволяют предположить участие тучных клеток в развитии диффузного фиброза миокарда преждевременно рожденных крыс в раннем постнатальном периоде (1–21 сут), что, однако, не исключает возможность их профибротического действия в отдаленном постнатальном периоде онтогенеза.

Увеличение экспрессии коллагена в миокарде преждевременно рожденных крыс наблюдается уже к 7 сут постнатального периода онтогенеза и может быть причиной более раннего перехода кардиомиоцитов в G<sub>0</sub> период клеточного цикла и, как следствие, снижения миокардиального резерва. Кроме того, диффузный фиброз способствует увеличению жесткости миокарда и является причиной развития систолической и диастолической дисфункции (Conrad et al., 1995; Rockey et al., 2015). По данным клинических исследований, фиброз миокарда является предиктором негативных исходов заболеваний сердечно-сосудистой системы (Assomull et al., 2006; Kwon et al., 2009).

Стоит отметить, что на сегодняшний день у человека структурная незрелость органов, как правило, не является изолированным фактором, а сопровождается различными терапевтическими воздействиями

ми (механическая вентиляция легких, введение глюкокортикостероидных препаратов и др.), которые также оказывают влияние на постнатальную адаптацию сердца преждевременно рожденных детей. Показано, что введение дексаметазона доношенным новорожденным крысам приводит к гипертрофии кардиомиоцитов и повышенному накоплению коллагеновых волокон в строме миокарда взрослых крыс (Bal et al., 2009). Антенатальная терапия глюкокортикостероидами приводит к увеличению толщины стенки левого желудочка и межжелудочковой перегородки новорожденных детей (Evans, 1994; Vrselja et al., 2021). Возможно, сопутствующая терапия может усугублять структурно-функциональные изменения миокарда, вызванные преждевременным рождением (Le et al., 2018).

Таким образом, преждевременное рождение приводит к увеличению удельного объема стромы миокарда в раннем постнатальном периоде онтогенеза, которое может быть одним из начальных звеньев патогенеза заболеваний сердечно-сосудистой системы. Коррекция постнатального ремоделирования сердца преждевременно рожденных детей может снизить риск развития сердечно-сосудистых заболеваний у лиц данной категории.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках Программы стратегического академического лидерства “Приоритет-2030”.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание крыс и манипуляции с ними проведены в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”, с соблюдением требований Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных животных. Протокол эксперимента одобрен решением локального этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России № 8475/1 от 30.11.2020.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гриценко О.В., Чумакова Г.А., Шевляков И.В., Веселовская Н.Г. 2020. Внеклеточный матрикс сердца и его изменения при фиброзе миокарда. Кардиология. Т. 60. С. 107. (Gritsenko O.V., Chumakova G.A., Shevlyakov I.V., Veselovskaya N.G. 2020. Extracellular matrix of the heart and its changes in myocardial fibrosis. Kardiologiya. V. 60. P. 107.)  
Филошкина М.Н., Тарасова А.А., Ефимов М.С., Чабайдзе Ж.Л., Эрлих А.Л. 2014. Особенности морфофункционального состояния сердца у недоношенных детей (обзор ли-

тературы). Вестник Российского научного центра рентгенодиагностики Минздрава России. Т. 3. С. 4. (Filushkina M.N., Tarasova A.A., Efimov M.S., Chabaidze J.L., Erlikh A.L. 2014. The unique features of morphofunctional condition of the heart in premature infants. Literature review. Vestnik of the Russian Scientific Center of Roentgenoradiology. V. 3. P. 4.)

Assomull R.G., Prasad S.K., Lyne J., Smith G., Burman E.D., Khan M., Sheppard M.N., Poole-Wilson P.A., Pennell D.J. 2006. Cardiovascular magnetic resonance, fibrosis, and prognosis in dilated cardiomyopathy. J. Am. Coll. Cardiol. V. 48. P. 1977.

Bal M.P., de Vries W.B., Steendijk P., Homoet-van der Kraak P., van der Leij F.R., Baan J., van Oosterhout M.F., van Bel F. 2009. Histopathological changes of the heart after neonatal dexamethasone treatment: studies in 4-, 8-, and 50-week-old rats. Pediatr. Res. V. 66. P. 74.

Barton G.P., Corrado P.A., Francois C.J., Chesler N.C., Eldridge M.W., Wieben O., Goss K.N. 2021. Exaggerated cardiac contractile response to hypoxia in adults born preterm. J. Clin. Med. V. 10. P. 1166.

Benny M., Hernandez D.R., Sharma M., Yousefi K., Kulandavelu S., Ballahally S., Zambrano R., Chen P., Martinez E.C., Schmidt A.F., Shehadeh L.A., Vasquez-Padron R.I., Wu S., Velazquez O.C., Young K.C. 2020. Neonatal hyperoxia exposure induces aortic biomechanical alterations and cardiac dysfunction in juvenile rats. Physiol. Rep. V. 8 e14334.

Bensley J.G., Stacy V.K., De Matteo R., Harding R., Black M.J. 2010. Cardiac remodelling as a result of pre-term birth: implications for future cardiovascular disease. Eur. Heart J. V. 31. P. 2058.

Bertagnoli M., Huyard F., Cloutier A., Anstey Z., Huot-Marchand J.É., Fallaha C., Paradis P., Schiffrin E.L., Deblois D., Nuyt A.M. 2014. Transient neonatal high oxygen exposure leads to early adult cardiac dysfunction, remodeling, and activation of the renin-angiotensin system. Hypertension. V. 63. P. 143.

Bradding P., Pejler G. 2018. The controversial role of mast cells in fibrosis. Immunological Reviews. V. 282. P. 198.

Carr H., Cnattingius S., Granath F., Ludvigsson J.F., Edstedt Bonamy A.K. 2017. Preterm birth and risk of heart failure up to early adulthood. J. Am. Coll. Cardiol. V. 69. P. 2634.

Carver W., Terracio L., Borg T.K. 1993. Expression and accumulation of interstitial collagen in the neonatal rat heart. Anat. Rec. V. 236. P. 511.

Cohen E.D., Yee M., Porter G.A. Jr., Ritzler E., McDavid A.N., Brookes P.S., Pryhuber G.S., O'Reilly M.A. 2021. Neonatal hyperoxia inhibits proliferation and survival of atrial cardiomyocytes by suppressing fatty acid synthesis. J.C.I. Insight. V. 6. e140785.

Conrad C.H., Brooks W.W., Hayes J.A., Sen S., Robinson K.G., Bing O.H. 1995. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. Circulation. V. 91. P. 161.

Cox D.J., Bai W., Price A.N., Edwards A.D., Rueckert D., Groves A.M. 2019. Ventricular remodeling in preterm infants: computational cardiac magnetic resonance atlas shows significant early remodeling of the left ventricle. Pediatr. Res. V. 85. P. 807.

Crump C., Howell E.A., Stroustrup A., McLaughlin M.A., Sundquist J., Sundquist K. 2019. Association of preterm birth

- with risk of ischemic heart disease in adulthood. *JAMA Pediatr.* V. 173. P. 736.
- Dudley D.J., Branch D.W., Edwin S.S., Mitchell M.D. 1996. Induction of preterm birth in mice by RU486. *Biol. Reprod.* V. 55. P.992.
- Erickson C.T., Patel M.D., Choudhry S., Bisselou K.S., Sekarski T., Craft M., Li L., Khuffash A. E., Hamvas A., Kutty S., Singh G.K., Levy P.T. 2019. Persistence of right ventricular dysfunction and altered morphometry in asymptomatic preterm Infants through one year of age: Cardiac phenotype of prematurity. *Cardiol. Young.* V. 29. P. 945.
- Evans N. 1994. Cardiovascular effects of dexamethasone in the preterm infant. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* V. 70. F. 25.
- Golding R., Braun R., Kumari S., Goss K. 2020. Differing collagen responses in the right and left ventricle following postnatal hyperoxia exposure. *The FASEB Journal.* V. 34. P. 1.
- Goss K.N., Haraldsdottir K., Beshish A.G., Barton G.P., Watson A.M., Palta M., Chesler N.C., Francois C.J., Wieben O., Eldridge M.W. 2020. Association between preterm birth and arrested cardiac growth in adolescents and young adults. *JAMA Cardiol.* V. 5. P. 910.
- Grases-Pintó B., Torres-Castro P., Abril-Gil M., Castell M., Rodríguez-Lagunas M.J., Pérez-Cano F.J., Franch À. 2019. A preterm rat model for immunonutritional studies. *Nutrients.* V. 11. P. 999.
- Harrison M.S., Goldenberg R.L. 2016. Global burden of prematurity. *Semin. Fetal Neonatal Med.* V. 21. P. 74.
- Huckstep O.J., Williamson W., Telles F., Burchert H., Bertagnolli M., Herdman C., Arnold L., Smillie R., Mohamed A., Boardman H., McCormick K., Neubauer S., Leeson P., Lewandowski A.J. 2018. Physiological stress elicits impaired left ventricular function in preterm-born adults. *J. Am. Coll. Cardiol.* V. 71. P. 1347.
- Kwon D.H., Halley C.M., Popovic Z.B., Carrigan T.P., Zysek V., Setser R., Schoenhagen P., Flamm S.D., Starling R.C., Desai M.Y. 2009. Gender differences in survival in patients with severe left ventricular dysfunction despite similar extent of myocardial scar measured on cardiac magnetic resonance. *Eur. J. Heart Fail.* V. 11. P. 937.
- Le B., Dahl M.J., Albertine K.H., Sutherland M.R., Black M.J. 2020. Preterm birth with neonatal interventions accelerates collagen deposition in the left ventricle of lambs without affecting cardiomyocyte development. *CJC Open.* V. 3. P. 574.
- Le B., Sutherland M.R., Black M.J. 2018. Maladaptive structural remodelling of the heart following preterm birth. *Curr. Opin. Physiol.* V. 1. P. 89.
- Lewandowski A.J., Raman B., Bertagnolli M., Mohamed A., Williamson W., Pelado J.L., McCance A., Lapidaire W., Neubauer S., Leeson P. 2021. Association of preterm birth with myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in young adulthood. *J. Am. Coll. Cardiol.* V. 78. P. 683.
- Li R., Yang X., Wang Y., Chu Z., Liu T., Zhu T., Gao X., Ma Z. 2013. Effects of preterm birth on normal retinal vascular development and oxygen-induced retinopathy in the neonatal rat. *Curr. Eye Res.* V. 38. P. 1266.
- Mian M.O.R., He Y., Bertagnolli M., Mai-Vo T.A., Fernandes R.O., Boudreau F., Cloutier A., Luu T.M., Nuyt A.M. 2019. TLR (Toll-like receptor) 4 antagonism prevents left ventricular hypertrophy and dysfunction caused by neonatal hyperoxia exposure in rats. *Hypertension.* V. 74. P. 843.
- Mohlkert L.A., Hallberg J., Broberg O., Rydberg A., Halvorsen C.P., Liuba P., Fellman V., Domellöf M., Sjöberg G., Norman M. 2018. The preterm heart in childhood: left ventricular structure, geometry, and function assessed by echocardiography in 6-year-old survivors of periviable births. *J. Am. Heart Assoc.* V. 7. e007742.
- Rockey D.C., Bell P.D., Hill J.A. 2015. Fibrosis—a common pathway to organ injury and failure. *N. Engl. J. Med.* V. 372. P. 1138.
- Silva A.C., Pereira C., Fonseca A.C.R.G., Pinto-do-Ó P., Nascimento D.S. 2021. Bearing my heart: the role of extracellular matrix on cardiac development, homeostasis, and injury response. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8. e621644.
- Sullivan M.C., Winchester S.B., Msall M.E. 2019. Prematurity and cardiovascular risk at early adulthood. *Child Care Health Dev.* V. 45. P. 71.
- Tanswell A.K., Wong L., Possmayer F., Freeman B.A. 1989. The preterm rat: a model for studies of acute and chronic neonatal lung disease. *Pediatr. Res.* V. 25. P. 525.
- Telles F., McNamara N., Nanayakkara S., Doyle M.P., Williams M., Yaeger L., Marwick T.H., Leeson P., Levy P.T., Lewandowski A.J. 2020. Changes in the preterm heart from birth to young adulthood: a meta-analysis. *Pediatrics.* V. 146. e20200146.
- Toyono M., Ito T., Harada K., Tamura M., Takada G. 1999. Morphological adaptation of the cardiovascular system in fetal rats during late gestation. *Tohoku J. Exp. Med.* V. 188. P. 299.
- Vrselja A., Pillow J.J., Black M.J. 2021. Effect of preterm birth on cardiac and cardiomyocyte growth and the consequences of antenatal and postnatal glucocorticoid treatment. *J. Clin. Med.* V. 10. P. 3896.
- Yahalom-Ronen Y., Rajchman D., Sarig R., Geiger B., Tzahor E. 2015. Reduced matrix rigidity promotes neonatal cardiomyocyte dedifferentiation, proliferation and clonal expansion. *Elife.* V. 4. e07455.

## Structural Features of Left Ventricle Myocardium in Premature Born Rats in the Early Postnatal Ontogenesis

V. V. Ivanova<sup>a,\*</sup>, I. V. Milto<sup>a</sup>, O. N. Serebryakova<sup>a</sup>, and I. V. Sukhodolo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

\*e-mail: ivvera92@rambler.ru

Preterm birth is positively correlated with a predisposition to development of cardiovascular diseases in adulthood. Morphological and functional changes establishing in the heart in prematurely born children in the early postnatal ontogenesis is a priority, since it will give opportunity to prevent or correct the development of long-term negative

effects of prematurity on the cardiovascular system. A histological and morphometric analysis of the left ventricle myocardium of the heart of Wistar rats born after 21 and 21.5 days of gestation (the full gestation duration is 22 days) was carried out. Preterm birth leads to an increase in the relative volume of the stroma of the rat myocardium in the early postnatal ontogenesis. Preterm birth does not lead to a change in the number and coefficient of degranulation of mast cells in the myocardium of the left ventricle of the rat heart. Morphological changes in the myocardium of prematurely born rats are more pronounced at a shorter gestation period (21 days of gestation).

*Keywords:* preterm birth, myocardium, structure, fibrosis, mast cells, rats

УДК 57.085.23;616-006.6

## ОСОБЕННОСТИ ЛОКАЛИЗАЦИИ БЕЛКА LIMCH1 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2022 г. В. В. Алифанов<sup>1</sup>\*, Л. А. Таширева<sup>1</sup>, М. В. Завьялова<sup>1</sup>, В. М. Перельмутер<sup>1</sup><sup>1</sup>Научно-исследовательский институт онкологии Томского научно-исследовательского медицинского центра, Томск, 634028 Россия

\*E-mail: alifanov.vl@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.11.2021 г.

После доработки 03.01.2022 г.

Принята к публикации 10.01.2022 г.

Белок LIMCH1 снижает клеточную подвижность, регулируя активность NM-IIA, что может быть критически важным для инвазии опухолевых клеток. В настоящее время роль белка LIMCH1 при злокачественных новообразованиях изучена недостаточно. Настоящая работа посвящена изучению особенностей локализации доменов белка LIMCH1 в различных компартментах опухолевых клеток больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа (ИКНТ) и участием доменов белка LIMCH1 в коллективной или индивидуальной миграции опухолевых клеток. В качестве модельной системы в работе использован феномен морфологической гетерогенности опухоли. Наиболее часто домен LIM белка LIMCH1 имел ядерную и субмембранную локализацию, другой домен белка LIMCH1 – кальпонин – наиболее часто имел субмембранную и цитоплазматическую локализацию. Ядерная локализация белка LIMCH1 в опухолевых клетках позволяет предполагать, что функции белка LIMCH1 в опухолевых клетках не ограничены влиянием на клеточную подвижность. Значительно чаще белок LIMCH1 обнаруживался в цитоплазме одиночных опухолевых клеток, по сравнению с многоклеточными структурами, что можно расценить как индикатор амебoidalного типа движения, учитывая сопряженность одиночных опухолевых клеток с гематогенным метастазированием. Можно предположить, что основной функцией белка LIMCH1 в многоклеточных структурах является обеспечение межклеточной адгезии.

**Ключевые слова:** LIMCH1, рак молочной железы, инвазия, морфологическая гетерогенность

**DOI:** 10.31857/S004137712202002X

Актиновый аппарат участвует в реализации нескольких важных функций в клетках: клеточной подвижности, поддержании и изменении формы клетки, внутриклеточном транспорте, а также адгезии с внеклеточным матриксом и межклеточной адгезии (Spiliotis, Nakos, 2021). Функционирование актинового аппарата клетки регулируется множеством белков, одним из которых является LIMCH1. Белок LIMCH1 (LIM and calponin-homology domains 1) состоит из двух доменов: LIM-домена, который участвует в формировании белок-белковых соединений, и кальпонинового домена, который является кальций-связывающим, благодаря чему может участвовать в активации кальций-зависимых белков (Lin et al., 2017). Кроме того, было показано, что в клетке могут присутствовать изоформы белка LIMCH1 с различными сочетаниями доменов (García et al., 2016).

В клетке белок LIMCH1 колокализуется с актиновыми волокнами, где он взаимодействует с немышечным миозином 2A типа (NM-IIA). В клетке вы-

деляют кортикальные, перинуклеарные волокна актина и волокна напряжения актина. При этом наиболее подробно изучена роль белка LIMCH1, который колокализован с волокнами напряжения, где он способен напрямую связываться с NM-IIA, что приводит к ретроградному току актина в ламеллоподиях и снижает клеточную подвижность. В свою очередь экспериментальное истощение LIMCH1 в клетках HeLa приводило к увеличению способности к миграции клеток (Lin et al., 2017). Таким образом, белок LIMCH1 выступает в роли ингибитора миграции клеток. Однако в литературе отсутствуют данные о функциях белка LIMCH1, когда он колокализован с кортикальными волокнами актина и имеет субмембранную локализацию, а также когда он колокализован с перинуклеарными волокнами актина.

Способность к миграции является одним из критических свойств опухолевых клеток и может существенно ограничивать прогрессию злокачественных новообразований. Было показано, что в опухолевых клетках больных немелкоклеточным раком легкого уровень белка LIMCH1 значительно снижен по сравнению с нормальной тканью (Zhang et al., 2019).

**Принятые сокращения:** ИКНТ – инвазивная карцинома неспецифического типа; НАХТ – неоадьювантная химиотерапия.

Также было показано, что низкий уровень LIMCN1 характерен для опухолевых клеток при тройной негативной инвазивной карциноме неспецифического типа (ИКНТ) молочной железы более продвинутых стадий (Bersini et al., 2020). Исследования, посвященные изучению роли белка LIMCN1 при злокачественных новообразованиях, немногочисленны, клиническое и прогностическое значение белка LIMCN1 у пациентов с ИКНТ остается наименее изученным.

Удобной моделью для изучения инвазивных свойств опухолевых клеток больных ИКНТ может служить морфологическая гетерогенность. При раке молочной железы описаны одиночные опухолевые клетки, являющиеся примером индивидуальной инвазии. Наличие одиночных опухолевых клеток с эпителиальной морфологией ассоциировано с большим риском развития гематогенных метастазов (Tashireva et al., 2020). Примером коллективной инвазии могут служить трабекулярные структуры, а также многоклеточные структуры с ракетообразной морфологией (Gerashchenko et al., 2019). Можно выделить структуры, морфология которых не имеет явных проявлений инвазивного роста, к таковым относятся тубулярные и альвеолярные структуры. Опухоли молочной железы с альвеолярными структурами характеризуются высокой частотой метастазирования в лимфатические узлы. При неоадъювантной химиотерапии (НАХТ) опухоли с альвеолярными или трабекулярными структурами часто демонстрируют плохой ответ на проводимую терапию и ассоциированы с повышенным риском гематогенных метастазов, а также с меньшей безметастатической выживаемостью (Gerashchenko et al., 2017). Таким образом, очевидно, что выраженная внутриопухолевая гетерогенность не является случайным явлением, а тесно связана с прогнозом заболевания и эффективностью терапии, что позволяет использовать ее в качестве надежной модели для изучения инвазивных свойств опухолевых клеток.

В связи с гетерогенностью карцином молочной железы можно ожидать что локализация LIMCN1 должна быть неодинаковой в разных клеточных структурах опухоли. Кроме этого, разная локализация LIMCN1 внутри клетки связана с разными функциональными эффектами. Между тем в литературе отсутствуют данные о внутриклеточной локализации белка LIMCN1 и его изоформ в опухолевых клетках больных ИКНТ.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении особенностей локализации доменов белка LIMCN1 в различных компартментах опухолевых клеток больных ИКНТ и участия доменов белка LIMCN1 в коллективной или индивидуальной миграции опухолевых клеток.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Материал для исследования.** В исследование было включено 89 больных с диагнозом инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы, проходивших лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ с 2007 по 2018 г. Данный диагноз был установлен в соответствии с рекомендациями ВОЗ на основании клинических, морфологических и иммуногистохимических критериев (WHO classification of tumours, 2019). В группе исследуемых больных были представлены все молекулярно-генетические типы (люминальный А, люминальный Б, HER2neu-позитивный и трижды негативный), НАХТ проводили у 41.6% больных. Средний возраст больных составил  $52.2 \pm 13.7$  лет. По классификации TNM среди больных были представлены стадии T1-4N0-3M0. У всех обследованных лиц было получено добровольное информированное согласие на проведение необходимых для исследования манипуляций в соответствии с требованиями локального этического комитета НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 7 от 24 мая 2021 г.).

Материалом для исследования служили фрагменты опухоли (операционный материал), фиксированные в 10%-ном нейтральном формалине и заключенные в парафин. Проводка материала и изготовление гистологических препаратов осуществлялись по стандартной методике.

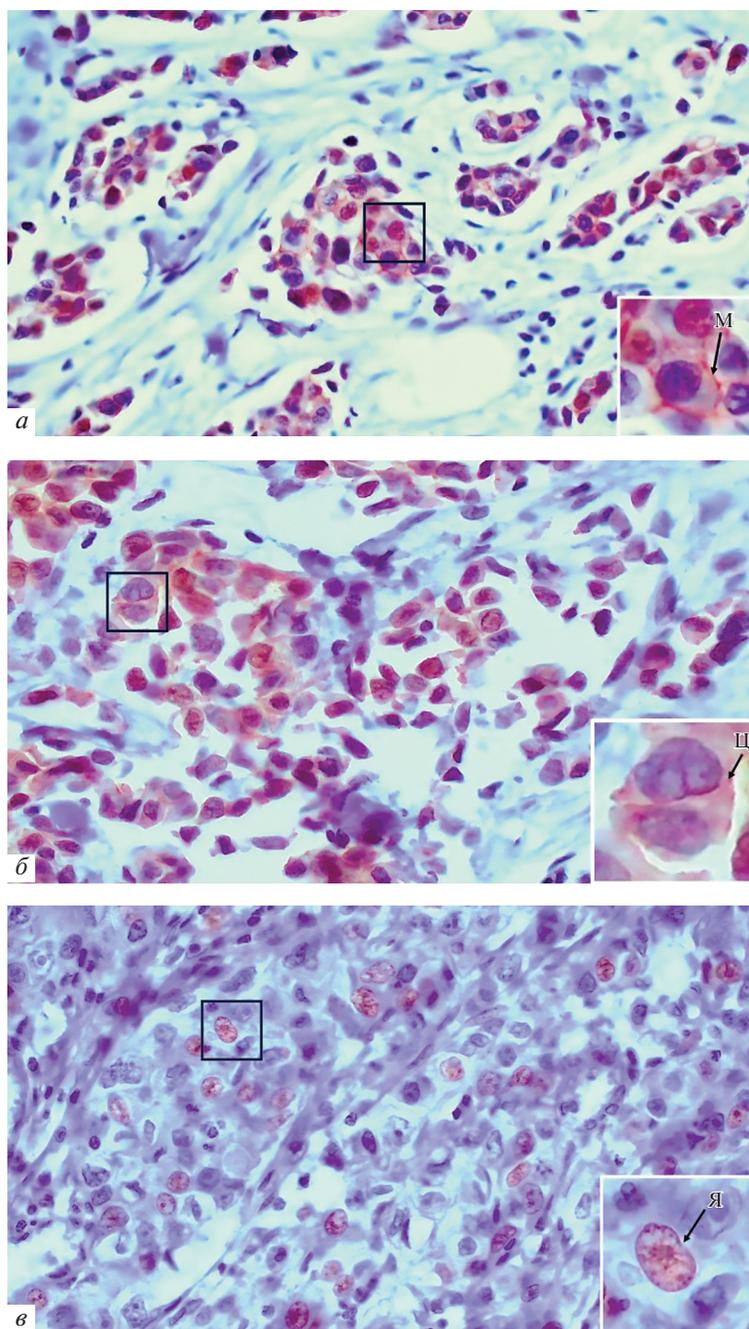
**Иммуногистохимия.** Оценка локализации доменов белка LIMCN1 в опухолевых клетках проводилась с помощью иммуногистохимии. Использовали антитела (Sigma Aldrich, Германия) против домена LIM (SAB2700402) и домена кальпонин (HRA004184) в разведении 1 : 1000. Визуализацию проводили с помощью системы детекции EnVision (Dako, Agilent, США). Затем срезы окрашивали гематоксилином и заключали в среду Витрогель (Биовитрум, Россия). Наличие доменов белка LIMCN1 в трех компартментах клетки (ядре, цитоплазме и мембране) оценивали с помощью световой микроскопии (Axio-Scope A1, Zeiss, Германия).

**Статистическая обработка.** Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0. Оценку различий частот встречаемости осуществляли при помощи двустороннего точного критерия Фишера. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Локализация доменов белка LIMCN1.** Только в 21.3% опухолей белок LIMCN1 отсутствовал. В остальных случаях наблюдали присутствие как минимум одного из доменов белка LIMCN1 (LIM или кальпонин) в ядре, цитоплазме или субмембранном пространстве (рис. 1, 2).

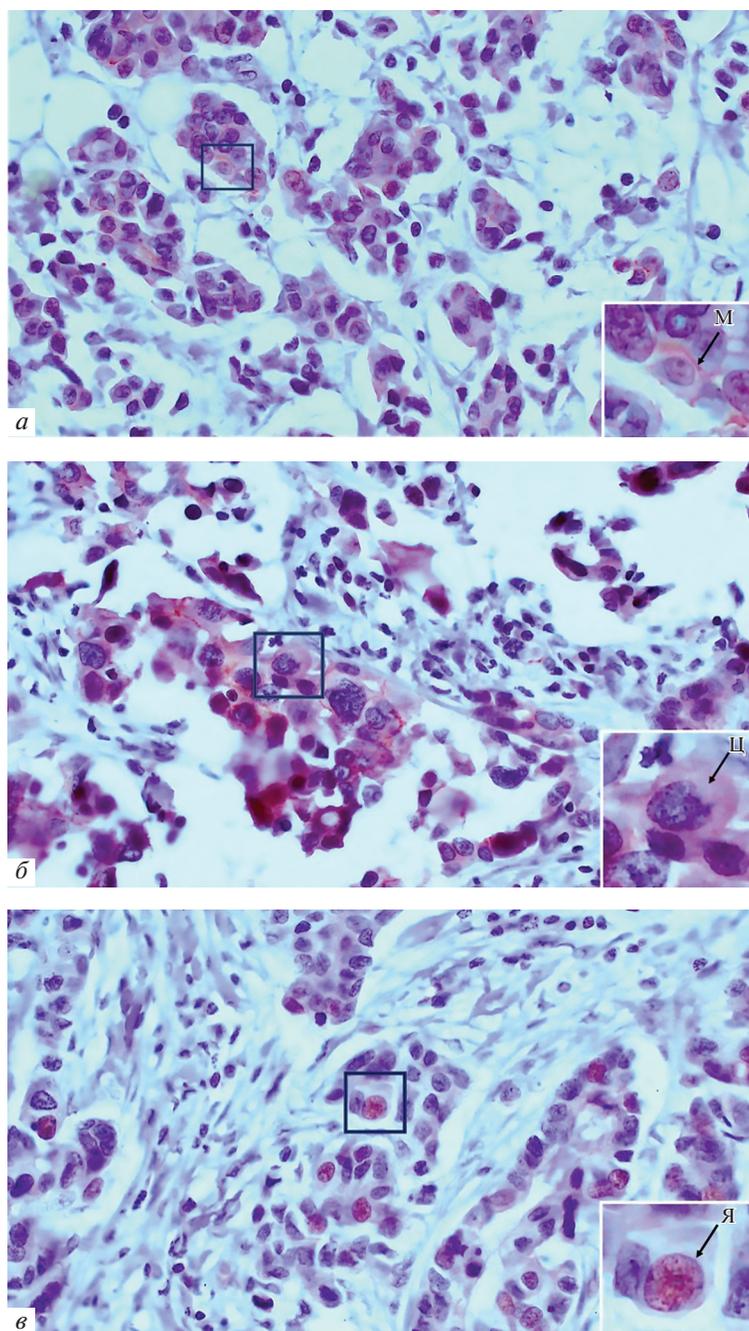
Наиболее часто домен LIM белка LIMCN1 имел ядерную и субмембранную локализацию (38 и 34%



**Рис. 1.** Локализация белка LIMCH1 (домен LIM) в опухолевых клетках больных с ИКНТ молочной железы: *а* – мембранная (*м*), *б* – цитоплазматическая (*ц*), *в* – ядерная (*я*). На *врезках* показано фотоувеличение выделенного участка. Иммуногистохимическое окрашивание. Увел. об.: 40×.

соответственно). Для другого домена белка LIMCH1 – кальпонин – наиболее характерной была субмембранная и цитоплазматическая локализация (51 и 47% соответственно). Стоит отметить, что в цитоплазме чаще встречался домен кальпонин по сравнению с доменом LIM (47 против 7% соответственно,  $p = 0.0000$ ). В других компартментах частоты встречаемости обоих доменов были сопоставимы (рис. 3).

Далее определяли, насколько часто присутствие доменов белка LIMCH1 в клеточных компартментах опухолевых клеток одного больного совпадает (табл. 1). Совместное присутствие двух доменов белка LIMCH1 (LIM и кальпонин) в ядре и субмембранном пространстве опухолевых клеток у больных ИКНТ, по сравнению с цитоплазмой, обнаруживалось чаще. Наличие домена LIM было наименее ха-

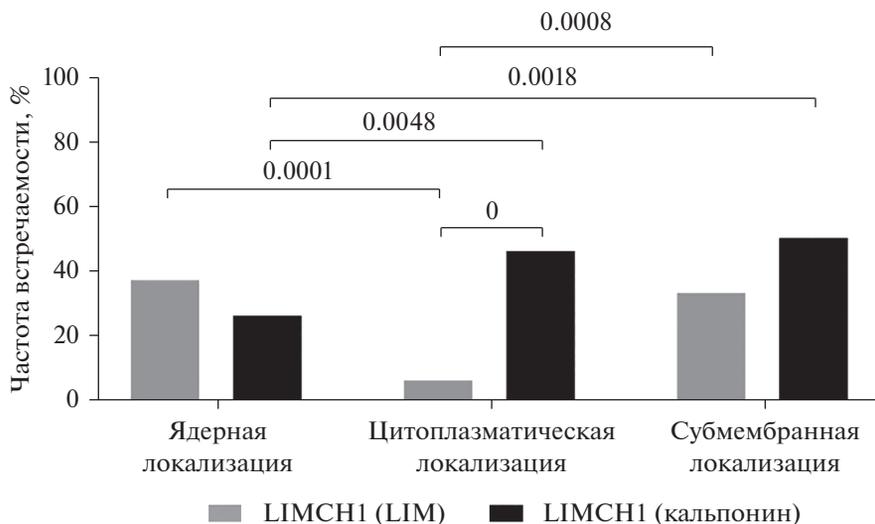


**Рис. 2.** Локализация белка LIMCN1 (домен кальпонин) в опухолевых клетках больных ИКНТ молочной железы: *а* – мембранная (*м*), *б* – цитоплазматическая (*ц*), *в* – ядерная (*я*). На *врезках* показано фотоувеличение выделенного участка. Иммуногистохимическое окрашивание. Увел. об.: 40×.

рактенно для больных ИКНТ и чаще всего LIM домен локализовался в ядре, по сравнению с другими компартаментами. Примерно у четверти пациентов в цитоплазме и субмембранном пространстве обнаруживали присутствие только домена кальпонин.

**Локализация белка LIMCN1 в опухолевых клетках больных с наличием и отсутствием НАХТ.** На следующем этапе был проведен сравнительный анализ локализации белка LIMCN1 в опухолевых клетках в

группах больных с наличием и отсутствием НАХТ. Ядерная локализация белка LIMCN1 в опухолевых клетках обнаруживалась у 52.8% больных в группе без применения НАХТ и у 47.2% больных,  $p = 0.07128$ , в группе с применением НАХТ. Локализацию белка LIMCN1 в цитоплазме наблюдали у 77.8 и 22.2%,  $p = 0.23775$ , а субмембранную – у 41.7 и 58.3%,  $p = 0.19480$  в группах без применения и с применением НАХТ соответственно. Таким образом, не бы-



**Рис. 3.** Частоты встречаемости доменов белка LIMCH1 (LIM и кальпонин) в клеточных компартаментах опухолевых клеток у больных ИНКТ молочной железы.

ло выявлено статистически значимых различий локализации белка LIMCH1 в опухолевых клетках в группах больных с наличием и отсутствием НАХТ.

**Локализация домена LIM в опухолевых клетках различных морфологических структур.** Далее мы оценивали локализацию доменов белка LIMCH1 в опухолевых клетках различных морфологических структур (тубулярных, альвеолярных, солидных и трабекулярных), а также в одиночных опухолевых клетках и инвазивном фронте ракетообразных структур (табл. 2).

Среди всех морфологических образований, наиболее редко домен LIM встречался в опухолевых клетках тубулярных структур независимо от внутриклеточной локализации. Частота встречаемости домена LIM в ядре была значительно выше в многоклеточных образованиях (альвеолярных, солидных и тра-

бекулярных), чем в одиночных опухолевых клетках и тубулярных структурах. В случае цитоплазматической локализации наблюдали обратную ситуацию: чаще она встречалась в одиночных опухолевых клетках, чем в опухолевых клетках многоклеточных морфологических образований. Частоты встречаемости субмембранной локализации не различались между морфологическими структурами ( $p < 0.05$ ). Частоты встречаемости домена LIM, вне зависимости от клеточного компартамента, не различались между инвазивным фронтом ракет, связанных с солидными структурами, и другими морфологическими структурами ( $p < 0.05$ ).

**Локализация домена кальпонин в опухолевых клетках различных морфологических структур.** Далее мы оценили локализацию домена кальпонин белка

**Таблица 1.** Частота встречаемости различных вариантов сочетания доменов белка LIMCH1 в клеточных компартаментах опухолевых клеток у больных ИКНТ молочной железы

Сочетания доменов LIMCH1	Локализация, % (абс.)		
	ядерная	цитоплазматическая	субмембранная
LIM <sup>+</sup> /кальпонин <sup>+</sup>	23.6% (21 из 89)	3.4% (3 из 89) $p_1 = 0.0001$	20.2% (18 из 89) $p_1 = 0.7174$ $p_2 = 0.0008$
LIM <sup>+</sup> /кальпонин <sup>-</sup>	10.1% (9 из 89)	2.2% (2 из 89) $p_1 = 0.0573$	1.1% (1 из 89) $p_1 = 0.0181$ $p_2 = 1.0000$
LIM <sup>-</sup> /кальпонин <sup>+</sup>	3.4% (3 из 89)	25.8% (23 из 89) $p_1 = 0.0000$	29.2% (26 из 89) $p_1 = 0.0000$ $p_2 = 0.7374$

Указана вероятность различий по сравнению с ядерной ( $p_1$ ) и цитоплазматической ( $p_2$ ) локализацией.

**Таблица 2.** Частота встречаемости разной локализации домена LIM белка LIMCN1 в опухолевых клетках морфологических образований больных ИКНТ молочной железы

Морфологические образования		Частота встречаемости домена LIM белка LIMCN1, % (абс.)		
		ядерная	цитоплазматическая	субмембранная
Тубулярные	1	7.4% (2 из 27) $p_{1-2} = 0.0104$ $p_{1-3} = 0.0192$ $p_{1-5} = 0.0298$	3.7% (1 из 27) $p_{1-6} = 0.0324$	7.4% (2 из 27) $p_{1-6} = 0.0492$
Альвеолярные	2	33.3% (26 из 78)	5.1% (4 из 78)	19.2% (15 из 78)
Солидные	3	29.9% (23 из 77)	5.2% (4 из 77)	20.8% (16 из 77)
Инвазивный фронт ракет, связанных с солидными структурами	4	15.8% (3 из 19)	10.5% (2 из 19)	21.1% (4 из 19)
Трабекулярные	5	29% (20 из 69)	7.2% (5 из 69)	17.4% (12 из 69)
Одиночные опухолевые клетки	6	7.8% (5 из 64) $p_{6-2} = 0.0002$ $p_{6-3} = 0.0012$ $p_{6-5} = 0.0019$	23.4% (15 из 64) $p_{6-1} = 0.0324$ $p_{6-2} = 0.0022$ $p_{6-3} = 0.0023$ $p_{6-5} = 0.0139$	26.6% (17 из 64) $p_{6-1} = 0.0492$

В табл. 2 и 3:  $p$  – вероятность различий между вариантами, указанными цифрами.

LIMCN1 в разных морфологических структурах (табл. 3). Реже всего ядерная локализация домена кальпонин обнаруживалась в одиночных опухолевых клетках по сравнению с альвеолярными, трабекулярными и солидными структурами. Частоты встречаемости домена кальпонин в цитоплазме и субмембранном

**Таблица 3.** Частота встречаемости разной локализации домена кальпонин белка LIMCN1 в опухолевых клетках морфологических образований больных ИКНТ молочной железы

Морфологические структуры		Частота встречаемости домена кальпонин белка LIMCN1, % (абс.)		
		ядерная	цитоплазматическая	субмембранная
Тубулярные	1	11.1% (3 из 27) $p_{1-2} = 0.0442$ $p_{1-3} = 0.0242$	14.8% (4 из 27)	37% (10 из 27)
Альвеолярные	2	21.8% (17 из 78)	14.1% (11 из 78)	37.2% (29 из 78)
Солидные	3	20.8% (16 из 77)	18.2% (14 из 77)	40.3% (31 из 77)
Инвазивный фронт ракет, связанных с солидными структурами	4	5.3% (1 из 19)	10.5% (2 из 19)	21.1% (4 из 19)
Трабекулярные	5	15.9% (11 из 69)	20.3% (14 из 69)	37.7% (26 из 69)
Одиночные опухолевые клетки	6	3.1% (2 из 64) $p_{6-2} = 0.0008$ $p_{6-3} = 0.0004$ $p_{6-5} = 0.0004$	23.4% (15 из 64)	25% (16 из 64)

пространстве опухолевых клеток, формирующих различные морфологические структуры, не различались ( $p < 0.05$ ). Частоты встречаемости домена кальпонин, вне зависимости от клеточного компартмента, не различались между инвазивным фронтом раков, связанных с солидными структурами, и другими морфологическими структурами ( $p < 0.05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе впервые были изучены особенности локализации белка LIMCN1 в опухолевых клетках. Выполнение белком в клетке своих функций тесно связано с его клеточной локализацией. Основной функцией белка LIMCN1, описанной в литературе, является торможение клеточной подвижности, благодаря формированию фокальных спаек и активации NM-IIA (Lin et al., 2017). Эта функция белка связана с его цитоплазматической локализацией. Однако нами было показано, что локализация белка LIMCN1 в клетке может быть не только цитоплазматической, он обнаруживается во всех клеточных компартментах. Это позволяет предполагать, что белок LIMCN1 имеет ряд других функций.

Как говорилось ранее, белок LIMCN1 имеет доменное строение и в клетке могут находиться его изоформы с различными сочетаниями доменов (García et al., 2016). Домен LIM участвует в формировании белок-белковых взаимодействий, а также связывает белок LIMCN1 с NM-IIA. В опухолевых клетках домен LIM встречается наиболее редко. Значительно чаще встречается домен кальпонин, который преимущественно локализуется в цитоплазме и субмембранном пространстве. Домен кальпонин является кальций-связывающим, что позволяет ему активировать кальций-зависимые белки. Изоформа белка LIMCN1 с доменом кальпонин благодаря своей локализации может участвовать в формировании спаек адгезии, а также во многих сигнальных путях, активируя кальций-зависимые белки. Сочетанная локализация доменов отражает способность белка LIMCN1 выполнять полный спектр своих функций, и такой вариант наиболее часто встречался в ядре и субмембранном пространстве в сравнении с цитоплазмой. Ядерная локализация белка LIMCN1 позволяет предполагать, что он может участвовать в регуляции экспрессии генов (Kadmas, Beckerle, 2004).

Отдельно стоит отметить, что сравнение локализации белка LIMCN1 опухолевыми клетками в группах пациентов с наличием и отсутствием НАХТ не показало статистически значимых различий. Вероятно, проведение НАХТ не влияет на локализацию белка LIMCN1 в опухолевых клетках.

Важной характеристикой рака молочной железы является его морфологическая гетерогенность. Опухолевые клетки различных структур отличаются по своим свойствам, а преобладание в опухоли определенных структур связано с чувствительностью к хи-

миотерапии, а также прогрессией заболевания (Gerashchenko et al., 2017). Анализ корреляций между характером локализации доменов белка LIMCN1 и морфологической гетерогенностью опухоли привел к выводам о том, что локализация доменов белка LIMCN1 опухолевыми клетками в морфологических образованиях является гетерогенной.

Так, цитоплазматическая локализация домена LIM белка LIMCN1 чаще всего обнаруживалась в одиночных опухолевых клетках, по сравнению с опухолевыми клетками многоклеточных морфологических структур. Известно, что для одиночных опухолевых клеток характерен индивидуальный тип инвазии. На первый взгляд, основная функция белка LIMCN1, описанная в литературе, а именно торможение миграции клеток, противоречит полученным данным. Однако, ламеллоподии, в которых LIMCN1, связываясь с NM-IIA, тормозит подвижность, формируются при мезенхимном варианте миграции. Это означает, что в одиночных опухолевых клетках в большей степени, чем в других структурах опухоли, происходит торможение мезенхимного типа инвазии. Однако опухолевые клетки обладают высокой пластичностью, мезенхимный тип инвазии переходит в амёбовидный и наоборот в зависимости от структуры стромы опухоли (Zavyalova et al., 2019). Из этого следует, что часть одиночных клеток способна к амёбовидному типу инвазии, который также участвует в интравазации и других этапах метастазирования. Это вполне согласуется с высокой степенью ассоциации наличия в ИКНТ одиночных клеток с развитием гематогенных метастазов (Tashireva et al., 2020).

Кроме того, известно, что белок LIMCN1 участвует во многих сигнальных путях, в том числе WNT, который приводит к повышению клеточной подвижности, что и характерно для одиночных опухолевых клеток (Cizkova et al., 2010). Ядерная локализация не может быть связана с клеточной адгезией. Достоверно меньшая частота случаев с локализацией в ядрах одиночных клеток доменов LIM и кальпонин подчеркивает особый статус одиночных клеток по регуляторному влиянию этих белков на геном клеток. Изучение регуляторных функций белка LIMCN1 при локализации в ядрах требует специальных исследований.

Частоты встречаемости доменов белка LIMCN1 не различались в инвазивном фронте структур, для которых характерен коллективный тип инвазии, и структур, для которых не характерны проявления инвазивного роста. Вероятно, в многоклеточных структурах белок LIMCN1 в меньшей степени связан с инвазией, по сравнению с одиночными опухолевыми клетками. Можно предположить, что основной функцией белка LIMCN1 в многоклеточных структурах является обеспечение межклеточной адгезии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Локализация доменов белка LIMCH1 в опухолевых клетках рака молочной железы гетерогенна и обнаруживается во всех клеточных компартментах. На модели морфологической гетерогенности было показано, что цитоплазматическая локализация домена LIM в одиночных клетках опухоли может быть связана с разными вариантами индивидуального типа инвазии. Функции белка LIMCH1 в опухолевых клетках не ограничены влиянием на клеточную подвижность, ядерная локализация домена LIM в опухолевых клетках может быть связана с регуляторной функцией белка.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-515-16001).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

У всех обследованных лиц было получено добровольное информированное согласие на проведение манипуляций в соответствии с требованиями локального этического комитета НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 7 от 24 мая 2021 г.).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bersini S., Lytle N.K., Schulte R., Huang L., Wahl G.M., Hetter M.W. 2020. Nup93 regulates breast tumor growth by modulating cell proliferation and actin cytoskeleton remodeling. *Life Sci. Alliance*. V. 3. P. e201900623. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900623>
- Cizkova M., Cizeron-Clairac G., Vacher S., Susini A., Andrieu C., Lidereau R., Bièche I. 2010. Gene expression profiling reveals new aspects of PIK3CA mutation in ERalpha-positive breast cancer: Major implication of the Wnt signaling pathway. *PloS One*. V. 5. P. e15647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015647>
- García D., Ordenes P., Benítez J., González A., García-Robles M.A., López V., Carvajal N., Uribe E. 2016. Cloning of two

LIMCH1 isoforms: Characterization of their distribution in rat brain and their agmatinase activity. *Histochem. Cell Biol.* V. 145. P. 305.

<https://doi.org/10.1007/s00418-015-1389-0>

- Gerashchenko T.S., Novikov N.M., Krakhmal N.V., Zolotaryova S.Y., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Denisov E.V., Perelmuter V.M. 2019. Markers of cancer cell invasion: are they good enough? *J. Clin. Med.* V. 8. P. 1092. <https://doi.org/10.3390/jcm8081092>

Gerashchenko T.S., Zavyalova M.V., Denisov E.V., Krakhmal N.V., Pautova D.N., Litviakov N.V., Vtorushin S.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. 2017. Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer as an indicator of the metastatic potential and tumor chemosensitivity. *Acta Naturae*. V. 9. P. 32.

<https://doi.org/10.32607/20758251-2017-9-1-56-67>

Kadmas J.L., Beckerle M.C. 2004. The LIM domain: From the cytoskeleton to the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 5. P. 920.

<https://doi.org/10.1038/nrm1499>

Lin Y.H., Zhen Y.Y., Chien K.Y., Lee I.C., Lin W.C., Chen M.Y., Pai L.M. 2017. LIMCH1 regulates nonmuscle myosin-II activity and suppresses cell migration. *Mol. Biol. Cell*. V. 28. P. 1054.

<https://doi.org/10.1091/mbc.e15-04-0218>

Spiliotis E.T., Nakos K. 2021. Cellular functions of actin- and microtubule-associated septins. *Curr. Biol.* V. 31. P. R651.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.03.064>

Tashireva L.A., Zavyalova M.V., Savelieva O.E., Gerashchenko T.S., Kaigorodova E.V., Denisov E.V., Perelmuter V.M. 2020. Single tumor cells with epithelial-like morphology are associated with breast cancer metastasis. *Front. Oncol.* V. 10. P. 50.

<https://dx.doi.org/10.3389/fonc.2020.00050>

WHO Classification of Tumours . Breast, 5th edn. Lyon: IARC Publications. 2019.

Zavyalova M.V., Denisov E.V., Tashireva L.A., Savelieva O.E., Kaigorodova E.V., Krakhmal N. V., Perelmuter V.M. 2019. Intravasation as a key step in cancer metastasis. *Biochem. (Moscow)*. V. 84. P.762.

<https://doi.org/10.1134/S0006297919070071>

Zhang Y., Zhang Y., Xu H. 2019. LIMCH1 suppress the growth of lung cancer by interacting with HUWE1 to sustain p53 stability. *Gene*. V. 712. P.143963.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.143963>

## Characteristic of LIMCH1 Protein Localization in Tumor Cells in Breast Cancer

V. V. Alifanov<sup>a</sup>, \*, L. A. Tashireva<sup>a</sup>, M. V. Zavyalova<sup>a</sup>, and V. M. Perelmuter<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Research Institute of Oncology, Tomsk NMRC, Tomsk, 634028 Russia

\*e-mail: alifanov.vl@yandex.ru

The LIMCH1 protein reduces cell motility by regulating the activity of NM-IIA, that may be critical for the invasion of tumor cells. At the moment, the role of the LIMCH1 protein in cancer progression is poorly understood. In this work we study features of the localization of the LIMCH1 protein domains in various compartments of tumor cells in patients with breast cancer and the role of the LIMCH1 protein domains in collective or individual migration of

tumor cells. Morphological heterogeneity was used as a model system for study migration of tumor cells. Nuclear localization of the LIMCH1 protein was found in tumor cells in patients with breast cancer. This suggests that the functions of the LIMCH1 protein in tumor cells are not limited to the effect on cell motility. Much more often the LIMCH1 protein was found in the cytoplasm of single tumor cells, compared with multicellular structures. This can be regarded as an indicator of the amoeboid type of motility, since single tumor cells is associated with hematogenous metastasis. It can be assumed that the main function of the LIMCH1 protein in multicellular structures is to provide intercellular adhesion.

*Keywords:* LIMCH1, breast cancer, invasion, morphological heterogeneity

УДК 57.012.3;57.032;57.033

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ МОЗГА ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ ЛИНИИ 5xFAD

© 2022 г. Н. Л. Туманова<sup>1</sup>, Д. С. Васильев<sup>1</sup>\*, Н. М. Дубровская<sup>1</sup>, Н. Н. Наливаева<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия\*E-mail: [dvasilyev@bk.ru](mailto:dvasilyev@bk.ru)

Поступила в редакцию 15.12.2021 г.

После доработки 02.01.2022 г.

Принята к публикации 13.01.2022 г.

В настоящем исследовании у мышей трансгенной линии 5xFAD, моделирующих патогенез болезни Альцгеймера, проводили сравнительный анализ структурных и ультраструктурных изменений в нервной ткани обонятельных луковиц, гиппокампа и энторинальной коры, а также исследовали распределение основной амилоид-деградирующей нейрорепептидазы неприлизина (НЕП) относительно мышей дикого типа. Исследование структуры нервной ткани показало, что у трансгенных животных, характеризующихся усиленной продукцией амилоидного пептида Аβ, наблюдается нарастающая гибель нейронов головного мозга, вследствие чего прерываются связи между нейронами и нарушается нейронная сеть. Кроме того, проведенное нами электронномикроскопическое исследование обнаружило у мышей линии 5xFAD снижение плотности расположения синаптических контактов и дендритных шипиков, локальные очаги поражения нервной ткани, появление аутофаголизосом в нейрорепептиде этих структур. Были выявлены признаки, указывающие на усиление нейродегенеративных процессов по сравнению с мышами дикого типа. У мышей линии 5xFAD имеет место изменение распределения амилоид-деградирующей пептидазы НЕП в энторинальной коре и в гиппокампе, а также снижение интенсивности ее окрашивания в энторинальной коре. У трансгенных мышей в возрасте 6 мес. также наблюдалось нарушение памяти при анализе в тесте распознавания новых объектов относительно мышей дикого типа.

**Ключевые слова:** трансгенные мыши 5xFAD, обонятельные луковицы, гиппокамп, энторинальная кора, ультраструктура, нейродегенерация, амилоидный пептид, неприлизин, распознавание нового объекта

DOI: 10.31857/S0041377122020080

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой многофакторное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся когнитивной дисфункцией, а также патологическим накоплением в ткани мозга амилоидного пептида (Аβ) и гиперфосфорилированного белка тау-1 (для обзора см. Lane et al., 2018). Трансгенные модели БА на животных, в частности на мышах, экспрессируют гены человека, которые содержат мутации, характерные для ранних, “семейных” форм БА, и повторяют ключевые особенности патологии Аβ и тау. Они позволяют получать ценную информацию о молекулярных и поведенческих нарушениях, характерных для пациентов с БА. Трансгенные мыши линии 5xFAD экспрессируют два гена человека: APP (ген белка-предшественника амилоидного пептида) с тремя типами мутаций (шведской (K670N, M671L), флоридской (I716V) и лондонской (V717I)), а также ген пресенилина 1 с мутациями (M146L и L286V), характерными для се-

мейных форм БА (FAD). Эти мутации приводят к накоплению в ткани мозга мышей амилоидных агрегатов, гибели нейронов и когнитивному дефициту (Oakley et al., 2006; Ohno et al., 2007). Растворимый Аβ<sub>42</sub> обнаруживается в ткани мозга 5xFAD мышей уже к 1.5 мес., и его уровни резко повышаются с возрастом (Ohno et al., 2007). Уровни Аβ<sub>40</sub> также увеличиваются с возрастом, но повышаются медленнее и значительно ниже, чем Аβ<sub>42</sub>, при этом соотношение Аβ<sub>42</sub>/Аβ<sub>40</sub> достигает порядка 3.6 у самцов в возрасте 6 мес. и коррелирует с уровнем экспрессии трансгена APP (Oakley et al., 2006). Также у этих мышей увеличена экспрессия BACE1, ключевого фермента амилоидогенного пути превращения APP (Devi et al., 2010; Maarouf et al., 2013).

Из структурных нарушений ткани мозга трансгенных животных, помимо амилоидоза, наиболее часто отмечают дегенерацию и гибель нейронов, синаптопатии и нейровоспалительные процессы. По литературным данным, у 5xFAD мышей примерно на третьем месяце жизни одновременно с образованием бляшек начинается развиваться астроглиоз и микроглиоз (Oakley et al., 2006). В возрасте 6 мес. по-

**Принятые сокращения:** APP – предшественник β-амилоидного пептида; БА – болезнь Альцгеймера; Аβ – β-амилоидный пептид; PS1 – пресенилин 1; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

казана активация микроглии в коре и гиппокампе, которую авторы связывают с нарушением нейронных функций и пластичности мозга (Mirzaei et al., 2016). Дегенерация синапсов, оцениваемая по уровням пресинаптического маркера синаптофизина, начинается во всем мозге к 4-мес. возрасту, а уровни другого пресинаптического маркера синтаксина и постсинаптического маркера PSD-95 снижаются к 9 мес. (Shao et al., 2011). Имеется мало информации о пространственно-временном паттерне или деталях потери синапсов, хотя есть данные, что в гиппокампе 12-мес. 5xFAD мышей наблюдается почти 50%-я потеря аксо-шиповых синапсов в *stratum lacunosum-moleculare*, в то время как количество синапсов в *stratum radiatum* не отличается от мышей дикого типа (Neuman et al., 2015). При этом данные об изменениях на ультраструктурном уровне на этой модели единичны (Park et al., 2017) и в основном подтверждают данные светооптических исследований, не касаясь специфических патологических процессов в самих клетках, что требует дальнейшего изучения.

Известно, что гибель нейронов у 5xFAD мышей наблюдается во многих областях мозга. В областях с наиболее тяжелым амилоидозом — субкулиуме и кортикальном слое V — гибель нейронов начинается примерно в 6-мес. возрасте и коррелирует с накоплением A $\beta$ <sub>42</sub> (Oakley et al., 2006; Eimer, Vassar, 2013). В этом же возрасте наблюдается уменьшение количества холинергических нейронов в базальной части переднего мозга (Devil, Ohno, 2010).

У 5xFAD мышей также наблюдаются существенные когнитивные нарушения. С помощью теста контекстуальной обусловленности страхом, было установлено нарушение памяти у 5xFAD мышей в возрасте 4–5 мес. При этом наблюдалось поражение гиппокампа, сопровождавшееся нарушением кратковременной и долговременной памяти (Kimura, Ohno, 2009; O’Leary et al., 2020). Тестирование трансгенных мышей в водном лабиринте Морриса показало, что в возрасте 6 мес. у них наблюдается увеличение времени поиска платформы, однако уровень фосфорилирования белка тау в гиппокампе повышался намного раньше, чем регистрировались нарушения памяти (Kanno et al., 2014). Это свидетельствует о том, что изменения на молекулярном уровне начинаются раньше формирования функциональных нарушений. Поскольку патогенез БА существенным образом связан с ранним нарушением обоняния (Murphy, 2019), исследования изменений обонятельной функции в процессе взросления трансгенных мышей и развития у них патологии БА представляет большой интерес. Однако число таких исследований довольно невелико, и они весьма противоречивы. Так, имеются данные, что нарушение обоняния имеет место только у самок трансгенных 5xFAD мышей и отсутствует у самцов (Roddick et al., 2016). Также у 5xFAD мышей не наблюдалось нарушения памяти на запахи (O’Leary et al., 2020). Тем не менее, имеются данные, что в процессе развития па-

тологии у этих мышей происходит дегенерация терминальных окончаний обонятельного нерва, вызванная не столько наличием внеклеточных депозитов A $\beta$ , сколько накоплением в них APP (Cai et al., 2012). Также имеются данные о нарушении у 5xFAD мышей экспрессии транскрипта обонятельного рецептора Olfrl10/111 в коре и гиппокампе (Gaudel et al., 2018). Это свидетельствует о необходимости сопоставления патологических изменений в периферической и центральной частях обонятельного анализатора.

Накопление A $\beta$  в ткани мозга тесно связано с дефицитом содержания и активности в нервной ткани амилоид-деградирующего фермента неприлизина (НЕП) (для обзора см. Nalivaeva, Turner, 2019; Nalivaeva et al., 2020), который также является основным ферментом, регулирующим действие нейромедиатора соматостатина в обонятельной луковице (Nocera et al., 2019). Ранее нами было показано, что пренатальная гипоксия у крыс приводит к существенным изменениям структурной организации и архитектоники энторинальной коры, теменной коры и гиппокампа, в которых наблюдается снижение экспрессии НЕП как на уровне мРНК, так и белка, что коррелирует с нарушением их обоняния и когнитивных функций (Туманова и др., 2021; Vasilev et al., 2021). У трансгенных 5xFAD мышей также наблюдается снижение содержания НЕП в ткани мозга, коррелирующее с уровнем накопления A $\beta$  (Hüttenrauch et al., 2015), однако характер экспрессии НЕП в структурах конечного мозга этих мышей не изучался.

Цель настоящего исследования заключалась в проведении сравнительного анализа структурных и ультраструктурных изменений в обонятельных луковицах, гиппокампе и энторинальной коре, а также содержания и распределения в них НЕП, как у трансгенных мышей линии 5xFAD, так и у мышей дикого типа. Выбор для изучения структур конечного мозга был обусловлен их вовлеченностью в механизмы памяти (кора, гиппокамп) и работу обонятельного анализатора (обонятельные луковицы, энторинальная кора, гиппокамп) у грызунов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Животные.** В работе использовали самцов мышей двух линий C57Bl (C57Bl/6 — дикий тип) и 5xFAD (C57Bl6 — гемизиготы (Tg(APP<sup>SwFlon</sup>, PSEN1\*<sup>M146L</sup>\*<sup>L286V</sup>) 6799Vas/J) — модель патологии альцгеймеровского типа) в возрасте 6 мес. из питомника “Черноголовка”. Животных содержали в стандартных условиях вивария ИЭФБ РАН при световом режиме (12 ч день/12 ч ночь) по 4–5 особей в клетке, со свободным доступом к воде и пище. Эксперименты осуществляли согласно протоколу использования лабораторных животных ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН, основанному на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Com-

munities Council Directive #86/609 for the Care of Laboratory Animals).

**Исследование памяти в тесте “Распознавание новых объектов”.** В тестировании участвовали 6 мышей дикого типа и 10 мышей линии 5xFAD в возрасте 6 мес. В начале тестирования мышей в течение 5 мин адаптировали к условиям эксперимента, для чего их помещали на специальную площадку 500 × 500 мм<sup>2</sup>, ограниченную непрозрачными стенками 200 мм высотой. Через 2 ч после адаптации, на экспериментальной площадке проводили тренировочное предъявление животному двух предметов в течение 5 мин. При последующем тестировании один объект заменяли новым предметом, а другой объект оставляли неизменным, но при этом меняли место его расположения. Через 1 и 24 ч после тренировки оценивали долговременную память, для чего животному предъявляли пару объектов, состоящую из известного и нового предметов. Регистрировали время, проведенное в непосредственном тактильном или обонятельном контакте животного с каждым объектом, и вычисляли индекс дискриминации, как отношение времени обнюхивания неизвестного (нового) предмета к времени обнюхивания известного:

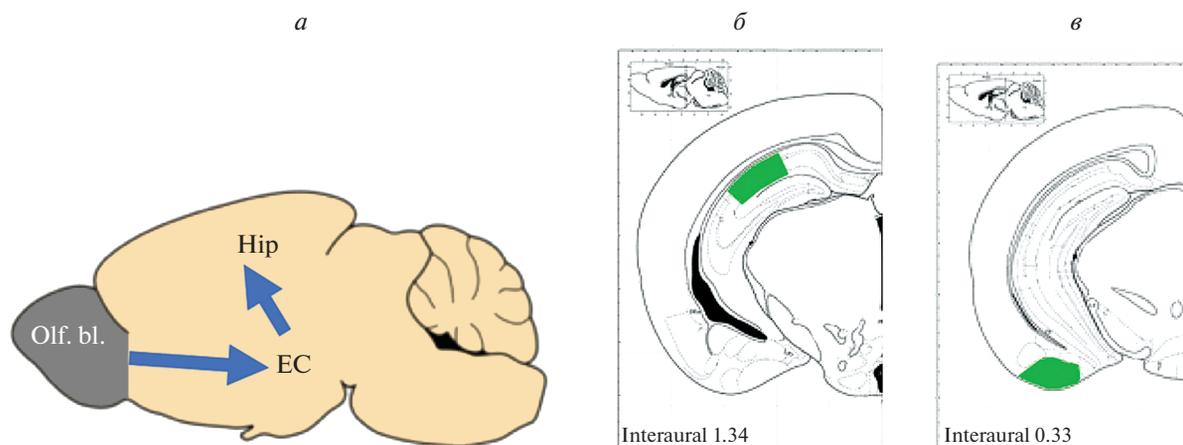
$$\text{индекс дискриминации} = t_{\text{нового}} / t_{\text{известного}}$$

Все предметы были сделаны из толстого стекла, и после каждого предъявления их и экспериментальную площадку протирали 50%-ным раствором этилового спирта.

**Световая микроскопия.** Светооптическое исследование ткани мозга проводили на мышах дикого типа ( $n = 8$ ) и линии 5xFAD ( $n = 8$ ) в возрасте 6 мес. Ткань мозга фиксировали методом транскардиальной перфузии 10%-ным нейтральным формалином на фосфатном буфере (PBS, 4°C, pH 7.4). Замороженные фронтальные срезы мозга толщиной 20 мкм изготав-

ливали на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Германия). Для исследования отбирали срезы обонятельной луковицы (4.0–2.5 мм от bregma), гиппокампа и энторинальной коры мозга (2.0–3.3 мм от bregma в каудальном направлении) (Paxinos, Franklin, 2001) (рис. 1а–в) и проводили комбинированное окрашивание по Нисслию и красителем Конго Ред (4%-й водный раствор). С использованием микроскопа ImagerA (Zeiss, Германия) оценивали состояние нервной ткани мозга. Количественное сравнение клеток поля CA1 гиппокампа и энторинальной коры проводили на серии срезов толщиной 20 мкм; первый срез серии выбирался случайно, расстояние между последующими срезами в серии составляло 40 мкм. При проведении анализа использовали программу Video Test Master-Morphology (Video Test, Санкт-Петербург, Россия). По срезам (6 на каждое животное), содержащим дорсальный гиппокамп или энторинальную кору вычисляли средние величины общего количества клеток и количества нейронов (на участке ткани площадью 10000 мкм<sup>2</sup>) для каждого животного дикого типа (WT,  $n = 8$ ) и линии 5xFAD ( $n = 8$ ).

**Электронная микроскопия.** Для анализа мозг мышей (C57Bl  $n = 5$ , 5xFAD  $n = 4$ ) фиксировали методом транскардиальной перфузии смесью 1%-го глутарового альдегида и 1%-го формальдегида на 0.1 М PBS, pH 7.4. Блоки, содержащие обонятельную луковицу, энторинальную кору или гиппокамп дополнительно фиксировали 1%-м OsO<sub>4</sub>, контрастировали уранилацетатом, обезвоживали и заливали в аралдит по стандартному протоколу (Туманова и др., 2018). На ультратоме Leica (Leica Microsystems, Германия) изготавливали срезы исследуемых структур толщиной 500Å, которые затем исследовали на электронном микроскопе FEI Tecnai V2 (FEI, США).



**Рис. 1.** Области интереса в обонятельных луковицах (Olf. bl.), энторинальной коре (EC) и гиппокампе (Hip) мозга мышей. Синими стрелками (а) показан восходящий путь от обонятельных луковиц к энторинальной коре и гиппокампу; светло-зеленым цветом обозначены области гиппокампа (б) и энторинальной коры (в), в которых исследовали экспрессию НЭП и амилоидоз.

**Иммуногистохимия.** Для исследования отбирали срезы обонятельной луковицы (4.0–2.5 мм от bregma, рис. 1а), энторинальной области коры и поля CA1 дорзального гиппокампа (на уровне 2.0–3.3 и 4.5–5.5 мм от bregma соответственно, рис 1б, в) (Paxinos, Franklin, 2001) животных дикого типа ( $n = 8$ ) и линии 5xFAD ( $n = 8$ ). Мозг фиксировали раствором 10%-ного нейтрального формалина на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4), затем изготавливали срезы на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Германия). Для снижения аутофлуоресценции срезы инкубировали в 0.1 М растворе глицина (SIGMA, Германия) на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4) под визуальным контролем до максимального ослабления свечения в диапазоне длин волн 490–550 нм. Блокировку неспецифического связывания антител осуществляли путем часовой инкубации в 2%-м растворе бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Германия) на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4), в который добавляли 0.01% Triton X-100 для пермеабиллизации клеточных мембран. Для иммуногистохимического исследования распределения НЭП использовали поликлональные антитела кролика Anti-CD10 (EPR5904, ab126593; Abcam, Великобритания, разведение 1 : 100). Визуализацию осуществляли с помощью FITC-конъюгированных вторичных антител против IgG кролика (ab96902; Abcam, Великобритания, разведение 1 : 500). В качестве негативного контроля неспецифического связывания ставили иммунохимическую реакцию в отсутствие первичных антител для исследуемых областей мозга у каждого животного. В качестве позитивного контроля использовали ткань печени, характеризующейся высоким содержанием НЭП, взятой от мыши дикого типа. Иммунофлуоресцентное исследование выполняли на микроскопе Leica DMR, оборудованном конфокальным сканером Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флюорохрома FITC осуществляли светом He/Ag лазера при длине волны 488 нм. Свечение FITC регистрировали в диапазоне длин волн 496–537 нм. Яркость свечения FITC на поле нервной ткани площадью 10000 мкм<sup>2</sup> оценивали при помощи программы Video Test Master-Morphology (Video Test, Санкт-Петербург, Россия). Для каждого животного вычисляли среднее значение по 6 срезам. Нормировку полученных значений для каждого животного осуществляли путем вычета среднего значения для негативного контроля (иммунохимическая реакция в отсутствие первичных антител) и сравнивали средние нормированные значения уровня сигнала FITC для мышей дикого типа и линии 5xFAD.

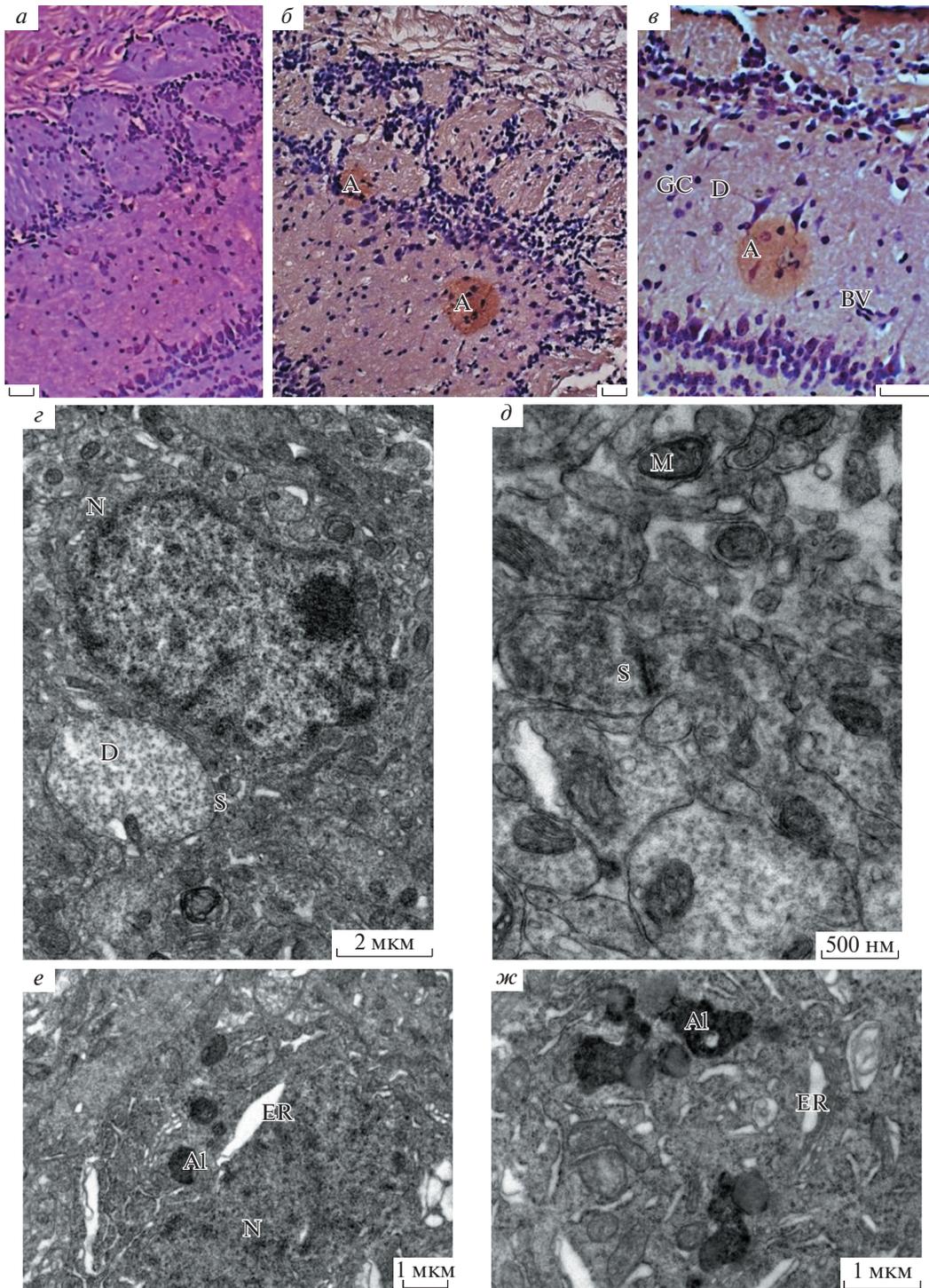
**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ “SigmaStat 3.0”, используя непарный двусторонний *t*-критерий (unpaired two-tailed *t*-test), и непараметрический критерий Манна–Уитни (Mann–Whitney *U*-test). Множественное сравнение проводили методом однофакторного

дисперсионного анализа (one-way ANOVA with Dunn’s post-hoc). Результаты представлены как среднее  $\pm$  SEM. Значимыми считались различия при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Морфологическое исследование структур мозга мышей дикого типа и линии 5xFAD. Обонятельные луковицы.** При комбинированном окрашивании срезов мозга методом Ниссля и Конго Ред в обонятельных луковицах трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа были выявлены существенные различия в строении нервной ткани. На рис. 2б, в показаны сферические образования (амилоидные бляшки) размером от 0.1 до 1.3 мм, которые наблюдались либо в слое митральных клеток, либо в волокнистых слоях обонятельных луковиц у трансгенных мышей. У мышей дикого типа (рис. 2а) таких сферических образований не отмечено. Амилоидные образования были окружены большим количеством глиальных клеток. На рис. 2в внутри амилоидных образований заметны признаки деструкции клеточных тел и их отростков. На периферии этих образований наблюдались кровеносные сосуды. На электроннограммах обонятельной луковицы у трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа заметны локальные очаги поражения нервной ткани с признаками клеточной гибели: деструкция ядерной и цитоплазматической мембраны, разрушение митохондрий и других клеточных органелл и появление большого количества глиальных клеток. На рис. 2е, ж заметны расширения ЭПР у трансгенных мышей. В нейронах и нейропиле обонятельных луковиц этих мышей видно большое количество аутофаголизосом различных форм и размеров. Синаптических контактов в нейропиле обонятельных луковиц трансгенных мышей наблюдалось намного меньше, чем у мышей дикого типа (рис. 2г, д).

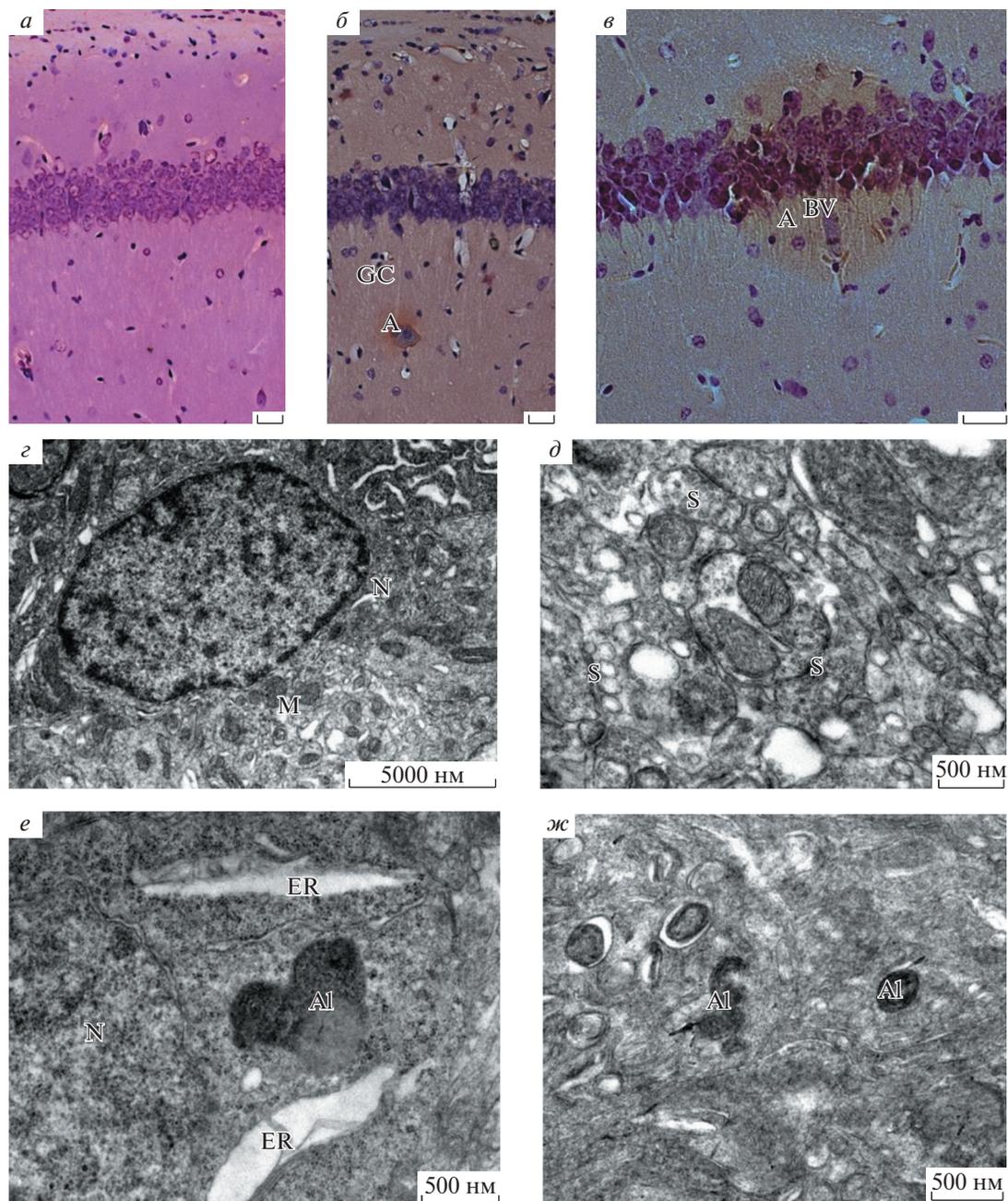
**Поле CA1 дорзального гиппокампа.** На препаратах, окрашенных комбинированным методом Ниссля и Конго Ред, в поле CA1 дорзального гиппокампа трансгенных мышей, по сравнению с мышами дикого типа, также выявлены различия в строении нервной ткани. На рис. 3б, в заметны амилоидные образования сферической формы. В гиппокампе амилоидные бляшки небольшого размера, около 0.1 мм и находятся, в основном, в волокнистых слоях. В пирамидном слое гиппокампа они встречаются реже. У мышей дикого типа они отсутствуют (рис. 3а). В гиппокампе трансгенных животных увеличено количество глиальных клеток. Внутри амилоидных образований заметны признаки деструкции клеточных тел и отростков нейронов, и глиальные клетки. Вблизи этих образований находятся кровеносные сосуды (рис. 3в). На электроннограммах поля CA1 дорзального гиппокампа у трансгенных мышей по сравнению с мышами дикого типа отмечены очаги локального поражения нервной ткани с признаками



**Рис. 2.** Обонятельные луковичи у мышей дикого типа (*a, z, d*) и трансгенных мышей линии 5xFAD (*б, в, e, ж*) в возрасте 6 мес. *a–в* – Окраска Конго красным, масштабные отрезки – 30 мкм; *z–ж* – электроннограммы участков нейропиля с нейронами обонятельной луковичи. Обозначения: А – амилоидные образования (бляшки), D – дендриты, BV – кровеносные сосуды, GC – глиальные клетки, N – нейроны, S – синаптические контакты, M – митохондрии, ER – ЭПР, Al – аутофаголизосомы.

гибели клеток и их отростков (рис. *3e, ж*). В цитоплазме нейронов замечены расширенные каналцы ЭПР. В нервных клетках, особенно в нейропиле гиппокампа, появляются аутофаголизосомы разных

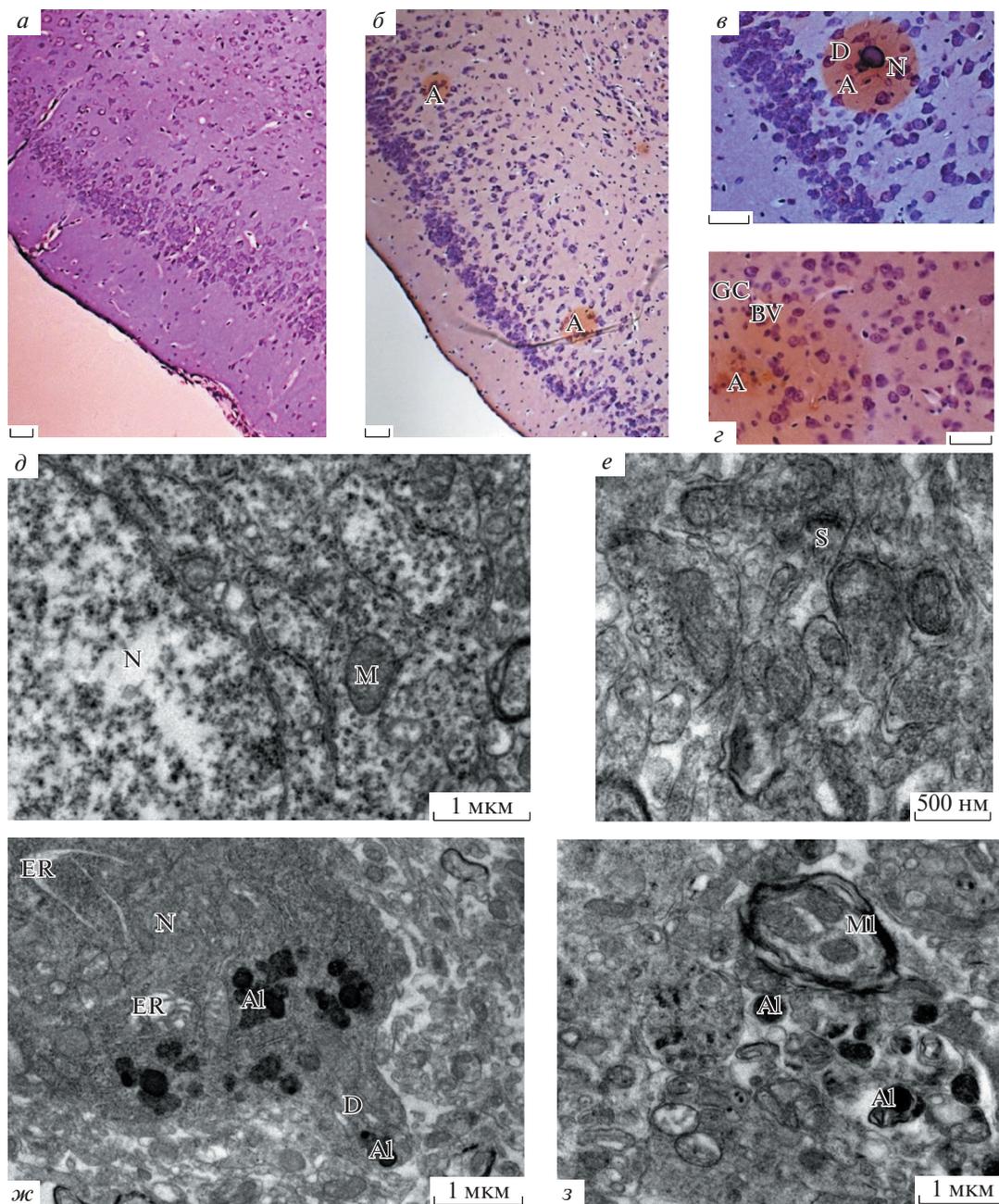
размеров и форм (рис. *3e, ж*). Синаптические контакты и шипики в нейропиле гиппокампа трансгенных мышей встречаются редко, в отличие от мышей дикого типа (рис. *3z, d*).



**Рис. 3.** Гиппокамп у мышей дикого типа (*a, z, д*) и трансгенных мышей линии 5xFAD (*б, в, е, жс*) в возрасте 6 мес. *a–в* – Окраска Конго Ред, масштабные отрезки 30 мкм; *z–жс* – электроннограммы участков нейропиля с нейронами гиппокампа мышей дикого типа (*z, д*) и трансгенных мышей линии 5xFAD (*е, жс*) с амилоидными образованиями и аутофаголизосомами (Al). Обозначения: A – амилоидные образования (бляшки), BV – кровеносные сосуды, GC – глиальные клетки, N – нейроны, S – синаптические контакты, M – митохондрии, ER – ЭПР, Al – аутофаголизосомы.

**Энторинальная кора.** Светооптическое исследование с использованием комбинированного окрашивания по методу Ниссля и Конго Ред выявило существенные различия в строении нервной ткани трансгенных мышей и мышей дикого типа. На рис. 4б–г в нервной ткани энторинальной коры заметно большее количество крупных амилоидных образований сферической формы. Их количество намного больше

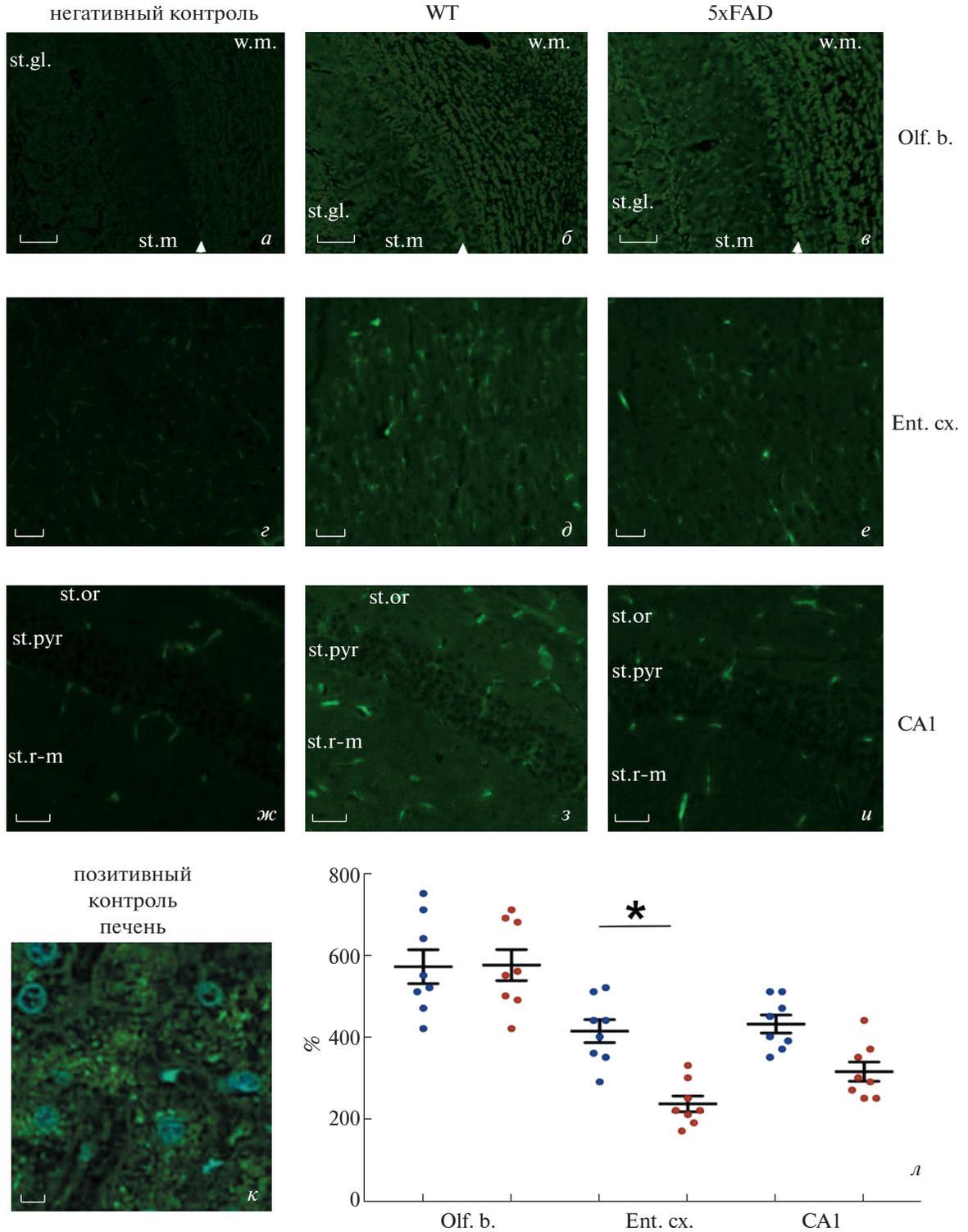
чем в гиппокампе, и располагаются они, в основном, в клеточном слое. Заметно увеличение количества глиальных клеток (рис. 4б–г) по сравнению с мышами дикого типа (рис. 4а). На рис. 4б–г в крупных амилоидных образованиях представлены дегенеративные изменения нейронов, изогнутые потерявшие форму дендриты и глиальные клетки. На периферии амилоидных образований располагаются



**Рис. 4.** Энторинальная кора у мышей дикого типа (*a, d, e*) и трансгенных мышей линии 5xFAD (*б-г, ж, з*) в возрасте 6 мес. *a-г* – Окраска Конго красным, масштабные отрезки – 30 мкм; *д-з* – электроннограммы участков нейропиля с нейронами энторинальной коры мышей дикого типа (*d, e*) и трансгенных мышей линии 5xFAD (*ж, з*) с амилоидными образованиями с аутофаголизосомами (AI). Обозначения А – амилоидные образования (бляшки), D – дендриты, BV – кровеносные сосуды, GC – глиальные клетки, N – нейроны, S – синаптические контакты, M – митохондрии, ER – ЭПР, MI – миелиновые волокна, AI – аутофаголизосомы.

кровеносные сосуды. На электроннограммах нервной ткани энторинальной коры трансгенных мышей при сравнении с мышами дикого типа обнаружены очаги локального поражения нервной ткани, которые выражаются в усилении нейродегенеративных изменений. На рисунке 4ж представлен нейрон сходящим от его тела дендритом с многочисленными

аутофаголизосомами. В нейропиле энторинальной коры трансгенных мышей в большом количестве также выявлены аутофаголизосомы различной формы (рис. 4ж, з). Более того, в этой части мозга заметно наличие расслоения миелиновой оболочки нервных отростков. Синаптических контактов и шипиков в энторинальной коре трансгенных мышей



**Рис. 5.** Распределение металлопептидазы неприлизина (FITC-позитивный сигнал зеленого цвета) в ткани обонятельных луковиц (Olf. b., *a–в*), энторинальной коры (Ent. cx., *г–е*) и поля CA1 гиппокампа (CA1, *ж–и*) у 6-мес. мышей дикого типа (*б, д, з*) и мышей линии 5xFAD (*в, е, и*). *а, г, ж* – Негативный контроль иммуногистохимического окрашивания ткани мозга (в отсутствие первичных антител к неприлизу (НЕП) иммунохимическая реакция не наблюдается), *к* – позитивный контроль иммунохимической реакции на НЕП в ткани печени мыши дикого типа. Печень характеризуется высоким содержанием НЕП (зеленый цвет FITC-сигнала); ядра окрашены неспецифическим ядерным красителем DAPI (синий цвет). *л* – Результаты денситометрического анализа яркости свечения FITC-позитивных структур в ткани энторинальной коры (Ent. cx.), поля CA1 гиппокампа (CA1) и обонятельной луковицы (Olf. b.) мышей дикого типа (синие точки,  $n = 8$ ) и мышей линии 5XFAD (красные точки,  $n = 8$ ); данные представлены в виде среднего значения и его ошибки в % от уровня среднего значения свечения FITC в ткани негативного контроля; различия между группами животных достоверны при  $*p < 0.05$  (one-way ANOVA with Dunn’s post-hoc). Масштабные отрезки: 70 (*a–в*) и 50 (*г–и*) мкм.

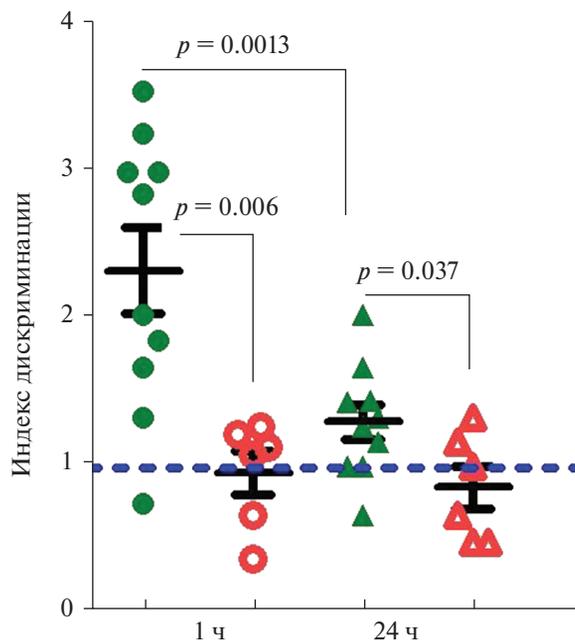
намного меньше по сравнению с мышами дикого типа (рис. 4д, е).

**Иммуногистохимическое исследование распределения НЕП.** В обонятельных луковицах, энторинальной коре и гиппокампе мышей дикого типа и трансгенных животных линии 5xFAD выявлены статистически значимые различия в интенсивности иммуногистохимического окрашивания НЕП (Kruskal–Wallis test,  $F_{5,47} = 34.7, p < 0.01$ ) (рис. 5). В энторинальной коре трансгенных мышей линии 5xFAD обнаружено статистически значимое снижение уровня флуоресцентного сигнала по сравнению с мышами дикого типа (Dunn’s post-hoc  $p = 0.0088$ ). При этом достоверных различий в уровне сигнала в ткани поля СА1 гиппокампа ( $p = 0.0711$ ) и обонятельных луковиц ( $p = 0.99$ ) выявить не удалось. В обонятельных луковицах мышей из обеих групп наиболее выраженное иммунное окрашивание НЕП отмечалось в нейропиле белого вещества, телах и отростках митральных клеток, а также мелких клеток, диффузно располагающихся в молекулярном слое и по краям гламерул (рис. 5б, в). Следует отметить, что в энторинальной коре мышей дикого типа, помимо относительно равномерного окрашивания нейропиля, наблюдались многочисленные НЕП-позитивные тела пирамидных нейронов (рис. 5з), а у мышей линии 5xFAD таких нейронов было заметно меньше, и их количество составляло  $44.5 \pm 6.1\%$  от уровня контроля (Mann–Whitney test  $U = 21, p = 0.02$ ). В дорсальном гиппокампе мышей обеих исследованных групп иммунопозитивными были преимущественно интернейроны, тогда как в пирамидном слое поля СА1 отмечались лишь единичные иммунопозитивные клетки (рис. 5ж, з). Разницы в общем количестве иммунопозитивных клеток между группами не отмечалось (Mann–Whitney test  $U = 3, p = 0.25$ ).

**Исследование долговременной памяти в тесте “Распознавание новых объектов”.** Сравнительный анализ поведения мышей линии 5xFAD и мышей дикого типа при предъявлении известных и новых объектов показал, что у трансгенных мышей в возрасте 6 мес. нарушена долговременная память. Было выявлено, что мыши дикого типа уделяли больше внимания исследованию новых объектов, при этом через 1 ч после тренировочного предъявления объектов индекс дискриминации составлял 2.44, а через 1 сут снижался (Mann–Whitney test  $U = 138.5, p = 0.013$ ) до 1.30. В то же время у трансгенных мышей индекс дискриминации был ниже по сравнению с диким типом: на 55% через 1 ч (Mann–Whitney test  $U = 25, p = 0.006$ ) и на 44% через 24 ч после тренировки ( $t$ -test  $t = 2.3, p = 0.037$ ) и приближался к 1, что свидетельствует об отсутствии предпочтения между новыми и известными объектами (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительное исследование нервной ткани обонятельных луковиц, а также входящих в общий гиппо-



**Рис. 6.** Сравнительный анализ уровня исследовательской деятельности в отношении нового объекта у мышей линии 5xFAD ( $n = 10$ ) и дикого типа ( $n = 6$ ). По вертикали – индекс дискриминации, вычисленный как частное чисел, отражающих время обнюхивания неизвестного (нового) и известного предметов. По горизонтали – время, прошедшее после тренировочного предъявления пары объектов. Над горизонтальными линиями, соединяющими сравниваемые группы животных, обозначен уровень значимости выявленных межгрупповых различий. Данные о животных дикого типа показаны зелеными кружками (1 ч) и треугольниками (24 ч), данные по животным линии 5xFAD представлены белыми кружками (1 ч) и треугольниками (24 ч) с красными границами. Пунктирной горизонтальной линией обозначен уровень, при котором наблюдается равнозначное предпочтение нового и известного объектов.

кампальный комплекс гиппокампа и энторинальной коры у мышей линии 5xFAD и дикого типа (рис. 1), с использованием светооптического, электронномикроскопического и иммуногистохимического методов показало наличие существенных различий в их ультраструктуре. У трансгенных мышей 5xFAD в возрасте 6 мес. в этих трех структурах на светооптическом уровне были обнаружены амилоидные сенильные бляшки, как в клеточных, так и в волокнистых слоях, которые не наблюдались у мышей дикого типа. У 5xFAD мышей в очагах поражения головного мозга, где концентрируются бляшки, увеличено количество глиальных клеток, свидетельствующее о нейровоспалительном процессе. Нейроны и их дендриты подвергаются дегенеративным изменениям, происходит гибель клеток и прерываются межнейрональные связи. Кроме того, проведенное нами электронномикроскопическое исследование обнаружило локальные очаги поражения нервной ткани,

появление аутофаголизосом в этих структурах, которые еще раз указывают на усиление нейродегенеративных процессов. У трансгенных мышей, по сравнению с мышами дикого типа, уменьшается число синаптических контактов и шипиков. Все эти изменения, обнаруженные нами, свидетельствуют об очевидном нарушении функционирования нейрональной сети как обонятельных луковиц, так и энторинальной коры и гиппокампа. Полученные нами данные согласуются с результатами других авторов, показавших гибель нейронов во многих областях мозга (Oakley et al., 2006; Eimer, Vassar, 2013), а также развитие астро- и микроглиоза, которое идет параллельно с образованием амилоидных бляшек (Oakley et al., 2006).

В проведенном нами исследовании выявлено нарушение долговременной памяти у трансгенных мышей в тесте распознавание нового объекта (NOR), который широко используется для исследования изменений памяти у животных (Antunes, Biala, 2012). Общеизвестно, что на результаты NOR тестирования влияют как гиппокампальные, так и кортикальные нарушения (Cohen, Stackman, 2015). Исследования на приматах и грызунах показали, что для распознавания визуальных объектов очень важны парагиппокампальные области височной доли, а именно периринальная, энторинальная и нижняя височная кора (Hammond et al., 2004). В нашем исследовании у мышей линии 5xFAD были обнаружены существенные ухудшения долговременной памяти при распознавании визуальных объектов вместе с структурными изменениями, наблюдаемыми в энторинальной коре и гиппокампе.

Наличие существенных изменений в исследованных структурах мозга указывает на то, что у 5xFAD мышей имеет место нарушение нейрональных связей, что не может не сказаться на формировании их обонятельной функции. Полученные нами данные также свидетельствуют, о том, что у 5xFAD мышей имеет место нарушение распознавания запаха масла валерианы (Vasilev et al., 2022), один из составляющих компонентов которого — изовалериановая кислота, имеет феромональную значимость для мышей (Мельник и др., 2009).

Полученные нами данные об изменении распределения амилоид-деградирующего фермента НЕП в ткани исследуемых нами структур мозга мышей линии 5xFAD по сравнению с диким типом позволяют предположить, что снижение уровня содержания НЕП в энторинальной коре может быть одной из причин нарушения деградации растворимых форм амилоидного пептида, который при его накоплении активно образует амилоидные агрегаты (Nalivaeva, Turner, 2019). Кроме того, в структурах мозга трансгенных мышей нами выявлено нарушение числа синаптических контактов, которые, по имеющимся представлениям, являются основными местами локализации и действия НЕП (Наливаева и др., 2020), что может нарушать нормальное функционирование

этого фермента и доступность его субстратов, к числу которых относятся А $\beta$  и соматостатин. С этой точки зрения представляет также интерес в будущем проанализировать уровень содержания и распределения соматостатина в обонятельном анализаторе 5xFAD мышей, поскольку есть данные, что у пациентов с БА имеет место нарушение его распределения в переднем обонятельном ядре (Saiz-Sanchez et al., 2010).

Проведенное нами исследование является важным шагом на пути к пониманию молекулярно-клеточных нарушений при патологии нервной ткани, вызванной накоплением амилоидного пептида. Особый интерес представляют результаты электронно-микроскопического исследования ткани мозга трансгенных мышей, показавшего, что накопление амилоидных отложений сопровождается развитием аутофагии, о чем свидетельствует наличие большого числа аутофаголизосом различных форм и размеров во всех исследованных нами участках мозга. Существует ряд гипотез о том, что в ходе развития БА происходит нарушение молекулярных механизмов образования аутофаголизосом (Reddy, Oliver, 2019), которое приводит к их накоплению в теле и отростках нейрона (Wang et al., 2018). Данные литературы согласуются с наблюдаемым нами накоплением аутофагосом и аутофаголизосом в нервных клетках. Однако доказательство активации аутофагии в нейронах у мышей линии 5xFAD требует проведения специального исследования с привлечением данных о динамике специфических маркерных белков (Atg-комплекс, Beclin-1, Lamp-1, Lamp-2, LC3 и др.). Так или иначе, результаты проведенного исследования впервые четко показывают накопление аутофаголизосом в нейронах кортикальных структур мозга мышей линии 5xFAD и свидетельствуют о вовлечении аутофагии в механизмы нейродегенеративных процессов у таких животных, что указывает на перспективность исследования аутофагии на данной модели.

Еще одним новым наблюдением в нашем исследовании является обнаружение различного характера клеточной локализации НЕП в исследуемых структурах, свидетельствующее, что в гиппокампе мышей НЕП-позитивными являются преимущественно интернейроны, а в энторинальной коре — тела пирамидных нейронов. При этом в обонятельных луковицах НЕП имеет более широкую локализацию: в нейроне белого вещества, в телах и отростках митральных клеток и в мелких клетках гломерулярного слоя. Все это указывает на то, что локализация НЕП в разных популяциях клеток и структурах мозга различна, что, вероятно, отражает специфический характер распределения его субстратов. Различия в распределении НЕП у трансгенных животных и мышей дикого типа может свидетельствовать о нарушении его внутриклеточного транспорта и локализации, что наблюдалось нами в нервных клетках при гипоксии (Fisk et al., 2007).

Несмотря на то, что различные трансгенные модели БА различаются по своим характеристикам и не могут полностью отражать патогенез БА у человека, они дают возможность исследовать основополагающие молекулярные механизмы нарушений, вызываемых усиленной продукцией и накоплением амилоидного пептида, что делает их важным инструментом для исследований и тестирования фармакологических препаратов (Yang et al., 2017).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность Центру коллективного пользования научным оборудованием для физиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований (ЦКП) ИЭФБ РАН.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-015-00232) и частично Госзадания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (№ АААА-А18-118012290373-7).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с животными осуществляли в соответствии с утвержденным протоколом использования лабораторных животных Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, основанным на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Communities Council Directive #86 / 609 for the Care of Laboratory Animals).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Т.Н.Л.: морфологические исследования, написание статьи; В.Д.С.: морфологические и иммуногистохимические исследования, статистическая обработка данных; Д.Н.М.: поведенческие эксперименты и статистическая обработка данных, Н.Н.Н.: анализ данных, написание и редактирование текста статьи, общее руководство выполнением работы. Текст и графические изображения статьи одобрены всеми соавторами.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Мельник С.А., Гладышева О.С., Крылов В.Н. 2009. Возрастные изменения обонятельной чувствительности самцов мышей к запаху изовалериановой кислоты. Сенс. Сист. Т. 23. P. 151. (Melnik S.A., Gladysheva O.S., Krylov V.N. 2009. Age-related changes in the olfactory sensitivity of male mice to the smell of isovaleric acid. Sensory Systems. V. 23. P. 151.)

Наливаева Н.Н., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Turner A.J., Журавин И.А. 2020. Role of neprilysin in synaptic plasticity and memory. Рос. физиол. журнал. им. И.М. Сеченова. Т. 106. № 10. С. 1191. (Nalivaeva N.N., Vasiliev D.S., Dubrovskaya N.M., Turner A.J., Zhuravin I.A. 2020. Role of neprilysin in synaptic plasticity and memory. Russian J. Physiol. V. 106. P. 1191.)

<https://doi.org/10.31857/S0869813920100076>

Туманова Н.Л., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Журавин И.А. 2018. Ультраструктурные изменения в сенсомоторной коре при отставании развития двигательного поведения в раннем онтогенезе крыс, перенесших пренатальную гипоксию. Цитология. Т. 60. № 5. С. 390. (Tumanova N.L., Vasiliev D.S., Dubrovskaya N.M., Zhuravin I.A. 2018. Changes in ultrastructure of the sensorimotor cortex accompanied by the motor behavior dysfunctions in the early ontogenesis of rats subjected to the prenatal hypoxia. Tsitologiya. V. 60. P. 390.)

<https://doi.org/10.31116/tsitol.2018.05.09>

Туманова Н.Л., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Наливаева Н.Н., Журавин И.А. 2021. Влияние пренатальной гипоксии на цитоархитектонику и ультраструктурную организацию структур мозга, связанных с обонятельной функцией у крыс. Цитология. Т. 63. № 2. С. 163. (Tumanova N.L., Vasiliev D.S., Dubrovskaya N.M., Nalivaeva N.N., Zhuravin I.A. 2021. Effect of prenatal hypoxia on cytoarchitectonics and ultrastructural organisation of brain regions related to olfaction in rats. Tsitologiya. V. 63. P. 193.)

<https://doi.org/10.31857/S0041377121020085>

Antunes M., Biala G. 2021. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. Cogn. Process. V. 13. P. 93.

<https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>

Cai Y., Xue Z.Q., Zhang X.M., Li M.B., Wang H., Luo X.G., Cai H., Yan X.X. 2012. An age-related axon terminal pathology around the first olfactory relay that involves amyloidogenic protein overexpression without plaque formation. Neuroscience. V. 215. P. 160.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.043>

Cohen C.J., Stackman R.W. Jr. 2015. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. Behav. Brain Res. V. 285. P. 105.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002>

Devi L., Alldred M.J., Ginsberg S.D., Ohno M. 2010. Sex- and brain region-specific acceleration of  $\beta$ -amyloidogenesis following behavioral stress in a mouse model of Alzheimer's disease. Mol. Brain. V. 3. P. 34.

<https://doi.org/10.1186/1756-6606-3-34>

Devi L., Ohno M. 2010. Phospho-eIF2 $\alpha$  level is important for determining abilities of BACE1 reduction to rescue cholinergic neurodegeneration and memory defects in 5XFAD mice. PLoS One. V. 5. P. e12974.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012974>

Eimer W.A., Vassar R. 2013. Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A $\beta$ 42 accumulation and Caspase-3 activation. Mol. Neurodegener. V. 8. P. 2.

<https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-2>

Fisk L., Nalivaeva N.N., Boyle J.P., Peers C.S., Turner A.J. 2007. Effects of hypoxia and oxidative stress on expression of neprilysin in human neuroblastoma cells and rat cortical neurones and astrocytes. Neurochem. Res. V. 32. P. 1741.

<https://doi.org/10.1007/s11064-007-9349-2>

Gaudel F., Stephan D., Landel V., Sicard G., Féron F., Guiraudie-Capraz G. 2018. Expression of the cerebral olfactory recep-

- tors Olf110/111 and Olf544 is altered during aging and in Alzheimer's disease-like mice. *Mol. Neurobiol.* V. 56. P. 2057.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1196-4>
- Hammond R.S., Tull L.E., Stackman R.W. 2004. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* V. 82. P. 26.  
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.03.005>
- Hüttenrauch M., Baches S., Gerth J., Bayer T.A., Weggen S., Wirths O. 2015. Neprilysin deficiency alters the neuropathological and behavioral phenotype in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* V. 44. P. 1291.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-142463>
- Kanno T., Tsuchiya A., Nishizaki T. 2014. Hyperphosphorylation of Tau at Ser396 occurs in the much earlier stage than appearance of learning and memory disorders in 5XFAD mice. *Behav. Brain Res.* V. 274. P. 302.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.034>
- Kimura R., Ohno M. 2009. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiol. Dis.* V. 33. P. 229.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.10.006>
- Lane C.A., Hardy J., Schott J.M. 2018. Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* V. 25. P. 59.  
<https://doi.org/10.1111/ene.13439>
- Maarouf C.L., Kokjohn T.A., Whiteside C.M., Macias M.P., Kalback W.M., Sabbagh M.N., Beach T.G., Vassar R., Roher A.E. 2013. Molecular differences and similarities between Alzheimer's disease and the 5XFAD transgenic mouse model of amyloidosis. *Biochem. Insights.* V. 6. P. 1.  
<https://doi.org/10.4137/BCI.S13025>
- Mirzaei N., Tang S.P., Ashworth S., Coello C., Plisson C., Passchier J., Selvaraj V., Tyacke R.J., Nutt D.J., Sastre M. 2016. In vivo imaging of microglial activation by positron emission tomography with [(11)C]PBR28 in the 5XFAD model of Alzheimer's disease. *Glia.* V. 64. P. 993.  
<https://doi.org/10.1002/glia.22978>
- Murphy C. 2019. Olfactory and other sensory impairments in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* V. 15. P. 11.  
<https://doi.org/10.1038/s41582-018-0097-5>
- Nalivaeva N.N., Turner A.J. 2019. Targeting amyloid clearance in Alzheimer's disease as a therapeutic strategy. *Br. J. Pharmacol.* V. 176. P. 3447.  
<https://doi.org/10.1111/bph.14593>
- Nalivaeva N.N., Zhuravin I.A., Turner A.J. 2020. Neprilysin expression and functions in development, ageing and disease. *Mech. Ageing Dev.* V. 192. P. 111363.  
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111363>
- Neuman K.M., Molina-Campos E., Musial T.F., Price A.L., Oh K.J., Wolke M.L., Buss E.W., Scheff S.W., Mufson E.J., Nicholson D.A. 2015. Evidence for Alzheimer's disease-linked synapse loss and compensation in mouse and human hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Brain Struct. Funct.* V. 220. P. 3143.  
<https://doi.org/10.1007/s00429-014-0848-z>
- Nocera S., Simon A., Fiquet O., Chen Y., Gascuel J., Datiche F., Schneider N., Epelbaum J., Viollet C. 2019. Somatostatin serves a modulatory role in the mouse olfactory bulb: Neuroanatomical and behavioral evidence. *Front. Behav. Neurosci.* V. 13. P. 61.  
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00061>
- O'Leary T.P., Stover K.R., Mantolino H.M., Darvesh S., Brown R.E. 2020. Intact olfactory memory in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease from 3 to 15 months of age. *Behav. Brain Res.* V. 393. P. 112731.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112731>
- Oakley H.O., 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, neurodegeneration, and neuron 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>
- Ohno M., Cole S.L., Yasvoina M., Zhao J., Citron M., Berry R., Disterhoft J.F., Vassar R. 2007. BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* V. 26. P. 134.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.12.008>
- Park S.W., Im S., Jun H.O., Lee K., Park Y.J., Kim J.H., Park W.J., Lee Y.H., Kim J.H. 2017. Dry age-related macular degeneration like pathology in aged 5XFAD mice: Ultrastructure and microarray analysis. *Oncotarget.* V. 8. P. 40006  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16967>
- Paxinos G., Franklin K.B.J. 2001. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd Edition, Academic Press, San Diego.
- Reddy P.H., Oliver D.M. 2019. Amyloid  $\beta$  and phosphorylated tau-induced defective autophagy and mitophagy in Alzheimer's disease. *Cells.* V. 8. P. 488.  
<https://doi.org/10.3390/cells8050488>
- Roddick K.M., Roberts A.D., Schellinck H.M., Brown R.E. 2016. Sex and genotype differences in odor detection in the 3 $\times$ Tg-AD and 5XFAD mouse models of Alzheimer's disease at 6 months of age. *Chem. Senses.* V. 41. P. 433.  
<https://doi.org/10.1093/chemse/bjw018>
- Saiz-Sanchez D., Ubeda-Bañon I., de la Rosa-Prieto C., Argandoña-Palacios L., Garcia-Muñozguren S., Insausti R., Martínez-Marcos A. 2010. Somatostatin, tau, and  $\beta$ -amyloid within the anterior olfactory nucleus in Alzheimer disease. *Exp. Neurol.* V. 223. P. 347.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.06.010>
- Shao C.Y., Mirra S.S., Sait H.B., Sacktor T.C., Sigurdsson E.M. 2011. Postsynaptic degeneration as revealed by PSD-95 reduction occurs after advanced A $\beta$  and tau pathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* V. 122. P. 285.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-011-0843-x>
- Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Zhuravin I.A., Nalivaeva N.N. 2021. Developmental profile of brain neprilysin expression correlates with olfactory behaviour of rats. *J. Mol. Neurosci.* V. 71. P. 1772.  
<https://doi.org/10.1007/s12031-020-01786-3>
- Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Tumanova N.L., Nalivaeva N.N. 2022. Analysis of expression of the amyloid-degrading enzyme neprilysin in brain structures of 5xFAD transgenic mice. *J. Evol. Biochem. Physiol.* V. 108. P. 417.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093022010173>
- Wang C., Telpoukhovskaia M.A., Bahr B.A., Chen X., Gan L. 2018. Endo-lysosomal dysfunction: A converging mechanism in neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurobiol.* V. 48. P. 52.  
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.09.005>
- Yang Z., Kuboyama T., Tohda C. 2017. A systematic strategy for discovering a therapeutic drug for Alzheimer's disease and its target molecule. *Front. Pharmacol.* V. 8. P. 340.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00340>

## Morphofunctional Changes in the Brain Tissue of 5xFAD Transgenic Mice

N. L. Tumanova<sup>a</sup>, D. S. Vasiliev<sup>a, \*</sup>, N. M. Dubrovskaya<sup>a</sup>, and N. N. Nalivaeva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia*

*\*e-mail: dvasilyev@bk.ru*

In the present study, we performed a comparative analysis of structural and ultrastructural changes in the nervous tissue of the olfactory bulbs, hippocampus, and entorhinal cortex in 5xFAD transgenic mice that model the pathogenesis of Alzheimer's disease, and also investigated the distribution of the main amyloid-degrading neuropeptidase neprilysin (NEP) relative to wild-type mice. The study of the structure of the nervous tissue showed, that in transgenic animals characterized by increased production of amyloid peptide A $\beta$ , there is an increasing death of brain neurons, as a result of which the neural network is disrupted. In addition, electron microscopy study revealed in 5xFAD mice a decrease of the density of synaptic contacts and dendritic spines, local foci of the nervous tissue damage, the appearance of autophagolysosomes in the neuropil of the tissue. Some features of the neurodegenerative processes were shown compared to wild-type mice. In 5xFAD mice, there were a change in the distribution of amyloid-degrading peptidase NEP in the entorhinal cortex and in the hippocampus, as well as a decrease in the intensity of its staining in the entorhinal cortex. In transgenic mice at the age of 6 months, some memory impairment was observed when analyzed in a novel object recognition test relative to wild-type mice.

*Keywords:* 5xFAD transgenic mice, olfactory bulbs, hippocampus, entorhinal cortex, ultrastructure, neurodegeneration, amyloid peptide, neprilysin, novel object recognition test

УДК 57.089:616-006:59.089

## МОРФОЛОГИЯ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ КРЫС ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ, СОСТОЯЩЕЙ ИЗ ПОРИСТЫХ ВАТЕРИТОВ, ДОПИРОВАННЫХ ДЕКСТРАНСУЛЬФАТОМ И СОДЕРЖАЩИХ ДОКСОРУБИЦИН

© 2022 г. Н. Н. Сударева<sup>1,2,\*</sup>, П. В. Попрядухин<sup>1</sup>, О. М. Суворова<sup>1</sup>, Г. Ю. Юкина<sup>2</sup>, Е. Г. Сухорукова<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, 199004 Россия<sup>2</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 197376 Россия

\*E-mail: nnsas@mail.ru

Поступила в редакцию 10.12.2021 г.

После доработки 29.12.2021 г.

Принята к публикации 09.01.2022 г.

В представленной работе описано поведение системы доставки лекарственных препаратов на базе пористых  $\text{CaCO}_3$  ватеритов, допированных сульфатом декстрана и содержащих противоонкологический антибиотик доксорубин, в мышечной ткани на сроках от 3 сут до 3 мес. На ранних сроках было выявлено токсическое влияние доксорубина на окружающую мышечную ткань и печень. С течением времени токсическая реакция уменьшалась, место имплантации отграничивалось выраженной соединительно-тканной капсулой, а имплантат подвергался биорезорбции. Практически полная биорезорбция системы доставки наблюдалась через 3 мес. после начала эксперимента.

**Ключевые слова:** система доставки, сульфат декстрана, доксорубин, карбонат кальция, биорезорбция, мышечная ткань, эксперимент *in vivo*

DOI: 10.31857/S0041377122020079

Онкологические заболевания занимают второе место в мире по смертности. Не исключено, что при имеющейся сейчас скорости роста заболеваемости раком, они займут первое место, опередив сердечно-сосудистые заболевания (Gray et al., 2018). Одним из основных методов лечения таких заболеваний является химиотерапия, которая осуществляется путем системного введения токсичного для клеток опухоли препарата. Доксорубин (DOX) — наиболее мощный на сегодняшний день противоопухолевый препарат, который относится к ряду антрациклиновых антибиотиков. Монотерапия DOX во многих странах является стандартной химиотерапевтической процедурой первой очереди (Basin, 2008). Механизм действия DOX на ингибирование раковых клеток широкого спектра основан в частности на его интеркаляции в ДНК (Gao et al., 2021). Высокая эффективность DOX, к сожалению, нивелируется значительной дозо-зависимой кардио- и гепатотоксичностью и быстрым выведением из организма (Mipotti et al., 2004). Преодолеть эти недостатки можно, используя системы доставки (СД) DOX, пролонги-

рующие высвобождение лекарства в кровь, и снижающие его кардиотоксичность за счет уменьшения концентрации в крови при сохранении общей дозы препарата. Структуры СД DOX могут быть разнообразными (Matyszewska, 2014; Ruman et al., 2020; Alven et al., 2020; Jiang et al., 2020; Edis et al., 2021).

Мы остановимся на СД с использованием  $\text{CaCO}_3$  ватеритов. Ватерит — единственная пористая структура из трех полиморфных модификаций карбоната кальция. В связи с этим ватериты используют для инкапсулирования DOX (Dizaj et al., 2015; Mydin et al., 2018; Trofimov et al., 2018) и других соединений — низкомолекулярного продукта традиционной китайской медицины камптогидина (Qui et al., 2012), пептидов и белков (Sudareva et al., 2018; Vinevski et al., 2019), а также генов (Dizaj et al., 2019). Биосовместимость, способность к биорезорбции, низкая токсичность и невысокая стоимость — свойства  $\text{CaCO}_3$  ватеритов, позволяющие использовать их в терапевтических целях (Mydin et al., 2018; Trofimov et al., 2018). Кроме того, структуры  $\text{CaCO}_3$  ватеритов зависят от значения pH, ионной силы и состава окружающих растворов (Parakhonskij et al., 2013; Sudareva et al., 2015), что играет большую роль в их поведении в биологических средах. Зависимость от pH определяет таргет-

**Принятые сокращения:** DOX — доксорубин; СД — системы доставки; DexS — натриевая соль сульфата декстрана; ГМКИТ — гигантские многоядерные клетки инородных тел.

ный (противоопухолевый) потенциал  $\text{CaCO}_3$  носителей DOX, обеспечивая более интенсивное высвобождение инкапсулированного соединения в кислой среде опухолей. В литературе имеются данные об ингибирующем влиянии  $\text{CaCO}_3$  на рост раковых клеток. Рост опухоли сопровождается увеличением концентрации ионов  $\text{H}^+$  во внеклеточной среде (Neri et al., 2011). В такой кислой среде  $\text{CaCO}_3$  разрушается, что приводит к увеличению pH среды и ингибированию роста опухоли (Som et al., 2016). Таким образом, носители  $\text{CaCO}_3$  усиливают противоопухолевую активность инкапсулированного противоракового препарата.

В водной среде происходит перекристаллизация ватеритов в непористые кальциты или арагониты (Ogino et al., 1987). В результате высвобождается инкапсулированное в пористую среду соединения. С целью сохранения пористой структуры ватеритов (Sudareva et al., 2021a) и для увеличения их сорбционной активности по отношению к инкапсулируемому веществу, а также для мукоадгезии (Borodina et al., 2016), карбонатные ядра покрывают полимерами разной природы. Происхождение полимеров может быть как синтетическим (Wang et al., 2006; Huang et al., 2008; Richardson et al., 2015), так и природным (Wang et al., 2010; Zhao et al., 2012; Bai et al., 2017). В представленной нами работе в качестве такого полимера был использован биосовместимый и биорезорбируемый полианион – натриевая соль сульфата декстрана (DexS).

Важным фактором, влияющим на процесс фармакодинамики лекарственного соединения, является способ его введения в организм. В нашей предыдущей работе (Sudareva et al., 2020) были приведены примеры из литературы экспериментов *in vivo* с разными способами введения  $\text{CaCO}_3$  ватеритов: пероральным, парентеральным, внутритрахеальным, трансдермальным, интраназальным, а также введением в костную ткань. В ряде случаев ватериты содержали лекарственные или модельные соединения, а также были покрыты различными полимерами. Авторы одной из работ (de Koker et al., 2007) вводили мышам подкожно компоненты СД, содержащие DexS (полиэлектrolитные капсулы из 4 пар слоев DexS – полиаргинин-сформированные на ядрах  $\text{CaCO}_3$  с последующим разрушением ядер) и продемонстрировали при помощи конфокальной микроскопии клеточное поглощение и постепенное внутриклеточное разрушение СД. В последние годы в литературе появились данные о внутриопухолевом введении СД различной структуры, содержащих DOX (Mondal et al., 2021; Gao et al., 2021). В работах показано увеличение апоптоза опухолевых клеток и уменьшение объема опухолей. Следует, однако, иметь в виду риск стимулирования процесса метастазирования.

Ранее нами (Попрядухин и др., 2020; Popryadukhin et al., 2020) был проведен ряд исследований по

изучению трансформации и резорбции ватеритов в условиях *in vivo*. После введения в мышечную ткань крыс  $\text{CaCO}_3$  и  $\text{CaCO}_3$ , покрытого DexS, была выявлена структурная трансформация и полная биорезорбция обоих типов СД в течение 2 и 4 нед. соответственно. Кроме того, ватериты, покрытые DexS и содержащие DOX, вводили интаперитонеально крысам для лечения привитой гепатомы Зайделя. Было показано, что у крыс, получавших терапию DOX в указанных СД, вдвое увеличилась продолжительность жизни и вдвое уменьшился объем асцита по сравнению с контрольной группой крыс с гепатомой Зайделя (Sudareva et al., 2021b). Работ, направленных на исследование морфологических изменений мышечной ткани крыс после введения СД на базе ватеритов, содержащих DOX, нами в литературе не обнаружено. Тем не менее, введение в мышечную ткань целесообразно, как минимум по двум причинам: для возможного в будущем лечения опухоли поперечно-полосатой мышечной ткани (рабдомиосаркомы) и для создания депо противоопухолевого препарата при лечении опухолей других видов и локализаций.

Поэтому цель настоящей работы заключалась в исследовании поведения в мышечной ткани крыс системы адресной доставки лекарственных препаратов на базе пористых  $\text{CaCO}_3$  ватеритов, допированных сульфатом декстрана и содержащих доксорубицин.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Получение систем доставки ( $\text{CaCO}_3 + \text{DexS}$ ).** Пористые  $\text{CaCO}_3$  ватериты получали по описанной методике (Volodkin et al., 2004) с небольшими модификациями, а именно: аликвоты 1 М растворов  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  быстро сливали и интенсивно перемешивали в течение 30 с. Образовавшийся осадок фильтровали через фильтр Шотта, промывали и сушили до постоянного веса при 40°C. Получившиеся  $\text{CaCO}_3$  ватериты обрабатывали раствором DexS в концентрации 1 мг/мл в течение 1 ч, затем промывали, фильтровали и сушили при 40°C до постоянного веса. Размеры полученных ватеритов находились в интервале 1–3 мкм.

**Насыщение ватеритов, допированных DexS, доксорубицином.** Навеску ватеритов, обработанных DexS, суспендировали в водном растворе DOX (2 мг/мл; соотношение DOX/ $\text{CaCO}_3$  составляло 0.2) и перемешивали в течение 3.5 ч, затем суспензию центрифугировали, удаляли супернатант и лиофилизировали. Загрузку DOX в ватериты ( $\text{CaCO}_3 + \text{DexS}$ ) определяли по разности количеств DOX в начальном растворе и в супернатанте, которую делили на вес обработанных ватеритов. Она составила 70 мкг/мг. Наличие DOX в растворах определяли спектрофотометрически. Косвенным доказательством сохранения структуры (следовательно, и функции) служит неизменность УФ-спектра растворов DOX как в супернатанте, так и в процессе высвобождения в соответствующую среду.

Таким образом, были получены системы доставки (СД) лекарственного препарата, состоящие из пористых  $\text{CaCO}_3$  ватеритов, допированных декстрансульфатом и загруженных доксорубицином (далее по тексту используется сокращение СД)

**Материалы.** Соли, используемые для синтеза карбонатных ядер  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и натриевая соль сульфата декстрана ММ в диапазоне 9–20 кДа, все – производства Sigma-Aldrich (США). DOX – препарат Синдроксоцин (Actavis, Hafnarfjordur, Исландия), содержит 17% DOX and 83% лактозы. Концентрацию DOX в растворах определяли по спектрофотометрической калибровке при длине волны  $\lambda = 480$  нм.

**Эксперименты на животных.** Для экспериментов *in vivo* использовали 30 самцов белых крыс Wistar, по 5 животных на каждый срок эксперимента. Вес животных составлял 200–250 г, возраст – 3 мес. Для изучения резорбции *in vivo* СД стерилизовали методом автоклавирования при 110°C в течение 1 ч. Для этого каждую навеску СД по 10 мг (содержащую 0.7 мг DOX), предназначенную для эксперимента, максимально герметично упаковывали в алюминиевую фольгу. Животных оперировали под общей анестезией с помощью растворов золетила 100 (растворенного в 20 мл физиологического раствора) и рометара (20 мг/мл), которые вводили интраперитонеально по 0.1 и 0.015 мл раствора соответственно на 0.1 кг массы животного. Навески СД помещали в большую приводящую мышцу бедра (*musculus adductor magnus*) на одной из тазовых конечностей, в каждое животное по одному образцу. Затем раны конечностей послойно ушивали атрауматическими иглами с проленовой нитью 4/0. После наложения наружных швов крыс содержали в индивидуальных клетках, животные получали свободный доступ к воде и стандартную диету. После операции выраженного негативного влияния со стороны имплантированных материалов не выявлено. Животные проявляли активность, в зоне имплантации отсутствовали признаки избыточного воспалительного процесса.

**Морфологическое исследование СД в мышечной ткани.** Через 3 сут, 1, 2, 4, 8 и 12 нед животных выводили из эксперимента. Образцы мышечной ткани, содержащие СД, а также печень и сердце фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине на фосфатном буфере (рН 7.4) не менее 24 ч, обезвоживали в серии растворов этанола возрастающей концентрации и заключали в парафиновые блоки по стандартной гистологической методике. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм, поперечные мышечным волокнам, готовили с помощью микротомы Ассу-Cut SRT 200 (Sakura, Япония), окрашивали гематоксилином Майера и эозином (БиоВитрум, Россия). Соединительную ткань визуализировали методом Маллори (БиоВитрум, Россия). Микроскопический анализ проводили на световом микроскопе Nikon Eclipse E200 (Nikon, Япония) с использованием окуляра с

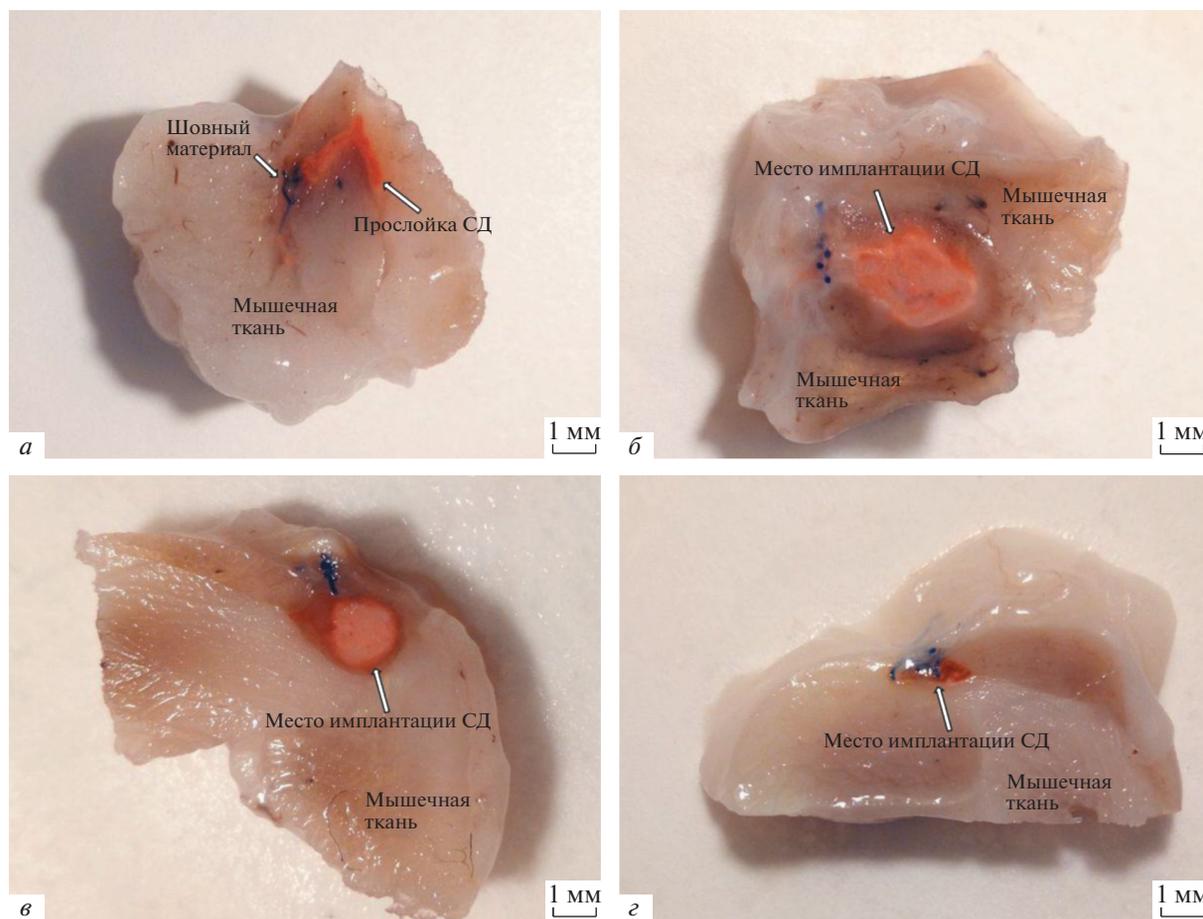
увеличением 10× и объективов с увеличением 4, 10, 20 и 40×. Запись цифровых изображений выполняли с помощью фотокамеры Nikon DS-Fi3 (Nikon, Япония).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Трое суток после имплантации СД.** На 3-и сут после операции визуально в мышечной ткани на месте имплантации во всех случаях определяются складчатые прослойки красного цвета, очевидно, содержащие СД, т.к. DOX имеет характерный красный цвет (рис. 1а). Наличие полостей, появление которых мы ранее фиксировали при имплантации  $\text{CaCO}_3$  ватеритов без DexS и DOX, не выявлено (Попрядухин и др., 2020). Причина – в замедлении скорости химических реакций, протекающих с  $\text{CaCO}_3$ , в результате которых образуется в частности углекислый газ, формирующий полости. Замедление скорости химических реакций, в свою очередь, связано с токсическим воздействием DOX на окружающие ткани, что приводит к нарушению процессов обмена веществ в зоне имплантации. Микроскопически СД находятся в окружении многочисленных рыхло лежащих клеток, в основном сегментоядерных лейкоцитов (нейтрофилов и эозинофилов) с единичными макрофагами и лимфоцитами, а также экстравазальными эритроцитами. Соединительнотканная капсула практически отсутствует. Сосуды расширены, полнокровны, определяются стопки эритроцитов, эндотелий набухший. Между мышечными волокнами, прилежащими к месту имплантации, определяется выраженный отек. Мышечные волокна разрушаются (рис. 2а, б). Очевидно, что наблюдаемые значительные воспалительная инфильтрация и деструктивные изменения, являются проявлением токсического действия DOX.

**Одна неделя после имплантации СД.** Через 1 нед. после операции визуально на месте имплантации в 3 случаях из 5 определяются слабовыраженные щелевидные полости неправильной формы. Микроскопически наблюдается перекристаллизация  $\text{CaCO}_3$  ватеритов в продолговатые кристаллы, вокруг которых отмечается гибель мышечных волокон с замещением их соединительной тканью (рис. 2в, г). Эта соединительная ткань инфильтрирована макрофагами и фибробластами. Полость с СД, многочисленными лейкоцитами и клеточным детритом окружена тонкой соединительнотканной капсулой. Сохранившаяся мышечная ткань имеет выраженный отек. Сосуды расширены, полнокровны, определяются стопки эритроцитов.

**Две недели после имплантации СД.** Через 2 нед. после имплантации в мышечной ткани во всех случаях определяются округлые структуры бледно-красного цвета и имеющие максимальный размер за весь период наблюдения (рис. 1б). Микроскопически полость, занимаемая СД, лейкоцитами и клеточным



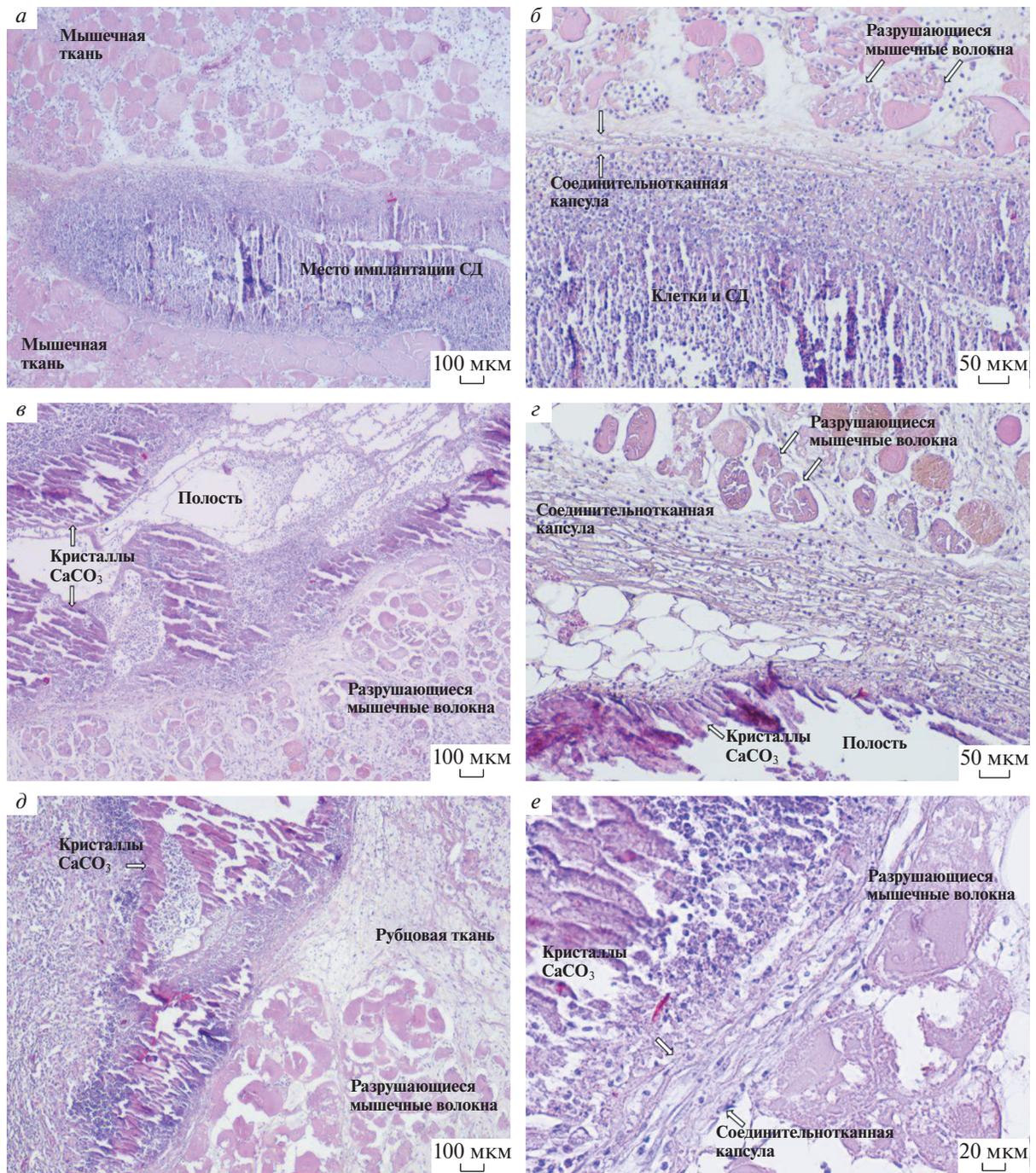
**Рис. 1.** Фотографии поперечного среза мышц с системой доставки (СД). *а* – Через 3 сут после имплантации, *б* – через 2 нед., *в* – через 1 мес., *з* – через 3 мес. Мышцы предварительно были фиксированы в нейтральном 10%-ном формалине не менее 48 ч.

детритом, окружена выраженной соединительно-тканной капсулой. На месте погибших мышечных волокон определяется соединительнотканый рубец, инфильтрированный многочисленными лимфоцитами. Сосуды расширены, полнокровны, определяются стопки эритроцитов. Отек в мышечной ткани вокруг рубца сохраняется (рис. 2*д, е*).

**Четыре недели после имплантации СД.** Через 4 нед. размер структур на месте имплантации уменьшается по сравнению с предыдущим сроком, они также приобретают более округлую форму, что свидетельствует о протекании процессов биорезорбции и компактизации (рис. 1*в*). Микроскопически капсула вокруг полости с кристаллами  $\text{CaCO}_3$  и клеточным детритом (в виде гомогенной массы) ярко выражена, полностью сформирована и представлена толстым слоем зрелых коллагеновых волокон. Эта картина, по-видимому, является реакцией организма на токсическое повреждение тканей, непосредственно прилегающих к месту имплантации СД. Капсула полностью инфильтрирована многочисленными лимфоцитами и макрофагами с оранжево-красной

цитоплазмой (очевидно, окрашенной поглощенным доксорубицином). Гигантские многоядерные клетки инородных тел (ГМКИТ) встречаются в небольшом числе. Сосуды капсулы расширены и полнокровны. Количество кристаллов меньше, чем на предыдущем сроке. Отек в мышечной ткани вокруг рубца сохраняется (рис. 3*а, б*).

**Двенадцать недель после имплантации СД.** Через 12 нед. эксперимента на месте имплантации СД во всех случаях визуально выявляется наличие следового количества структур красного цвета, что говорит о практически полной биорезорбции СД и о наличии остаточного количества DOX (рис. 1*з*). На этом сроке морфологическая картина схожа с таковой на предыдущем сроке. Соединительнотканная капсула вокруг полости полностью отграничивает содержимое полости от окружающей мышечной ткани. Выявляются единичные кристаллы  $\text{CaCO}_3$ . В капсуле выявляется умеренное число лимфоцитов и макрофагов с оранжево-красной цитоплазмой и умеренное число ГМКИТ. Сосуды в пределах нормы. Мы-



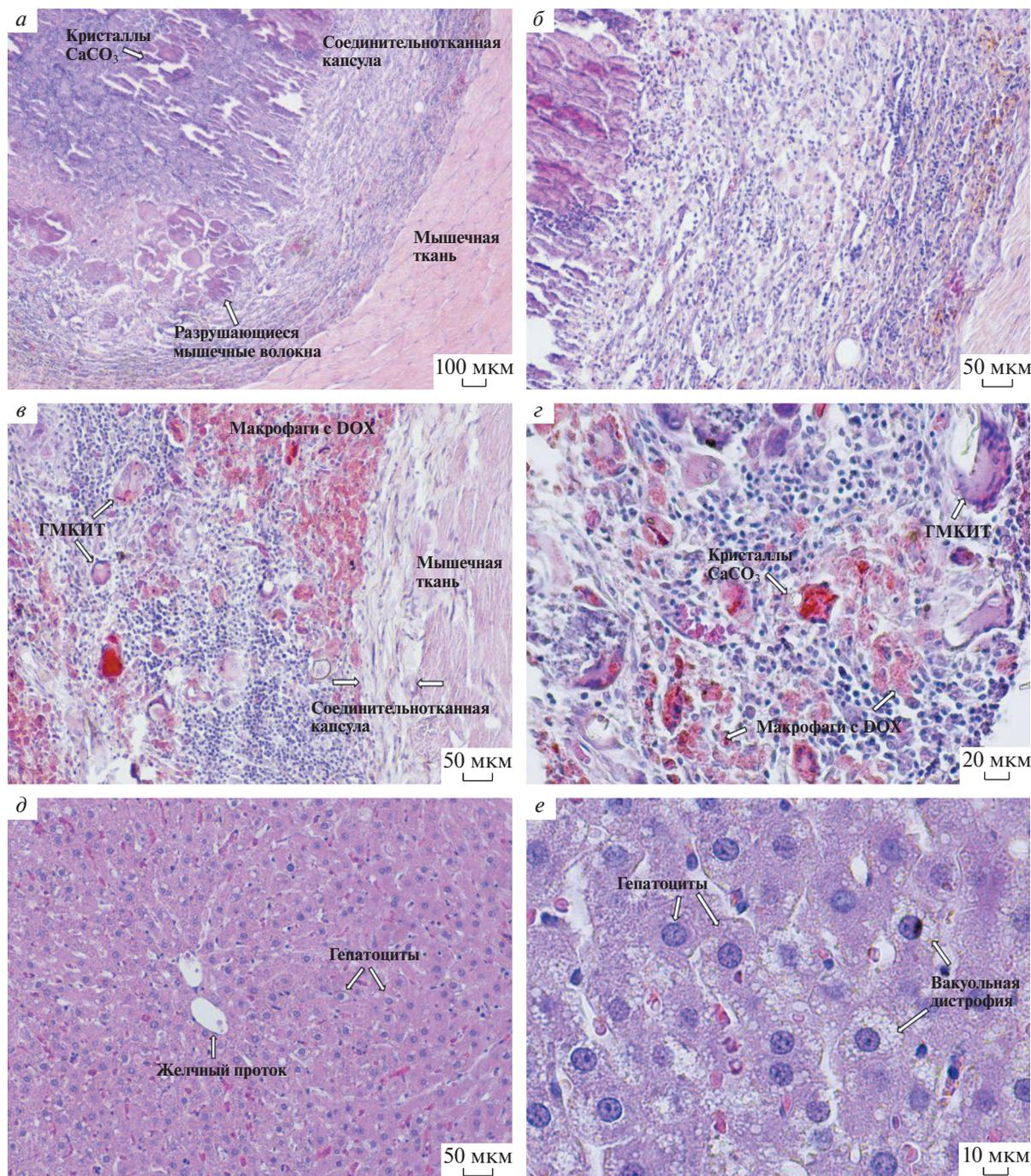
**Рис. 2.** Гистологические срезы мышечной ткани крысы через 3 сут (*a, б*), 1 нед. (*в, з*) и 2 нед. (*д, е*) после имплантации СД. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. об.: 4× (*a, в, д*), 10× (*б, з*) и 20× (*е*).

шечная ткань, прилежащая к капсуле, имеет умеренный отек (рис. 3*в, з*).

**Изменения в печени и миокарде после имплантации СД.** На указанных сроках эксперимента также исследовали печень и миокард. Максимальные изменения в печени определяются на сроке 7 сут в виде выраженной вакуольной дистрофии гепатоцитов (рис. 3*д, е*), что, очевидно, связано с токсическим

действием DOX. Морфологических изменений в миокарде на всех сроках эксперимента не выявлено.

Таким образом, было показано, что процессы, проходящие в мышечной ткани крыс после имплантации СД, содержащих DOX, значительно отличаются от процессов, развитие которых мы наблюдали ранее, при имплантации компонентов СД без DOX (Попрядухин и др., 2020; Popryadukhin et al., 2020). В



**Рис. 3.** Гистологические срезы мышечной ткани через 4 нед. (а, б), 12 нед. (в, з) и печени крысы через 1 нед. (д, е) после имплантации СД. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.об.: 4× (а), 10× (б, в, д), 20× (з) и 40× (е).

настоящем исследовании мы наблюдали более выраженную воспалительную реакцию в зоне имплантации СД, токсическое повреждение и некроз прилегающих тканей, прежде всего мышечных волокон. Кроме того, констатировали более выраженный процесс образования соединительнотканной капсулы и значительное замедление процесса биорезорбции СД, который продлился 3 мес. При этом ско-

рость перекристаллизации сферических пористых  $\text{CaCO}_3$  ватеритов в продолговатые непористые кристаллы, предположительно арагонита, значительно не отличалась от таковой, наблюдаемой нами ранее (Porquyadukhin et al., 2020). Это обусловлено наличием в зоне протекания процесса необходимых условий: водной среды и приемлемой температуры.

Помимо местного токсического воздействия было выявлено и системное воздействие на клетки печени, что четко свидетельствует о выходе DOX за пределы зоны первоначальной имплантации. Следовательно, предложенный способ введения противоопухолевого препарата имеет ряд преимуществ. Он дает возможность создания локально высокой концентрации препарата в течение длительного времени, что приводит к значительному повреждающему воздействию. Такое воздействие является положительным при введении СД внутрь опухоли или инъекции вокруг нее. Хотя оно полностью не исключает токсического влияния на организм, как местного, так и системного характера. Однако этот эффект может быть с успехом использован в случае применения СД в качестве депо лекарственного препарата. В частности, при лечении опухолей, для которых необходимо поддержание в течение длительного времени терапевтической концентрации препарата в крови, но при этом невозможно внутриопухолевое введение.

Таким образом, показана перспективность системы доставки лекарственного препарата, состоящей из пористых CaCO<sub>3</sub> ватеритов, допированных декстрасульфатом и насыщенных доксорубицином, а также целесообразность ее дальнейшего исследования.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках бюджетной темы (AAAA-A20-120022090044-2) Института высокомолекулярных соединений РАН.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа с животными выполнена в соответствии с правилами их использования в эксперименте согласно принципам Европейской конвенции, Страсбург, 1986 г. и Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными, 1996 г., а также ГОСТ 33216-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами”.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Попрядухин П.В., Сударева Н.Н., Суворова О.М., Юкина Г.Ю., Сухорукова Е.Г., Сапрыкина Н.Н. 2020. Морфология компонентов систем адресной доставки лекарственных препаратов (пористых ватеритов CaCO<sub>3</sub>) в мышечной ткани крыс. Цитология. Т. 62. № 10. С. 1. (Popryadukhin P.V., Sudareva N.N., Suvorova O.M., Yukina G.Yu., Sukhorukova E.G., Saprykina N.N. 2020. Morphology of porous CaCO<sub>3</sub> vaterites as components of target drug delivery systems in rat muscle tissue. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 15. P. 208.)  
<https://doi.org/10.31857/S0041377120100053>  
<https://doi.org/10.1134/S1990519X21020061>
- Alven S., Nqoro X., Buyana B., Aderibigbe B. 2020. Polymer-drug conjugate, a potential therapeutic to combat breast and lung cancer. *Pharmaceutics*. V. 12. P. 406.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050406>
- Bai J., Xu J., Zhao J., Zhang R. 2017. Hyaluronan and calcium carbonate hybrid nanoparticles for colorectal cancer chemotherapy. *Mater. Res. Express*. V. 4. P. 095401.  
<https://doi.org/10.1088/2053-1591/aa822d>
- Basin I.S. 2008. Hepatocellular cancer – modern status. *Problems. Practical Oncology*. V. 9. P. 216.
- Binevski P.V., Balabushevich N.G., Uvarova V.I., Vikulina A.S., Volodkin D. 2019. Bio-friendly encapsulation of superoxide dismutase into vaterite CaCO<sub>3</sub> crystals. Enzyme activity, release mechanism, and perspectives for ophthalmology. *Coll. and Surf. B: Biointerfaces*. V. 181. P. 437.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.077>
- Borodina T.N., Trushina D.B., Marchenko I.V., Bukreeva T.V. 2016. Calcium carbonate-based mucoadhesive microcontainers for intranasal delivery of drugs bypassing the blood–brain barrier. *BioNanoScience*. V. 6. P. 261.  
<https://doi.org/10.1007/s12668-016-0212-2>
- Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel P., Torre L.A., Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* V. 68. P. 394.  
<https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- De Koker S., De Geest B.G., Cuvelier C., Ferdinande L., Deckers W., Hennink W.E., De Smedt S., Mertens N. 2007. In vivo cellular uptake, degradation, and biocompatibility of polyelectrolyte microcapsules. *Adv. Funct. Mater.* V. 17. P. 3754.  
<https://doi.org/10.1002/adfm.200700416>
- Dizaj M., Barzegar-Jalali M., Zarrintan M., Adibkia K., Lotfipour F. 2015. Calcium carbonate nanoparticles as cancer drug delivery system. *Expert Opin. Drug Del.* V. 12. P. 1649.  
<https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1049530>
- Dizaj M., Sharifi S., Ahmadian E., Eftekhari A., Adibkia K., Lotfipour F. 2019. An update on calcium carbonate nanoparticles as cancer drug/gene delivery system. *Expert Opin. Drug Deliv.* V. 16. P. 331.  
<https://doi.org/10.1080/17425247.2019.15874>
- Edis Z., Wang J., Waqas M.K., Ijaz M., Ijaz M. 2021. Nanocarriers-mediated drug delivery systems for anticancer agents: an overview and perspectives. *Int. J. Nanomed.* V. 16. P. 1313.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S289443>
- Gao B., Luo J., Liu Y., Su S., Fu S., Yang X., Li B. 2021. Intratumoral administration of thermosensitive hydrogel co-loaded with norcantharidin nanoparticles and doxorubicin for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Nanomed.* V. 16. P. 4073.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S308057>
- Huang S., Naka K., Chujo Y. 2008. Effect of molecular weights of poly(acrylic acid) on crystallization of calcium carbonate by the delayed addition method. *Polymer J.* V. 40. P. 154.  
<https://doi.org/10.1295/polymj.PJ2007162>
- Jiang Y., Zhou Y., Zhang C., Fang T. 2020. Co-delivery of paclitaxel and doxorubicin by pH-responsive prodrug micelles

- for cancer therapy. *Int. J. Nanomed.* V. 15. P. 3319.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S249144>
- Matyszczyńska D.* 2014. Drug delivery systems in the transport of doxorubicin. *Inst. Civil Eng. Surf. Innovat.* V. 2. P. 201.  
<https://doi.org/10.1680/si.13.00040>
- Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L.* 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* V. 56. P. 185.  
<https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6>
- Mondal L., Mukherjee B., Das K., Bhattacharya S., Dutta D., Chakraborty S., Pal M., Gaonkar R.H., Debnath M.Ch.* 2021. CD-340 functionalized doxorubicin-loaded nanoparticle induces apoptosis and reduces tumor volume along with drug-related cardiotoxicity in mice. *Int. J. Nanomed.* V. 14. P. 1001.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S305317>
- Mydin R., Zahidi I., Ishak N., Ghazali N., Moshawih S., Siddiquee S.* 2018. Potential of calcium carbonate nanoparticles for therapeutic applications. *Malayas. J. Med. Health Sci.* V. 14 (SUPP1). P. 201.
- Neri D., Supuran C.* 2011. Interfering with pH regulation in tumors as therapeutic strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* V. 10. P. 767.  
<https://doi.org/10.1038/nrd3554>
- Ogino T., Suzuki T., Sawada K.* 1987. The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water. *Geochim. Cosmochim. Acta.* V.51. P. 2757.  
[https://doi.org/10.1016/0016-7037\(87\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(87)90155-4)
- Parakhonskiy B., Tessarolo F., Haase A., Antolini R.* 2013. Dependence of sub-micron vaterite container release properties on pH and ionic strength of the surrounding solution. *Adv. Sci. Technol.* V. 86. P. 81.  
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AST.86.81>
- Popryadukhin P.V., Sudareva N.N., Suvorova O.M., Yukina G.Yu., Sukhorukova E.G., Saprykina N.N., Galibin O.V., Vilesov A.D.* 2020. Morphology of target drug delivery systems (CaCO<sub>3</sub> vaterites covered with dextran sulfate) in rat muscular tissue. *Cell. Ther. Transpl.* V. 9. P. 78.  
<https://doi.org/10.18620/ctt-1866-8836-2020-9-4-78-84>
- Qiu N., Yin H., Ji B., Klauke N., Glidle A., Zhang Y., Song H., Cai L., Ma L., Wang G., Chen L., Wang W.* 2012. Calcium carbonate microspheres as carriers for the anticancer drug camptothecin. *Mater. Sci. Eng. C.* V. 32. P. 2634.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.08.026>
- Richardson J., Maina J., Ejima H., Hu M., Guo J., Cho M., Gunawan S.T., Lybaert L., Hagemeyer C.E., De Geest B.G., Caruso F.* 2015. Versatile loading of diverse cargo into functional polymer capsules. *Adv. Sci.* V. 2. P. 1400007.  
<https://doi.org/10.1002/advs.201400007>
- Ruman U., Fakurazi S., Masarudin M., Hussein M.* 2020. Nano-carrier-based therapeutics and theranostics drug delivery systems for next generation of liver cancer nanodrug modalities. *Int. J. Nanomed.* V. 15. P. 1437.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S236927>
- Som A., Raliya R., Tian L., Akers W., Ippolito J., Singamaneni S., Biswas P., Achilefu S.* 2016. Monodispersed calcium carbonate nanoparticles modulate local pH and inhibit tumor growth in vivo. *Nanoscale.* V. 8. P. 12639.  
<https://doi.org/10.1039/C5NR06162H>
- Sudareva N.N., Popryadukhin P.V., Saprykina N.N., Suvorova O.M., Yukina G.Yu., Galibin O.V., Vilesov A.D.* 2020. CaCO<sub>3</sub> vaterites as components of target drug delivery systems. *Cell. Ther. Transpl.* V. 9. P. 13.  
<https://doi.org/10.18620/ctt-1866-8836-2020-9-2-13-19>
- Sudareva N.N., Saprykina N.N., Popova E.V., Vilesov A.D.* 2015. Porous calcium carbonate cores as templates for preparation of peroral proteins delivery systems. The influence of composition of simulated gastrointestinal fluids on the structure and morphology of carbonate cores. In: *Calcium carbonate: occurrence, characterization and applications.* NY: Nova Science Publishers. P. 73.
- Sudareva N., Suvorova O., Saprykina N., Smirnova N., Bel'tukov P., Petunov S., Radilov A., Vilesov A.* 2018. Two-level delivery systems based on CaCO<sub>3</sub> cores for oral administration of therapeutic peptides. *J. Microencapsul.* V. 35. P. 619.  
<https://doi.org/10.1080/02652048.2018.155924>
- Sudareva N., Suvorova O., Saprykina N., Vlasova H., Vilesov A.* 2021a. Doxorubicin delivery systems based on doped CaCO<sub>3</sub> cores and polyanion drug conjugates. *J. Microencapsul.* V. 38. P. 164.  
<https://doi.org/10.1080/02652048.2021.1872724>
- Sudareva N.N., Suvorova O.V., Suslov D.N., Galibin O.V., Vilesov A.D.* 2021b. Dextran sulfate coated CaCO<sub>3</sub> vaterites as the systems for regional administration of doxorubicin. *Cell. Ther. Transpl.* V. 10. P. 71.  
<https://doi.org/10.18620/ctt-1866-8836-2021-10-3-4-71-77>
- Trofimov A., Ivanova A., Zyuzin M., Timin A.* 2018. Porous inorganic carriers based on silica, calcium carbonate and calcium phosphate for controlled/modulated drug delivery: Fresh outlook and future perspectives. *Pharmaceutics.* V. 10. P. 167.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040167>
- Volodkin D.V., Petrov A.I., Prevot M., Sukhorukov G.B.* 2004. Matrix polyelectrolyte microcapsules: New system for macromolecule encapsulation. *Langmuir.* V. 20. P. 3398.
- Wang C., He C., Tong Z., Liu X., Ren B., Zeng F.* 2006. Combination of adsorption by porous CaCO<sub>3</sub> microparticles and encapsulation by polyelectrolyte multilayer films for sustained drug delivery. *Int. J. Pharm.* V. 308. P. 160.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.004>
- Wang J., Chen J., Zong J., Zhao D., Li F., Zhuo R., Cheng S.* 2010. Calcium carbonate/carboxymethyl chitosan hybrid microspheres and nanospheres for drug delivery. *J. Phys. Chem. C.* V. 114. P. 18940.  
<https://doi.org/10.1021/jp105906p>
- Zhao D., Zhuo R., Cheng S.* 2012. Alginate modified nanostructured calcium carbonate with enhanced delivery efficiency for gene and drug delivery. *Mol. BioSystems.* V. 8. P. 753.  
<https://doi.org/10.1039/C1MB05337J>

## **Morphology of Rat Muscle Tissue after Implantation of Delivery System Consisting of Porous Vaterites Doped with Dextransulfate and Containing Doxorubicin**

**N. N. Sudareva<sup>a, b, \*</sup>, P. V. Popryadukhin<sup>a</sup>, O. M. Suvorova<sup>a</sup>, G. Y. Yukina<sup>b</sup>, and E. G. Sukhorukova<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199004 Russia*

<sup>b</sup>*Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, 197376 Russia*

*\*e-mail: nnsas@mail.ru*

This work describes the behavior of a drug delivery system based on porous CaCO<sub>3</sub> vaterites doped with dextran sulfate and containing the anti-cancer antibiotic doxorubicin in muscle tissue for periods from 3 days to 3 months. In the early stages, the toxic effect of doxorubicin on the surrounding muscle tissue and liver was revealed. Over time, the toxic reaction decreased, the site of implantation was delimited by a pronounced connective tissue capsule, its contents underwent bioresorption. Almost complete bioresorption of the delivery system was observed 3 months after the start of the experiment.

*Keywords:* delivery system, dextran sulfate, doxorubicin, calcium carbonate, bioresorption, muscle tissue, *in vivo* experiment