

СОДЕРЖАНИЕ

Том 64, номер 1, 2022

Роль активированных стромальных клеток в развитии протоковой аденокарциномы поджелудочной железы и терапевтические подходы к ремоделированию стромы <i>И. В. Рыков, Е. Г. Солоницын, Т. М. Шестопалова, И. И. Гин, Е. Н. Толкунова</i>	3
Макрофаги селезенки: особенности популяционного состава и функции <i>Е. С. Андрюхова, Л. А. Таширева, С. В. Вторушин, М. В. Завьялова, В. М. Перельмутер</i>	14
Изменение профиля микроРНК в клетках меланомы, резистентных к действию дакарбазина <i>И. С. Зинченко, Н. В. Палкина, Т. Г. Рукша</i>	26
Иммунолокализация BDNF, GDNF и NT-3 в теменной коре крысы при постоянной окклюзии средней мозговой артерии <i>С. Г. Калинин, А. В. Коробцов, Н. Ю. Матвеева</i>	36
Влияние внутривенной трансплантации мезенхимных стволовых клеток на функциональную активность K_{ATP} -каналов пиальных артерий после ишемии/реперфузии головного мозга <i>И. Б. Соколова, О. П. Горшкова, Н. Н. Павличенко</i>	47
Лиганды рецепторов сигма-1 хлорпромазин и трифлуоперазин подавляют Ca^{2+} -ответы в перитонеальных макрофагах крысы <i>Л. С. Миленина, Э. И. Крутецкая, В. Г. Антонов, Н. И. Крутецкая</i>	58
Морфофункциональная характеристика инсулин-синтезирующих клеток различной локализации в поджелудочной железе интактных крыс <i>Т. С. Булавинцева, Б. Г. Юшков, И. Г. Данилова</i>	70
Использование сфероидов из PANC-1 для тестирования противоопухолевых препаратов <i>in vitro</i> и создания опухолевой модели <i>in vivo</i> <i>С. Ш. Каршиева, С. П. Кудан, Ю. Д. Хесуани, В. С. Покровский, В. А. Миронов, Е. В. Кудан</i>	77
Структурный полиморфизм амилоидных фибрилл на основе лизоцима <i>Н. М. Мельникова, М. И. Сулацкий, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов, А. И. Сулацкая</i>	86
Улучшение кислотно-щелочного состава среды для длительного и обратимого криосохранения срезов мозга крыс <i>А. А. Мокрушин</i>	96

Contents

Vol. 64, No. 1, 2022

The role of activated stromal cells in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma and therapeutic approaches to stroma remodeling <i>I. V. Rykov, E. G. Solonitsyn, T. M. Shestopalova, I. I. Gin, E. N. Tolkunova</i>	3
Spleen macrophages: features of population composition and function <i>E. S. Andryuhova, L. A. Tashireva, S. V. Vtorushin, M. V. Zavyalova, V. M. Perelmuter</i>	14
Change of microRNA profile in melanoma cells resistant to dacarbazine <i>I. S. Zinchenko, N. V. Palkina, T. G. Ruksha</i>	26
Immunolocalization of BDNF, GDNF, and NT-3 in the rat parietal cortex after the permanent occlusion of the middle cerebral artery <i>S. G. Kalinichenko, A. V. Korobtsov, N. Yu. Matveeva</i>	36
The effect of intravenous mesenchymal cells transplantation on the functional activity of KATP channels of pial arteries after brain ischemia/reperfusion <i>I. B. Sokolova, O. P. Gorshkova, N. N. Pavlichenko</i>	47
Sigma-1 receptor ligands chlorpromazine and trifluoperazine attenuate Ca ²⁺ responses in rat peritoneal macrophages <i>L. S. Milenina, Z. I. Krutetskaya, V. G. Antonov, N. I. Krutetskaya</i>	58
Morphofunctional characteristics of insulin-synthesizing cells of different localization in the pancreas of intact rats <i>T. S. Bulavintseva, B. G. Yushkov, I. G. Danilova</i>	70
The use of PANC-1 spheroids for testing antitumor drugs in vitro and creating a tumor model in vivo <i>S. Sh. Karshieva, S. P. Kudan, Y. D. Khesuani, V. S. Pokrovsky, V. A. Mironov, E. V. Koudan</i>	77
Structural polymorphism of lysozyme amyloid fibrils <i>N. M. Melnikova, M. I. Sulatsky, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, A. I. Sulatskaya</i>	86
Improvement of the acid-alkaline composition of the medium for prolonged and reversible cryopreservation of rat brain slices <i>A. A. Mokrushin</i>	96

УДК 611.3;7616-006.67

РОЛЬ АКТИВИРОВАННЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В РАЗВИТИИ ПРОТОВОКОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К РЕМОДЕЛИРОВАНИЮ СТРОМЫ

© 2022 г. И. В. Рыков¹, Е. Г. Солоницын¹, Т. М. Шестопалова², И. И. Гин³, Е. Н. Толкунова³, *

¹Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, 197341 Россия

²Национальный центр клинической морфологической диагностики, Санкт-Петербург, 192283 Россия

³Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: entolk62@mail.ru

Поступила в редакцию 12.09.2021 г.

После доработки 23.09.2021 г.

Принята к публикации 27.09.2021 г.

Прогресс в терапии рака поджелудочной железы остается весьма незначительным, и по прогнозам в течение следующего десятилетия протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (PDAC) станет в западных странах второй ведущей причиной смертности от рака. Традиционная цитотоксическая химиотерапия представляет собой современный стандарт лечения метастатического PDAC. Результаты исследований эпителиального и стромального компонентов показали, что плотная фиброзная строма опухоли играет активную роль в процессе развития PDAC. Накапливаются данные о том, что активированная строма способствует прогрессированию опухоли. В небольшом обзоре мы описываем современное представление о роли активированных клеток опухолевой стромы в развитии PDAC и современное состояние исследований, направленных на создание новых терапевтических стратегий стромальной абляции и ремоделирования.

Ключевые слова: протоковая аденокарцинома поджелудочной железы, активированные клетки опухолевой стромы, десмоплазия

DOI: 10.31857/S0041377122010096

Метастатическая протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (PDAC) является одной из наиболее летальных солидных опухолей, несмотря на использование традиционных схем химиотерапии. PDAC составляет ~95% случаев рака поджелудочной железы (Hidalgo, 2010). Количество смертельных исходов этого заболевания в США оценивается как 45.750 в 2019 (Siegel et al., 2019). Прогресс в терапии рака поджелудочной железы остается весьма незначительным, и по прогнозам PDAC станет в западных странах второй ведущей причиной смертности от рака в течение следующего десятилетия (Rahib et al., 2014). Симптомы заболевания часто неспецифичны, а это означает, что заболевание часто обнаруживается на поздних стадиях. Традиционная цитотоксическая химиотерапия представляет собой

современный стандарт лечения прогрессирующего или метастатического PDAC и обеспечивает только месяцы продления жизни (Von Hoff et al., 2013; Congou et al., 2011). Новые подходы к исследованию генетических и эпигенетических изменений, опухолево-стромальных взаимосвязей и идентификации биомаркеров раннего обнаружения заболевания до настоящего момента не обеспечили резкого изменения общей выживаемости больных PDAC (Kleeff et al., 2016). Более того, в период с 2011 по 2015 г. было зарегистрировано увеличение смертности пациентов с PDAC на 0.3% (Siegel et al., 2018), а пожизненные шансы развития составляют примерно 1 из 64 человек.

Морфологически развитие PDAC начинается с так называемой интраэпителиальной неоплазии поджелудочной железы (Ho et al., 2020), и развивается с увеличением гистологической стадии вплоть до превращения в инвазивную аденокарциному. Развитие опухоли приводит к изменению тканевой стромы. Стромальная перестройка является распространенным явлением, например при заживлении раны, в случае которого активированные миофибробласты подвергаются апоптозу после полного заживления ткани (Rybinski et al., 2014). Однако при

Принятые сокращения: ВКМ – внеклеточный матрикс; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; ММП – матриксные металлопротеиназы; МОО – микроокружение опухоли; CAFs – ассоциированные с опухолью фибробласты; PDAC – протоковая аденокарцинома поджелудочной железы; PEGPH20 – синтетическая модифицированная фрагментами полиэтиленгликоля форма гиалуронидазы, PSCs – звездчатые клетки поджелудочной железы; α -SMA – α -гладкомышечный актин.

раке активированные миофибробласты не элиминируются, и злокачественная опухоль прогрессирует до стадии, на которой строма изменяется так, что сама начинает вносить вклад в прогрессирование новообразования (Malik et al., 2015). Основной характеристикой нетрансформированной тканевой стромы является способность обеспечивать гомеостатический ответ на травму с помощью ее иммунных, сосудистых и соединительнотканых компонентов. Развитие опухоли нарушает гомеостаз, в результате чего создается благоприятное для роста микроокружение опухоли (МОО) (Foster et al., 2018). Именно МОО является важным фактором, лежащим в основе резистентности PDAC к лечению.

МОО представлено плотной матрицей, состоящей из коллагена, гидрофильного гликозаминогликана гиалуроновой кислоты (известной также как гиалуронан), фибронектинов, протеогликанов и содержит стромальные и иммунные клетки. Считается, что микроокружение многих солидных опухолей обладает повышенным интерстициальным давлением, которое не только разрушает кровеносные сосуды, но и физически ограничивает перфузию цитотоксических препаратов в опухолевые клетки. Гиалуронан, содержание которого повышено в МОО аденокарциномы PDAC, может быть быстро разрушен (переварен) гиалуронидазой (Toole, Slomiany, 2008). На животных моделях было показано, что гиалуронидаза деградирует гиалуронан, и это приводит к снижению интерстициального давления опухоли, повторному расширению микроциркуляторного русла, увеличению концентрации внутри опухоли химиотерапевтических средств, задержке роста опухоли и продлению жизни (Provenzano et al., 2012).

В качестве терапевтического промотора, модифицирующего строму опухоли, дополняющего применяемые цитостатики и облегчающие их доставку к клеткам опухоли поджелудочной железы, была предложена пегилированная (то есть модифицированная фрагментами полиэтиленгликоля) форма рекомбинантной гиалуронидазы человека (PEGPH20). Она обладает более длинным периодом полураспада, чем природные гиалуронидазы. Таргетирование опухолево-стромальных связей в МОО является перспективной терапевтической стратегией направленной против прогрессирования и метастазирования рака поджелудочной железы.

В небольшом обзоре мы опишем современное представление о роли активированных клеток опухолевой стромы в развитии PDAC и современное состояние исследований, направленных на создание новых терапевтических стратегий стромальной абляции и ремоделирования стромы.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС PDAC

Недавно разработанные стратегии лечения PDAC делали акцент на попытках ремоделирования стро-

мы с целью облегчить распределение системных агентов в МОО. Строма опухоли включает такие компоненты, как клетки сосудистой системы, фибробласты, иммунные клетки и внеклеточный матрикс (ВКМ) (Brekken et al., 2000; Jacobetz et al., 2013). ВКМ — это физическая и биохимическая структура, которая регулирует трехмерную организацию и функцию клеток в данной ткани. Уникальная архитектура и четкий биохимический состав ВКМ направляет матриксно-клеточные взаимодействия в основном через клеточные рецепторы специфических белков ВКМ (Geiger, Yamada, 2011). Архитектура ВКМ также обеспечивает определяющее физическое руководство во время туморогенеза, влияя на миграцию клеток, инвазию и метастазирование (Provenzano et al., 2008; Goetz et al., 2011). ВКМ биохимически и структурно существует в двух различных формах: базальная мембрана и интерстициальный (стромальный) ВКМ. Базальная мембрана — листовидная структура — расположена на базальной поверхности большинства эпителиальных и эндотелиальных монослоев, состоит в основном из ламининов, коллагена IV, энтактина, гепаринсульфатных протеогликанов и нидогена и служит плотным барьером, отделяющим эпителий или эндотелий от нижележащей мезенхимы (Kalluri, 2003).

Основная масса стромального ВКМ продуцируется мезенхимными (т.е. фибробластными) клетками и богата фибриллярными гликопротеинами, такими как коллагены I и III, а также фибронектином (Badylak et al., 2009). В нормальных непатологических условиях базальная мембрана обеспечивает апикобазальную полярность эпителия, но при определенных физиологических состояниях, таких как заживление и развитие ран, а также при патологических нарушениях, таких как рак и хронический фиброз, когда нарушается гомеостатическое равновесие, базальная мембрана часто истончается или деградирует (Paszek et al., 2005). В этих условиях эпителиальные клетки “активируются” и, частично пройдя через эпителиально-мезенхимный переход, приобретают способность мигрировать, пересекают базальную мембрану и вступают в прямой контакт с интерстициальным ВКМ. Эти мигрирующие активированные эпителиальные клетки могут вызвать активацию стромальных клеток непосредственно или с помощью паракринных сигналов, что приводит к приобретению стромой “праймированного” или “активированного” состояния. Накапливаются данные о том, что активированная строма способствует прогрессированию опухоли (Beacham, Cukierman, 2005; Sherman et al., 2014).

Случайное изотропное расположение фибриллярных компонентов ВКМ указывает на “нормальную” (покоящуюся или гомеостатическую) паренхиму, тогда как организованное, анизотропное расположение относительно прямых волокон ВКМ является признаком патологического микроокружения (Provenzano et al., 2006; Goetz et al., 2011). Такой

вид расположения фибрилл (прямые (анизотропные)) наблюдается при фиброзе и в строме, ассоциированной с эпителиальными опухолями (Rybinski et al., 2014), и свидетельствуют о плохом прогнозе пациента. Выровненные стромальные элементы ВКМ *in vivo* служат естественными “тропами”, по которым мигрируют раковые клетки (Condeelis, Segall, 2003; Provenzano et al., 2006). Изменения, заключающиеся в выравнивании структурных коллагеновых волокон, связанные с туморогенезом, называют опухоль-ассоциированными коллагеновыми сигнатурами, которые можно визуализировать *in vivo* с помощью генерации второй гармоники поляризованного света (Conklin et al., 2011). Линеаризацию и параллельное выравнивание фибрилл ВКМ наблюдали также *in vitro*, когда для получения ВКМ использовали фибробласты, выделенные из опухолевых тканей (Amatangelo et al., 2005; Lee et al., 2011).

Ассоциированные с опухолью фибробласты (CAFs), являются основными производителями интерстициального ВКМ. Опухолевые клетки и активированные стромальные клетки могут регулировать выравнивание фибрилл матрикса, высвобождая все большее количество протеаз и вспомогательных факторов роста, которые вызывают изменения в ВКМ (Cukierman, Bassi, 2010; Goetz et al., 2011). Специфический ВКМ, синтезируемый CAFs, как правило, содержит высокие уровни коллагена I и онкофетальных сплайсинговых вариантов фибронектина, таких как ED-A, а также множество матриксных клеточных белков, таких как периостин (Cirri, Chiarugi, 2011).

PDAC характеризуются устойчивым фибро-воспалительным ответом. Эта десмопластическая реакция генерирует необычайно высокое давление интерстициальной жидкости и индуцирует сосудистый коллапс, представляя при этом существенную преграду для перфузии, диффузии и конвекции низкомолекулярных терапевтических средств. Ряд авторов идентифицируют гиалуронан, как первичный матричный детерминант этого барьера (Provenzano et al., 2012). Повышение уровня специфических компонентов ВКМ происходит при различных подтипах рака и может быть использовано в качестве прогностического показателя. Например, повышенная секреция гиалуронана активированными фибробластами обычно наблюдается при раке поджелудочной железы и, как известно, способствует росту опухоли (Kultti et al., 2014).

РОЛЬ АКТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК СТРОМЫ В РАЗВИТИИ PDAC

После десятилетий исследований эпителиального и стромального компонентов опухоли стало ясно, что плотная фиброзная строма играет активную роль в процессе развития PDAC. Перекрестные взаимосвязи между опухолевыми и стромальными компонентами очень сложны, и фактическая функция

плотной стромы, окружающей опухоль, оставалась в значительной степени неизвестной до тех пор, пока не стали накапливаться результаты исследований звездчатых клеток стромы поджелудочной железы (Apte et al., 1998; Bachem et al., 1998). Известно и описано участие клеток различных типов МОО в индукции десмопластических реакций в ВКМ при раке поджелудочной железы. К ним относятся звездчатые клетки поджелудочной железы (PSCs), ассоциированные с раком фибробласты (CAF), эндотелиальные клетки, иммунные клетки, нервные клетки. МОО подвержено динамическим изменениям, которые в совокупности с активностью нескольких онкогенных сигнальных каскадов приводят к прогрессированию опухоли PDAC (Quail, Joyce, 2013). Стромальные изменения в первую очередь обусловлены активацией тканерезидентных PSCs, и поэтому именно они рассматриваются как основные клетки, стимулирующие прогресс стромальной активации и прогрессирования PDAC (Thomas, Radhakrishnan, 2014).

Существование PSCs, для которых характерно наличие витамин-А-содержащих липидных капель, в ткани поджелудочной железы было впервые описано в 1982 г., но попытки их культивировать были предприняты значительно позже (Watari et al., 1982; Bachem et al., 1998). Происхождение их остается до конца не выясненным. К настоящему времени описано происхождение PSCs из клеток эндодермы, мезодермы, нейро-эктодермы и костного мозга (Watanabe et al., 2009; Yamamoto et al., 2017). Несмотря на то, что PSCs экспрессируют различные маркеры, схожие с маркерами стволовых клеток (Lardon et al., 2002), убедительных функциональных данных, доказывающих возможность дифференцировки PSCs в клетки другого типа поджелудочной железы, нет (Mato et al., 2009). PSCs способны замещать утраченные клеточные компоненты фиброзной ткани, которая необходима для поддержания целостности органа, но длительная их активация может привести к избыточному отложению матриксных белков и образованию рубцовой ткани (Phillips et al., 2003; Bachem et al., 2005).

Покоящиеся или инактивированные PSCs содержат ретинол, и поэтому они жизненно важны для поддержания тканевого гомеостаза. Интересно, что поддержание покоящегося фенотипа PSCs зависит от уровня витамина А, поскольку он ингибирует экспрессию α -гладкомышечного актина (α -SMA), коллагена, фибронектина и ламинина (McCarroll et al., 2006). Покоящиеся PSCs обладают способностью продуцировать белки ВКМ, такие как десмин, виментин, и ферменты, разрушающие матрикс, а именно матриксные металлопротеиназы (ММП). Кроме того, они обладают способностью продуцировать тканевые ингибиторы ММП (ТИМПs); следовательно, считается, что PSCs играют важную роль в поддержании баланса между образованием и деградацией матрикса и, следовательно, в поддержании нормальной архитектуры тканей (Masamune et al., 2009). Од-

нако многие внешние стимулы приводят к активации PSCs, которые трансформируются в клетки миофибробластоподобного фенотипа. Этот фенотипический переход коррелирует с функциональными и морфологическими изменениями. Эти изменения включают: потерю витамин-А-содержащих липидных капель; повышенную экспрессию α -SMA; увеличение выработки коллагена, ламинина, нестина и фибронектина; снижение выработки десмина и виментина; увеличение выработки ВКМ; увеличение ядра; потерю баланса между MMP и TIMPs; секрецию различных цитокинов и хемокинов; усиление миграционного и пролиферативного потенциала (Apte et al., 2013).

Активированные PSCs приобретают веретенообразный фенотип, напоминая фибробласты, проявляя повышенный миграционный и пролиферативный потенциал за счет увеличения продукции коллагеновых фибрилл и фибронектина. Кроме того, наличие промежуточных филаментных белков обеспечивает специфические характеристики PSCs, которые напоминают клетки других типов. Например, наличие глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) обеспечивает характеристики астроцитов; присутствие десмина напоминает миоциты, нестина — характеристику нейроэпителиальных стволовых клеток, а виментина — характеризует фибробластов и эндотелиальных клеток (Omary et al., 2004). Активированные PSCs могут подвергаться апоптозу или возвращаться к покою после прекращения повреждения ткани. Таким образом, поскольку фиброз поджелудочной железы регулируется как качественно, так и количественно персистирующей активацией PSCs, их можно рассматривать как основного участника биологических событий, приводящих к фиброзу.

В поджелудочной железе человека и грызунов активированные PSCs обычно обнаруживаются в местах обширных повреждений, их жизнедеятельность приводит к усилению выработки цитокинов и хемокинов и создает среду, благоприятную для воспалительной реакции (Kloppel et al., 2004). Внешние сигналы, опосредованные активными формами кислорода, приводят к активации PSCs аутокринными продуктами, такими как интерлейкины IL-1, IL-6 и факторы роста PDGF и TGF- β . Активированные PSCs мигрируют к месту повреждения и в дальнейшем способны выработать аутокринных и паракринных продуктов. Стойкая активация PSCs реорганизует ВКМ и увеличивает десмоплазию (Thomas, Radhakrishnan, 2020).

Было показано, что 80% объема опухоли PDAC состоит из десмопластической стромы. Активированные PSCs и ассоциированные с раком CAFs являются основными клеточными компонентами стромы, т.е. окружения PDAC, и их влияние на поведение опухолевых клеток доказано (Vachem et al., 2005; Bailey et al., 2008). Подтверждены симбиотиче-

ские отношения между раковыми клетками и PSCs в стимулировании роста опухоли (Koning et al., 2004). Однако как именно активированные PSCs и десмоплазия усиливают пролиферацию опухолевых клеток, остается неясным. Считается, что плотная фиброзная строма, окружающая опухоль, способствует выживанию опухолевых клеток и предотвращая апоптоз (Vaquero et al., 2003; Suklabaidya et al., 2018). Это может быть достигнуто путем прямого взаимодействия опухолевых клеток с белками ВКМ. Пролiferация опухолевых клеток требует значительных структурных изменений в МОО, включая повышенную продукцию компонентов ВКМ, таких как фибронектин и коллаген (Malik et al., 2015).

Активированные PSC и CAFs в МОО являются основными движущими силами этих архитектурных изменений микроокружения (Moir et al., 2015; Moir et al., 2018). Другой возможный механизм, с помощью которого активированные PSCs в МОО способствуют росту клеток аденокарциномы, заключается в том, что опухолевые клетки и PSCs продуцируют больше MMP и других тканевых сериновых протеаз, которые разрушают белки ВКМ и базальную мембрану, а это позволяет опухолевым клеткам мигрировать, инвазировать и метастазировать, как это было постулировано для других опухолей (Liotta, Kohn, 2001). Поскольку фиброз является ранним событием в процессе развития PDAC, первоначально считали, что строма, производимая PSCs, защищает от прогрессирования опухоли. Однако сейчас принято считать, что взаимодействия опухолевых клеток с PSCs стромы динамичны, зависят от стадии и клеточного контекста. PSCs могут защищать на самой ранней стадии развития метаплазии, и становиться очевидно вредными на более поздней стадии (Hamada et al., 2012; Wilson et al., 2014).

Работа Шермана с соавторами (Sherman et al., 2014) иллюстрирует, что транскрипционное ремоделирование стромы опухоли поджелудочной железы через активацию рецептора витамина D (VDR) в значительной степени ослабляет способность PSCs поддерживать рост опухоли. Эта работа описывает молекулярную стратегию, с помощью которой транскрипционное перепрограммирование опухолевой стромы обеспечивает химиотерапевтический ответ, и предлагает витамин D в качестве дополнения к терапии PDAC. Авторы (Sherman et al., 2014) обнаружили, что лечение лигандом VDR кальцитриолом заметно снижает уровень маркеров воспаления и фиброза при панкреатите и в строме опухоли человека. Другое исследование показало, что индуцированный ретиноевой кислотой покой PSCs снижает пролиферацию опухолевых клеток путем регулирования передачи сигналов Wnt (Froeling et al., 2011). Основываясь на иммуносупрессивной роли активированных PSCs, регулирующих миграцию Т-клеток, пришли к выводу, что эффективным способом противостоять опухоли может служить изменение функции PSCs (Ene-Obong et al., 2013).

Фибробласты (CAF) наряду с PSCs являются важнейшим компонентом ассоциированной с опухолью стромы (Yoshida, 2020): CAFs способствуют регуляции ряда этапов, имеющих решающее значение для злокачественной прогрессии, включая инициацию рака, пролиферацию, инвазию и метастазирование, путем выработки различных типов цитокинов, хемокинов, факторов роста и ферментов, разрушающих матрицу (Kalluri, Zeisberg, 2006; LeBleu, Kalluri, 2018; Yoshida et al., 2019). CAFs отличаются от своих нормальных аналогов дифференциальной экспрессией таких маркеров, как α -SMA, белок активации фибробластов (FAP), специфичный для фибробластов белок 1 (FSP1) и рецептор фактора роста тромбоцитов (PDGFR) (Kalluri, Zeisberg, 2006, 2016; LeBleu, Kalluri, 2018; Yoshida et al., 2019). CAFs изменяют МОО, непосредственно взаимодействуя с раковыми клетками и регулируя паракринную сигнализацию с помощью воспалительных цитокинов, контролируют иммунный ответ на неоплазию, депонируют различные компоненты ВКМ, стимулируют ангиогенез и обеспечивают основу для метастазирования и инвазии опухоли (LeBleu, Kalluri, 2018).

Однако клеточное происхождение CAFs и механизмы, лежащие в основе перепрограммирования нормальных фибробластов в CAFs, остаются в значительной степени неизвестными. Все больше доказательств, которые убедительно свидетельствуют о гетерогенности CAFs: они выполняют различные функции, а это значит, что в строме опухоли сосуществуют как способствующие развитию опухоли CAFs, так и CAFs, подавляющие ее рост (Ishii et al., 2016; LeBleu, Kalluri, 2018). В ткани аденокарциномы PDAC была идентифицирована специфическая субпопуляция CAFs, которая отличается от миофибробластных CAFs, для которых характерна экспрессия α -SMA. Эти “воспалительные” CAFs экспрессируют провоспалительные цитокины, такие как интерлейкины IL-6 и IL-11, тем самым активируя JAK-киназу – преобразователь сигналов и активатор сигнального пути транскрипции STAT (Ohlund et al., 2017). Поскольку сигнальный каскад, индуцированный IL-1, активирует JAK/STAT и способствует образованию воспалительных CAFs (Biffi et al., 2019), сигнальный путь IL-1 α является потенциальной терапевтической мишенью для направленного уничтожения клеток и “воспалительных” CAFs в микроокружении опухоли PDAC.

Результаты экспериментов по уничтожению CAFs, экспрессирующих α -SMA и нацеленных на десмопластический ответ, индуцированный сигнальным путем Hh (Ozdemir et al., 2014; Rhim et al., 2014), показали, что 80%-ное истощение популяции α -SMA-положительных миофибробластов приводит к активированию программы эпителиально-мезенхимального перехода, связанной с увеличением количества раковых стволовых клеток и повышением экспрессии факторов транскрипции, связанных с ЭМП, таких как Snail, Slug и Twist. В клинике более

низкие показатели пропорции CAF в популяции клеток коррелируют со снижением выживаемости у пациентов с PDAC (Ozdemir et al., 2014). Использование мышинной модели PDAC с истощением по компонентам сигнального пути Shh показало, что активация Slug и Zeb1 приводит к плохому прогнозу (Rhim et al., 2014). Недавно показано, что при PDAC экспрессия ассоциированными с опухолью фибробластами мефлина (маркера мезенхимных стволовых клеток), поддерживающего их в недифференцированном состоянии (Maeda et al., 2016), замедляет рост опухоли. Выявили обратную корреляцию между уровнем α -SMA и экспрессией мефлина в ассоциированных с PDAC фибробластах. Это говорит о том, что фенотипически CAFs с высоким содержанием мефлина отличаются от CAFs с высоким уровнем экспрессии α -SMA, стимулирующих рост опухоли.

CAFs также способны облегчать коллективную миграцию и инвазию клеток путем ремоделирования ВКМ и создания путей для миграции опухолевых клеток и (или) экспрессии различных кадгеринов, которые позволяют клеткам сохранять адгезию, контролируя переднюю (заднюю) поляризацию ведущих (лидирующих) клеток (Olumi et al., 1999; Gaggioli et al., 2007; Labernadie et al., 2017). Физическая сила межклеточных взаимодействий раковых клеток и CAFs обеспечивается с помощью гетерофильного комплекса адгезии, включающего E-кадгерин на мембране раковых клеток и N-кадгерин на мембране CAFs.

ПОПЫТКИ ИСПОЛЬЗОВАТЬ REGN20 В ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ. ВЗЛЕТЫ И ПАДЕНИЯ

Поскольку было обнаружено, что плотная строма PDAC ассоциирована с гипоксией и лекарственной устойчивостью клеток, ожидается, что препараты, разрушающие строму, могут быть эффективны при терапии (Kozono et al., 2013; Gonzalez-Villasana et al., 2014; Pomianowska et al., 2014).

Как говорилось выше, эффективная доставка лекарств к клеткам опухолей поджелудочной железы является серьезной проблемой. В PDAC плотная фиброзная строма (образовавшаяся в процессе десмоплазии) окружает растущую опухолевую массу, но может также сжимать опухолевую сосудистую сеть в микроокружении и увеличивать интерстициальное давление, препятствуя перфузии и доставке системных агентов (Provenzano et al., 2012; Thompson et al., 2010; Singha et al., 2015; Whatcott et al., 2015). Гиалуронан, гидрофильный гликозаминогликан, является основным компонентом ВКМ и, как было показано, накапливается в микроокружении PDAC (Koyama et al., 2007; Itano et al., 2008; Damodarasamy et al., 2014; Evanko et al., 2015; Li et al., 2018).

Доклинические и клинические данные указывают на то, что накопление гиалуронана в МОО связано с агрессивным метастатическим заболеванием, лекарственной устойчивостью и плохим прогнозом (Koyama et al., 2007; Damodarasamy et al., 2014; Evancko et al., 2015; Foster et al., 2018; Li et al., 2018). Метаболизм гиалуронана динамичен и быстр, а деградация контролируется в основном гиалуронидазами (Kielty et al., 1992; Itano et al., 2008).

PEGPH20 – это новая модифицированная фрагментами полиэтиленгликоля форма рекомбинантной гиалуронидазы человека, разработанная в качестве препарата для противопухоловой терапии в сочетании с другими системными методами лечения. PEGPH20 деградирует опухолевый гиалуронан, тем самым ремоделируя МОО и облегчая доставку цитостатиков к клеткам опухоли. На моделях PDAC и других опухолей PEGPH20 демонстрировала противоопухоловую активность и увеличивала эффективность доставки системных препаратов (Koyama et al., 2007; Damodarasamy et al., 2014; Willumsen et al., 2014; Hansen et al., 2016; Kehlet et al., 2016).

Комбинация PEGPH20 и гемцитабина оказалась хорошо переносима в исследованиях фазы I и продемонстрировала обнадеживающие терапевтические результаты при лечении PDAC с высоким содержанием гиалуронана. Недавно описанные результаты клинических исследований применения PEGPH20 для лечения пациентов с прогрессирующими солидными опухолями, в том числе раком поджелудочной железы согласовались с выводами доклинических исследований, и на основании этого была поддержана следующая стадия клинических исследований (Willumsen et al., 2013; Bager et al., 2015).

Результаты второй фазы клинических испытаний экспериментального препарата PEGPH20 были опубликованы в 2018 г. и продемонстрировали превосходную выживаемость без прогрессирования опухолей с высоким уровнем НА в группе PEGPH20 (9,2 против 5,2 мес. в группе плацебо) (Hingorani et al., 2018). В этом исследовании PEGPH20 или плацебо сочетали либо с Nab-паклитакселом (Nab-paclitaxel) и гемцитабином (HALO-202), либо с модифицированным фторурацилом (FU), лейковорином, иринотеканом и оксалиплатином (mFOLFIRINOX; Southwest Oncology Group (SWOG) study S1313) (Wang-Gillam, 2019). Результаты исследования HALO-202 возродили энтузиазм в отношении стратегии таргетирования стромы после длительного периода отсутствия клинического успеха и проложили путь к первому рандомизированному исследованию фазы III, в котором участвовали пациенты только с опухолями PDAC с высоким содержанием гиалуронана (NA-high; HALO-301; ClinicalTrials.gov идентификатор: NCT02715804). Ванг с коллегами (Wang et al., 2018), проанализировав результаты испытания HALO-301, сообщили о значительном улучшении выживаемости без прогрессирования опухоли в слу-

чае добавления PEGPH20 в качестве усилителя терапевтического воздействия цитостатиков.

На фоне описанного выше успеха использования PEGPH20 в качестве вещества, модифицирующего строму опухоли, неожиданной стала неудача недавних исследований эффективности использования PEGPH20, примененного совместно с комплексом лекарственных препаратов mFOLFIRINOX (Ramanathan et al., 2019). Выживаемость пациентов в этих испытаниях была ниже в случае применения PEGPH20: 7,7 мес. по сравнению с 14,4 мес. в случае плацебо. Соответственно выживаемость без прогрессирования опухоли также была ниже (4,3 против 6,2 мес.). Такие результаты в группе с PEGPH20 были частично объяснены исследователями более высокой токсичностью комбинированного воздействия, которая требовала снижения дозы применяемых терапевтических агентов и общего снижения времени применения mFOLFIRINOX, что и привело к снижению эффективности проводимой терапии.

Результаты неудачного использования PEGPH20 в сочетании с mFOLFIRINOX существенно насторожили клиницистов, поставив вопрос о необходимости создания экспериментальной модели для будущих исследований ремоделирования стромы опухоли. Очевидные расхождения между результатами доклинических и клинических исследований PDAC объясняются в частности и тем, что ни одна из существующих экспериментальных моделей сама по себе не является адекватной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При лечении PDAC вещества, нацеленные на модификацию стромы, следует рекомендовать к использованию с большой осторожностью, учитывая отрицательные результаты второй фазы клинических испытаний действия ингибиторов сигнального пути Hedgehog (висмодегиба и саредигиба) в сочетании с гемцитабином недавнего рандомизированного исследования (Catenacci et al., 2015; The Olive Laboratory: Clinical trial IPI-926-03. <https://www.olivelab.org/ipi-926-03>). Необходимо учитывать, что перепрограммирование опухолевой стромы и увеличение функционирующей сосудистой сети может и создать окно для терапевтической доставки, и повысить потенциал для распространения опухолевых клеток по кровотоку.

Действительно, недавняя неудача клинических исследований терапевтического потенциала ингибирования Shh-сигнального пути в комбинации с гемцитабином при раке поджелудочной железы выявила потенциальные ограничения терапии, направленной на истощение стромы. Было обнаружено, что уменьшение десмоплазии стромы усиливает рост опухоли и приводит к снижению выживаемости (Rhim et al., 2014). Эти исследования убедительно свидетельствуют о том, что вместо стремления

устранить десмоплазию, эффективнее стала бы попытка нормализовать ВКМ, ассоциированный с опухолью стромы, путем уменьшения его жесткости или изменения “выровненных” фибрилл ВКМ в строме опухоли. Хотя концепция использования нормальной стромы для сдерживания прогрессирующего рака была предложена уже давно, только недавно идею восстановления нормальной стромы стали рассматривать как потенциальную терапевтическую стратегию лечения рака.

В целом, однако, препараты-промоторы остаются перспективным инструментом повышения эффективности существующих или будущих противоопухолевых методов лечения. Они представляют ценность для различных классов эффекторных препаратов как низкомолекулярных цитотоксических, так и макромолекулярных или нано-препаратов. В частности, их потенциал может иметь особое значение для ограничения накопления в гипоксической нише популяции стволовых опухолевых клеток, которые, как известно, не восприимчивы к цитотоксическим эффекторным препаратам. Поэтому ожидается, что вспомогательные препараты, усиливающие действие цитостатиков, займут достойное место в терапевтическом арсенале борьбы с раком. Напомним в этой связи, что потенциальная терапевтическая польза ингибирования гиалуроновой кислоты в комплексе с химиопрепаратами достигается, в первую очередь, за счет преодоления стромального барьера для сенсibiliзирующей химиотерапии, а не за счет ее собственного противоопухолевого эффекта.

В настоящее время при лечении PDAC применяются три основные стратегии, нацеленные на гиалуронан, описанные Сато с коллегами (Sato et al., 2016): 1) ингибирование синтеза гиалуронана, 2) блокирование передачи сигналов рецепторов гиалуронана и 3) истощение стромального гиалуронана в сочетании с химиотерапией. В дополнение к этим стратегиям могут существовать и другие потенциальные стратегии таргетирования гиалуронана для лечения PDAC. Например, ингибирование деградации, а также синтеза гиалуронана может быть идеальной стратегией, поскольку накопленные данные свидетельствуют о том, что низкомолекулярная или фрагментированная гиалуроновая кислота, продуцируемая в результате деградации гиалуронидазой, может вносить вклад в прогрессирование рака (Schmaus et al., 2014; Wu et al., 2015). Опубликованные исследования показали противоопухолевое действие ингибиторов гиалуронидазы при некоторых видах рака (Benitez et al., 2011; Huang et al., 2014). При безусловной необходимости дальнейших доклинических и клинических исследований, контроль количества и размера гиалуроновой кислоты путем модуляции процесса ее выработки и деградации остается перспективной терапевтической стратегией для улучшения прогноза такого смертельно опасного заболевания, как PDAC.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет бюджетных средств Института цитологии РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Amatangelo M.D., Bassi D.E., Klein—Szanto A.J., Cukierman E.* 2005. Stroma-derived three-dimensional matrices are necessary and sufficient to promote desmoplastic differentiation of normal fibroblasts. *Am. J. Pathol.* V. 167. P. 475.
- Apte M.V., Haber P.S., Applegate T.L., Norton I.D., McCaughan G.W., Korsten M.A., Pirola R.C., Wilson J.S.* 1998. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut.* V.43. P. 128.
- Apte M.V., Wilson J.S., Lugea A., Pandol S.J.* 2013. A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment. *Gastroenterol.* V. 144. P. 1210.
- Bachem M.G., Schneider E., Gross H, Weidenbach H., Schmid R.M., Menke A., Siech M., Beger H., Grünert A., Adler G.* 1998. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterol.* V. 115. P. 421.
- Bachem M.G., Schünemann M., Ramadani M., Siech M., Beger H., Buck A., Zhou.S, Schmid-Kotsas A., Adler G.* 2005. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterol.* V. 128. P. 907.
- Badylak S.F., Freytes D.O., Gilbert T.W.* 2009. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta Biomater.* V. 5. P. 1.
- Bager C.L., Willumsen N., Leeming D.J., Smith V., Karsdal M.A., Dornan D., Bay-Jensen A.C.* 2015. Collagen degradation products measured in serum can separate ovarian and breast cancer patients from healthy controls: a preliminary study. *Cancer Biomark.* V. 15. P. 783.
- Beacham D.A., Cukierman E.* 2005. Stromagenesis: The changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin. Cancer Biol.* V. 15. P. 329.
- Benitez A., Yates T.J., Lopez L.E., Cerwinka W.H., Bakkar A., Lokeshwar V.B.* 2011. Targeting hyaluronidase for cancer therapy: Antitumor activity of sulfated hyaluronic acid in prostate cancer cells. *Cancer Res.* V. 71. P. 4085.
- Biffi G., Oni T.E., Spielman B., Hao Y., Elyada E., Park Y., Preall J., Tuveson D.A.* 2019. IL1-induced JAK/STAT signaling is antagonized by TGFbeta to shape CAF heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discov.* V. 9. P. 282.
- Brekken C., Bruland O.S., De Lange Davies C.* 2000. Interstitial fluid pressure in human osteosarcoma xenografts: significance of implantation site and the response to intratumoral injection of hyaluronidase. *Anticancer Res.* V. 20. P. 3503.

- Catenacci D.V., Junttila M.R., Karrison T., Bahary N., Horiba M.N., Nattam S.R., Marsh R., Wallace J., Kozloff M., Rajdev L., Cohen D., Wade J., Sleckman B., Lenz H.J., Stiff P. et al.* 2015. Randomized phase Ib/II study of gemcitabine plus placebo or vismodegib, a Hedgehog pathway inhibitor, in patients with metastatic pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* V. 33. P. 4284.
- Cirri P., Chiarugi P.* 2011. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am. J. Cancer Res.* V. 1. P. 482.
- Condeelis J., Segall J.E.* 2003. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat. Rev. Cancer.* V. 3. P. 921.
- Conklin M.W., Eickhoff J.C., Riching K.M., Pehlke C.A., Eliceiri K.W., Provenzano P.P., Friedl A., Keely P.J.* 2011. Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* V. 178. P. 1221.
- Conroy T., Desseigne F., Ychou M., Bouché O., Guimbaud R., Bécauarn Y., Adenis A., Raoul J.L., Gourgou-Bourgade S., de la Fouchardière C., Bennouna J., Bachet J.B., Khemissa-Akouz F., Péré-Vergé D. et al.; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup.* 2011. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* V. 364. P. 1817.
- Cukierman E., Bassi D.E.* 2010. Physico-mechanical aspects of extracellular matrix influences on tumorigenic behaviors. *Semin. Cancer Biol.* V. 20. P. 139.
- Damodarasamy M., Johnson R.S., Bentov I., MacCoss M.J., Vernon R.B., Reed M.J.* 2014. Hyaluronan enhances wound repair and increases collagen III in aged dermal wounds. *Wound Repair Regen.* V. 22. P. 521.
- Ene-Obong A., Clear A.J., Watt J., Wang J., Fatah R., Riches J.C., Marshall J.F., Chin-Aleong J., Chelala C., Gribben J.G., Ramsay A.G., Kocher H.M.* 2013. Activated pancreatic stellate cells sequester CD8⁺ T cells to reduce their infiltration of the juxtatumoral compartment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterol.* V. 145. P. 1121.
- Evanko S.P., Potter-Perigo S., Petty L.J., Workman G.A., Wight T.N.* 2015. Hyaluronan controls the deposition of fibronectin and collagen and modulates TGF- β 1 induction of lung myofibroblasts. *Matrix Biol.* V. 42. P. 74.
- Foster D.S., Jones R.E., Ransom R.C., Longaker M.T., Norton J.A.* 2018. The evolving relationship of wound healing and tumor stroma. *JCI Insight.* V. 8. P. 1.
- Froeling F.E., Feig C., Chelala C., Dobson R., Mein C.E., Tuveson D.A., Clevers H., Hart I.R., Kocher H.M.* 2011. Retinoic acid-induced pancreatic stellate cell quiescence reduces paracrine Wnt- β -catenin signaling to slow tumor progression. *Gastroenterol.* V. 141. P. 1486.
- Gaggioli C., Hooper S., Hidalgo-Carcedo C., Grosse R., Marshall J.F., Harrington K., Sahai E.* 2007. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* V. 9. P. 1392.
- Geiger B., Yamada K.M.* 2011. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 3. P. a005033. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005033>
- Goetz J.G., Minguet S., Navarro-Lérida I., Lazcano J.J., Samaniego R., Calvo E., Tello M., Osteso-Ibáñez T., Pellinen T., Echarri A., Cerezo A., Klein-Szanto A.J., Garcia R., Keely P.J., Sánchez-Mateos P., Cukierman E., Del Pozo M.A.* 2011. Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell.* V. 146. P. 148.
- Gonzalez-Villasana V., Rodriguez-Aguayo C., Arumugam T., Cruz-Monserrate Z., Fuentes-Mattei E., Deng D., Hwang R.F., Wang H., Ivan C., Garza R.J., Cohen E., Gao H, Armaiz-Pena G.N, Del C. Monroig-Bosque P., Philip B. et al.* 2014. Bisphosphonates inhibit stellate cell activity and enhance antitumor effects of nanoparticle albumin-bound paclitaxel in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol. Cancer Ther.* V. 13. P. 2583.
- Hamada S., Masamune A., Takikawa T., Suzuki N., Kikuta K., Hirota M., Hamada H., Kobune M., Satoh K., Shimosegawa T.* 2012. Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 421. P. 349.
- Hansen N.U.B., Willumsen N., Sand J.M.B., Larsen L., Karsdal M.A., Leeming D.J.* 2016. Type VIII collagen is elevated in diseases associated with angiogenesis and vascular remodeling. *Clin. Biochem.* V. 49. P. 903.
- Hidalgo M.* 2010. Pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* V. 362. P. 1605.
- Hingorani S.R., Zheng L., Bullock A.J., Seery T.E., Harris W.P., Sigal D.S., Braiteh F., Ritch P.S., Zalupski M.M., Bahary N., Oberstein P.E., Wang-Gillam A., Wu W., Chondros D., Jiang P. et al.* 2018. HALO 202: Randomized phase II study of PEGPH20 plus nab-paclitaxel/gemcitabine versus nab-paclitaxel/gemcitabine in patients with untreated, metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* V. 36. P. 359.
- Ho W.J., Jaffee E.M., Zheng L.* 2020. The tumour microenvironment in pancreatic cancer – clinical challenges and opportunities. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* V. 17. P. 527.
- Hollingsworth M.A.* 2008. Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* V. 14. P. 5995.
- Huang R.Y., Chu Y.L., Jiang Z.B., Chen X.M., Zhang X., Zeng X.* 2014. Glycyrrhizin suppresses lung adenocarcinoma cell growth through inhibition of thromboxane synthase. *Cell. Physiol. Biochem.* V. 33. P. 375.
- Ishii G., Ochiai A., Neri S.* 2016. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* V. 99. P. 186.
- Itano N., Zhuo L., Kimata K.* 2008. Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression. *Cancer Sci.* V. 99. P. 1720-5. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00885.x>
- Jacobetz M.A., Chan D.S., Nesses A., Bapiro T.E., Cook N., Frese K.K., Feig C., Nakagawa T., Caldwell M.E., Zecchini H.I., Lolkema M.P., Jiang P., Kultti A., Thompson C.B., Maneval D.C. et al.* 2013. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut.* V. 62. P. 112.
- Kalluri R.* 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* V. 3. P. 422.
- Kalluri R., Zeisberg M.* 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* V. 6. P. 392.
- Kalluri R., Zeisberg R.* 2016. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* V. 16. P. 582.
- Kehlet S.N., Sanz-Pamplona R., Brix S., Leeming D.J., Karsdal M.A., Moreno V.* 2016. Excessive collagen turnover products are released during colorectal cancer progression

- and elevated in serum from metastatic colorectal cancer patients. *Sci. Rep.* V. 6. P. 30599.
- Kielty C.M., Whittaker S.P., Grant M.E., Shuttleworth C.A. 1992. Type VI collagen microfibrils: evidence for a structural association with hyaluronan. *J. Cell Biol.* V. 118. P. 979.
- Kleeff J., Korc M., Apte M., La Vecchia C., Johnson C.D., Biankin A.V., Neale R.E., Tempero M., Tuveson D.A., Hruban R.H., Neoptolemos J.P. 2016. Pancreatic cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers.* V. 2. P. 16022.
- Kloppel G., Detlefsen S., Feyerabend B. 2004. Fibrosis of the pancreas: The initial tissue damage and the resulting pattern. *Virchows Arch.* V. 445. P. 1.
- Koninger J., Giese T., di Mola F.F., Wente M.N., Esposito I., Bachem M.G., Giese N.A., Buchler M.W., Friess H. 2004. Pancreatic tumor cells influence the composition of the extracellular matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 322. P. 943.
- Koyama H., Hibi T., Isogai Z., Yoneda M., Fujimori M., Amano J., Kawakubo M., Kannagi R., Kimata K., Taniguchi S., Itano N. 2007. Hyperproduction of hyaluronan in Neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: Possible involvement of versican/PG-M. *Am. J. Pathol.* V. 170. P. 1086.
- Kozono S., Ohuchida K., Eguchi D., Ikenaga N., Fujiwara K., Cui L., Mizumoto K., Tanaka M. 2013. Pirfenidone inhibits pancreatic cancer desmoplasia by regulating stellate cells. *Cancer Res.* V. 73. P. 2345.
- Kultti A., Zhao C., Singha N.C., Zimmerman S., Osgood R.J., Symons R., Jiang P., Li X., Thompson C.B., Infante J.R., Jacobetz M.A., Tuveson D.A., Frost G.I., Shepard H.M., Huang Z. 2014. Accumulation of extracellular hyaluronan by hyaluronan synthase 3 promotes tumor growth and modulates the pancreatic cancer microenvironment. *BioMed. Res. Int.* V. 2014. P. 817613.
- Labernadie A., Kato T., Brugues A., Serra-Picamal X., Derzsi S., Arwert E., Weston A., Gonzalez-Tarrago V., Elosegui-Artola A., Albertazzi L., Alcaraz J., Roca-Cusachs P., Sahai E., Trepap X. 2017. A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* V. 19. P. 224.
- Lardon J., Rooman I., Bouwens L. 2002. Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Histochem. Cell Biol.* V. 117. P. 535.
- LeBleu V.S., Kalluri R. 2018. A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Dis. Model. Mech.* V.11. P. dmm 029447. <https://doi.org/10.1242/dmm.029447>
- Lee H.O., Mullins S.R., Franco-Barraza J., Valianou M., Cukierman E., Cheng J.D. 2011. FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. *BMC Cancer.* V. 11. P. 245.
- Li X., Shepard H.M., Cowell J.A., Zhao C., Osgood R.J., Rosengren S., Blouw B., Garrovillo S.A., Pagel M.D., Whatcott C.J., Han H., Von Hoff D.D., Taverna D.M., LaBarre M.J., Manneval D.C., Thompson C.B. 2018. Parallel accumulation of tumor hyaluronan, collagen, and other drivers of tumor progression. *Clin. Cancer Res.* V. 24. P. 4798.
- Liotta L.A., Kohn E.C. 2001. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature.* V. 411. P. 375.
- Maeda K., Enomoto A., Hara A., Asai N., Kobayashi T., Horinouchi A., Maruyama S., Ishikawa Y., Nishiyama T., Kiyoi H., Kato T., Ando K., Weng L., Mii S., Asai M. et al. 2016. Identification of Meflin as a potential marker for Mesenchymal stromal cells. *Sci. Rep.* V. 6. P. 22288.
- Malik R., Lelkes P.I., Cukierman E. 2015. Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol.* V. 33. P. 230.
- Masamune A., Watanabe T., Kikuta K., Shimosegawa T. 2009. Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* V. 7. P. S48.
- Mato E., Lucas M., Petriz J., Gomis R., Novials A. 2009. Identification of a pancreatic stellate cell population with properties of progenitor cells: new role for stellate cells in the pancreas. *Biochem. J.* V. 421. P. 181.
- McCarroll J.A., Phillips P.A., Santucci N.C., Pirola R., Wilson J.S., Apte M.V. 2006. Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: Implications for treatment of pancreatic fibrosis. *Gut.* V. 55. P. 79.
- Moir J.A., Mann J., White S.A. 2015. The role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer. *Surg. Oncol.* V. 24. P. 232.
- Moir L., Ye H., Li G., Lu Y., Zhou Q., Zheng S., Lin Q., Liu Y., Li Z., Chen R. 2018. Cancer-associated fibroblasts promote progression and gemcitabine resistance via the SDF-1/SATB-1 pathway in pancreatic cancer. *Cell Death Dis.* V. 9. P. 1065.
- Ohlund D., Handly-Santana A., Biffi G., Elyada E., Almeida A.S., Ponz-Sarvisé M., Corbo V., Oni T.E., Hearn S.A., Lee E.J., Chio II., Hwang C.I., Tiriach H., Baker L.A., Engle D.D. et al. 2017. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* V. 214. P. 579.
- Olumi A.F., Grossfeld G.D., Hayward S.W., Carroll P.R., Tlsty T.D., Cunha G.R. 1999. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* V. 59. P. 5002.
- Omary M.B., Coulombe P.A., McLean W.H. 2004. Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N. Engl. J. Med.* V. 351. P. 2087.
- Ozdemir B.C., Pentcheva-Hoang T., Carstens J.L., Zheng X., Wu C.C., Simpson T.R., Laklai H., Sugimoto H., Kahlert C., Novitskiy S.V., De Jesus-Acosta A., Sharma P., Heidari P., Mahmood U., Chin L. et al. 2014. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell.* V. 25. P. 719.
- Paszek M.J., Zahir N., Johnson K.R., Lakins J.N., Rozenberg G.I., Gefen A., Reinhart-King C.A., Margulies S.S., Dembo M., Boettiger D., Hammer D.A., Weaver V.M. 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell.* V. 8. P. 241.
- Phillips P.A., McCarroll J.A., Park S., Wu M.J., Pirola R., Korsten M., Wilson J.S., Apte M.V. 2003. Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: Implications for extracellular matrix turnover. *Gut.* V. 52. P. 275.
- Pomianowska E., Sandnes D., Grzyb K., Schjølberg A.R., Aasrum M., Tveteraas I.H., Tjomsland V., Christoffersen T., Gladhaug I.P. 2014. Inhibitory effects of prostaglandin E2 on collagen synthesis and cell proliferation in human stellate cells from pancreatic head adenocarcinoma. *BMC Cancer.* V. 14. P. 413.

- Provenzano P.P., Eliceiri K.W., Campbell J.M., Inman D.R., White J.G., Keely P.J. 2006. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med.* V. 4. P. 38.
- Provenzano P.P., Inman D.R., Eliceiri K.W., Trier S.M., Keely P.J. 2008. Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. *Biophys. J.* V. 95. P. 5374.
- Provenzano P.P., Cuevas C., Chang A.E., Goel V.K., Von Hoff D.D., Hingorani S.R. 2012. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* V. 21. P. 418.
- Quail D.F., Joyce J.A. 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* V. 9. P. 1423.
- Rahib L., Smith B.D., Aizenberg R., Rosenzweig A.B., Fleshman J.M., Matrisian L.M. 2014. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* V. 74. P. 2913.
- Ramanathan R.K., McDonough S.L., Philip P.A., Hingorani S.R., Lacy J., Kortmansky J.S., Thumar J., Chiorean E.G., Shields A.F., Behl D., Mehan P.T., Gaur R., Seery T., Guthrie K.A., Hochster H.S. 2019. Phase IB/II randomized study of FOLFIRINOX plus pegylated recombinant human hyaluronidase versus FOLFIRINOX alone in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma: SWOG S1313. *J. Clin. Oncol.* V. 37. P. 1062.
- Rhim A.D., Oberstein P.E., Thomas D.H., Mirek E.T., Palermo C.F., Sastra S.A., Dekleva E.N., Saunders T., Becerra C.P., Tattersall I.W., Westphalen C.B., Kitajewski J., Fernandez-Barrera M.G., Fernandez-Zapico M.E., Iacobuzio-Donahue C., Olive K.P., Stanger B.Z. 2014. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* V. 25. P. 735.
- Rybinski B., Franco-Barraza J., Cukierman E. 2014. The wound healing, chronic fibrosis, and cancer progression triad. *Physiol. Genomics.* V. 46. P. 223.
- Sato N., Cheng X-B., Kohi S., Koga A., Hirata K. 2016. Targeting hyaluronan for the treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Acta Pharm. Sin. B.* V. 6. P. 101.
- Schmaus A., Klusmeier S., Rothley M., Dimmler A., Sipos B., Faller G., Thiele W., Allgayer H., Hohenberger P., Post S., Sleeman J.P. 2014. Accumulation of small hyaluronan oligosaccharides in tumour interstitial fluid correlates with lymphatic invasion and lymph node metastasis. *Br. J. Cancer.* V. 111. P. 559.
- Sherman M.H., Yu R.T., Engle D.D., Ding N., Atkins A.R., Tiriach H., Collisson E.A., Connor F., Van Dyke T., Kozlov S., Martin P., Tseng T.W., Dawson D.W., Donahue T.R., Masamune A. et al. 2014. Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell.* V. 159. P. 80.
- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. 2018. Cancer statistics, 2018. *CA: Cancer J. Clin.* V. 68. P. 7.
- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. 2019. Cancer statistics, 2019. *CA: Cancer J. Clin.* V. 69. P. 7.
- Singha N.C., Nekoroski T., Zhao C., Symons R., Jiang P., Frost G.I., Huang Z., Shepard H.M. 2015. Tumor-associated hyaluronan limits efficacy of monoclonal antibody therapy. *Mol. Cancer Ther.* V. 14. P. 523.
- Suklabaidya S., Dash P., Das B., Suresh V., Sasnal P.K., Senapati S. 2018. Experimental models of pancreatic cancer desmoplasia. *Lab. Invest.* V. 98. P. 27.
- Thomas D., Radhakrishnan P. 2014. Tumor-stromal crosstalk in pancreatic cancer and tissue fibrosis. *Mol. Cancer.* V. 18. P. 14.
- Thomas D., Radhakrishnan P. 2020. Pancreatic stellate cells: the key orchestrator of the pancreatic tumor microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 1234. P. 57.
- Thompson C.B., Shepard H.M., O'Connor P.M., Kadhim S., Jiang P., Osgood R.J., Bookbinder L.H., Li X., Sugarman B.J., Connor R.J., Nadsjombati S., Frost G.I. 2010. Enzymatic depletion of tumor hyaluronan induces antitumor responses in preclinical animal models. *Mol. Cancer Ther.* V. 9. P. 3052.
- Toole B.P., Slomiany M.G. 2008. Hyaluronan: A constitutive regulator of chemoresistance and malignancy in cancer cells. *Semin. Cancer Biol.* V. 18. P. 244.
- Vaquero E.C., Edderkaoui M., Nam K.J., Gukovsky I., Pandolfi S.J., Gukovskaya A.S. 2003. Extracellular matrix proteins protect pancreatic cancer cells from death via mitochondrial and nonmitochondrial pathways. *Gastroenterol.* V. 125. P. 1188.
- Von Hoff D.D., Ervin T., Arena F.P., Chiorean E.G., Infante J., Moore M., Seay T., Tjulandin S.A., Ma W.W., Saleh M.N., Harris M., Reni M., Dowden S., Laheru D., Bahary N. et al. 2013. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N. Engl. J. Med.* V. 369. P. 1691.
- Wang S., Willumsen N., Cecilie B., Karsdal M., Chondros D., Taverna D. 2018. Extracellular matrix (ECM) circulating peptide biomarkers as potential predictors of survival in patients (pts) with untreated metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma (mPDA) receiving pegvorhialuronidase alfa (PEGPH20), nab-paclitaxel (a), and gemcita. *J. Clin. Oncol.* V. 36. P. 12030.
- Wang-Gillam A. 2019. Targeting stroma: A tale of caution. *J. Clin. Oncol.* V. 37. P. 1041.
- Watanabe T., Masamune A., Kikuta K., Hirota M., Kume K., Satoh K., Shimosegawa T. 2009. Bone marrow contributes to the population of pancreatic stellate cells in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* V. 297. P. G1138.
- Watari N., Hotta Y., Mabuchi Y. 1982. Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* V. 58. P. 837.
- Whitcott C.J., Diep C.H., Jiang P., Watanabe A., LoBello J., Sima C., Hostetter G., Shepard H.M., Von Hoff D.D., Han H. 2015. Desmoplasia in primary tumors and metastatic lesions of pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* V. 21. P. 3561.
- Willumsen N., Bager C.L., Leeming D.J., Smith V., Karsdal M.A., Dornan D., Bay-Jensen A.C. 2013. Extracellular matrix specific protein fingerprints measured in serum can separate pancreatic cancer patients from healthy controls. *BMC Cancer.* V. 13. P. 1.
- Willumsen N., Bager C.L., Leeming D.J., Smith V., Christiansen C., Karsdal M.A., Dornan D., Bay-Jensen A.C. 2014. Serum biomarkers reflecting specific tumor tissue remodeling processes are valuable diagnostic tools for lung cancer. *Cancer Med.* V. 3. P. 1136.

- Wilson J.S., Pirola R.C., Apte M.V. 2014. Stars and stripes in pancreatic cancer: Role of stellate cells and stroma in cancer progression. *Front Physiol.* V. 5. P. 52.
- Wu M., Cao M., He Y., Liu Y., Yang C., Du Y., Wang W., Gao F. 2015. A novel role of low molecular weight hyaluronan in breast cancer metastasis. *FASEB J.* V. 29. P. 1290.
- Yamamoto G., Taura K., Iwaisako K., Asagiri M., Ito S., Koyama Y., Tanabe K., Iguchi K., Satoh M., Nishio T., Okuda Y., Ikeno Y., Yoshino K., Seo S., Hatano E., Uemoto S. 2017. Pancreatic stellate cells have distinct characteristics from hepatic stellate cells and are not the unique origin of collagen-producing cells in the pancreas. *Pancreas.* V. 46. P. 1141.
- Yoshida G.J. 2020. Regulation of heterogeneous cancer-associated fibroblasts: The molecular pathology of activated signaling pathways. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* V. 39. P. 112.
- Yoshida G.J., Azuma A., Miura Y., Orimo A. 2019. Activated fibroblast program orchestrates tumor initiation and progression; molecular mechanisms and the associated therapeutic strategies. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 2256.

The Role of Activated Stromal Cells in the Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Therapeutic Approaches to Stroma Remodeling

I. V. Rykov^a, E. G. Solonitsyn^a, T. M. Shestopalova^b, I. I. Gin^c, and E. N. Tolkunova^{c, *}

^aAlmazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, 197341 Russia

^bNational Center for Clinical Morphological Diagnostics, St. Petersburg, 192283 Russia

^cInstitute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

*e-mail: entolk62@mail.ru

Progress in the treatment of pancreatic cancer remains very small and according to forecasts, PDAC (pancreatic ductal adenocarcinoma) will become the second leading cause of cancer death in Western countries over the next decade. Traditional cytotoxic chemotherapy is the modern standard of treatment for metastatic PDAC. The results of studies of the epithelial and stromal components showed that the dense fibrous stroma of the tumor plays an active role in the development of PDAC. There is accumulating evidence that the activated stroma contributes to the progression of the tumor. In a short review, we will describe the current understanding of the role of activated tumor stroma cells in the development of PDAC and the current state of research aimed at creating new therapeutic strategies for stromal ablation and stroma remodeling.

Keywords: pancreatic ductal adenocarcinoma, activated tumor stroma cells, desmoplasia

МАКРОФАГИ СЕЛЕЗЕНКИ: ОСОБЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА И ФУНКЦИИ

© 2022 г. Е. С. Андриюхова¹, *, Л. А. Таширева¹, С. В. Вторушин^{1, 2},
М. В. Завьялова^{1, 2}, В. М. Перельмутер¹

¹Научно-исследовательский институт онкологии Томского научно-исследовательского медицинского центра РАН, Томск, 634009 Россия

²Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, 634055 Россия

*E-mail: elenasergeevna9607@gmail.com

Поступила в редакцию 25.08.2021 г.

После доработки 22.09.2021 г.

Принята к публикации 23.09.2021 г.

Гетерогенная популяция макрофагов в селезенке выполняет разнообразные важные функции. Однако исследования макрофагов селезенки большей частью проведены на экспериментальных моделях. Многого остается не до конца изученным. В представленном обзоре обобщены данные об особенностях макрофагов разных функциональных зон селезенки у человека и животных. Обсуждается роль макрофагов селезенки в утилизации стареющих эритроцитов, метаболизме железа, иммуногенезе, иммуносупрессии и элиминации клеток в состоянии апоптоза, фагоцитозе гематогенно распространяющихся патогенов и участие в этом процессе тафтсина, а также роль селезенки как резервуара моноцитов, участвующих в воспалении и регенерации. Предпринята попытка найти данные о возможной роли макрофагов селезенки в феномене редкости метастатического поражения этого органа. Обсуждаются некоторые важные, но малоизученные функциональные аспекты макрофагов селезенки человека и животных.

Ключевые слова: макрофаги, селезенка, спленэктомия, репарация, карциномы

DOI: 10.31857/S0041377122010023

Селезенка является важным резервуаром моноцитов (Swirski et al., 2009; Laan et al., 2014), участвующих в утилизации эритроцитов, фагоцитозе патогенов, иммуногенезе (Den Haan, Kraal, 2012). Популяционный состав макрофагов в селезенке крайне разнообразен. В разных морфологических зонах селезенки в зависимости от физиологических условий и патологических состояний встречаются разные популяции макрофагов (Den Haan, Kraal, 2012).

В гетерогенной популяции макрофагов селезенки различают четыре подгруппы, которые заселяют разные функциональные зоны, микроокружение которых определяет их разный фенотип и функции. Макрофаги белой пульпы участвуют в иммуногенезе на антигены, доставляемые кровью; две популяции макрофагов маргинальной зоны ответственны за преемственность врожденного и адаптивного иммуногенеза; с макрофагами красной пульпы связан фа-

гоцитоз эритроцитов и метаболизм железа (A-Gonzalez, Castrillo, 2018).

Макрофаги селезенки имеют двойственное происхождение. Одни из них являются потомками стволовых клеток костного мозга, другие – резидентных клеток. Ранее считалось, что тканевые резидентные макрофаги в основном дифференцируются из циркулирующих моноцитов. Однако многочисленные исследования показывают, что резидентные макрофаги селезенки имеют местное происхождение. Популяция резидентных макрофагов может поддерживаться независимо от гемопоэтических стволовых (ГС) клеток и от циркулирующих моноцитов и обладает способностью к самообновлению (Schulz et al., 2012; Hashimoto et al., 2013; Yona et al., 2013).

Несмотря на уникальность селезенки, как органа, в котором многочисленные субпопуляции макрофагов выполняют разные функции *in situ*, а также как резервуара недифференцированных моноцитов – источников макрофагов в очагах воспаления и репаративной регенерации, многое остается недостаточно изученным. То, что известно о макрофагальной системе селезенки, большей частью исследовано на животных. Кроме этого, нужно признать, что не все-

Принятые сокращения: ГС-клетки – гемопоэтические стволовые клетки; ГСП-клетки – ГС и прогениторные клетки; MDSCs – клетки-супрессоры миелоидного происхождения; M-CSF – макрофагальный колониестимулирующий фактор; VCAM-1 – молекула клеточной адгезии сосудов-1.

ми понимается роль селезенки. Видимо, этим можно объяснить, что спленэктомия, как и аппендэктомия, считается многими вмешательством, не имеющим серьезных последствий. Некоторые функции макрофагов селезенки человека и животных, по-видимому, уникальны. Нет четкого понимания, какова роль макрофагальной системы селезенки в феномене крайней редкости ее метастатического поражения при злокачественных новообразованиях. Настоящий обзор посвящен анализу всех этих вопросов.

СУБПОПУЛЯЦИИ МАКРОФАГОВ СЕЛЕЗЕНКИ

Макрофаги красной пульпы селезенки. Нет единого мнения о происхождении макрофагов красной пульпы. Исследование Хашимото и сотрудников (Hashimoto et al., 2013) демонстрирует, что их численность у мышей регулируется путем локальной пролиферации. Другие авторы (Schulz et al., 2012) показали, что макрофаги красной пульпы селезенки, как и многие резидентные популяции макрофагов легких, печени, головного мозга, брюшины, костного мозга, появляются в период эмбриогенеза из элементов желточного мешка.

Во взрослом организме человека и животных макрофаги красной пульпы селезенки состоят преимущественно из самообновляющихся популяций макрофагов эмбрионального происхождения и, в меньшей степени, возникают путем дифференцировки из моноцитов крови мыши (Lavin et al., 2015; Yona et al., 2013). Было установлено, что макрофаги красной пульпы локализируются в ретикулярной сети фибробластов, которые характеризуются экспрессией генов опухолевого белка Вильмса 1 и колониестимулирующего фактора 1. Делеция гена этого фактора в фибробластах, продуцирующих опухолевый белок Вильмс 1, вызывает резкое истощение макрофагов в красной пульпе. К пополнению их популяции приводит рекрутирование моноцитов благодаря продуцированию фибробластами хемоаттрактантов CCL2 и CCL7 (Bellomo et al., 2020).

Резидентные макрофаги красной пульпы отличаются от макрофагов селезенки, происходящих из моноцитов крови, по поверхностным рецепторам. Так, у людей преимущественно экспрессируются низкоаффинные рецепторы FcγRIIa и FcγRIIIa. В отличие от макрофагов, происходящих из моноцитов крови, резидентные макрофаги красной пульпы не экспрессируют FcγRIIb, однако экспрессируют очень низкие уровни высокоаффинного рецептора FcγRI. Экспрессия этого рецептора может быть индуцирована в условиях воспаления (Nagelkerke et al., 2018).

Макрофаги красной пульпы у мышей характеризуются фенотипом F4/80^{high}CD68⁺Integrin-αM-CD11b^{low/-} (Kohyama et al., 2009). Макрофаги красной пульпы с фенотипом F4/80⁺, CD206⁺ осуществ-

ляют клиренс стареющих эритроцитов и полиморфноядерных лейкоцитов, а также метаболизм железа (Gordon, Plüddemann, 2017).

Как у мышей, так и у людей существуют макрофаги, экспрессирующие SIRPα. Взаимодействие этого рецептора с CD47 на функционально полноценных эритроцитах ингибирует фагоцитоз последних, но на стареющих, наоборот, приводит к их фагоцитозу (Burger et al., 2012).

Полагают, что именно макрофаги красной пульпы селезенки способны к фагоцитозу IgG-опсонизированных эритроцитов через FcγRs *ex vivo*. Они являются наиболее распространенными макрофагами в селезенке. Было продемонстрировано, что все макрофаги красной пульпы, кроме макрофагов с FcγRIIb, участвуют в фагоцитозе IgG-опсонизированных клеток крови (Nagelkerke et al., 2018).

Гомеостаз железа может играть роль в развитии макрофагов. CD163-экспрессирующие макрофаги, являющиеся самой распространенной популяцией, участвуют в фагоцитозе старых эритроцитов и продуктов метаболизма железа (Kristiansen et al., 2001). Свободный гем индуцирует транскрипционный фактор Spi-C, от которого зависит развитие макрофагов красной пульпы (Halдар et al., 2014; Gordon, Plüddemann, 2017).

Важно отметить, что функция макрофагов красной пульпы зависит от цитокинов. Классические макрофаги M1 обладают способностью накапливать железо. Это поддерживает популяцию этих клеток в провоспалительных реакциях. С другой стороны, альтернативные M2-макрофаги имеют повышенную способность высвобождать железо, а повышенная доступность железа в микроокружении, по-видимому, способствует ремоделированию ткани (Recalcati et al., 2012).

Резервные моноциты красной пульпы селезенки. Моноциты крови, проникая в разные ткани, дифференцируются либо в макрофаги, либо в дендритные клетки. Подобные процессы происходят и в разных зонах селезенки. Однако в определенной степени селезенка — исключение из общего правила, поскольку является резервуаром недифференцированных моноцитов, которые располагаются в субкапсулярной зоне красной пульпы. Причем, как считают, их количество в селезенке превышает число в циркулирующей крови. Полагают, что моноциты, рекрутированные из селезенки, участвуют в регуляции воспаления и регенерации. В популяции моноцитов селезенки мышей клеток с фенотипом Ly-6C^{high} больше, чем Ly-6C^{low}. Обе субпопуляции обладают фагоцитарной активностью и способны *in vitro* дифференцироваться в макрофаги или дендритные клетки (Swirski et al., 2009). IL-1β и фактор стволовых клеток увеличивают количество резидентных моноцитов в селезенке (Dutta et al., 2015).

Участие макрофагов красной пульпы селезенки в экстрамедуллярном кроветворении. От лиганда VCAM-1 (молекулы клеточной адгезии сосудов-1), который экспрессируется макрофагами селезенки, зависит удержание ГС-клеток, а также ГС и прогениторных (ГСП) клеток в кроветворной ткани костного мозга и селезенки. Так, в экспериментах на мышах макрофаги, экспрессирующие VCAM-1, удерживают ГС-клетки в красной пульпе селезенки, чем способствуют экстрамедуллярному кроветворению. Подавление VCAM-1 обуславливает выход ГС-клеток из селезенки. Предполагают, что формирование гемопоэтических ниш селезенки зависит от M-CSF (макрофагального колониестимулирующего фактора). Его ингибирование избирательно снижало уровень VCAM-1 в селезенке. В свою очередь, подавление экспрессии макрофагального VCAM-1 снижает количество ГСП-клеток в селезенке. Снижению экстрамедуллярного кроветворения в селезенке и высвобождению ГС-клеток из селезенки способствуют нарушение созревания макрофагов из-за супрессии РНК *in vivo*, истощение макрофагов селезенки и подавление VCAM-1 в макрофагах. Это доказывает важную роль экспрессии VCAM-1 макрофагами селезенки в экстрамедуллярном кроветворении (Dutta et al., 2015).

Ингибция фагоцитоза ГСП-клеток макрофагами обеспечивается взаимодействием сигнального регуляторного белка α (SIRP α), который экспрессируется на CD47-положительных (сигнал “не ешь меня”) фагоцитах. На ГСП-клетках экспрессия этого маркера активируется непосредственно во время миграции на периферию (Jaiswal et al., 2009).

Макрофаги белой пульпы селезенки. Лимфоидные фолликулы со светлыми центрами и периартериальные лимфоидные муфты представляют белую пульпу селезенки. Вместе с маргинальной зоной фолликулов белая пульпа составляет, по сути, лимфоидный орган, ответственный за иммуногенез, инициируемый антигенами, распространяемыми кровотоком. Макрофаги белой пульпы с фенотипом F4/80⁻, CD68⁺ осуществляют клиренс апоптотических В- и Т-лимфоцитов (Gordon, Plüddemann, 2017). Это происходит каждый раз, когда завершается иммуногенез в ответ на один антиген и инициируется новый иммуногенез на другой антиген. Морфологическим проявлением этого процесса являются макрофаги в светлых центрах лимфоидных фолликулов с наличием в цитоплазме апоптотических телец.

Макрофаги маргинальной и перифолликулярной зон селезенки. Популяция макрофагов маргинальной зоны гетерогенна. Часть клеток характеризуется экспрессией рецептора MARCO и лектинового рецептора SIGN-R1. Другая часть популяции экспрессирует MARCO, но не экспрессирует SIGN-R1 (Pirgova et al., 2020). Полагают, что клетки с фенотипом MARCO⁺SIGN-R1⁻ располагаются в наружной мар-

гинальной зоне (Gordon, Plüddemann, 2017; Pirgova et al., 2020). Макрофаги, экспрессирующие SIGN-R1, связаны с функциональным состоянием В-лимфоцитов герминальной зоны (Pirgova et al., 2020). Макрофаги маргинальной зоны играют центральную роль в фагоцитозе апоптотических клеток. Благодаря этому уменьшается вероятность развития аутоиммунного ответа на аутоантигены (McGaha et al., 2011).

Кроме собственно маргинальной зоны описывается наружная маргинальная зона (Gordon, Plüddemann, 2017). По-видимому, это морфофункциональная зона, которая в других работах обозначается как “перифолликулярная” и располагается между маргинальной зоной и красной пульпой (Steiniger et al., 2001). Перифолликулярная зона содержит покрытые оболочкой капилляры и заполненные кровью пространства без эндотелиальной выстилки (Steiniger et al., 2001). Большая часть макрофагов капиллярной оболочки перифолликулярной зоны имеет фенотип CD163⁻CD68⁺, что отличает их от большинства макрофагов красной пульпы. В отличие от макрофагов капиллярной оболочки красной пульпы, макрофаги перифолликулярной зоны экспрессируют CD169 (Steiniger et al., 2014).

Макрофаги CD169⁺ известны как металлофильные макрофаги маргинальной зоны. Происхождение CD169⁺-макрофагов до конца непонятно. Считают, что они не происходят из предшественников желточного мешка. Для генерации макрофагов CD169⁺ необходимо присутствие В-клеток. Восстановление популяции этих макрофагов после истощения происходит за счет моноцитов. Полагают, что макрофаги маргинальной зоны, содержащие антиген CD169⁺, участвуют в индукции как иммунных ответов, так и толерантности. Одной из функций макрофагов CD169⁺ является поглощение экзосом (Grabowska et al., 2018). Например, установлено, что экзосомы, источником которых являлась меланома B16F10, обнаруживаются в CD169⁺-макрофагах, дренирующих лимфатические узлы (Pucci et al., 2016).

Макрофаги маргинальной и перифолликулярной зон с фенотипом CD169⁺ осуществляют клиренс микроорганизмов, антигенов, полисахаридов (Gordon, Plüddemann, 2017).

УЧАСТИЕ МАКРОФАГОВ КРАСНОЙ ПУЛЬПЫ СЕЛЕЗЕНКИ В РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

Макрофаги разных функциональных зон селезенки участвуют в индукции как адаптивного иммуногенеза, так и толерантности.

Дендритные клетки селезенки. Дендритные клетки селезенки происходят из ГС-клеток костного мозга и специализируются на презентации антигена. По-

мимо продуцирующих интерферон плазмоцитонидных дендритных клеток, селезенка содержит еще два классических подмножества дендритных клеток: 1) $CD8\alpha^+CD11b^-$, ответственных за утилизацию апоптотических клеток и перекрестную презентацию антигенов $CD8^+$ Т-клеткам, и 2) $CD8\alpha^-CD11b^+$, преимущественно обнаруживаемых в красной пульпе и маргинальной зоне, которые экспрессируют основные компоненты главного комплекса гистосовместимости и представляют антигены $CD4^+$ Т-клеткам (Dudziak et al., 2007; Sancho et al., 2009). Клиренс клеток в состоянии апоптоза, включая дендритные клетки $CD8\alpha^+$, играет важную роль в индукции ауто-толерантности (Miyake et al., 2007).

Механизмы, которые определяют фенотипическую и функциональную гетерогенность дендритных клеток селезенки, затрагивают несколько молекулярных путей. К ним относится передача сигналов лимфотоксина-бета, Notch2, RAR β и EB12. Передача сигналов рецепторами лимфотоксина-бета способствует генерации и поддержанию популяции дендритных клеток (Kabashima et al., 2005). Передача сигналов рецептора Notch2 контролирует дифференцировку подмножества $CD8\alpha^-CD11b^+$ -дендритных клеток селезенки. Эти клетки экспрессируют ESAM (endothelial cell-selective adhesion molecule). Дендритные клетки $Esam^{hi}CD8\alpha^-CD11b^+$ специализируются на праймировании $CD4^+$ -Т-клеток (Lewis et al., 2011). Было обнаружено, что дендритные клетки селезенки различаются по экспрессии EB12 (GPR183), от которого зависит их локализация (Gatto et al., 2013).

Макрофаги селезенки могут оказывать иммуносупрессорные и толерогенные эффекты. Популяция клеток-супрессоров миелоидного происхождения (MDSCs) характеризуется фенотипом $CD11b^+Gr1^+$, экспрессией иммуносупрессивных ферментов, таких как аргиназа-1 и индуцибельная синтаза оксида азота, продукцией активных форм кислорода, ингибированием пролиферации Т-клеток и продукции интерферона IFN- γ , а также подавлением активности противоопухолевых Т-клеток в естественных условиях. Полный спектр подавляющих функций клетки MDSCs могут приобретать не в селезенке, а при рекрутировании в очаги воспаления (Haverkamp et al., 2011).

MDSCs с фенотипом $CD11b^+Gr1^+F4/80^-CD11c^-$ могут накапливаться в селезенке людей в процессе канцерогенеза плоскоклеточного рака кожи (Gabrilovich et al., 2012).

Макрофаги красной пульпы с фенотипом $F4/80^{hi}Mac-1^{low}$ могут предотвращать аутоиммунные реакции, продуцируя противовоспалительные цитокины, такие как TGF- β и IL-10. Они способны сдерживать чрезмерный иммунный ответ, индуцируя образование Treg-лимфоцитов (Kurotaki et al., 2011).

Полагают, что содержащие антиген $CD169^+$ макрофаги маргинальной зоны взаимодействуют с дендритными клетками, что играет роль в индукции как иммунных ответов, так и толерантности (Grabowska et al., 2018). Фагоцитоз $CD169^+$ -макрофагами клеток в состоянии апоптоза приводит к экспрессии хемокина CCL22. Это вызывает миграцию и активацию FoxP3 $^+$ -Treg и дендритных клеток. Авторы полагают, что макрофаги, экспрессирующие CCL22, координируют клеточные взаимодействия, необходимые для развития толерантности, индуцируемой апоптотическими клетками (Ravishanker et al., 2014).

МАКРОФАГИ СЕЛЕЗЕНКИ И ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС

Макрофаги селезенки обладают двумя основными протективными свойствами во время инфекций, возбудители которых передаются через кровь. Первым и наиболее хорошо изученным является фагоцитоз и устранение патогенных микроорганизмов из кровотока. Однако помимо задачи устранения патогенов, распространяющихся через кровь, макрофаги селезенки могут играть важную роль в активации иммунной системы. Для выполнения этих функций они снабжены большим количеством рецепторов распознавания патогенов. Они распознают молекулы, связанные с патогенами, и молекулы, связанные с повреждениями. Связывание Toll-подобных рецепторов макрофагов селезенки с молекулами патогенов или молекулами, возникающими при повреждении, приводит к секреции ими провоспалительных цитокинов. В результате макрофаги селезенки становятся источником провоспалительных цитокинов (Den Haan, Kraal, 2012).

Функциональные особенности макрофагов красной пульпы селезенки способствуют борьбе с многочисленными патогенами, передающимися через кровь. Например, макрофаги красной пульпы могут распознавать капсульный полисахарид глюкуронон-силломаннан из *Cryptococcus neoformans* и впоследствии фагоцитировать бактерии (De Jesus et al., 2008). Макрофаги красной пульпы мышей с фенотипом $SIGNR1^-$ эффективно фагоцитируют *Streptococcus pneumoniae* (Kirby et al., 2009). Однако макрофаги красной пульпы не эффективны при внутриклеточном росте *Salmonella typhimurium* (Salcedo et al., 2001). Макрофаги красной пульпы также участвуют в развитии малярии. При экспериментальной инфекции *Plasmodium yoelii* ремоделирование селезенки способствует прикреплению инфицированных эритроцитов к эндотелию сосудов и, как следствие, позволяет паразитам миновать фагоциты (Martin-Jaular et al., 2011).

Интересно, что часть фагоцитов положительны по F4/80 и CD11c. Этот фенотип является общим для

макрофагов красной пульпы и дендритных клеток. Эта популяция клеток участвует в уничтожении паразитов *Plasmodium chabaudi* на ранней стадии, но на пике паразитемии она резко уменьшается (Borges da Silva et al., 2015).

Макрофаги красной пульпы могут экспрессировать CXCR3- и (или) CCR5-связывающие хемокины по механизму, подобному тому, который наблюдается при раннем кандидозе. Рецепторы CXCR3 и CCR5 являются основными хемокиновыми рецепторами с повышенной активностью в CD4⁺-Т-клетках селезенки во время острой стадии малярии (Gwyer Findlay et al., 2013).

Макрофаги маргинальной и перифолликулярной зон и красной пульпы, экспрессирующие CD169, участвуют в контроле распространения вирусов и бактерий. В частности это касается листерий (Perez et al., 2017; Grabowska et al., 2018).

Все макрофаги, экспрессирующие рецепторы к Fc-фрагменту любого варианта иммуноглобулинов (IgG), имеют и рецептор к олигопептиду тафтсину. Тафтсин является частью СН-домена Fc-фрагмента тяжелой цепи IgG. В процессе фагоцитоза комплекса патоген–IgG происходит ферментативное отделение тафтсина от Fc-фрагмента, который соединяется со своим рецептором. Далее происходит интернализация комплекса тафтсин–рецептор вместе с комплексом патоген–IgG. Благодаря способности тафтсина стимулировать образование макрофагами супероксидного и нитроксильных радикалов фагоцитоз становится завершенным. Роль селезенки заключается в том, что освобождение тафтсина происходит при участии двух ферментов. Один из них тафтсинэндокарбокситепептидаза образуется только в селезенке. Важность роли тафтсина в завершенности фагоцитоза демонстрируется развитием тафтсиновой недостаточности у спленэктомированных животных и людей. У них возникают инфекции после спленэктомии, возбудителями которых являются капсульные бактерии (Одинцов и др., 2002; Перельмутер и др., 2004).

РОЛЬ МОНОЦИТОВ (МАКРОФАГОВ) СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ ПАТОЛОГИИ

Некоторые заболевания вызывают рекрутирование моноцитов как из костного мозга, так и из селезенки. Механизмы высвобождения моноцитов из этих органов различны. Миграция моноцитов костного мозга зависит от передачи сигналов CCR2, тогда как рекрутирование моноцитов из селезенки происходит благодаря взаимодействию ангиотензина-2 с рецептором на резервных моноцитах (Swirski et al., 2009).

Макрофаги селезенки и цирроз печени. Предполагают, что вклад селезенки в развитие цирроза печени связан со стимуляцией фиброгенеза и ингибированием регенерации. Авторы предполагают, что моноциты

селезенки, наряду с Т-клетками, могут способствовать патологическим изменениям в печени (Li et al., 2017). Было продемонстрировано, что спленэктомия способствует регенерации печени у животных и пациентов с циррозом печени (Yamada et al., 2016). Как полагают, это происходит при участии фактора TNF- α , источником которого являются макрофаги селезенки (Murata et al., 2001). В исследовании Ли и сотрудников (Lee et al., 2015) использовали крыс, перенесших 70%-ю гепатэктомию со спленэктомией или без таковой. Было установлено, что после спленэктомии происходило снижение уровня TGF- β 1 и повышение уровня фактора роста гепатоцитов в воротной вене, что приводило к улучшению регенерации печени.

Макрофаги селезенки и инфаркт миокарда. Репарация зоны инфаркта миокарда, как и заживление поврежденных других тканей, происходит в три фазы: воспалительная, пролиферативная и фаза созревания, при которой происходит ремоделирование соединительной ткани. При инфаркте миокарда развивается демаркационное воспаление, которое является основой для неполной регенерации — замещения некротизированных кардиомиоцитов соединительной тканью.

Основным источником циркулирующих моноцитов после острого инфаркта миокарда является селезеночный резервуар. Эти клетки генерируются как за счет клеток из костного мозга, так и за счет местного моноцитопоэза (Swirski et al., 2009; Leuschner et al., 2012; Ismahil et al., 2014).

Мобилизация моноцитов в зону инфаркта — одно из проявлений этого процесса. В эксперименте на мышах показано, что моноциты селезенки инфильтрируют зону инфаркта миокарда. Рекрутирование резервных моноцитов из селезенки происходит за счет увеличения концентрации ангиотензина-2 (Swirski et al., 2009; Honold, Nahrendorf, 2018). Высвобождение моноцитов селезенки, как было показано, зависит от рецептора ангиотензина-2 типа 1a, и нокаут этого рецептора снижает как количество циркулирующих моноцитов, так и моноцитов в зоне инфаркта миокарда (Swirski et al., 2009).

После инфаркта миокарда у мышей в крови в большем количестве циркулируют ГСП-клетки костного мозга, активируя гемопоэз в селезенке (Dutta et al., 2012). Увеличение количества гемопоэтических и эндотелиальных клеток-предшественников в крови людей происходит в раннюю фазу инфаркта миокарда (Massa et al., 2005; Assmus et al., 2012). Прижизненная микроскопия показывает, что источником моноцитов в зоне инфаркта сначала является сосудистое русло, а затем селезеночный резервуар. Моноциты, экспрессирующие антиген Ly-6C^{high} у мышей освобождаются из костного мозга и селезенки и рекрутируются в участки повреждения ткани с участием хемокинового рецептора CCR2

(Peet et al., 2020). Рекрутирование моноцитов в зону инфаркта начинается уже через 15–30 мин после острого нарушения кровотока в сердце (Jung et al., 2013; Peet et al., 2020). Моноциты селезенки, избирательно накапливающиеся при инфаркте миокарда, имеют фенотипы $Ly-6C^{high}$ и $Ly-6C^{low}$. Через 1 сут после возникновения инфаркта преобладают моноциты $Ly-6C^{high}$, а $Ly-6C^{low}$ доминируют позднее (Nahrendorf et al., 2007).

Исследование ответа моноцитов после острого инфаркта миокарда у пациентов показало, что в воспалительную фазу репарации в пограничной зоне инфаркта преобладают моноциты с фенотипом $CD14^+CD16^-$. В пролиферативную фазу в грануляционной ткани, замещающей центр инфаркта, преимущественно встречаются моноциты $CD14^+CD16^+$ (Laan et al., 2014). Получены факты, свидетельствующие о том, что источником моноцитов, инфильтрирующих инфаркт миокарда, является селезенка (Laan et al., 2014; Peet et al., 2020).

В ранней фазе регенерации, на 2–3 сут после инфаркта миокарда, рекрутированные моноциты (макрофаги) секретируют протеиназы и провоспалительные цитокины (TNF- α , IL-1 и IL-6). Тогда как в более поздний этап регенерации, на 4–7 сут, моноциты (макрофаги) становятся источником противовоспалительных цитокинов IL-10, фактора роста эндотелия сосудов и TGF- β (Libby et al., 2016).

Активация β_2 -адренорецептора увеличивала экспрессию мРНК IL-10 в селезенке и концентрацию IL-10 в плазме, что совпадало с уменьшением размера инфаркта у мышей. Активации β_2 -адренорецепторов и уменьшения размера инфаркта не происходило при спленэктомии, что указывает на роль IL-10 селезенки в кардиопротекции (Tian et al., 2018).

Активация селезенки через блуждающие нервы высвобождает кардиопротективные факторы, которые уменьшают размер инфаркта. В то же время более поздняя активация селезенки за счет активации симпатической нервной системы и увеличения ангиотензина-2 сначала увеличивает воспалительную инфильтрацию миокарда, а затем уменьшает ее, обеспечивая регенерацию миокарда. Поиск кардиопротективных факторов, которые высвобождаются из селезенки, все еще продолжается (Neusch, 2019). Очевидно, что вторая фаза репарации (пролиферации) осуществляется с участием противовоспалительных цитокинов, источником которых являются, в частности, и макрофаги типа M2.

С селезенкой связано и отрицательное влияние на состояние миокарда. При воспроизведении на мышцах повреждения миокарда рекрутируемые в сердце моноциты селезенки не только участвуют в репарации, но и могут способствовать иммуноопосредованному повреждающему воздействию на миокард. Спленэктомия у мышей с повреждением

сердца приводила к реверсии воспаления и патологического ремоделирования (Ismahil et al., 2014).

Активность селезенки при остром коронарном синдроме ассоциирована с активацией показателей, связанных с воспалением. В свою очередь, активность селезенки ассоциирована с повышенным риском повреждения сердечно-сосудистой системы (Emami et al., 2015).

Макрофаги селезенки и атеросклероз. Было показано, что клетки ГС и ГСП костного мозга мышей мигрируют в красную пульпу селезенки, где они пролифирируют и дифференцируются в $Ly-6C^{high}$ -моноциты. Последние мигрируют в атеросклеротические бляшки, где секретируют провоспалительные цитокины, активные формы кислорода, протеазы и превращаются в пенистые клетки. Это способствует формированию атеромы (Dutta et al., 2012; Robbins et al., 2012; Wang et al., 2014). Дифференцировке в селезенке моноцитов $Ly-6C^{high}$ способствует гиперхолестеринемия (Kuaw et al., 2011).

Острый инфаркт миокарда увеличивает активность симпатической нервной системы, следствием чего является мобилизация клеток-предшественников из костного мозга. Они мигрируют в селезенку и увеличивают количество резидентных моноцитов, способствуя протеолитической дестабилизации атеросклеротических бляшек у мышей, нокаутированных по гену *ApoE* (Dutta et al., 2012).

МАКРОФАГИ СЕЛЕЗЕНКИ И ОПУХОЛЕВЫЙ ПРОЦЕСС

Моноциты резервуара селезенки, мигрируя в опухоль, становятся опухоль-ассоциированными макрофагами.

У мышей-опухоленосителей усиливается продукция ангиотензина-2, который приводит к увеличению в селезенке количества ГС-клеток и предшественников макрофагов (Cortez-Retamozo et al., 2013). В селезенке мышей с экспериментально вызванной аденокарциномой легких было обнаружено большое количество ГСП-клеток, включая предшественников гранулоцитов (макрофагов). Они фенотипически и функционально сходны со своими аналогами из костного мозга. ГСП-клетки селезенки дают начало миелоидным клеткам, таким как моноциты и нейтрофилы, которые впоследствии мигрируют в опухоль и выполняют проопухолевые функции (Cortez-Retamozo et al., 2012).

Связанные с опухолью макрофаги могут стимулировать рост опухоли и ухудшать выживаемость пациентов при разных типах злокачественных новообразований (Qian, Pollard, 2010). Роль селезенки в этом процессе подтверждается в экспериментах со спленэктомией. Она уменьшала количество опухоль-ассоциированных макрофагов и нейтрофилов и замедляла рост экспериментальной опухоли.

Предшественники макрофагов и гранулоцитов и их потомки идентифицированы и в селезенке человека (Cortez-Retamozo et al., 2012).

Среди мононуклеарных клеток селезенки имеются $Tie2^+$ -моноциты, экспрессирующие рецептор ангиопоэтина-2 с фенотипом $Tie2^+CD14^{low}CD16^{bright}CDL62^-CCR2^-$. $Tie2^+$ -макрофаги привлекаются в опухоль в ответ на продукцию ангиопоэтина-2 эндотелиальными клетками. Они накапливаются в гипоксических периваскулярных участках опухоли и очагах воспаления и обуславливают повышение проницаемости сосудов, в которых происходит интравазация опухолевых клеток. Было показано, что моноциты, экспрессирующие рецептор $Tie2$, поддерживают аномальные ангиогенные процессы в солидных опухолях посредством паракринного действия, происходящего вблизи сосудов (Campanelli et al., 2016).

Существует корреляция между усилением экстрамедуллярного кроветворения в селезенке и прогрессированием рака у человека. Клинически у пациентов с различными типами солидных опухолей наблюдались повышенные уровни ГСП-клеток в селезенке, связанные с плохой выживаемостью. Эти результаты показывают уникальную и важную роль селезеночного кроветворения. Показано, что $CD133$ может служить полезным маркером ГСП-клеток селезенки у людей. У пациентов с раком желудка накопление $CD133^+$ ГСП-клетками имеет обратную корреляцию со снижением общей выживаемости после операции (Wu et al., 2018).

В настоящее время роль селезенки при злокачественных новообразованиях исследуется на пациентах со спленэктомией. Эти исследования дают почву для следующей полемики: 1) способствует ли спленэктомия усилению или понижению онкогенеза; 2) влияет ли спленэктомия на рост, прогрессирование и рецидивирование опухоли. Было обнаружено, что удаление селезенки сопровождается усилением онкогенеза солидных опухолей пищевода, печени, толстой кишки, поджелудочной железы, легких, предстательной железы и злокачественных гематологических новообразований, таких как неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина, множественная миелома, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз (Kristinsson et al., 2014). Было показано, что пациенты, перенесшие спленэктомию, имеют повышенный риск развития рака желудочно-кишечного тракта, головы и шеи, гематологических злокачественных новообразований (Sun et al., 2015). Полагают, что селезенка осуществляет иммунный надзор, защищая от онкогенеза. Что касается влияния на уже имеющиеся опухоли, исследования эффектов спленэктомии у пациентов с раком желудка, толстой кишки, печени и поджелудочной железы показали крайне незначительное влияние на безрецидивную и общую выживаемость (Cadili, de Gara, 2008).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Селезенка уникальна наличием чрезвычайно гетерогенной популяции макрофагов, часть которой представлена резидентными макрофагами, а часть происходит от моноцитов крови. Функциональная гетерогенность макрофагов ассоциирована с их локализацией в разных морфологических зонах селезенки. Некоторые функции макрофагов селезенки кажутся удивительными. Это касается, прежде всего, функций моноцитарно-макрофагальной системы селезенки, которые, казалось бы, уникальны, однако после спленэктомии отсутствуют фатальные последствия. Одна из таких функций селезенки — функция резервуара недифференцированных моноцитов. Именно эти клетки составляют значительную часть макрофагов в очагах воспаления и при репаративной регенерации. Последнее хорошо иллюстрировано при репарации инфаркта миокарда. Недифференцированные моноциты из селезенки дифференцируются в опухоль-ассоциированные макрофаги. Остается непонятным, почему моноциты субкапсулярной зоны остаются недифференцированными. Существует ли механизм ингибиции дифференцировки таких моноцитов в макрофаги *in situ*? Если существует, то имеет ли он значение в судьбе клеток карцином, попадающих в селезенку гематогенным путем?

Интересна функция макрофагов, несущих рецептор к ангиопоэтину-2 ($Tie2^+$ -моноцитов). Такие макрофаги обладают ангиогенными свойствами. В карциномах $Tie2^+$ -макрофаги инициируют ангиогенез и участвуют в интравазации опухолевых клеток.

Уникальна функция селезенки как единственного источника фермента тафтсинэндокарбокситидазы — обязательного участника “вырезки” из Fc-фрагмента иммуноглобулина олигопептида тафтсина, обеспечивающего заверченный фагоцитоз патогенов. Подавляющие инфекции после спленэктомии (OPSI) подчеркивают роль селезенки в элиминации патогенов как в самой селезенке, так и в очагах воспаления. Эта функция селезенки мало известна и во многом недооценивается.

Однако несмотря на присутствие в селезенке патогенов, которые могли бы играть роль флогенных факторов, не происходит ни развития воспаления, ни связанного с ним ангиогенеза. Обусловлено ли это механизмом, ингибирующим ангиогенные функции $Tie2^+$ -макрофагов? В связи с изучением роли экзосом опухолевых клеток в избирательной локализации метастазов, интересна способность $CD169^+$ -макрофагов поглощать экзосомы.

Ангиотензин-2 — олигопептидный гормон ответственный, с одной стороны, за накопление в селезенке ГС-клеток и предшественников макрофагов, а с другой — за рекрутирование моноцитов из селезенки, в частности в зону острого инфаркта миокарда. Поскольку концентрация ангиотензина-2 повышена

при остром и хроническом стрессе, любая хроническая патология, сопровождающаяся воспалением, репарацией и являющаяся стрессовым фактором, должна сопровождаться мобилизацией моноцитов из селезенки. Это относится и к карциномам. Значит ли это, что антистрессорная терапия могла бы уменьшать мобилизацию резервных моноцитов селезенки?

В селезенке несколько популяций макрофагов обладают иммуносупрессорной способностью. Это прежде всего MDSCs, которые ингибируют пролиферацию Т-клеток, продукцию IFN- γ , подавляют активность противоопухолевых Т-клеток в естественных условиях. Вопрос состоит в том, реализуют ли они иммуносупрессорные эффекты в селезенке или только депонируются в ней? Такой вопрос правомочен, поскольку есть информация о том, что MDSCs окончательно приобретают подавляющие функции при рекрутировании в очаги воспаления. В селезенке иммуносупрессия может, по-видимому, осуществляться CD169⁺-макрофагами, которые выполняют фагоцитоз клеток в состоянии апоптоза, что вызывает миграцию FoxP3⁺-Treg-лимфоцитов *in situ*. Это является важным звеном в развитии толерантности, индуцируемой клетками в состоянии апоптоза. У мышей F4/80^{hi}Mac-1^{low} макрофаги красной пульпы являются источниками противовоспалительных цитокинов TGF- β и IL-10, индуцируют дифференциацию Treg-лимфоцитов. Если крайняя редкость метастатического поражения селезенки, действительно, как предполагают некоторые исследователи, связана с иммунными реакциями, то либо иммуносупрессорное действие не эффективно, либо редкость метастазов в селезенке не связана с иммунной системой.

Таким образом, кроме утилизации стареющих эритроцитов и лейкоцитов, участия в метаболизме железа, фагоцитозе патогенов, развитии иммуногенеза, селезенка участвует в других важных процессах. Спленэктомия свидетельствует об избирательном ослаблении противоинфекционного иммунитета, увеличении частоты онкологических заболеваний (по некоторым данным). Однако многое в механизме эффектов гетерогенной популяции моноцитов и макрофагов селезенки остается неизученным и требует специальных исследований, особенно у людей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (НШ-2701.2020.7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит каких-либо исследований с использованием животных или людей в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., Климентьева Т.К. 2002. Тафтсин: роль в развитии негранулематозных и гранулематозных бактериозов. Бюлл. сибирской мед. Т. 1. № 3. С. 98. (Odintsov Y.N., Perelmutter V.M., Klimentyeva T.K. 2002. Taftsin: Role in the development of non-granulomatous and granulomatous bacteriosis. Bull. Siberian Med. V. 1. № 3. P. 98.)
- Перельмутер В.М., Одинцов, Ю.Н., Климентьева, Т.К. 2004. Тафтсин — естественный иммуномодулятор. Возможная роль в опухолевой прогрессии. Сибирский онкол. журн. № 4. С. 57. (Perelmutter V.M., Odintsov Y.N., Klimentyeva T.K. 2004. Taftsin is a natural immunomodulator. Possible role in tumor progression. Siberian J. Oncol. № 4. P. 57.)
- A-Gonzalez N., Castrillo A. 2018. Origin and specialization of splenic macrophages. Cell. Immunol. V. 330. P. 151. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.05.005>
- Assmus B., Iwasak M., Schächinger V., Roexe T., Koyanagi M., Iekushi K., Xu Q., Tonn T., Seifried E., Liebner S., Kranert W.T., Grünwald F., Dimmeler S., Zeiher A.M. 2012. Acute myocardial infarction activates progenitor cells and increases Wnt signalling in the bone marrow. Eur. Heart J. V. 33. P. 1911. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr388>
- Bellomo A., Mondor I., Spinelli L., Lagueyrie M., Stewart B.J., Brouilly N., Malissen B., Clatworthy M.R., Bajénoff M. 2020. Reticular fibroblasts expressing the transcription factor WT1 define a stromal niche that maintains and replenishes splenic red pulp macrophages. Immunity. V. 53. P. 127. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.008>
- Burger P., Hilarius-Stokman P., de Korte D., van den Berg T.K., van Bruggen R. 2012. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. Blood. V. 119. P. 5512. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-386805>
- Cadili A., de Gara C. 2008. Complications of splenectomy. Am. J. Med. V. 121. P. 371. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2008.02.014>
- Campanelli R., Fois G., Catarsi P., Poletto V., Villani L., Erba B.G., Maddaluno L., Jemos B., Salmoiraghi S., Guglielmelli P., Abbonante V., Di Buduo C.A., Balduini A., Iurlo A., Barosi G. et al. 2016. Tie2 expressing monocytes in the spleen of patients with primary myelofibrosis. PLoS One. V. 6. e0156990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156990>
- Cortez-Retamozo V., Eitzrodt M., Newton A., Rauch P.J., Chudnovskiy A., Berger C., Ryan R. J.-H., Iwamoto Y., Marinelli B., Gorbatov R., Forghani R., Novobrantseva T.I., Koteliansky V., Figueiredo J.-L., Chen J.W. et al. 2012. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 109. P. 2491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113744109>
- Cortez-Retamozo V., Eitzrodt M., Newton A., Ryan R., Pucci F., Sio S.W., Kuswanto W., Rauch P. J., Chudnovskiy A., Iwamoto Y., Kohler R., Marinelli B., Gorbatov R., Wojtkiewicz G., Panizzi P. et al. 2013. Angiotensin II drives the production

- of tumor-promoting macrophages. *Immunity*. V. 38. P. 296.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.015>
- De Jesus M., Park C.G., Su Y., Goldman D.L., Steinman R.M., Casadevall A. 2008. Spleen deposition of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan in rodents occurs in red pulp macrophages and not marginal zone macrophages expressing the C-type lectin SIGN-R1. *Med. Mycol.* V. 46. P. 153.
<https://doi.org/10.1080/13693780701747182>
- Den Haan J.M.M., Kraal G. 2012. Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *Innate Immun.* V. 4. P. 437–445.
<https://doi.org/10.1159/000335216>
- Dudziak D., Kamphorst A.O., Heidkamp G.F., Buchholz V.R., Trumpheller C., Yamazaki S., Cheong C., Liu K., Lee H.W., Park C.G., Steinman R.M., Nussenzweig M.C. 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets *in vivo*. *Science*. V. 315. P. 107.
<https://doi.org/10.1126/science.1136080>
- Dutta P., Courties G., Wei Y., Leuschner F., Gorbатов R., Robbins C.S., Iwamoto Y., Thompson B., Carlson A.L., Heidt T., Majumdar M.D., Lasitschka F., Etzrodt M., Waterman P., Waring M.T. et al. 2012. Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature*. V. 487. P. 325.
<https://doi.org/10.1038/nature11260>
- Dutta P., Hoyer F.F., Grigoryeva L.S., Sager H.B., Leuschner F., Courties G., Borodovsky A., Novobrantseva T., Ruda V.M., Fitzgerald K., Iwamoto Y., Wojtkiewicz G., Sun Y., Da Silva N., Libby P. et al. 2015. Macrophages retain hematopoietic stem cells in the spleen via VCAM-1. *Exp. Med.* V. 212. P. 497.
<https://doi.org/10.1084/jem.20141642>
- Emami H., Singh P., MacNabb M., Vucic E., Lavender Z., Rudd J. -H.F., Fayad Z.A., Graiwer J.L., Korsgren M., Figueroa A.L., Fredrickson J., Rubin B., Hoffmann U., Truong Q.A. et al. 2015. Splenic metabolic activity predicts risk of future cardiovascular events: Demonstration of a cardio splenic axis in humans. *JACC Cardiovasc. Imaging*. V. 8. P. 121.
<https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2014.10.009>
- Gabrilovich D.I., Ostrand-Rosenberg S., Bronte V. 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* V. 12. P. 253.
<https://doi.org/10.1038/nri3175>
- Gatto D., Wood K., Caminschi I., Murphy-Durland D., Schofield P., Christ D., Karupiah G., Brink R. 2013. The chemotactic receptor EB12 regulates the homeostasis, localization and immunological function of splenic dendritic cells. *Nat. Immunol.* V. 14. P. 446.
<https://doi.org/10.1038/ni.2555>
- Gordon S., Plüddemann A. 2017. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol.* V. 15. P. 53.
<https://doi.org/10.1186/s12915-017-0392-4>
- Grabowska J., Lopez-Venegas M.A., Affandi A.J., den Haan J.M.M. 2018. CD169⁺ Macrophages capture and dendritic cells instruct: The interplay of the gatekeeper and the general of the immune system. *Front. Immunol.* V. 9. P. 2472.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02472>
- Gwyer Findlay E., Villegas-Mendez A., de Souza J.B., Inkson C.A., Shaw T.N., Saris C.J., Hunter C.A. 2013. IL-27 receptor signaling regulates CD4⁺ T cell chemotactic responses during infection. *J. Immunol.* V. 190. P. 4553.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202916>
- den Haan J.M.M., Kraal G. 2012. Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *J. Innate Immun.* V. 4. P. 437.
<https://doi.org/10.1159/000335216>
- Haldar M., Kohyama M., So A.Y., Kc W., Wu X., Briseño C.G., Satpathy A.T., Kretzer N.M., Rajasekaran N.S., Wang L., Egawa T., Igarashi K., Baltimore D., Murphy T.L., Murphy K.M. 2014. Heme-mediated SPI-C induction promotes monocyte differentiation into iron-recycling macrophages. *Cell*. V. 156. P. 1223.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.069>
- Hashimoto D., Chow A., Noizat C., Teo P., Beasley M.B., Leboeuf M., Becker C.D., See P., Price J., Lucas D., Greter M., Mortha A., Boyer S.W., Forsberg E.C., Tanaka M. et al. 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. V. 38. P. 792.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>
- Haverkamp J.M., Crist S.A., Elzey B.D., Cimen C., Ratliff T.L. 2011. *In vivo* suppressive function of myeloid derived suppressor cells is limited to the inflammatory site. *Eur. J. Immunol.* V. 41. P. 749.
<https://doi.org/10.1002/eji.201041069>
- Heusch G. 2019. The spleen in myocardial infarction. *Circ. Res.* V. 124. P. 26.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.314331>
- Honold L., Nahrendorf M. 2018. Resident and monocyte-derived macrophages in cardiovascular disease. *Circ. Res.* V. 122. P. 113.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311071>
- Ismahil M.A., Hamid T., Bansal S.S., Patel B., Kingery J.R., Prabhu S.D. 2014. Remodeling of the mononuclear phagocyte network underlies chronic inflammation and disease progression in heart failure: Critical importance of the cardio-splenic axis. *Circ. Res.* V. 114. P. 266.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301720>
- Jaiswal S., Jamieson C.H., Pang W.W., Park C.Y., Chao M.P., Majeti R., Traver D., van Rooijen N., Weissman I.L. 2009. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*. V. 138. P. 271.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.046>
- Jung K., Kim P., Leuschner F., Gorbатов R., Kim J.K., Ueno T., Nahrendorf M., Yun S.H. 2013. Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infarcted mouse hearts. *Circ. Res.* V. 112. P. 891.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300484>
- Kabashima K., Banks T.A., Ansel K.M., Lu T.T., Ware C.F., Cyster J.G. 2005. Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity*. V. 22. P. 439.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.02.007>
- Kirby A.C., Beattie L., Maroof A., van Rooijen N., Kaye P.M. 2009. SIGNR1-negative red pulp macrophages protect against acute streptococcal sepsis after *Leishmania donovani*-induced loss of marginal zone macrophages. *Am. J. Pathol.* V. 175. P. 1107.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090258>
- Kohyama M., Ise W., Edelson B.T., Wilker P.R., Hildner K., Mejia C., Frazier W.A., Murphy K.M. Murphy T.L. 2009. Role

- for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature*. V. 457. P. 318. <https://doi.org/10.1038/nature07472>
- Kristiansen M., Graversen J.H., Jacobsen C., Sonne O., Hoffman H.J., Law S.K., Moestrup S.K. 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. V. 409. P. 198. <https://doi.org/10.1038/35051594>
- Kristinsson S.Y., Gridley G., Hoover R.N., Check D., Landgren O. 2014. Long-term risks after splenectomy among 8,149 cancer-free American veterans: A cohort study with up to 27 years follow-up. *Haematologica*. V. 99. P. 392. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.092460>
- Kurotaki D., Kon S., Bae K., Ito K., Matsui Y., Nakayama Y., Kanayama M., Kimura C., Narita Y., Nishimura T., Iwabuchi K., Mack M., van Rooijen N., Sakaguchi S., Uede T. et al. 2011. CSF-1-dependent red pulp macrophages regulate CD4 T cell responses. *J. Immunol*. V. 186. P. 2229. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001345>
- Kyaw T., Tay C., Krishnamurthi S., Kanellakis P., Agrotis A., Tipping P., Bobik A., Toh B.H. 2011. B1a B- lymphocytes are atheroprotective by secreting natural IgM that increases IgM deposits and reduces necrotic cores in atherosclerotic lesions. *Circ. Res*. V. 109. P. 830. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.248542>
- Laan A.V.D., Horst E.T., Delewi R., Begieneman M.P.V., Krijnen P.A.J., Hirsch A., Lavaei M., Nahrendorf M., Horrevoets A.J., Niessen H.W.M., Piek J.J. 2014. Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *Eur. Heart J*. V. 35. P. 376. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh331>
- Lavin Y., Mortha A., Rahman A., Merad M. 2015. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat. Rev. Immunol*. V. 15. P. 731. <https://doi.org/10.1038/nri3920>
- Lee S.C., Jeong H.J., Choi B.J., Kim S.J. 2015. Role of the spleen in liver regeneration in relation to transforming growth factor- β 1 and hepatocyte growth factor. *J. Surg. Res*. V. 196. P. 270. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2015.02.025>
- Leuschner F., Rauch P.J., Ueno T., Gorbatov R., Marinelli B., Lee W.W., Dutta P., Wei Y., Robbins C., Iwamoto Y., Sena B., Chudnovskiy A., Panizzi P., Keliher E., Higgins J.M. et al. 2012. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopenesis. *J. Exp. Med*. V. 209. P. 123. <https://doi.org/10.1084/jem.20111009>
- Lewis K.L., Caton M.L., Bogunovic M., Greter M., Grajkowska L.T., Ng D., Klinakis A., Charo I. F., Jung S., Gommerman J.L., Ivanov I.I., Liu K., Merad M., Reizis B. 2011. *Notch2* receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. *Immunity*. V. 35. P. 780. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.08.013>
- Li L., Duan M., Chen W., Jiang A., Li X., Yang J., Li Z. 2017. The spleen in liver cirrhosis: revisiting an old enemy with novel targets. *J. Transl. Med*. V. 15. P. 111. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1214-8>
- Libby P., Nahrendorf M., Swirski F.K. 2016. Leukocytes link local and systemic inflammation in ischemic cardiovascular disease: An expanded “cardiovascular continuum”. *J. Am. Coll. Cardiol*. V. 67. P. 1091. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.12.048>
- Martin-Jaular L., Ferrer M., Calvo M., Rosanas-Urgell A., Kalko S., Graewe S., Soria G., Cortadellas N., Ordi J., Planas A., Burns J., Heussler V., A del Portillo H. 2011. Strain-specific spleen remodelling in *Plasmodium yoelii* infections in Balb/c mice facilitates adherence and spleen macrophage-clearance escape. *Cell. Microbiol*. V. 13. P. 109. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01523.x>
- Massa M., Rosti V., Ferrario M., Campanelli R., Ramajoli I., Rosso R., De Ferrari G.M., Ferlini M., Goffredo L., Bertolotti A., Klersy C., Pecci A., Moratti R., Tavazzi L. 2005. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood*. V. 105. P. 199. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-1831>
- McGaha T.L., Chen Y., Ravishankar B., van Rooijen N., Karlsson M.C.I. 2011. Marginal zone macrophages suppress innate and adaptive immunity to apoptotic cells in the spleen. *Blood*. V. 117. P. 5403. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-320028>
- Miyake Y., Asano K., Kaise H., Uemura M., Nakayama M., Tanaka M. 2007. Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *J. Clin. Invest*. V. 117. P. 2268. <https://doi.org/10.1172/JCI31990>
- Murata K., Shiraki K., Sugimoto K., Takase K., Nakano T., Furusaka A., Tameda Y. 2001. Splenectomy enhances liver regeneration through tumor necrosis factor (TNF)- α following dimethylnitrosamine-induced cirrhotic rat model. *Hepato-gastroenterol*. V. 48. P. 1022.
- Nagelkerke S.Q., Bruggeman C.W., den Haan J.M.M., Mul E.P.J., van den Berg T.K., van Bruggen R., Kuijpers T.W. 2018. Red pulp macrophages in the human spleen are a distinct cell population with a unique expression of Fc- γ receptors. *Blood Adv*. V. 2. P. 941. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017015008>
- Nahrendorf M., Swirski F.K., Aikawa E., Stangenberg L., Wurdinger T., Figueiredo J.L., Libby P., Weissleder R., Pittet M.J. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med*. V. 204. P. 3037. <https://doi.org/10.1084/jem.20070885>
- Pirgova G., Chauveau A., MacLean A.J., Cyster J.G., Arnon T.I. 2020. Marginal zone SIGN-R1⁺ macrophages are essential for the maturation of germinal center B cells in the spleen. *PNAS*. V. 117. P. 12295. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921673117>
- Peet C., Ivetic A., Bromage D.I., Shah A.M. 2020. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res*. V. 116. P. 1101. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz336>
- Perez O.A., Yeung S.T., Vera-Licona P., Romagnoli P.A., Samji T., Ural B.B., Maher L., Tanaka M., Khanna K.M. 2017. CD169(+) macrophages orchestrate innate immune responses by regulating bacterial localization in the spleen. *Sci. Immunol*. V. 2. P. 5520. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aah5520>
- Pucci F., Garris C., Lai C.P., Newton A., Pfirschke C., Engblom C., Alvarez D., Sprachman M., Evavold C., Magnuson A., von Andrian U.H., Glatz K., Brakefield X.O., Mempel T.R., Weissleder R. et al. 2016. SCS macrophages suppress melanoma by restricting tumor-derived vesicle-B cell interac-

- tions. *Science*. V. 352. P. 242.
<https://doi.org/10.1126/science.aaf1328>
- Qian B.Z., Pollard J.W. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. V. 141. P. 39.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>
- Ravishankar B., Shinde R., Liu H., Chaudhary K., Bradley J., Lemos H.P., Chandler P., Tanaka M., Munn D.H., Mello A.L., McGaha T.L. 2014. Marginal zone CD169+ macrophages coordinate apoptotic cell-driven cellular recruitment and tolerance. *PNAS*. V. 111. P. 4215.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1320924111>
- Recalcati S., Locati M., Gammella E., Invernizzi P., Cairo G. 2012. Iron levels in polarized macrophages: Regulation of immunity and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* V. 11. P. 883.
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.03.003>
- Robbins C.S., Chudnovskiy A., Rauch P.J., Figueiredo J.-L., Iwamoto Y., Gorbatov R., Etzrodt M., Weber G.F., Ueno T., van Rooijen N., Mulligan-Kehoe M.J., Libby P., Nahrendorf M., Pittet M.J., Weissleder R. et al. 2012. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C^{high} monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation*. V. 125. P. 364.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.061986>
- Salcedo S.P., Noursadeghi M., Cohen J., Holden D.W. 2001. Intracellular replication of *Salmonella typhimurium* strains in specific subsets of splenic macrophages *in vivo*. *Cell. Microbiol.* V. 3. P. 587.
<https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00137.x>
- Sancho D., Joffre O.P., Keller A.M., Rogers N.C., Martinez D., Hernanz-Falcon P., Rosewell I., Reis e Sousa C. 2009. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature*. V. 458. P. 899.
<https://doi.org/10.1038/nature07750>
- Schulz C., Perdiguero E.G., Chorro L., Szabo-Rogers H., Cagnard N., Kierdorf K., Prinz M., Wu B., Jacobsen S.E., Pollard J.W., Frampton J., Liu K.J., Geissmann F. 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*. V. 336. P. 86.
<https://doi.org/10.1126/science.1219179>
- da Silva H.B., Fonseca R., dos Anjos Cassado A., de Salles E.M., de Menezes M.N., Langhorne J., Perez K.R., Cuccovia I.M., Ryffel B., Barreto V.M., Marinho F.C.-R., Boscardin S.-B., Alvarez J.-M., D'Imperio-Lima M.-R., Tadokoro C.-E. 2015. *In vivo* approaches reveal a key role for DCs in CD4+ T cell activation and parasite clearance during the acute phase of experimental blood-stage malaria. *PLoS Pathog.* V. 11. P. 24.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004598>
- Steiniger B., Barth P., Hellinger A. 2001. The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp. Do fibroblasts guide lymphocyte immigration? *Am. J. Pathol.* V. 159. P. 501.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61722-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61722-1)
- Steiniger B.S., Seiler A., Lampp K., Wilhelmi V., Stachniss V. 2014. B lymphocyte compartments in the human splenic red pulp: capillary sheaths and periarteriolar regions. *Histochem. Cell Biol.* V. 141. P. 507.
<https://doi.org/10.1007/s00418-013-1172-z>
- Sun L.M., Chen H.J., Jeng L.B., Li T.C., Wu S.C., Kao C.H. 2015. Splenectomy and increased subsequent cancer risk: A nationwide population-based cohort study. *Am. J. Surg.* V. 210. P. 243.
<https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2015.01.017>
- Swirski F.K., Nahrendorf M., Etzrodt M., Wildgruber M., Cortez-Retamozo V., Panizzi P., Figueiredo J.-L., Kohler R.H., Chudnovskiy A., Waterman P., Aikawa E., Mempel T.R., Libby P., Weissleder R., Pittet M.J. 2009. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. V. 325. P. 612.
<https://doi.org/10.1126/science.1175202>
- Tian Y., Miao B., Charles E.J., Wu D., Kron I.L., French B.A., Yang Z. 2018. Stimulation of the beta2 adrenergic receptor at reperfusion limits myocardial reperfusion injury via an interleukin-10-dependent antiinflammatory pathway in the spleen. *Circ. J.* V. 82. P. 2829.
<https://doi.org/10.1253/circj.CJ-18-006>
- Wang M., Subramanian M., Abramowicz S., Murphy A.J., Gonen A., Witztum J., Welch C., Tabas I., Westerterp M., Tall A.R. 2014. Interleukin-3/granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor promotes stem cell expansion, monocytosis, and atheroma macrophage burden in mice with hematopoietic ApoE deficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* V. 34. P. 976.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.303097>
- Wu C., Ning H., Liu M., Lin J., Luo S., Zhu W., Xu J., Wu W.-C., Liang J., Shao C.-K., Ren J., Wei B., Cui J., Chen M.-S., Zheng L. 2018. Spleen mediates a distinct hematopoietic progenitor response supporting tumor-promoting myelopoiesis. *J. Clin. Invest.* V. 128. P. 3425.
<https://doi.org/10.1172/JCI97973>
- Yamada S., Morine Y., Imura S., Ikemoto T., Arakawa Y., Iwahashi S., Saito Y., Yoshikawa M., Teraoku H., Shimada M. 2016. Liver regeneration after splenectomy in patients with liver cirrhosis. *Hepatol. Res.* V. 46. P. 443.
<https://doi.org/10.1111/hepr.12573>
- Yona S., Kim K.W., Wolf Y., Mildner A., Varol D., Breker M., Strauss-Ayali D., Viukov S., Guillemins M., Misharin A., Hume D.A., Perlman H., Malissen B., Zelzer E., Jung S. 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. V. 38. P. 1073.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>

Spleen Macrophages: Features of Population Composition and Function

E. S. Andryuhova^{a, *}, L. A. Tashireva^a, S. V. Vtorushin^{a, b}, M. V. Zavyalova^{a, b}, and V. M. Perelmuter^a

^aCancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634009 Russia

^bSiberian State Medical University, Tomsk, 634055 Russia

*e-mail: elenasergeevna9607@gmail.com

The heterogeneous population of spleen macrophages perform many important functions. However, most of the research in this field has been done on experimental models and much remains have been understood not fully. The

review summarizes data about characteristics of human and animal macrophages in various functional areas of the spleen. The role of spleen macrophages in the utilization of senescent erythrocytes, iron metabolism, immunogenesis, immunosuppression and elimination of apoptotic cells, phagocytosis of hematogenically spreading pathogens and the role of tuftsin in this process, the role of the spleen as a reservoir of monocytes involved in inflammation and regeneration are discussed. An attempt was made to find data on the possible role of spleen macrophages in the phenomenon of the rarity spleen metastases during cancer progression.

Keywords: macrophages, spleen, splenectomy, repair, carcinomas

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ микроРНК В КЛЕТКАХ МЕЛАНОМЫ, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ДЕЙСТВИЮ ДАКАРБАЗИНА

© 2022 г. И. С. Зинченко¹, Н. В. Палкина¹, Т. Г. Рукша¹, *

¹Кафедра патологической физиологии им. профессора В.В. Иванова Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ, Красноярск, 660022 Россия

*E-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Поступила в редакцию 25.09.2021 г.

После доработки 22.10.2021 г.

Принята к публикации 01.11.2021 г.

Одним из компонентов опухолевой прогрессии меланомы кожи является формирование лекарственной устойчивости. Химиотерапевтические средства способны влиять на клеточный цикл, репарацию ДНК, в том числе посредством реализации эпигенетических механизмов с участием микроРНК, представляющих собой малые некодирующие молекулы РНК длиной 18–25 нуклеотидов. Они способны осуществлять регуляцию возникновения и развития опухоли, изменяя экспрессию генов различных сигнальных каскадов. В этой связи, цель нашего исследования заключалась в определении профиля микроРНК и распределения клеток меланомы по фазам клеточного цикла при воздействии химиотерапевтическим агентом дакарбазином с последующим биоинформатическим анализом профиля микроРНК, опосредующих развитие химиорезистентности. Для решения этой задачи использовали клеточную линию BRO, в которой после воздействия дакарбазином оценивали профиль микроРНК при помощи микрочипирования и определяли распределение клеток по фазам клеточного цикла на основе проточной цитометрии. Статистическую значимость данных анализа профиля микроРНК рассчитывали методом дисперсионного анализа (ANOVA), а для коррекции уровней значимости различий использовали метод множественного сравнения Бенджамини–Хохберга с использованием коэффициента ложного обнаружения FDR, остальные эксперименты оценивали по *U*-критерию Манна–Уитни. Результаты показали, что под воздействием дакарбазина увеличивается доля жизнеспособных опухолевых клеток линии BRO в фазе митоза, а также изменяется экспрессия ряда микроРНК. Согласно проведенному биоинформатическому анализу, эти микроРНК принимают участие в механизмах передачи сигнала, относящихся исключительно к канцерогенезу и имеют ключевое значение в патогенезе меланомы.

Ключевые слова: меланома, микроРНК, miR-204-5p, miR-146a-5p, микрочипирование, клеточный цикл, дакарбазин, химиорезистентность

DOI: 10.31857/S0041377122010114

Развитие злокачественных новообразований включает многочисленные генетические и эпигенетические изменения, принципы организации которых остаются до сих пор малопонятными (Powers et al., 2016), а изменение уровней и активности различных молекул микроРНК является одним из характерных эпигенетических явлений этого процесса (Fabbri et al., 2013). МикроРНК относятся к классу малых некодирующих РНК, каноническая функция которых заключается в регуляции экспрессии генов посредством связывания с целевой мРНК, приводя к последующей деградациии последней и ингибированию трансляции. Синтез микроРНК начинается в ядре клетки, где образуется первичный транскрипт, прай-микроРНК, из которого впоследствии под воздействием нуклеазы-РНКазы III типа формируются шпилеподобные структуры размером 60–70 нуклеотидов, связывающиеся с белком экспортином и транслоцирующиеся в цитоплазму. Фермент Dicer

образует ассиметричный дуплекс микроРНК: микроРНК, который взаимодействует с РНК-индуцированным комплексом выключения гена (комплексом RISC), в результате чего одна часть дуплекса становится зрелой, функционально активной микроРНК.

Один вид микроРНК может регулировать экспрессию нескольких сотен генов. МикроРНК характеризуются высокой стабильностью, а также специфичностью профиля экспрессии в отдельных типах тканей и клеток (Ha et al., 2014). Эти молекулы выполняют как онкогенную, так и онкосупрессорную функцию в канцерогенезе (Zhang et al., 2007). Одной из микроРНК, изменение уровня которой показано при меланоме, является miR-204-5p (Galasso et al., 2018). Ранее нами было установлено, что данная микроРНК функционирует в клетках меланомы как онкосупрессор, регулируя интенсивность пролифе-

рации и миграции клеток. В частности, снижение уровня miR-204-5p в клетках меланомы приводит к снижению уровня пролиферации и усилению миграции клеток меланомы (Palkina et al., 2018). Помимо этого, показано, что изменение уровня этой микроРНК посредством введения как имитатора (синтетического специфического аналога), так и ингибитора, вызывает увеличение доли клеток меланомы, находящихся в фазе G₁ клеточного цикла и снижает долю клеток, находящихся в фазах S и G₂. Эти данные согласуются с другими исследованиями в отношении функционирования miR-204-5p в опухолевых клетках.

Например, было установлено, что эктопическая экспрессия микроРНК miR-204-5p вызывает снижение миграции и инвазии клеток рака молочной железы (Toda et al., 2018). Экспрессия miR-204-5p негативно коррелировала с объемом опухоли, развитием метастазирования при немелкоклеточном раке легкого (Xia et al., 2014). А при плоскоклеточном раке кожи наблюдается значительное снижение miR-204-5p по сравнению с актиническим кератозом – хроническим предраковым заболеванием кожи, возникающем под воздействием ультрафиолетового излучения (Toll et al., 2016). Показано участие miR-204-5p, а также miR-211, относящейся к этому же семейству, в реализации резистентности клеток меланомы к селективному ингибитору BRAFV600E вемурафенибу посредством воздействия на компоненты сигнального каскада ERK, изменении синтеза меланина и функционирования меланосом. Меланин обладает фотопротекторными свойствами, но в меланосомах, помимо его синтеза, происходит секвестрация противоопухолевых агентов с последующей элиминацией их опухолевыми клетками, что вносит вклад в развитие лекарственной резистентности (Башмакова и др., 2015; Vitiello et al., 2017).

Было предположено несколько механизмов, посредством которых возможна реализация эффектов микроРНК miR-204-5p в опухолевых клетках. В частности, было показано, что miR-204-5p комплементарно связывается с белком HMGB1 (амфотерином), который, в свою очередь, обладает способностью взаимодействовать с ДНК и транскрипционными факторами, регулируя структуру и функцию хромосом. При этом функционирование HMGB1 в качестве мишени miR-204-5p было подтверждено люциферазным тестом, а модуляция уровня этой микроРНК вызывала HMGB1-опосредованное изменение пролиферации и миграции клеток рака щитовидной железы (Lin et al., 2020). Кроме этого, ранее нами было установлено, что одним из генов-мишеней miR-204-5p является транскрипционный фактор FOXC1, который входит в семейство транскрипционных факторов “Forkhead box” (FOX) и который способен менять динамику клеточного цикла, участвуя во внутриклеточном сигнальном пути PI3K/AKT и регулируя при этом экспрессию бел-

ков-циклинов. С помощью репортерного люциферазного анализа установлено, что воздействие имитатора miR-204-5p вызывает репрессию люциферазной активности в клетках с этой конструкцией, что указывает на прямое регуляторное воздействие miR-204-5p на мРНК гена *FOXC1* посредством взаимодействия с ее 3'-нетранслируемой областью (Дубовцева и др., 2021).

Одним из механизмов прогрессии злокачественных новообразований является развитие лекарственной устойчивости клеток к противоопухолевым средствам – невосприимчивости к лекарственным препаратам разного химического строения и механизма действия, в основе которой могут лежать эпигенетические модификации (Housman et al., 2014). В свою очередь, известно, что посредством реализации эпигенетических механизмов противоопухолевые средства могут влиять на прогрессию клеточного цикла (Yang et al., 2021).

В этой связи, цель настоящего исследования заключалась в определении изменений профиля микроРНК в клетках меланомы, резистентных к действию дакарбазина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточная линия BRO и культивирование. Клетки меланомы линии BRO были предоставлены Научно-исследовательским институтом фундаментальной и клинической иммунологии (Новосибирск, Россия); клетки были получены из беспиgmentной меланомы лица мужского пола 34 лет в 1985 г. Клетки культивировали в питательной среде RPMI-1640 с L-глутамином, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и противомикробный комплекс антибиотик-антимикотик в условиях CO₂-инкубатора MSO-5AC (Sanyo Electric Co. Ltd., Япония) при температуре 37°C и концентрации углекислого газа 5%. Эксперименты на клетках проводили после предварительного культивирования в течение трех-пяти пассажей. Исследование было выполнено после согласования с Локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета (протокол № 92/2019 от 25 октября 2019 г.).

Определение IC₅₀ для дакарбазина. Концентрацию, при которой погибает 50% клеток (IC₅₀), проводили колориметрическим методом на основе определения оптической плотности формазана, являющегося продуктом метаболизма 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) как было описано ранее (Komina et al., 2019). Оптическую плотность определяли на спектрофотометре Anthos 2010 ELISA (Biochrom Ltd, Англия) с использованием фильтров 495 и 620 нм с нормированием по чистому раствору DMSO (растворителя формазана). Значение определяемой оптической плотности считали соответствующим значению жизнеспособности клеток (усл. ед.). Полумаксимальную ингиби-

рующую концентрацию дакарбазина рассчитывали с помощью программы Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). В дальнейшем клетки линии BRO высевали в 6-луночные планшеты или культуральные флаконы объемом 25 см², по достижении плотности клеток 80–90% вносили стоковый раствор дакарбазина в DMSO в концентрации, соответствующей $1 \times IC_{50}$. В контроли вместо раствора дакарбазина добавляли DMSO в конечной концентрации 1%. Клетки культивировали 72 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе, после чего культуральную среду заменяли на свежую и культивировали еще 48 ч, а затем клетки трансфицировали имитатором микроРНК miR-204-5p – hsa-miR-204-5p-mimic (последовательность зрелой микроРНК: UUUUUUUUGUCAUCCUAUGCCU). Трансфекцию имитатора микроРНК осуществляли по протоколу, описанному нами ранее (Palkina et al., 2018). Эксперименты выполняли в трех технологических повторах.

Проточная цитометрия и распределение клеток по фазам клеточного цикла. Для определения доли клеток меланомы, находящихся в G₀-фазе клеточного цикла, использовали метод проточной цитометрии. С этой целью клетки линии BRO открепляли от поверхности культуральной емкости при помощи 0.25%-ного раствора Трипсин-ЭДТА, промывали фосфатным буфером и фиксировали 10%-ным раствором формальдегида в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее при помощи 0.1% -ного раствора Тритона X-100 пермеабелизовали клеточные мембраны для проникновения красителей в ядро и другие внутриклеточные структуры, после чего клетки несколько раз промывали фосфатным буфером, а затем инкубировали с антителами к маркеру пролиферации Ki-67, конъюгированными с флуоресцеиновой меткой (FITC) в разведении 1 : 100 в присутствии 10% FBS в течение 4 ч при комнатной температуре. После инкубации клетки снова промывали фосфатным буфером и окрашивали йодидом пропидия (PI) в концентрации 100 мкг/мл в течение 20 мин. Суспензии окрашенных клеток анализировали на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, Inc., США) с использованием лазерного модуля, излучающего в синем спектре (488 нм). Полученные цитометрические результаты обрабатывали с помощью программных продуктов Navios Software v. 1.2 и Kaluza v. 2.1.1 (Beckman Coulter, Inc., США). Гейтинг клеток на разных стадиях клеточного цикла проводили в логарифмическом режиме. Клетки в G₀-фазе определяли как Ki-67-отрицательные и имеющие низкие уровни флуоресценции по PI (в интервале 0.7–1.3 отн. ед.). Эксперимент выполняли в трех технологических повторах.

ПЦР в реальном времени. Выделение РНК из клеток проводили с помощью набора реагентов, предназначенных для выделения тотальной РНК из культур клеток diaGene (ДиаЭм, Москва, РФ). Для определения уровней экспрессии микроРНК прово-

дили реакцию обратной транскрипции с использованием набора MMLV RT. Для этого каждый образец, состоящий из 3 мкл раствора РНК, содержащего 1.5 мкл 5× праймеров из соответствующего набора микроРНК для исследования экспрессии микроРНК miR-204-5p и miR-4286, а также 1.5 мкл случайных праймеров, входящих в набор MMLV RT, нагревали в термостате при 70°C в течение 2 мин и охлаждали на льду. Затем к образцу добавляли 5.5 мкл реакционной смеси, состоящей из 1 мкл смеси dNTP, 1 мкл DTT (1,4-дителиотреитола), 2 мкл 5-кратного стандартного буфера, 0.5 мкл обратной транскриптазы MMLV и 1 мкл воды без нуклеаз, инкубировали в термостате при 37°C в течение 50 мин, а затем реакцию останавливали, нагревая образцы в течение 10 мин при 70°C. Амплификацию полученной кДНК в количестве 2 мкл на каждый образец выполняли на основе ПЦР с детекцией в режиме реального времени с использованием амплификатора StepOne™ (Applied Biosystems, Сингапур) с протоколом термоциклирования: 50°C – 2 мин, 95°C – 10 мин, затем 40 циклов 95°C – 15 с, 60°C – 1 мин. Реакционная смесь для каждой реакции по определению экспрессии микроРНК в общем объеме 18 мкл состояла из 1 мкл 20× праймеров TaqMan™ Gene Expression Assay и TaqMan™ MicroRNA & Non-coding RNA Assays, 8 мкл 2.5-кратной реакционной смеси для ПЦР в присутствии ROX и 9 мкл безнуклеазной воды. В качестве эндогенного нормализующего контроля использовали U6 snRNA и RNU6B snRNA (№ 001973 и 001093 соответственно; Applied Biosystems, США). Данные анализировали с использованием метода $\Delta\Delta Ct$ (Livak, Schmittgen, 2001). Исследование было проведено в трех технологических повторениях.

Микрочипирование с целью определения профиля микроРНК. Анализ профиля микроРНК выполняли с использованием системы GeneAtlas Microarray System (Affymetrix, Санта-Клара, США). Выделение тотальной РНК с целью изучения транскриптома осуществляли с использованием набора Affymetrix Flash Tag™ Biotin HSR в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию полученной РНК и степень чистоты образцов определяли на приборе Qubit® 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Сингапур). Для анализа каждого образца использовали 100 нг общей РНК. Гибридизацию на чипе Affymetrix miRNA 4.1 Array Strip (Thermo Fisher Scientific, Сингапур) проводили с использованием набора реагентов Gene Chip Gene Atlas Hybridization, Wash and Stain Module (Affymetrix, Санта-Клара, США) при 48°C в течение 20 ч, затем чипы промывали и регистрировали флуоресцентные сигналы на станциях Gene Atlas Fluidic Station и Gene Atlas Imaging Station (Affymetrix, Санта-Клара, США). Обработку результатов проводили с помощью программы Transcriptome Analysis Console 4.0.1 (Thermo Fisher Scientific, США). Отбор дифференциально-экспрессируемых микроРНК, которые далее были сгруппированы в

Таблица 1. Распределение клеток меланомы BRO по фазам клеточного цикла после действия дакарбазина и трансфекции hsa-miR-204-5p-mimic (имитатора miR-204-5p)

Фаза клеточного цикла	Доля клеток после воздействия, %		
	нет (контроль)	дакарбазина	дакарбазина и трансфекция
G ₀	17.4 ± 3.8	6.5 ± 1.1 ^a	4.6 ± 2.5
G ₁	42.3 ± 7.6	42.0 ± 6.3	56.5 ± 8.6 ^b
S	21.3 ± 1.4	24.3 ± 3.2	18.8 ± 1.8
G ₂	14.9 ± 5.8	14.1 ± 8.3	10.3 ± 2.2
M	4.5 ± 1.2	13.1 ± 3.9 ^a	9.2 ± 4.5

Примечание. Различия достоверны при $p \leq 0.05$ по сравнению с соответствующей фазой в контроле (^a) и по сравнению с соответствующей фазой для клеток, подвергнутых действию только дакарбазина (^b).

соответствии с категориями функций, выполняемых в клетках, проводили на основе значений уровня статистической значимости $p < 0.05$ с использованием коэффициента ложного обнаружения FDR (Storey, Tibshirani, 2003), а также значения кратности различий, равного значению 2 и более.

Статистический анализ. Использовали программный пакет статистического анализа Statistica 7.0 (StatSoft, Россия). Статистическую значимость данных анализа профиля микроРНК рассчитывали методом дисперсионного анализа (ANOVA), а для коррекции уровней значимости различий использовали метод множественного сравнения Бенджамини–Хохберга с использованием коэффициента ложного обнаружения FDR, остальные эксперименты рассчитывали по *U*-критерию Манна–Уитни, результаты считали значимыми при $p < 0.05$. В биоинформатическом анализе пороговые значения определяли с использованием точного критерия Фишера при уровне значимости $p \leq 0.05$. Данные представлены как средние и стандартные ошибки среднего ($M \pm m$).

Использованные реактивы. RPMI-1640 с L-глутамином (ПанЭко, Россия); FBS, антибиотик-антимикотик, hsa-miR-204-5p-mimic (№ 4464066, MC11116), Трипсин-ЭДТА (Gibco, ThermoFisher Scientific, США); дакарбазин (Sigma, США); фосфатный буфер (VWR International, LL AMRESCO, США); Triton X-100 (GERBU Biotechnik GmbH, Германия); антитела к Ki-67, конъюгированные с флуоресцеином (eBioscience, Invitrogen, США); иодид пропидия (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Нидерланды); diaGene (Диа-М, Россия); MMLV RT (Евроген, Россия); наборы для исследования экспрессии микроРНК miR-204-5p, miR-4286 (№ 4427975, Applied Biosystems, США); U6 snRNA и RNU6B snRNA (№ 001973 и 001093 Applied Biosystems, США); реакционная смесь для ПЦР в присутствии ROX (Syntol, Россия); Affymetrix Flash TagTM Biotin HSR (№ 901911, Thermo Fisher Scientific, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ клеточного цикла в клетках BRO после воздействия дакарбазином, трансфекции имитатора miR-204-5p. В клеточной линии BRO после воздействия дакарбазином показано снижение доли клеток в фазе G₀ клеточного цикла в сравнении с контролем в 2.7 раза, а также увеличение доли клеток в фазе M в 2.9 раза, тогда как процентное содержание клеток, находящихся в фазах G₁, S, G₂ оставалось без изменений. Клетки в M-фазе клеточного цикла дифференцировали от клеток, находящихся в фазах G₁, S, G₂ на основе интенсивности флуоресценции: в клетках, находящихся в фазе M, интенсивность флуоресценции Ki-67 возрастала в 10–15 раз, хотя, безусловно, для точной дифференцировки циклов эффективнее использовать анализ уровня нескольких белков. При трансфекции в клетки имитатора микроРНК miR-204-5p наблюдали увеличение доли клеток, находящихся в фазе G₁ клеточного цикла на 14 и 16% по сравнению с клетками BRO, подвергнутыми только воздействию дакарбазина и по сравнению с контролем соответственно (табл. 1).

Профилирование микроРНК в клетках BRO после воздействия дакарбазином, трансфекции имитатора miR-204-5p. Валидация результатов посредством ПЦР в реальном времени. При анализе результатов микрочипирования (MicroArray) выявлено 202 вида микроРНК, профиль экспрессии которых изменился после воздействия дакарбазином, а также при трансфекции имитатора микроРНК miR-204-5p. Иерархическая кластеризация продемонстрировала четкое разделение на кластеры, соответствующие трем исследованным группам (рис. 1). Результаты микрочипирования были переподтверждены посредством определения уровней двух микроРНК – miR-204-5p и miR-4286 во всех группах с помощью ПЦР в реальном времени (рис. 2, 3). Эти микроРНК были выбраны для валидации результатов микрочипирования, исходя из наличия различий в процентном содержании GC и количестве нуклеотидов в miR-204-5p и miR-4286: 45.5% и 22 нуклеотида, 64.7% и 17 нуклеотидов соответственно.

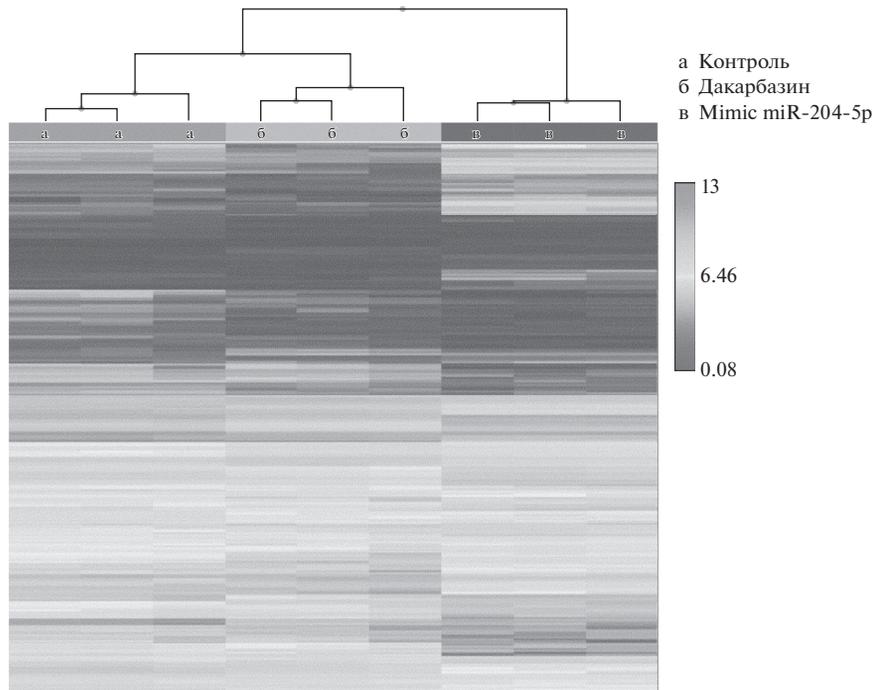


Рис. 1. Тепловая карта с отображением иерархической кластеризации микроРНК. а – В клетках меланомы BRO, б – после воздействия дакарбазина, в – после воздействия дакарбазином с последующей трансфекцией имитатора miR-204-5p (Mimic miR-204-5p).

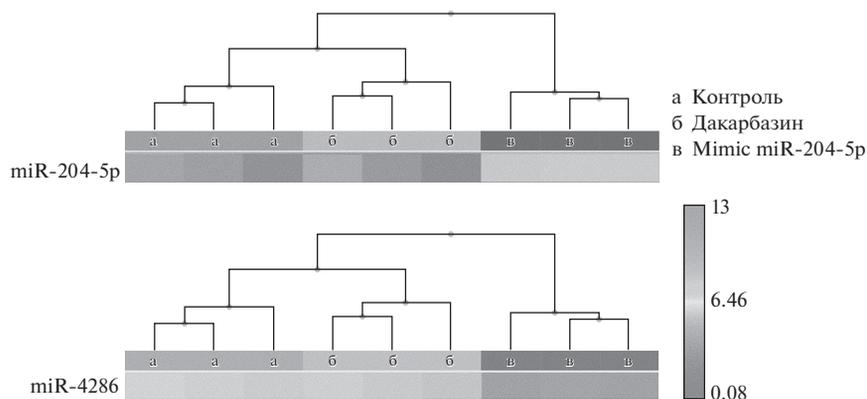


Рис. 2. Характер экспрессии микроРНК miR-204-5p (вверху) и miR-4286 (внизу) в клетках меланомы BRO после воздействия только дакарбазина и дакарбазина с последующей трансфекцией имитатора miR-204-5p (согласно методу MicroArray).

По результатам микрочипирования образцов, полученных после воздействия дакарбазина на клетки линии BRO, было зафиксировано изменение уровня 37 видов микроРНК по сравнению с контролем, среди которых имели повышенную экспрессию 8 видов, а пониженную – 29. К числу высокоэкспрессируемых микроРНК относились miR-320a, miR-30c-2-3p, miR-6871-5p. Среди микроРНК со сниженной экспрессией определялись miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-301a-3p, уровни которых была понижены в 6.4, 5.2 и 4.7 раза соответственно. К микроРНК, имеющим наибольшую величину показателя кратности

различий, можно отнести miR-320a, miR-30c-2-3p и miR-6871-5p, для которых выявили снижение экспрессии в 2.8, 2.7 и 2.7 раз соответственно. Все микроРНК с измененной экспрессией после воздействия дакарбазина на клетки линии BRO являлись зрелыми.

После воздействия дакарбазина на клетки линии BRO с последующей трансфекцией в них имитатора miR-204-5p определялось изменение экспрессии более чем в 2 раза у 152 видов микроРНК по отношению к контрольной группе, и 142 видов микроРНК по сравнению с профилем клеток, подвергнутых

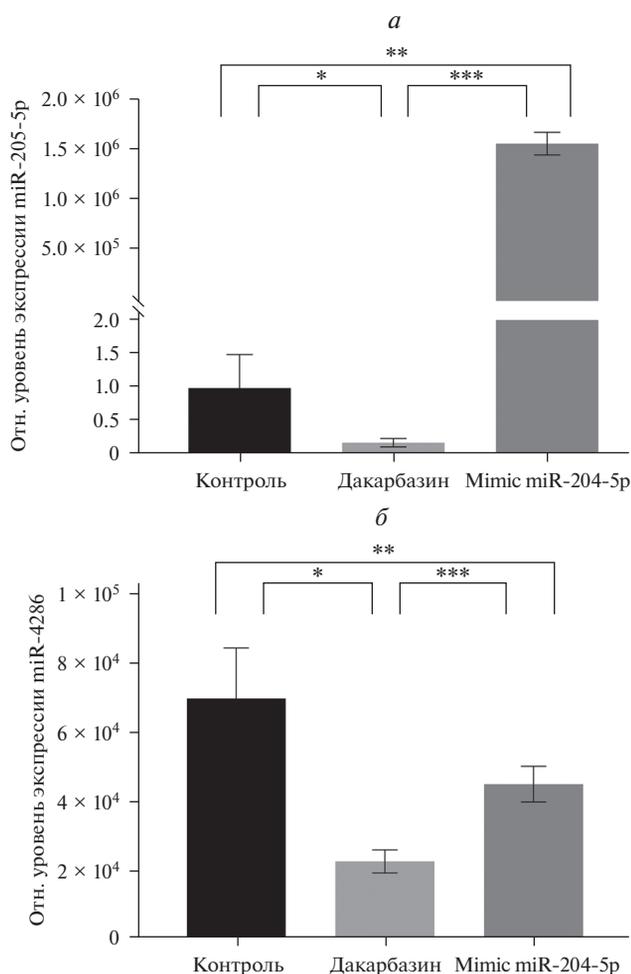


Рис. 3. Уровни экспрессии miR-204-5p (а) и miR-4286 (б) в клетках меланомы ВRO после воздействия дакарбазином и имитатора miR-204-5p, определяемые с помощью ПЦР в реальном времени. Обозначения те же, что и на рис. 1. Данные представлены как средние и их стандартные ошибки, различия достоверны при (*, **, ***) $p \leq 0.05$.

только влиянию дакарбазина. Уровни 54-х микроРНК были выше, чем в контрольной группе, и 82-х — выше в группе после воздействия дакарбазином. К высокоэкспрессируемым микроРНК по сравнению с контролем относились miR-204-5p, miR-483-5p и miR-1973, уровни которых были повышены в 98.6, 19.2 и 13.0 раз соответственно. К наиболее высокоэкспрессируемым микроРНК в клетках, подвергнутых воздействию дакарбазина с последующей трансфекцией имитатора miR-204-5p, по отношению к клеткам, подвергнутым только воздействию дакарбазина, относились miR-204-5p, miR-483-5p, miR-6723-5p, у которых регистрировали изменение экспрессии в 127.5, 21.0 и 13.6 раз соответственно. Из повышенных 54 видов микроРНК 5 микроРНК были незрелыми — это miR-3689b, miR-3689b, miR-4419a, miR-4539, miR-682, из 82 — 6 незрелых

микроРНК — это miR-3689b, miR-3689b, miR-4539, miR-6791, miR-6800, miR-6827.

После воздействия дакарбазином и имитатором miR-204-5p в профиле микроРНК выявляли снижение экспрессии 99 микроРНК по отношению к контрольной группе, 60 — по сравнению с клетками, подвергнутыми только воздействию дакарбазина. Минимальная экспрессия регистрировалась у микроРНК miR-7975, miR-18a-5p, miR-15a-5p. Снижение экспрессии по отношению к контролю составило 21.9, 21.6 и 15.4 раза соответственно. Наиболее низкая экспрессия в клетках после воздействия дакарбазина и трансфекции имитатора miR-204-5p по отношению к профилю клеток, подвергнутых только воздействию дакарбазина, отмечалась у микроРНК miR-7975, miR-6765-3p, miR-7977 со снижением в 17.1, 13.1 и 12.6 раз соответственно. Из 99 измененных микроРНК 7 микроРНК были незрелыми — miR-3150a, miR-3158-2, miR-3714, miR-4758, miR-4785, miR-6724 и miR-6819, из 60 микроРНК — 3: miR-3150a, miR-3714, miR-933.

Биоинформатический анализ результатов профилирования микроРНК. По результатам биоинформатического анализа на основе Киотской энциклопедии генов и геномов определено, что часть сигнальных путей, в которых регуляция генов осуществляют молекулы микроРНК с измененными профилями экспрессии, была однотипной во всех трех сравниваемых группах. К таким внутриклеточным сигнальным каскадам можно отнести PI3K/Akt, MAPK, “Сигнальные пути при раке” и Ras-путь. Напротив, в клетках меланомы после действия дакарбазина изменялась экспрессия совокупности микроРНК, участвующих в регуляции сигнальных каскадов “Нарушение транскрипции при раке” и “Протеогликаны при раке”, а после воздействия дакарбазина с последующей трансфекцией имитатора miR-204-5p — Rap1-путь и “Сигнальные пути, регулирующие плюрипотентность стволовых клеток” (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение клеточного цикла и профиля микроРНК в клеточной линии ВRO после воздействия дакарбазина. Эпигенетические изменения в опухолевых клетках наблюдаются на всех этапах канцерогенеза в равной степени, как и изменения микроРНК. В данной работе показано, что под воздействием дакарбазина в клеточной линии ВRO увеличивается доля жизнеспособных опухолевых клеток, находящихся в фазе М клеточного цикла, снижается доля G₀-положительных клеток. Согласно биоинформатическому анализу, увеличение доли клеток в фазе митоза сопряжено с увеличением уровня микроРНК, регулирующих механизмы внутриклеточной сигнализации и имеющие ключевое значение в патогенезе меланомы — “Сигнальные пути при раке”, путь PI3K-Akt, MAPK, Ras-сигнальный путь, а также “Нарушение транскрипции при раке”. Необходимо отметить,

Таблица 2. Сигнальные пути, регулируемые микроРНК, уровни которых изменялись в клетках меланомы BRO после действия дакарбазина и трансфекции hsa-miR-204-5p-mimic (имитатора miR-204-5p)

№	Сигнальный путь (signaling pathway), регулируемый микроРНК, уровень которой изменялся после воздействия дакарбазина	Число микроРНК с измененной экспрессией	Число генов, регулируемых измененными микроРНК	<i>p</i>
1	Сигнальные пути при раке (Pathways in cancer)	28	184	1.7680e-07
2	PI3K–Akt	28	153	6.3451e-05
3	MAPK	28	123	9.7119e-06
4	Ras	27	106	2.4041e-05
5	cAMP	26	89	0.0091
6	Эндоцитоз (Endocytosis)	25	103	2.2518e-05
7	Нарушение транскрипции при раке (Transcriptional misregulation in cancer)	25	80	0.0038
8	Дофаминергический синапс (Dopaminergic synapse)	25	61	0.0131
9	Протеогликаны при раке (Proteoglycans in cancer)	24	93	4.1801e-07
10	Вирусный канцерогенез (Viral carcinogenesis)	24	77	0.0053
Сигнальные пути, регулируемые микроРНК, уровни которых изменялись в клетках меланомы BRO после воздействия имитатором miR-204-5p				
1	PI3K–Akt	80	245	0.0014
2	Ras	80	172	0.0001
3	MAPK	79	186	0.0015
4	Сигнальные пути при раке	78	296	3.5794e-06
5	cAMP	78	148	0.0028
6	Neurotrophin	78	96	0.0006
7	cGMP–PKG	77	121	0.0172
8	Эндоцитоз	76	163	3.8380e-06
9	Фокальная адгезия (Focal adhesion)	76	162	2.3611e-05
10	Rap1	76	165	2.3611e-05
Сигнальные пути, регулируемые микроРНК, уровни которых изменялись в клетках меланомы BRO после воздействия дакарбазином и трансфекции имитатора miR-204-5p				
1	Ras	81	179	1.5860e-06
2	Сигнальные пути при раке	80	298	0.0001
3	PI3K–Akt	80	252	0.0004
4	Эндоцитоз	80	163	1.0054e-05
5	MAPK	79	191	0,0004
6	Rap1	78	172	4.3567e-07
7	Фокальная адгезия	78	166	5.4193e-06
8	cAMP	78	151	0.0015
9	Метаболизм холина при раке (Choline metabolism in cancer)	78	81	0.0023
10	Сигнальные пути, регулирующие плюрипотентность стволовых клеток (Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells)	77	115	9.8532e-06

Примечание. Названия сигнальных путей даны в соответствии с Киотской классификацией генов и геномов по ресурсу PANTER, некоторые из которых даны на английском языке (в скобках); *p* – уровень статистической значимости, рассчитанный методом дисперсионного анализа ANOVA.

что при воздействии на клетки линии BRO дакарбазина, уменьшались уровни miR-146a-5p и miR-21-5p.

Ранее нами было показано, что miR-146a-5p относится к наиболее высокоэкспрессируемым микроРНК в клетках меланомы по сравнению с клетками непораженной кожи (Aksenenko et al., 2019). Повышение данной микроРНК описано при различных злокачественных новообразованиях – трижды негативном раке молочной железы (Liang et al., 2019), раке желудка (Xiao et al., 2012) и раке щитовидной железы (Czajka et al., 2016). В клетках меланомы высокая экспрессия miR-146a-5p сопряжена с резистентностью к BRAF- и MEK-ингибиторам, а также связана с активацией провоспалительного внутриклеточного механизма передачи сигнала NF-kB (Vergani et al., 2020). Вместе с тем, в клетках гепатоцеллюлярной карциномы комбинированное применение ингибитора поли(АДФ-рибоза)-полимеразы и блокатора рецепторов андрогена вызывало снижение miR-146a-5p, нарушение BRCA1-опосредованной репарации ДНК с последующим повышением уровня апоптоза (Zhao et al., 2020). Таким образом, изменение уровня miR-146a-5p может быть ассоциировано с развитием химиорезистентности. Наряду с miR-146a-5, miR-21-5p также регулируется транскрипционным фактором NF-kB и имеет высокое число генов-мишеней, являющихся компонентами одноименного внутриклеточного сигнального каскада, незначительно экспрессируется в нормальных клетках, но экспрессируется повышено в опухолевых клетках (Olivieri et al., 2021).

Изменения профиля микроРНК в клеточной линии BRO после воздействия дакарбазином и последующей трансфекции имитатора микроРНК miR-204-5p. Интересно, что при трансфекции имитатора miR-204-5p в клетки линии BRO после воздействия дакарбазина, наблюдали повышение miR-483-5p по сравнению как с клетками контрольной группы, так и клетками, подвергнутыми воздействию дакарбазина. Функциональная активность miR-483-5p является менее изученной по сравнению с вышеуказанными молекулами. Вместе с тем, известно, что высокая экспрессия этой микроРНК ассоциируется с развитием химиорезистентности при эпителиальном раке яичников (Castro-Vega et al., 2020), а также с высокими уровнями миграции и инвазии клеток рака надпочечников (Agosta et al., 2018). Это может, по меньшей мере, свидетельствовать о роли этой микроРНК в канцерогенезе. Стоит также подчеркнуть, что трансфекция имитатора miR-204-5p вызывала изменение в профиле микроРНК незрелых форм данных молекул.

Необходимо отметить, что недавние исследования указывают на возможную регуляторную роль незрелых форм микроРНК, которые в контексте канцерогенеза также могут иметь проонкогенную, антионкогенную роль или быть амбивалентны по своей функции. Пре-микроРНК могут превращаться в две зрелые микроРНК, а последние могут вы-

полнять функцию, противоположную своему предшественнику (Chen et al., 2020). Точная роль незрелых микроРНК при этом требует разъяснения на основе механистических исследований в такой же мере, как и зрелых микроРНК.

Внутриклеточные сигнальные механизмы, компоненты которых регулируются микроРНК с измененной экспрессией, относятся исключительно к канцерогенезу и к изменениям, характерным для меланомы. В частности, внутриклеточный сигнальный каскад PI3K–Akt в норме регулирует процессы пролиферации, дифференцировки, апоптоза структурных элементов кожи, препятствует развитию апоптоза в меланоцитах, индуцированного окислительным стрессом (Teng et al., 2021). Активация PI3K–Akt достоверно связана с развитием меланомы посредством ряда механизмов, в том числе изменения динамики клеточного цикла (Broussard et al., 2018), что регистрировалось и в настоящей работе с помощью проточной цитометрии.

Стоит отметить, что после трансфекции имитатора микроРНК miR-204-5p в клетки, подвергнутые воздействию дакарбазина, отмечали изменение уровня микроРНК, регулирующих компоненты сигнального каскада Rap1. Rap1 (Ras-ассоциированный белок 1) относится к ГТФазам белкового семейства Ras и является регулятором и медиатором многочисленных функций белка. Кроме того, сообщается, что Rap1 регулирует процессы адгезии и считается одним из ключевых регуляторов подвижности, миграции клеток, что согласуется с выявленным нами ранее регуляторным влиянием miR-204-5p в клетках меланомы на эти процессы (Palkina et al., 2018; Shah et al., 2019). Помимо этого, в данной группе клеток отмечали изменение профиля микроРНК, регулирующих внутриклеточный путь “Сигнальные пути, регулирующие плюрипотентность стволовых клеток”. Предполагается, что наиболее резистентными к химиотерапии являются опухолевые клетки, которые в той или иной мере обладают характеристиками нормальных стволовых клеток (Phi et al., 2018).

МикроРНК miR-204-5p, согласно ряду исследований, определялась как онкосупрессор, поэтому в настоящей работе трансфекция ее имитатора была осуществлена в клетки линии BRO, резистентные к воздействию противоопухолевым препаратом. Выявленные изменения свидетельствуют, что действительно, в данном случае профиль микроРНК подвергается изменениям, соотносящимися с развитием химиорезистентности. Целенаправленное исследование профиля микроРНК резистентных опухолевых клеток с определением молекул-мишеней для изменения их фенотипа может рассматриваться как перспективный подход в экспериментальной онкологии для установления маркеров химиорезистентности и молекул-мишеней для таргетного воздействия на них.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00110).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Выполнение работы согласовано с Локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета (протокол № 92/2019 от 25 октября 2019 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Башимакова Е.Е., Красицкая В.В., Бондарь А.А., Козлова А.В., Рукша Т.Г., Франк Л.А. 2015. Выявление однонуклеотидных полиморфизмов (R160W, R151C, D294H) в гене рецептора меланокортина-1 (MC1R) биолюминесцентным анализом. Мол. биология. Т. 49. № 6. С. 953. (Bashmakova E.E., Krasitskaya V.V., Bondar A.A., Kozlova A.V., Ruksha T.G., Frank L.A. 2015. A bioluminescent assay for detecting melanocortin-1 receptor (MC1R) gene polymorphisms R160W, R151C, and D294H. Mol. Biol. V. 49. P. 852.)
- Дубовцева И.Ю., Аксененко М.Б., Николаева Е.Д., Аверчук А.С., Мошев А.В., Савченко А.А., Маркова С.В., Рукша Т.Г. 2021. FOXC1-опосредованное влияние микроРНК miR-204-5p на пролиферацию клеток меланомы. Мол. биология. Т. 55. № 4. С. 667. (Dubovtseva I.Y., Akseenenko M.B., Nikolaeva E.D., Averchuk A.S., Moshev A.V., Savchenko A.A., Markova S.V., Ruksha T.G. 2021. FOXC1-mediated effects of miR-204-5p on melanoma cell proliferation. Mol. Biol. V. 55. P. 667.)
- Agosta C., Laugier J., Guyon L., Denis J., Bertherat J., Libé R., Boisson B., Sturm N., Feige J.J., Chabre O., Cherradi N. 2018. MiR-483-5p and miR-139-5p promote aggressiveness by targeting N-myc downstream-regulated gene family members in adrenocortical cancer. Int. J. Cancer. V. 143. P. 944.
- Akseenenko M., Palkina N., Komina A., Tashireva L., Ruksha T. 2019. Differences in microRNA expression between melanoma and healthy adjacent skin. BMC Dermatol. V. 19. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12895-018-0081-1>
- Broussard L., Howland A., Ryu S., Song K., Norris D., Armstrong C.A., Song P.I. 2018. Melanoma Cell Death Mechanisms. Chonnam. Med. J. V. 54. P. 135.
- Castro-Vega L.J., Calsina B., Burnichon N., Drossart T., Martínez-Montes Á.M., Verkarre V., Amar L., Bertherat J., Rodríguez-Antona C., Favier J., Robledo M., Gimenez-Roqueplo A.P. 2020. Overexpression of miR-483-5p is confined to metastases and linked to high circulating levels in patients with metastatic pheochromocytoma/paraganglioma. Clin. Transl. Med. V. 10. P. e260. <https://doi.org/10.1002/ctm2.260>
- Chen L., Huang K., Yi K., Huang Y., Tian X., Kang C. 2020. Premature MicroRNA-Based Therapeutic: A “One-Two Punch” against Cancers. Cancers (Basel). V. 12. P. 3831. <https://doi.org/10.3390/cancers12123831>
- Czajka A.A., Wójcicka A., Kubiak A., Kotlarek M., Bakuła-Zalewska E., Koperski Ł., Wiechno W., Jażdżewski K. 2016. Family of microRNA-146 regulates RARβ in papillary thyroid carcinoma. PLoS One. V. 11. P. e0151968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151968>
- Fabbri M., Calore F., Paone A., Galli R., Calin G.A. 2013. Epigenetic regulation of miRNAs in cancer. Adv. Exp. Med. Biol. V. 754. P. 137.
- Galasso M., Morrison C., Minotti L., Corrà F., Zerbinati C., Agnoletto C., Baldassari F., Fassan M., Bartolazzi A., Vecchione A., Nuovo G.J., Di Leva G., D'Atri S., Alvino E. et al. 2018. Loss of miR-204 expression is a key event in melanoma. Mol. Cancer. V. 17. P. 71. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0819-8>
- Ha M., Kin V.N. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. V. 15. P. 24. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Housman G., Byler S., Heerboth S., Lapinska K., Longacre M., Snyder N., Sarkar S. 2014. Drug resistance in cancer: An overview. Cancers (Basel). V. 6. P. 1769.
- Komina A.V., Palkina N.V., Akseenenko M.B., Lavrentev S.N., Moshev A.V., Savchenko A.A., Averchuk A.S., Rybnikov Y.A., Ruksha T.G. 2019. Semaphorin-5A downregulation is associated with enhanced migration and invasion of BRAF-positive melanoma cells under vemurafenib treatment in melanomas with heterogeneous BRAF status. Melanoma Res. V. 29. P. 544.
- Liang H., Huang W., Wang Y., Ding L., Zeng L. 2019. Overexpression of MiR-146a-5p Upregulates lncRNA HOTAIR in triple-negative breast cancer cells and predicts poor prognosis. Technol. Cancer Res. Treat. V. 18. P. 1533033819882949. <https://doi.org/10.1177/1533033819882949>
- Lin Y., Jiang J. 2020. Long non-coding RNA LINC00704 promotes cell proliferation, migration, and invasion in papillary thyroid carcinoma via miR-204-5p/HMGB1 axis. Open Life Sci. V. 15. P. 561.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods. V. 25. P. 402.
- Olivieri F., Prattichizzo F., Giuliani A., Matakchione G., Rippo M.R., Sabbatinelli J., Bonafè M. 2021. miR-21 and miR-146a: The microRNAs of inflammaging and age-related diseases. Ageing Res. Rev. V. 70. P. 101374. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101374>
- Palkina N., Komina A., Akseenenko M., Moshev A., Savchenko A., Ruksha T. 2018. miR-204-5p and miR-3065-5p exert anti-tumor effects on melanoma cells. Oncol Lett. V. 15. P. 8269.
- Phi L.T.H., Sari I.N., Yang Y.G., Lee S.H., Jun N., Kim K.S., Lee Y.K., Kwon H.Y. 2018. Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment. Stem Cells Int. V. 2018. P. 5416923. <https://doi.org/10.1155/2018/5416923>
- Powers J.T., Tsanov K.M., Pearson D.S., Roels F., Spina C.S., Ebright R., Seligson M., de Soysa Y., Cahan P., Theifßen J., Tu H.C., Han A., Kurek K.C., LaPier G.S., Osborne J.K. et al. 2016. Multiple mechanisms disrupt the let-7 microRNA family in neuroblastoma. Nature. V. 535. P. 246.
- Shah S., Brock E.J., Ji K., Mattingly R.R. 2019. Ras and Rap1: A tale of two GTPases. Semin. Cancer Biol. V. 54. P. 29.

- Storey J. D., Tibshirani R. 2003. Statistical significance for genome-wide studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 100. P. 9440.
- Teng Y., Fan Y., Ma J., Lu W., Liu N., Chen Y., Pan W., Tao X. 2021. The PI3K/Akt pathway: Emerging roles in skin homeostasis and a group of non-malignant skin disorders. *Cells*. V. 10. P. 1219. <https://doi.org/10.3390/cells10051219>
- Toda H., Kurozumi S., Kijima Y., Idichi T., Shinden Y., Yamada Y., Arai T., Maemura K., Fujii T., Horiguchi J., Natsugoe S., Seki N. 2018. Molecular pathogenesis of triple-negative breast cancer based on microRNA expression signatures: Antitumor miR-204-5p targets AP1S3. *J. Hum. Genet.* V. 63. P. 1197.
- Toll A., Salgado R., Espinet B., Díaz-Lagares A., Hernández-Ruiz E., Andrades E., Sandoval J., Esteller M., Pujol R.M., Hernández-Muñoz I. 2016. MiR-204 silencing in intraepithelial to invasive cutaneous squamous cell carcinoma progression. *Mol. Cancer*. V. 15. P. 53. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0537-z>
- Vergani E., Dugo M., Cossa M., Frigerio S., Di Guardo L., Gallino G., Mattavelli I., Vergani B., Lalli L., Tamborini E., Valeri B., Gargiuli C., Shahaj E., Ferrarini M., Ferrero E. et al. 2020. miR-146a-5p impairs melanoma resistance to kinase inhibitors by targeting COX2 and regulating NFκB-mediated inflammatory mediators. *Cell Commun. Signal*. V. 18. P. 156. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00601-1>
- Vitiello M., Tuccoli A., D'Aurizio R., Sarti S., Giannecchini L., Lubrano S., Marranci A., Evangelista M., Peppicelli S., Ippolito C., Barravecchia I., Guzzolino E., Montagnani V., Gowen M., Mercoledì E. et al. 2017. Context-dependent miR-204 and miR-211 affect the biological properties of amelanotic and melanotic melanoma cells. *Oncotarget*. V. 8. P. 25395. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15915>
- Xia Y., Zhu Y., Ma T., Pan C., Wang J., He Z., Li Z., Qi X., Chen Y. 2014. miR-204 functions as a tumor suppressor by regulating SIX1 in NSCLC. *FEBS Lett*. V. 588. P. 3703.
- Xiao B., Zhu E.D., Li N., Lu D.S., Li W., Li B.S., Zhao Y.L., Mao X.H., Guo G., Yu P.W., Zou Q.M. 2012. Increased miR-146a in gastric cancer directly targets SMAD4 and is involved in modulating cell proliferation and apoptosis. *Oncol. Rep*. V. 27. P. 559.
- Yang C., Tian C., Hoffman T.E., Jacobsen N.K., Spencer S.L. 2021. Melanoma subpopulations that rapidly escape MAPK pathway inhibition incur DNA damage and rely on stress signalling. *Nat. Commun*. V. 12. P. 1747. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21549-x>
- Zhang B., Pan X., Cobb G.P., Anderson T.A. 2007. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol*. V. 302. P. 1.
- Zhao J., Sun Y., Lin H., Chou F., Xiao Y., Jin R., Cai X., Chang C. 2020. Olaparib and enzalutamide synergistically suppress HCC progression via the AR-mediated miR-146a-5p/BRCA1 signaling. *FASEB J*. V. 34. P. 5877.

Change of microRNA Profile in Melanoma Cells Resistant to Dacarbasine

I. S. Zinchenko^a, N. V. Palkina^a, and T. G. Ruksha^{a, *}

^aKrasnoyarsk State Medical University, Department of Pathophysiology, Krasnoyarsk, 660022 Russia

*e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

It is known that microRNAs are capable for regulating the onset and development of tumor growth by altering the gene expression within a specific signaling pathways. Drug resistance is crucial for tumor progression since chemotherapeutic agents can affect the cell cycle, DNA replication resulting both genetic and epigenetic changes in survived cells. In this regard, the purpose of this study was to determine the microRNAs profile and cell cycle alteration in melanoma cells after chemotherapeutic agent dacarbazine treatment or after dacarbazine treatment followed by microRNA miR-204-5p mimic transfection. Dacarbazine led to increase in the proportion of cells in M phase, as well as to changes in the expression of microRNAs. MiR-146a-5p and miR-21-5p levels were one of the most down-regulated which are according to bioinformatic analysis, take part cancer cell chemoresistance.

Keywords: melanoma, microRNA, miR-204-5p, miR-146a-5p, microarray, cell cycle, dacarbazine, drug resistance

ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИЯ BDNF, GDNF И NT-3 В ТЕМЕННОЙ КОРЕ КРЫСЫ ПРИ ПОСТОЯННОЙ ОККЛЮЗИИ СРЕДНЕЙ МОЗГОВОЙ АРТЕРИИ

© 2022 г. С. Г. Калиниченко¹, *, А. В. Коробцов¹, Н. Ю. Матвеева¹

¹Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии Тихоокеанского государственного медицинского университета
Министерства здравоохранения РФ, Владивосток, 690002 Россия

*E-mail: sgkalinichenko@gmail.com

Поступила в редакцию 17.10.2021 г.

После доработки 05.11.2021 г.

Принята к публикации 08.11.2021 г.

Исследовали иммунолокализацию нейротрофического фактора мозга (BDNF), нейротрофина-3 (NT-3) и глиального нейротрофического фактора (GDNF) в теменной коре крыс на модели фокального инсульта, вызванного постоянной окклюзией средней мозговой артерии. Пространственная плотность маркированных клеток постоянно варьирует по слоям коры и на разных сроках ишемического процесса, демонстрируя в ядре инсульта и пенумбре противоположные топографические тренды. Для всех исследованных нейротрофинов характерна значительная редукция иммунореактивных клеток в IV–VI слоях коры в первые и третьи сутки ишемии. В супрагранулярных слоях их количество остается относительно стабильным, либо слегка снижается по сравнению с контролем. На 8-е сут ишемии в ядре инсульта нейротрофины в нейронах почти не выявляются, а в пенумбре возникает индукция иммунореактивности. В пенумбре NT-3-иммунореактивные нейроны преобладают в слоях II–III, BDNF выявляется в нейронах слоев II–III и V, а основную популяцию GDNF-иммунореактивных клеток составляют астроциты. Топография нейротрофинов в контралатеральном полушарии повторяет паттерн их локализации в области пенумбры. Неоднородная стратификация нейротрофинов и их избирательная реакция на ишемическое повреждение определяют их различным участием в поддержании цитопротективных и нейродеструктивных эффектов.

Ключевые слова: нейротрофический фактор мозга BDNF, нейротрофин-3 NT-3, глиальный нейротрофический фактор GDNF, селективная нейропротекция, окклюзия средней мозговой артерии, инсульт

DOI: 10.31857/S0041377122010047

Характер и темпы ишемического повреждения в значительной степени лимитируются уровнем трофического обеспечения нейронов, а естественной защитной реакцией мозга в первые минуты ишемии является изменение экспрессии нейротрофинов (НТ), нейроростовых факторов и их рецепторов (Beker et al., 2020). Сумма влияний НТ обеспечивает выживание, пролиферацию и дифференцировку клеток, регулирует синаптическую трансмиссию и экзоцитоз медиаторов, выработку белков постсинаптических уплотнений и ключевых ферментов медиаторного обмена, а также напрямую управляют активностью ионных каналов (Miranda et al., 2019).

В спектр нейропротективных влияний при остром инсульте включаются глиальный нейротрофический фактор (GDNF), нейротрофический фактор мозга (BDNF) и нейротрофин-3 (NT-3) (Митрошина и др., 2019; Pöyhönen et al., 2019; Liu et al., 2020). Их эффекты связаны с активацией сигнального ме-

ханизма, сцепленного с определенным типом Trk-рецептора. Молекулы NT-3 имеют родство к рецепторам TrkC, рецептор TrkB связывается с BDNF, а GDNF реагирует с рецептором GFR α 1 экстраклеточного домена тирозинкиназы (Попова и др., 2017; Sasi et al., 2017; Ibanez, Andressoo, 2017). Избирательное действие НТ на нейроны различной медиаторной организации реализуется комплексом вторичных мессенджеров, один из которых опосредуется фосфолипазой C- γ (PLC- γ), другой – митоген-активируемой протеинкиназой (МАРК), а третий – через экспрессию фосфоинозитид 3-киназы/протеинкиназы B (PI3K/Akt) (Bothwell, 2014; Bronfman et al., 2014).

При экспериментальной ишемии экзогенное подведение НТ сокращает размер инфарктной зоны на 35–50% (Boyce, Mendell, 2014; Liu, Chopp, 2016; Jiang et al., 2017), снижает глутаматергическую эксайтотоксичность, оказывая про- или антиапоптотическое действие (Калиниченко и др., 2020). Хотя повышение экспрессии НТ коррелирует с регрессом неврологического дефицита, их протективные эффекты неоднородны, зависят от типологии и нейрохими-

Принятые сокращения: НТ – нейротрофины; GDNF – глиальный нейротрофический фактор; BDNF – нейротрофический фактор мозга; NT-3 – нейротрофин-3.

ческого профиля поврежденных клеток (Sims et al., 2020). Для нейронов новой коры эти исследования не находят однозначного решения и на различных патогенетических моделях инсульта дают разноречивые результаты. Неизвестна также стратификация НТ в фокусе инсульта и ишемической пенумбре, что затрудняет интерпретацию данных о мишенях их избирательной активности.

Цель настоящей работы состояла в исследовании топографического и количественного представительства нейронов, экспрессирующих BDNF, NT-3 и GDNF в неокортексе крыс при фокальном ишемическом инсульте, вызванном постоянной окклюзией средней мозговой артерии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Экспериментальные животные и моделирование инсульта. Работа выполнена на материале от 27 беспородных крыс-самцов весом 200–250 г. Условия содержания животных, а также экспериментальные условия соответствовали директиве 2010/63/EU Европейского союза 2010 г., определяющей правила научных экспериментов с животными. Все экспериментальные процедуры были одобрены междисциплинарным комитетом по этике ФГБОУ ТГМУ Минздрава России (протокол № 4 от 6 марта 2013 г.).

Операция проводилась в асептических условиях под ингаляционным наркозом севофлураном. Фокальный ишемический инсульт моделировали с помощью метода постоянной филаментной окклюзии средней мозговой артерии (Koizumi et al., 1986; Sommer, 2017). По достижении глубокого наркоза, крысу фиксировали на манипуляционном столике с подогревом в положении на спине. После обработки операционного поля антисептиком на передней стороне шеи по средней линии производили разрез кожи длиной 1.5 см, выделяли левую общую сонную артерию (ОСА) и ее бифуркацию на внутреннюю (ВСА) и наружную (НСА) сонные артерии. Затем выполняли перевязку ОСА и НСА. Крылонебную артерию, как коллатераль ВСА, и коллатерали НСА – затылочную и верхнюю щитовидную артерии – коагулировали. Через прокол ОСА в ее просвет вводили окклюдер (полиамидную нить (филамент)), который надежно заполнял весь поперечник сосуда. Окклюдер проводили интраваскулярно в собственно ВСА на глубину около 1.5–2.0 см. Нить оставляли в просвете артерии и фиксировали перевязкой ВСА. После чего рану ушивали. Время операции составляло 40–60 мин. Описанные манипуляции полностью исключают ретроградный и коллатеральный кровоток в ВСА, дают возможность контролировать зону распространения инсульта в бассейне средней мозговой артерии (Коробцов, Калининченко, 2017). Животных выводили из эксперимента через 1, 3, 8, и 21 сут после операции. На каждом сроке исследовали по 6 крыс. Контролем служили интактные животные ($n = 3$). Для анестезии использовали внутривенное введение

3%-ного раствора тиопентала натрия, после чего животных декапитировали.

Анатомические координаты области инфаркта мозга в первые сутки после моделируемого инсульта определяли с помощью окрашивания в растворе 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ). Мозг оперированного животного помещали в холодный физиологический раствор на 10 мин при 4°C, затем разрезали фронтально на сегменты толщиной 1–2 мм. Затем материал погружали в 2%-ный раствор ТТХ и выдерживали 30 мин в темноте при 37°C. После установления фокуса инсульта на окрашенных ТТХ фрагментах остальную ткань мозга обрабатывали для иммуногистохимии.

Иммуногистохимия. Материал фиксировали в 4%-ном параформальдегиде на фосфатном буфере в течение 4 ч, после чего промывали 0.1 М Na-фосфатным буфером (pH 7.2) с многократной сменой раствора, заливали в парафин по общепринятой методике. Затем срезы толщиной 15 мкм монтировали на предметные стекла, депарафинировали и инкубировали с первичными антителами. Для этой цели использовали следующие антитела (Abcam, Великобритания): мышинные моноклональные против BDNF (ab205067) в разведении 5 мкг/мл, кроличьи поликлональные против GDNF (ab18956) в разведении 5 мкг/мл, кроличьи поликлональные против NT-3 (ab216491) в разведении 1 : 200. Первичные антитела разводили в 10 мл фосфатного буфера, содержащего 10% Тритона X-100 и 200 мг бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. Промывали 0.1 М Na-фосфатным буфером, затем в течение 1 ч инкубировали в растворе биотинилированных вторичных антител против иммуноглобулина мыши и кролика соответственно первичным антителам (Biotinylated Goat anti-Mouse IgG (ab64255, Abcam, UK,) и Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody, Biotin, (№ 31820; Invitrogen, США)) в разведении согласно протоколу фирмы производителя, а затем в растворе авидин-пероксидазного комплекса (Abcam, Великобритания). После этого срезы выдерживали 4 мин в растворе диаминобензидина (DAB Substrate Kit; Abcam, Великобритания), затем трижды промывали фосфатным буфером, обезвоживали и заключали в бальзам. В качестве контроля из среды исключали первичные антитела, окрашивание клеток отсутствовало. Часть срезов окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля.

Препараты изучали в световом микроскопе AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали при помощи цифровой камеры AxioCam ICc3. Морфометрическую обработку полученных фотографий проводили при помощи пакета программ AxioVision 4.8.1. Относительную плотность иммуноокрашенных клеток вычисляли на участках коры площадью 0.5 мм². При подсчете учитывали только сохранные клетки, содержащие ядро, с учетом поправки на тол-

щину среза и диаметр ядра по Аберкромби. Включение этой поправки в расчеты позволяет исключить повторный подсчет на серийных срезах одной и той же клетки в результате ее фрагментации. Достоверность межгрупповых различий определяли методом рангового дисперсионного анализа с попарными двусторонними *post hoc* тестами Манна–Уитни. Достоверными признавали различия при $P \leq 0.05$ с поправкой Бонферрони на множественную проверку нулевых гипотез.

В отдельных случаях определяли долю позитивно окрашенных нейронов. Для этого с помощью окуляр-морфометрической сетки подсчитывали абсолютное количество иммуореактивных клеток на участках коры площадью 0.29 мм^2 в 20–25 полях зрения и высчитывали их долю от среднего числа клеток, окрашенных в сходных областях по методу Ниссля. Данные обрабатывали методом вариационной статистики с определением *t*-критерия достоверности по Стьюденту ($P < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Метод филаментной окклюзии позволяет при сравнительно малой инвазивности блокировать кровоток на значительном протяжении сосуда. При обработке мозга с помощью ТТХ зона ишемического инсульта проявляется в левом полушарии со стороны окклюзии как неокрашенный участок фронтально-париетальной коры (3.5–4 мм кпереди от брегмы) и внутренней капсулы величиной $0.3 \times 0.5 \times 0.8 \text{ см}$ (рис. 1). На 8-е и 14-е сут отмечается значительная вариабельность конфигурации и размеров зоны инсульта. В этом периоде ишемическое ядро всегда локализуется в неокортексе, а структуры внутренней капсулы могут не показывать существенных изменений. На 21-е сут участок ишемического повреждения, как правило, не имеет четких границ, распространяется на часть височной доли и полностью охватывает внутреннюю капсулу с признаками спонгиоза белого вещества. Окружающая его ткань мозга деформируется за счет набухания и отека, внутри ядра инсульта и около него формируются множественные кисты.

Ядро ишемии вначале формируется в слоях II–VI, а затем распространяется на всю корковую пластинку от пиальной поверхности до подкоркового белого вещества. Фокус инсульта по периферии окружает пенумбра – зона жизнеспособных клеток шириной до 800 мкм. При иммуногистохимическом окрашивании на BDNF, GDNF и NT-3 выявляются пирамидные и непирамидные нейроны и глиальные клетки. Локализация нейротрофинов дифференцирована по слоям коры, зависит от экспозиции ишемии и удаленности от ядра инсульта (рис. 2).

У контрольных животных BDNF-иммуореактивные нейроны обнаруживаются во всех слоях коры, имеют интенсивно окрашенный перикарион и первичные сегменты дендритов (рис. 2). Экспрессия

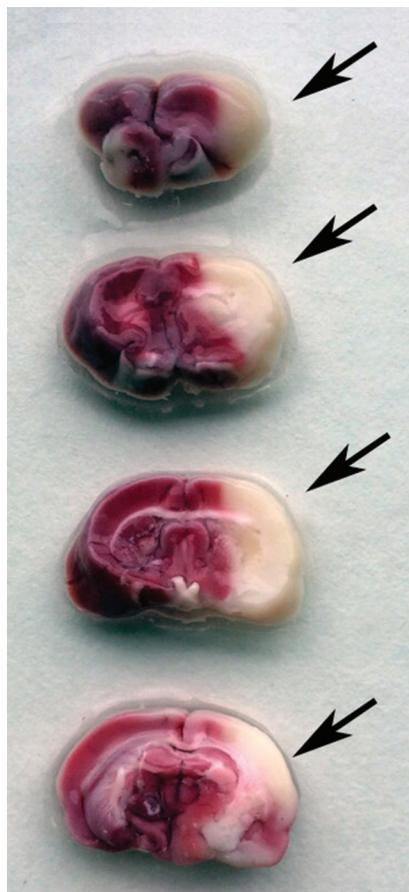


Рис. 1. Топографические границы фокуса ишемического инсульта (стрелки) в левом полушарии мозга крысы через 1 сут после окклюзии средней мозговой артерии. Коронарные срезы головного мозга, окрашенные ТТХ (раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида).

BDNF преобладает в пирамидных клетках, количество которых в контроле составляет $81.3 \pm 1.1\%$. В слое I с большим постоянством выявляются веретеновидные нейроны, имеющие морфологию типичных клеток Кахаля–Ретциуса. В глубоких слоях коры субпопуляция BDNF-позитивных интернейронов включает полиморфные и биполярные клетки. Динамика плотности BDNF-реактивных клеток у экспериментальных крыс в разных слоях коры значительно отличается от контрольной группы (рис. 3a). В 1-е сут ишемии в ядре инсульта маркируются пирамидные и непирамидные клетки слоев II и V с высокой степенью иммуореактивности и небольшие скопления бледно окрашенных нейронов в слоях I и VI. Здесь также выявляются редкие диффузно расположенные астроцитоподобные клетки.

На 3-и сут ишемии ядро инсульта становится полностью организованным. Большинство клеток здесь дистрофически изменено, они увеличены в размерах, перикарионы без четких контуров. В нейропиле наблюдаются признаки перивазального и перинеуронального отека. Границы слоев стерты,

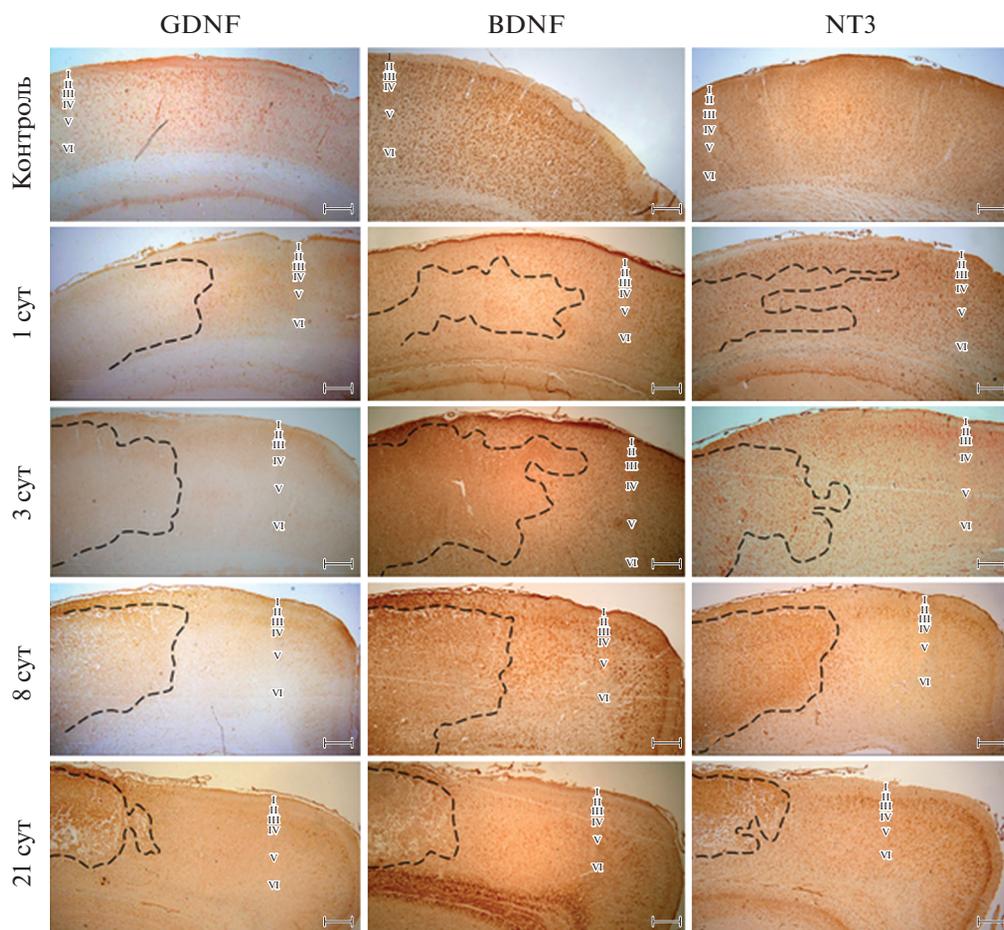


Рис. 2. Распределение BDNF-, GDNF- и NT-3-иммунореактивных клеток в теменной коре крыс в фокусе инсульта (выделен штриховой линией) и ишемической пенумбре. Масштабная линейка: 250 мкм.

четко определяются только слои I и II, в которых на BDNF окрашивается лишь $9.8 \pm 2.1\%$ клеток от их общего количества в контроле. В остальных слоях встречаются редкие пирамидные клетки и астроциты с умеренной и слабой иммунореактивностью. На 8-е сут после операции в слое V выявляются единичные BDNF-позитивные клетки, а на 21-е сут в ядре ишемии нейроны и глиальные клетки не маркируются.

В зоне пенумбры BDNF-иммунореактивные клетки преобладают в слоях II, III и V. Их количество редуцируется в 1-е и 3-е сут ишемии, а, начиная с 8-х сут, постепенно увеличивается (рис. 3б). Количество таких клеток возрастает примерно на $3.2 \pm 1.1\%$ на каждые 100–150 мкм латерально от границы ядра инсульта. При сравнении плотности маркированных клеток во II слое коры в ядре и пенумбре ни в одном из исследованных периодов ишемии достоверных различий не обнаружено. Однако в слоях V и VI на 3-и и 21-е сут после окклюзии плотность BDNF-иммунореактивных клеток в пенумбре достоверно превышает их количество в фокусе ишемии (рис. 3а).

Высокую степень неоднородности демонстрирует топография иммунореактивного GDNF (рис. 4). У контрольных животных маркер локализуется в нейронах всех слоев коры, составляющих $52 \pm 4.5\%$ от общего количества клеток. Относительное количество окрашенных нейронов в ядре инсульта неизменно снижается. В первые сутки после окклюзии СМА их выявляется $29 \pm 2.1\%$, на 8-е – $13.8 \pm 0.6\%$, а на 21-е – $3.1 \pm 0.2\%$. При этом в первые 3 сут плотность клеток в ядре ишемии значительно возрастает в слоях I и II и снижается в глубоких слоях коры (рис. 4а, б). Основную порцию GDNF-иммунореактивности в ядре и пенумбре на 8-е и 21-е сут эксперимента формируют глиальные клетки (рис. 4в). Сравнительная оценка плотности маркированных клеток в одинаковые сроки “ишемического” периода показывает различные значения по слоям коры в ядре инсульта и пенумбре (рис. 4а). Отметим, что в I слое выборочная дисперсия плотности клеток в контроле и экспериментальных группах значительно превосходит подобные значения в других слоях коры всех исследованных групп животных.

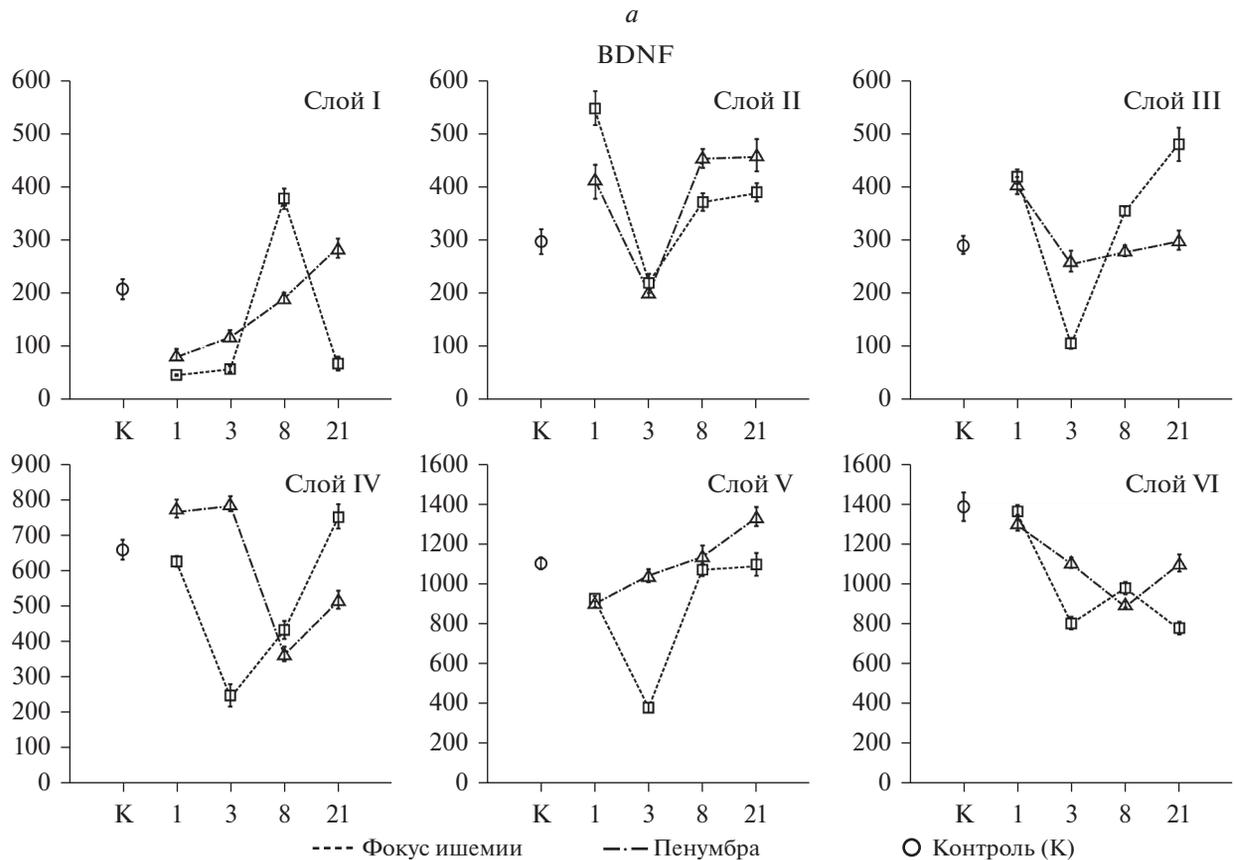
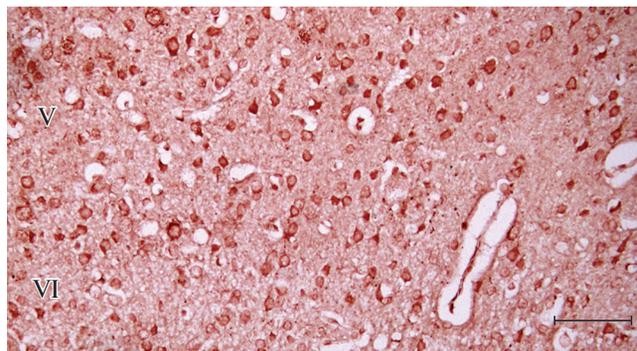
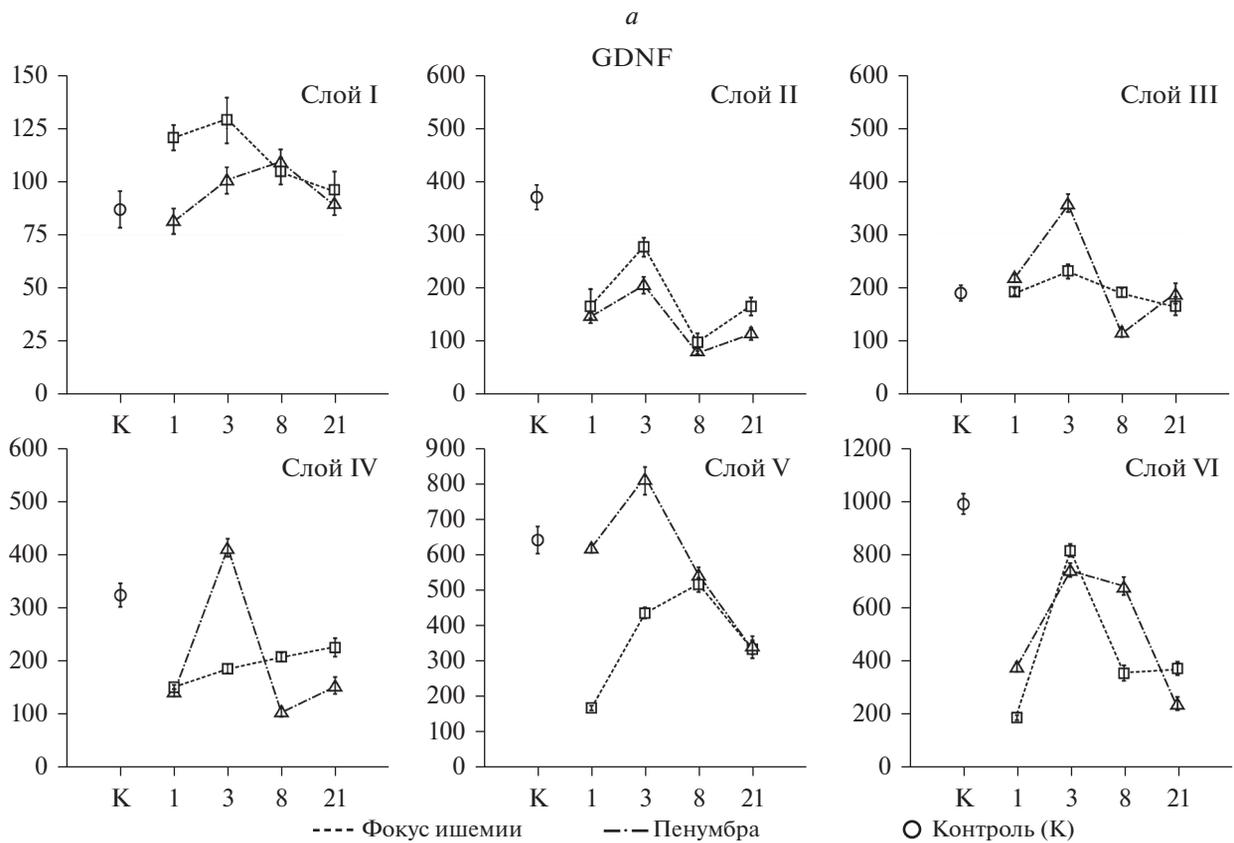
*b*

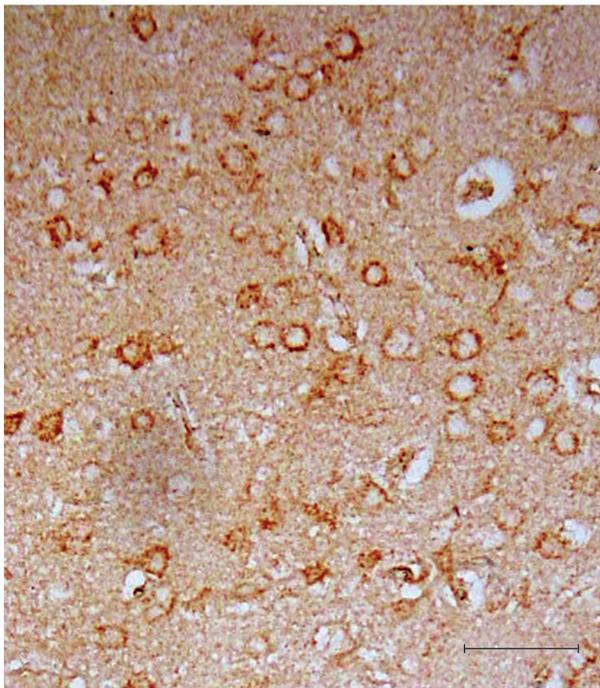
Рис. 3. Топография BDNF в теменной коре большого мозга крысы при постоянной окклюзии средней мозговой артерии. *a* – Изменение пространственной плотности (по оси ординат – кл./0.5 мм²) BDNF-иммунореактивных нейронов по слоям коры в контроле (К) и на разных сроках ишемического инсульта; по оси абсцисс – время после ишемии, сут; показаны средние значения и их ошибки (M±SEM), $P < 0.05$. *b* – BDNF-иммунореактивные нейроны в слоях V–VI области пенумбры на 8-е сут ишемии; масштабная линейка: 150 мкм.

При иммуногистохимическом выявлении NT-3 в неокортексе контрольных крыс обнаруживаются преимущественно пирамидные клетки, составляющие $78.3 \pm 2.4\%$ от общего числа нейронов. В 1-е сут после индукции инсульта в ядре ишемии наблюдается снижение иммунореактивности по всему поперечнику коры с максимальной концентрацией реактивных клеток в слое II, в то время как в слоях III–IV

и VI их окрашивается относительно меньше (рис. 5). В пенумбре в этот период, напротив, отмечается нарастание пространственной плотности NT-3-иммунореактивных клеток с превалированием последних в слоях V и VI и достоверным снижением этих показателей в поверхностных слоях коры (рис. 5*a*). Отметим, что в I и VI слоях коры ни в одной из контрольных точек экспериментальной ишемии не отмечено



б



в

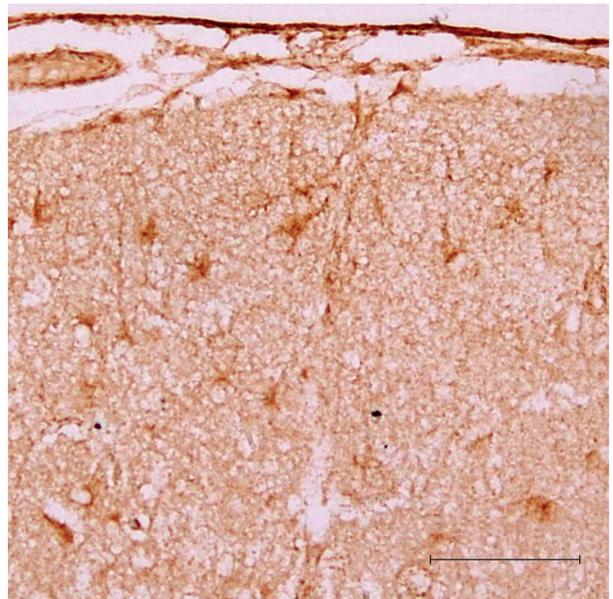


Рис. 4. Иммунолокализация GDNF в теменной коре крысы в условиях фокального ишемического инсульта. *a* – Пространственная плотность (по оси ординат – кл./0.5 мм²) GDNF-иммунореактивных нейронов по слоям коры в контроле (К) и на разных сроках ишемического инсульта; по оси абсцисс – время после ишемии, сут; показаны средние значения и их ошибки (M ± SEM), *P* < 0.05. *б* – GDNF-иммунореактивные нейроны в III слое пенумбры, 1 сут ишемии. *в* – Гиперэкспрессия GDNF в астроцитах слоя I области пенумбры на 8-е сут ишемии; масштабная линейка: 100 мкм.

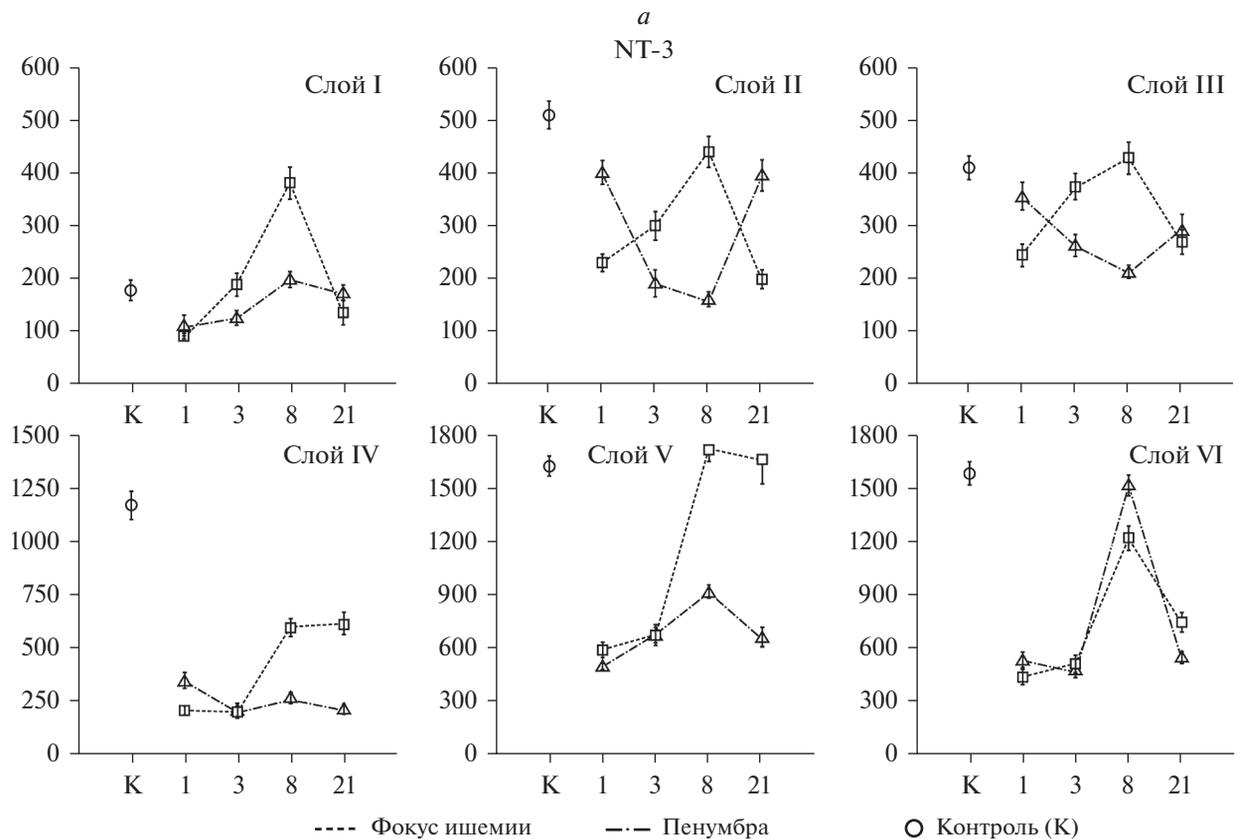
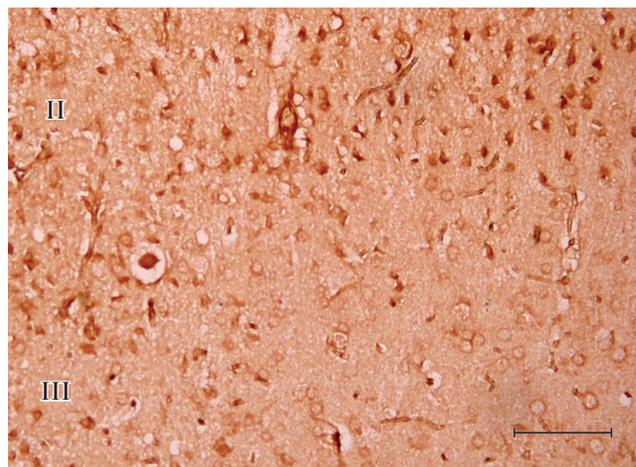
*b*

Рис. 5. Распределение иммунореактивного NT-3 в теменной коре крысы при фокальном ишемическом инсульте. *a* – Изменение пространственной плотности (по оси ординат – клеток/ 0.5 мм^2) NT-3-иммунореактивных нейронов по слоям коры в контроле (К) и на разных сроках ишемического инсульта; по оси абсцисс – время после ишемии, сут; показаны средние значения и их ошибки ($M \pm SEM$), $P < 0.05$. *b* – NT-3-иммунореактивные нейроны слоев II и III области пенумбры на 8-е сут ишемии; масштабная линейка: 150 мкм.

достоверных различий между плотностью клеток в зоне фокуса и пенумбры, в то время как в остальных слоях такие различия становятся ярко выраженными (рис. 5*a*).

На 3-и и 8-е сут эксперимента в ядре ишемии почти не встречаются NT-3-позитивные нейроны. Нейропилль здесь контрастирует за счет диффузного окрашивания, в котором можно идентифицировать

астроциты, сопровождающие сосуды. Часто глиоциты группируются в обширные кластеры, простирающиеся на соседние слои. В пенумбре в этот период NT-3 экспрессируют в основном нейроны слоев II–III, в остальных слоях встречаются редкие диффузно рассеянные клетки (рис. 5б). В астроцитах иммунореактивность заметно снижается, а их скопления располагаются в непосредственной близости к ядру ишемии.

На 21-е сут в ядре инсульта между стенками кистоподобных лакун наблюдаются диффузно рассеянные мелкие NT-3-позитивные клетки с округлым или полигональным перикарионом. В этот удаленный период ишемии в пенумбре выявляется топографический паттерн иммунореактивности, соответствующий распределению NT-3 в контроле, хотя и при значительно меньшем количестве окрашенных клеток. Локализация исследованных нейротрофинов в одноименных участках коры контралатерального полушария сохраняет основной топографический паттерн их распределения в пенумбре на всех сроках ишемического повреждения.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе установлено гетерогенное распределение BDNF, GDNF и NT-3 в неокортексе крыс, которое дополняется их различной стратификацией в ядре инсульта и пенумбре на каждом сроке ишемии. Эти данные позволяют картировать цитопротективные эффекты НТ на основе топографии и типологической характеристики маркированных нейронов.

Очаг тотального некроза, ядро инсульта, окружается пенумброй – зоной обратимого ишемического повреждения, в которой наблюдается избирательная и отсроченная гибель клеток. В механизме этой избирательности участвует фактор, индуцируемый гипоксией $\alpha 1$, который запускает экспрессию апоптотических молекул и НТ (Barteczek et al., 2017; Sarkar et al., 2019). На моделях временной редукции церебрального кровотока показано, что в ядре ишемии в первую очередь погибают пирамидные нейроны средних и нижних корковых слоев, а в пенумбре – клетки слоев I–II и поверхностного уровня слоя III (Witte et al., 2000). Причины этого явления связывают с дифференцированной локализацией субъединицы GluR2 AMPA-рецепторов, имеющей ограниченную проницаемость для ионов Ca^{2+} . При инсульте GluR2 сдерживает распространение глутаматной гипервозбудимости, что наряду с апоптозом ГАМК-ергических нейронов вызывает неоднородную гибель клеток по слоям коры (Sommer, Kiessling, 2002). Иммунолокализация исследованных нами НТ согласуется с описанным порядком ишемического повреждения только в первые сутки инсульта, когда в ядре и пенумбре плотность окрашенных нейронов демонстрирует противоположные тренды. Первоначальной реакцией на окислительный стресс является

тотальная редукция маркированных клеток на стороне повреждения. В отсроченный период эти показатели увеличиваются, однако существенно варьируют для каждого типа НТ.

Достоверное снижение количества маркированных клеток в соответствующих слоях ядра и пенумбры может быть связано с аноксической гибелью части нейронов. Остальная их популяция характеризуется селективной устойчивостью и высоким уровнем экспрессии НТ. К ним относятся пирамидные нейроны супра- и инфрагранулярных слоев, и в меньшей степени – интернейроны слоев I и VI. Данные настоящей работы отвечают быстрой и активной экспрессии генов НТ и их рецепторов с максимумом через 72 ч после окклюзии средней мозговой артерии (Дмитриева и др., 2016). Нарастание синтеза НТ при увеличении экспозиции фокальной ишемии способно успешно компенсировать ишемию мозга (Митрошина и др., 2019). При этом нейроны слоя IV в ядре инсульта не выявляются, а в пенумбре их количество значительно редуцировано. Слой IV отличается значительной концентрацией возбуждающих глутаматергических связей, которые формируют таламокортикальные афференты и шипиковые звездчатые клетки (Andjelic et al., 2009). Можно полагать, что эти нейроны лишаются нейротрофиновой поддержки в период ишемической гипервозбудимости и поражаются в первую очередь. Относительно небольшая популяция BDNF- и NT-3-позитивных клеток обнаружена нами в ядре инсульта на 8-ой и 21-ый день после операции. Вероятно, эта иммунореактивность связана с наличием НТ в некоторой порции глиальных клеток и, в частности, микроглии, количество которых в этот период значительно возрастает (Kalinichenko et al., 2020).

Однако не всегда индукция НТ воспроизводит заметный протективный эффект. Молекулы BDNF и NT-3 секретируются в виде смеси предшественников и их зрелых форм, имеющих разные рецепторные мишени и функциональную активность. Например, proBDNF специфически активизирует сцепленный с сортином рецептор смерти $p75NTR$ и запускает апоптоз, а зрелая форма BDNF регулирует TrkB и репаративные процессы (Sasi et al., 2017). На модели фототромбоза кортикальных сосудов установлено, что proBDNF экспрессируется уже через 6 ч от начала инсульта, а его созревание завершается к концу первых суток. При этом пиковые значения экспрессии $p75NTR$ отмечаются в течение 3 сут ишемии (Rahman et al., 2018). Баланс этих влияний остается критическим в оценке протективных свойств НТ. Поскольку в нейропиле присутствуют обе их фракции, обнаруженная нами валовая индукция иммунореактивного BDNF может не коррелировать с общим количеством жизнеспособных клеток.

Если границы ядра инсульта, как правило, определяются четко, то ареал распространения пенумбры при микроскопии коры не всегда столь очевиден.

Своеобразным маркером границ пенумбры могут служить скопления активированных астроцитов с индуцибельной экспрессией GFAP и GDNF (Kalinichenko et al., 2020). Локализация BDNF- и NT-3-позитивных клеток в разные периоды корковой ишемии закономерно смещается в латеральном и вертикальном направлениях от ядра инсульта. Этот факт указывает на динамические изменения границ нейропротективной зоны и согласуется с гипотезой, рассматривающей пенумбру как мозаику из множества микролокусов переживающих инсульт нейронов (del Zoppo et al., 2011). Эта особенность касается и контралатерального полушария, где при экспериментальном инсульте наблюдается индукция экспрессии NT-3, TrkA и TrkC (Дмитриева и др., 2016), а по нашим данным формируется сходный с пенумброй паттерн иммунолокализации НТ.

Данные настоящего исследования указывают на тесные метаболические отношения астроцитов и нейронов, адаптирующие их к условиям ишемии. Установленное нами постепенное смещение GDNF-иммунореактивности из нейронального в глиальный компартмент пенумбры следует рассматривать как проявление протективных свойств нейротрофина. Способность астроцитов аккумулировать высокие уровни GDNF показана на различных моделях ишемического инсульта (Mitroshina et al., 2019). Механизмы подобных взаимосвязей остаются неясны. Однако известно, что индукцию GDNF в астроцитах опосредуют аденозиновые A_{2A} -рецепторы (Ke et al., 2012). Можно полагать, что аноксия быстро истощает нейронный пул АТФ, вызывает нарастание уровня аденозина в нейропиле и вторичное накопление GDNF в астроцитарной глии. Если это действительно так, то GDNF здесь противостоит вазоконстрикторному действию АТФ, которое при нарушении кровотока может усиливать ишемический процесс (McConnell et al., 2017).

Таким образом, избирательная локализация BDNF, NT-3 и GDNF выступает значимым индикатором защитных и нейродеструктивных процессов при ишемическом повреждении. Эти данные представляют особый интерес для выяснения механизмов нейрохимической адаптации и разработки прецизионных средств фармакологической коррекции состояния нейронов в условиях острого инсульта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Постоянная окклюзия средней мозговой артерии вызывает закономерную альтерацию экспрессии НТ в нейронах теменной коры крыс. Иммунолокализация BDNF, NT-3 и GDNF характеризуется топографической гетерогенностью в ядре инсульта и ишемической пенумбре и динамично варьирует по слоям коры в разные периоды ишемии.

Пространственная плотность клеток, экспрессирующих НТ, заметно меняется в первые трое суток

инсульта, демонстрируя в ишемическом ядре и пенумбре противоположные топографические тренды. В ядре инсульта они концентрируются в слоях I–II. На 8-е сут ишемии НТ экспрессируется, главным образом, в клетках пенумбры. При этом иммунореактивный BDNF локализуется в нейронах слоев II–III и V, NT-3 – в слоях II–III, GDNF – в астроцитах. В пенумбре основная порция иммунореактивных клеток сосредоточена в поверхностных слоях коры. Данные исследования впервые демонстрируют избирательную локализацию НТ в разных типах нейронов. Различная стратификация НТ в коре и динамика их изменений определяет смещение границ ишемической пенумбры в разные периоды инсульта.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках плановой темы № 01201350008 Тихоокеанского государственного медицинского университета Минздрава России (Владивосток).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных проводили в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского союза 2010 г. Все экспериментальные процедуры были одобрены Междисциплинарным комитетом по этике Тихоокеанского государственного медицинского университета Минздрава России (протокол № 4 от 6 марта 2013 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дмитриева В.Г., Ставчанский В.В., Поварова О.В., Скворцова В.И., Лимборская С.А., Дергунова Л.В. 2016. Влияние ишемии на экспрессию генов нейротрофинов и их рецепторов в структурах мозга крыс вне очага повреждения, включая противоположное полушарие. Мол. биология. Т. 50. № 5. С. 775. (Dmitrieva V.G., Stavchansky V.V., Povarova O.V., Skvortsova V.I., Limborska S.A., Dergunova L.V. 2016. Effects of ischemia on the expression of neurotrophins and their receptors in rat brain structures outside the lesion site, including on the opposite hemisphere. Mol. Biol. (Mosk.) V. 50. № 5. P. 775.)
- Калиниченко С.Г., Матвеева Н.Ю., Коробцов А.В. 2020. Нейротрофический фактор мозга (BDNF) как регулятор апоптоза в условиях фокального экспериментального инсульта. Бюлл. эксп. биол. и мед. Т. 169. № 5. С. 634. (Kalinichenko S.G., Matveeva N.Y., Korobtsov A.V. 2020. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a regulator of apoptosis under conditions of focal experimental stroke. Bull. Exp. Biol. Med. V. 169. № 5. P. 701.)
- Коробцов А.В., Калиниченко С.Г. 2017. Экспериментальные стратегии исследования ишемического инсульта. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Т. 117. № 12-2. С. 38. (Korobtsov A.V., Kalinichenko S.G.

2017. The experimental strategies in the study of ischemic stroke. Zh. Nevrol. Psikhiatr. im S.S. Korsakova. V. 117. № 12-2. P. 38.)
- Митрошина Е.В., Мищенко Т.А., Шишкина Т.В., Ведунова М.В.* 2019. Роль нейротрофических факторов BDNF и GDNF в адаптации нервной системы к действию факторов ишемии. Клеточные технологии в биологии и медицине. Т. 2. С. 121. (*Mitroshina E.V., Mishchenko T.A., Shishkina T.V., Vedunova M.V.* 2019. Role of neurotrophic factors BDNF and GDNF in nervous system adaptation to the Influence of ischemic factors. Bull. Exp. Biol. Med. V. 167. P. 574.)
- Попова Н.К., Ильчибаева Т.В., Науменко В.С.* 2017. Нейротрофические факторы (BDNF, GDNF) и серотонинергическая система мозга. Биохимия. Т. 82. № 3. С. 449. (*Popova N.K., Ilchibaeva T.V., Naumenko V.S.* 2017. Neurotrophic factors (BDNF and GDNF) and the serotonergic system of the brain. Biochemistry (Mosc.) V. 82. № 3. P. 308.)
- Andjelic S., Gallopin T., Cauli B., Hill E.L., Roux L., Badr S., Hu E., Tamás G., Lambolez B.* 2009. Glutamatergic nonpyramidal neurons from neocortical layer VI and their comparison with pyramidal and spiny stellate neurons. J. Neurophysiol. V. 101. P. 641.
- Bartczek P., Li L., Ernst A.S., Böhler L.I., Marti H.H., Kunze R.* 2017. Neuronal HIF-1 α and HIF-2 α deficiency improves neuronal survival and sensorimotor function in the early acute phase after ischemic stroke. J. Cereb. Blood Flow Metab. V. 37. P. 291.
- Beker M., Caglayan A.B., Beker M.C., Altunay S., Karacay R., Dalay A., Altıntas M.O., Kose G.T., Hermann D.M., Kilic E.* 2020. Lentivirally administered glial cell line-derived neurotrophic factor promotes post-ischemic neurological recovery, brain remodeling and contralesional pyramidal tract plasticity by regulating axonal growth inhibitors and guidance proteins. Exp. Neurol. V. 331. P. 113364. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113364>
- Bothwell M.* 2014. NGF, BDNF, NT3, and NT4. Handb. Exp. Pharmacol. V. 220. P. 3.
- Boyce V.S., Mendell L.M.* 2014. Neurotrophic factors in spinal cord injury. Handb. Exp. Pharmacol. V. 220. P. 443.
- Bronfman F.C., Lazo O.M., Flores C., Escudero C.A.* 2014. Spatiotemporal intracellular dynamics of neurotrophin and its receptors. Implications for neurotrophin signaling and neuronal function. Handb. Exp. Pharmacol. V. 220. P. 33.
- del Zoppo G.J., Sharp F.R., Heiss W.D., Albers G.W.* 2011. Heterogeneity in the penumbra. J. Cereb. Blood Flow Metab. V. 31. P. 1836.
- Ibáñez C.F., Andressoo J.O.* 2017. Biology of GDNF and its receptors – Relevance for disorders of the central nervous system. Neurobiol. Dis. V. 97 (Pt B). P. 80.
- Jiang M.Q., Zhao Y.Y., Cao W., Wei Z.Z., Gu X., Wei L., Yu S.P.* 2017. Long-term survival and regeneration of neuronal and vasculature cells inside the core region after ischemic stroke in adult mice. Brain Pathol. V. 27. P. 480.
- Kalinichenko S.G., Korobitsov A.V., Matveeva N.Y., Pushchin I.I.* 2020. Structural and chemical changes in glial cells in the rat neocortex induced by constant occlusion of the middle cerebral artery. Acta Histochem. V. 122. P. 151573. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151573>
- Ke R.H., Xiong J., Liu Y.* 2012. Adenosine A2a receptor induces GDNF expression by the Stat3 signal in vitro. Neuroreport. V. 23. P. 958.
- Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T., Ooneda G.* 1986. Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. Jpn. J. Stroke. V. 8. P. 1.
- Liu Z., Chopp M.* 2016. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. Prog. Neurobiol. V. 144. P. 103.
- Liu W., Wang X., O'Connor M., Wang G., Han F.* 2020. Brain-derived neurotrophic factor and its potential therapeutic role in stroke comorbidities. Neural Plast. 2020. P. 1969482. <https://doi.org/10.1155/2020/1969482>
- McConnell H.L., Kersch C.N., Woltjer R.L., Neuwelt E.A.* 2017. The translational significance of the neurovascular unit. J. Biol. Chem. V. 292. P. 762.
- Miranda M., Morici J.F., Zaroni M.B., Bekinschtein P.* 2019. Brain-derived neurotrophic factor: a key molecule for memory in the healthy and the pathological brain. Front. Cell Neurosci. V. 13. P. 363. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00363>
- Mitroshina E.V., Mishchenko T.A., Shirokova O.M., Astrakhanova T.A., Loginova M.M., Epifanova E.A., Babaev A.A., Tarabykin V.S., Vedunova M.V.* 2019. Intracellular neuroprotective mechanisms in neuron-glia networks mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor. Oxid Med. Cell Longev. 2019. P. 1036907. <https://doi.org/10.1155/2019/1036907>
- Pöyhönen S., Er S., Domanskyi A., Airavaara M.* 2019. Effects of neurotrophic factors in glial cells in the central nervous system: expression and properties in neurodegeneration and injury. Front. Physiol. V. 10. P. 486. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00486>
- Rahman M., Luo H., Sims N.R., Bobrovskaya L., Zhou X.F.* 2018. Investigation of mature BDNF and proBDNF signaling in a rat photothrombotic ischemic model. Neurochem. Res. V. 43. P. 637.
- Sarkar S., Chakraborty D., Bhowmik A., Ghosh M.K.* 2019. Cerebral ischemic stroke: cellular fate and therapeutic opportunities. Front. Biosci. V. 24. P. 435.
- Sasi M., Vignoli B., Canossa M., Blum R.* 2017. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. Pflugers Arch. V. 469. P. 593.
- Sims S.K., Rizzo A., Howard K., Farrand A., Boger H., Adkins D.L.* 2020. Comparative enhancement of motor function and BDNF expression following different brain stimulation approaches in an animal model of ischemic stroke. Neurorehabil. Neural Repair. V. 34. P. 925.
- Sommer C.J.* 2017. Ischemic stroke: experimental models and reality. Acta Neuropathol. V. 133. P. 245.
- Sommer C., Kiessling M.* 2002. Ischemia and ischemic tolerance induction differentially regulate protein expression of GluR1, GluR2, and AMPA receptor binding protein in the gerbil hippocampus: GluR2 (GluR-B) reduction does not predict neuronal death. Stroke. V. 33. P. 1093.
- Witte O.W., Bidmon H.J., Schiene K., Redecker C., Hagemann G.* 2000. Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. J. Cereb. Blood Flow Metab. V. 20. P. 1149.

Immunolocalization of BDNF, GDNF, and NT-3 in the Rat Parietal Cortex after the Permanent Occlusion of the Middle Cerebral Artery

S. G. Kalinichenko^{a, *}, A. V. Korobtsov^a, and N. Yu. Matveeva^a

^a*Department of Histology, Embryology and Cytology, Pacific State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Vladivostok, 690002 Russia*

**e-mail: sgkalinichenko@gmail.com*

The immunolocalization of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the parietal cortex of rats was studied in a model of focal stroke caused by permanent occlusion of the middle cerebral artery. The spatial density of stained cells constantly varies across the layers of the cortex and at different periods of the ischemic process, demonstrating opposite topographic trends in the stroke nucleus and penumbra. All investigated neurotrophins are characterized by a significant reduction of immunoreactive cells in layers IV–VI of the cortex on the first and third days of ischemia. In the supragranular layers, their number remains relatively stable, or slightly decreases in comparison with the control. On the 8th day of ischemia neurotrophins are almost not detected in neurons of the nucleus of the stroke, and induction of immunoreactivity occurs in the penumbra. In penumbra NT-3-immunoreactive neurons prevail in layers II–III, BDNF is detected in neurons of layers II–III and V, and astrocytes constitute the main population of GDNF-immunoreactive cells. The topography of neurotrophins in the contralateral hemisphere follows the pattern of their localization in the area of the penumbra. The heterogeneous stratification of neurotrophins and their selective response to ischemic damage are determined by their different participation in the maintenance of cytoprotective and neurodestructive effects.

Keywords: brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, glial cell line-derived neurotrophic factor, selective neuroprotection, middle cerebral artery occlusion, stroke

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ $K_{AT\Phi}$ -КАНАЛОВ ПИАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ ПОСЛЕ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

© 2022 г. И. Б. Соколова¹, *, О. П. Горшкова¹, Н. Н. Павличенко²

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия

²ООО “Транс-Технологии”, Санкт-Петербург, 192148 Россия

*E-mail: SokolovaIB@infran.ru

Поступила в редакцию 28.09.2021 г.

После доработки 22.10.2021 г.

Принята к публикации 02.11.2021 г.

Цель работы заключалась в исследовании влияния внутривенной трансплантации мезенхимных стволовых клеток человека (МСКч) на функциональное состояние $K_{AT\Phi}$ -каналов гладкомышечных клеток церебральных артерий на разных сроках постишемического периода. С помощью установки для прижизненной визуализации пиальных сосудов исследовали реакцию артерий на воздействие блокатора $K_{AT\Phi}$ -каналов глибенкламида (GB), активатора этих же каналов пинацидила (PI), ацетилхолина (ACh), и ACh на фоне действия GB (ACh/GB) через 7, 14, 21 сут после ишемии/реперфузии (И/Р) головного мозга и внутривенной трансплантации МСКч. На воздействие GB через 7 сут после И/Р сузилось в 2–5 раз меньше артерий, чем в ЛО группе, а на действие PI расширилось в 1.5 раза меньше. Введение МСКч в день проведения И/Р головного мозга через 7 сут никак не отразилось на функционировании $K_{AT\Phi}$ -каналов: констрикторная реакция на GB и дилататорная на PI в этой группе была такой же, как и у животных, перенесших И/Р. Через 14 сут после И/Р число сузившихся на GB пиальных артерий было в 1.5–2 раза меньше, чем у ЛО крыс; число артерий, ответивших дилатацией на PI, было меньше в 2–2.5 раза. В группе клеточной терапии на 14 сут после И/Р число сузившихся пиальных артерий под воздействием GB и расширившихся под воздействием PI практически полностью соответствовало таковому у ЛО крыс. На 21 сут после И/Р наблюдали полное восстановление реакций пиальных артерий на GB до уровня ЛО крыс. В группе клеточной терапии реактивность пиальных артерий полностью соответствовала показателям в группе ЛО животных. О функциональном состоянии $K_{AT\Phi}$ -каналов после И/Р головного мозга судили, сопоставляя дилататорные реакции пиальных артерий при воздействии чистым ACh и ACh на фоне блокировки $K_{AT\Phi}$ -каналов с помощью глибенкламида (ACh/GB). У ЛО животных GB блокировал дилататорную реакцию на ACh. Применение ACh на фоне GB привело к росту числа дилатаций через 7–14 сут после И/Р, а через 21 сут число расширившихся сосудов на воздействие ACh и ACh/GB было одинаковым. После введения МСКч, исключая первые 7 сут, GB блокировал дилататорную реакцию пиальных артерий на ACh так же, как в ЛО группе. Можно заключить, что И/Р коры головного мозга крыс снижает вклад $K_{AT\Phi}$ -каналов в поддержание базального тонуса пиальных артериальных сосудов. Изменения сохраняются на протяжении 14 сут после ишемического воздействия. Одновременно с этим в период с 7 по 21 сут после И/Р снижается роль $K_{AT\Phi}$ -каналов в дилатации пиальных артерий на ACh: к 21 сут каналы практически не участвуют в дилататорном ответе. Внутривенная трансплантация МСКч в день проведения И/Р головного мозга приводит к более раннему (уже через 14 сут) восстановлению участия $K_{AT\Phi}$ -каналов ГМК в поддержании базального тонуса и осуществлении ACh-опосредованной дилатации пиальных артерий.

Ключевые слова: ишемия/реперфузия, головной мозг, пиальные артерии, внутривенная трансплантация, мезенхимные стволовые клетки, $K_{AT\Phi}$ -каналы

DOI: 10.31857/S0041377122010102

Ишемия/реперфузия (И/Р) головного мозга приводит к повреждению мозговой ткани. Морфологические изменения нарастают с течением времени. Первые признаки апоптоза выявляются уже через 6 ч после воздействия. Через 7 сут начинается некроз нейронов. В это же время наблюдаются и изменения

в мозговом сосудистом русле: дистония сосудистых стенок, периваскулярные отеки и мелкие периваскулярные кровоизлияния (Шертаев и др., 2015). Нарушения, происходящие в церебральном сосудистом русле, во многом определяют исход И/Р. Важнейшими элементами, обеспечивающими нор-

мальное функционирование сосудистой сети, являются ионные каналы. Значительную роль в регуляции тонуса мозговых сосудов играют АТФ-чувствительные калиевые каналы (K_{ATP}) (Syed et al., 2019). K_{ATP} -каналы гладкомышечных клеток (ГМК) мозговых артерий – октомеры, состоящие из 4 $K_{\beta 6.2}$ субъединиц, образующих проводящую пору в клеточной мембране и 4-х дополнительных белков – рецепторов к сульфонилмочевине SUR2B, которые отвечают за фармакологические свойства каналов. Активация K_{ATP} -каналов приводит к уменьшению активности потенциал-зависимых кальциевых каналов, снижению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , гиперполяризации клеточной мембраны, ослаблению ГМК и увеличению диаметра артерий. Напротив, ингибирование K_{ATP} -каналов сопровождается входом Ca^{2+} в ГМК через кальциевые каналы, высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо, деполяризацией мембраны ГМК, уменьшением диаметра артерий и увеличением сосудистого сопротивления (Гусакова и др., 2017). K_{ATP} -каналы чувствительны к различного рода гипоксическим состояниям (Foster, Coetzee, 2016; Yang et al., 2016). Процессы И/Р могут вызвать нарушение функционирования этих каналов и, как следствие, ухудшение дилататорной реакции церебральных сосудов. Локальное сужение или закрытие мозговых артерий приводят к развитию повторной очаговой ишемии, усугубляющей повреждение ткани головного мозга.

Для коррекции ишемических состояний и предотвращения постишемической гибели нейронов необходима разработка методов восстановления структуры и функциональности сосудистого русла. В многочисленных работах показано, что трансплантация МСК после ишемических или травматических повреждений головного мозга приводит к уменьшению объема поврежденной ткани, сохранению функции нейронов в пограничной с повреждением зоне, восстановлению микроциркуляции (Ball et al., 2007; Yang et al., 2015; Sheikh et al., 2019). Применение МСК для восстановления функциональной активности ионных каналов – практически не исследованный путь коррекции постишемических осложнений.

Цель данной работы – исследование влияния внутривенной трансплантации мезенхимных стволовых клеток человека (МСКч) на функциональное состояние K_{ATP} -каналов гладкомышечных клеток церебральных артерий на разных сроках постишемического периода. В задачи исследования входило: (1) изучение изменения вклада K_{ATP} -каналов в поддержание базального тонуса и осуществление опо-

средованной ацетилхолином (АСh) дилатации пиальных артериальных сосудов у крыс через 7, 14 и 21 сут после кратковременной глобальной транзиторной И/Р коры головного мозга; (2) исследование влияния внутривенного введения МСКч, проведенного в день И/Р головного мозга, на постишемическое изменение вклада K_{ATP} -каналов в дилатацию пиальных артерий на АСh у крыс через 7, 14 и 21 сут после И/Р.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена на животных из биокolleкции “Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Исследования проводили в соответствии с регламентом, установленным МЗСР РФ № 708н от 23.08.10 (“Правила лабораторной практики”), Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях, и рекомендациями биоэтической комиссии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Животные. Эксперименты проведены на 3х-месячных крысах-самцах Wistar ($n = 85$). Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище.

Ишемия/реперфузия. У наркотизированных хлоралгидратом (внутрибрюшинно, 43 мг/100 г массы тела) крыс ишемию воспроизводили с использованием техники 12-минутной окклюзии обеих сонных артерий с одновременной управляемой гипотензией (снижение и строгое поддержание артериального давления (АД) на уровне 45 ± 2 мм рт. ст. путем забора/реинфузии крови в гепаринизированный шприц). Прямое измерение АД производили через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTX-Plus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур), подключенным к компьютеру, работающему с оригинальной программой визуализации значений АД, разработанной в нашей лаборатории. По окончании периода ишемии производили полную реинфузию забранной крови. После ушивания операционных ран и выхода из наркоза (на подогреваемых грелках) животных возвращали в клетки обычного содержания.

МСКч и их трансплантация. Для внутривенной трансплантации использовали мезенхимные стволовые клетки человека (МСКч), полученные от одного донора. Выделение МСК из костного мозга, их культивирование и фенотипирование проводили в ООО “Транс-Технологии” по стандартным, общепринятым методикам (Azizi et al., 1998; Penforinis, Pochampally, 2011). В частности, для культивирования МСКч использовали питательную среду α -MEM (Nucclone, Новая Зеландия), с добавлением 20% сы-

Принятые сокращения: АД – артериальное давление; ГМК – гладкомышечные клетки; И/Р – ишемия/реперфузия; ЛО – ложнопериованные крысы; МСК и МСКч – мезенхимные стволовые клетки и МСК человека соответственно; АСh – ацетилхолин; АСh/GV – действие ацетилхолина на фоне глибенкламида; GV – глибенкламид; PI – пинацидил.

воротки крови эмбрионов коров (Gibco, США) и 100 мкг/мл пенициллина/стрептомицина (Nuclone, Новая Зеландия). Фенотипирование МСКч проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACSScan (Beckton Dickinson, США). МСКч окрашивали с помощью антител против позитивных маркеров CD90, CD105, CD44, CD73 и антител против негативных маркеров CD45, CD34, CD14, CD11b, HLA-DR и 7AAD (Beckton Dickinson, США). Для трансплантации использовали МСКч на 2–3 пассажах. Внутривенная трансплантация была проведена крысам через 1 ч после И/Р головного мозга. Каждому животному было введено 5 млн МСКч в 30 мкл культуральной среды.

Все последующие экспериментальные действия были проведены на наркотизированных (золетил, 20 мг/кг, внутривенно, Virbac, Франция) крысах; эвтаназия проведена путем введения увеличенной дозы зоветила (60 мг/кг).

Группы животных. 1. Контрольная группа: ложно-оперированные (ЛО) крысы Вистар, которые подвергались оперативному вмешательству, но без проведения И/Р. Исследования реактивности пиальных артерий у данной и всех последующих групп были проведены на отдельных подгруппах животных через 7, 14, 21 сут после хирургического воздействия (острые опыты). Вес крыс и АД на 7 сут ($n = 9$) составляли 245 ± 13.8 г и 139 ± 5.6 мм рт. ст. соответственно, на 14 сут ($n = 10$) – 303 ± 12.7 г и 133 ± 4.6 мм рт. ст. соответственно, на 21 сут ($n = 9$) – 310 ± 15.8 г и 135 ± 2 мм рт. ст. соответственно.

2. Крысы Вистар, которым была проведена И/Р головного мозга. Вес и АД на 7 сут ($n = 9$) составляли 259 ± 12.1 г и 149 ± 4.7 мм рт. ст. соответственно, на 14 сут ($n = 8$) – 256 ± 5.2 г и 133 ± 5.3 мм рт. ст. соответственно и на 21 сут ($n = 9$) – 318 ± 4.2 г и 124 ± 3.9 мм рт. ст. соответственно.

3. Крысы Вистар, которым была проведена И/Р головного мозга и внутривенно введены МСКч. Вес и АД на 7 сут ($n = 9$) составляли 250 ± 11.3 г и 144 ± 4.1 мм рт. ст. соответственно, на 14 сут ($n = 10$) – 306 ± 9.9 г и 134 ± 4.9 мм рт. ст. соответственно и на 21 сут ($n = 12$) – 327 ± 6.3 г и 123 ± 5.7 мм рт. ст. соответственно.

Визуализация и мониторинг микрососудистой сети. Для проведения прижизненного исследования реакций пиальных артерий в теменной области черепа животного высверливали отверстие ($S \approx 1$ см²). Твердую мозговую оболочку в пределах отверстия удаляли, тем самым открывая поле для дальнейшего исследования. Поверхность мозга непрерывно орошали раствором Кребса (в мМ: NaCl 120.4; KCl 5.9; NaHCO₃ 15.5; MgCl₂ 1.2; CaCl₂ 2.5; NaH₂PO₄ 1.2; глюкоза 11.5; рН 7.4), аэрированного карбогеном. Раствор для орошения, как и все другие применяемые растворы, в течение всего эксперимента находился в медицинском водяном термостате (TW-2, SIA ELMI, Латвия) при температуре 37°C. На протя-

жении всего эксперимента контролировали среднее АД, показатели которого в течение всего эксперимента оставались примерно на одном уровне для каждой группы животных. Температуру тела животных в течение всего опыта поддерживали на уровне 38°C. Визуализацию пиальных артерий проводили с помощью оригинальной установки, включающей в себя стереоскопический микроскоп MC-2ZOOM (Микромед, Россия), цветную камеру – видеоокуляр для микроскопа DCM-510 (Scopetek, Китай) и персональный компьютер. На статических изображениях с помощью компьютерной программы для цитофотометрии Photo M (авторская разработка А. Черниговского, http://www.t_lambda.chat.ru) измеряли диаметры пиальных артериальных сосудов. В ходе эксперимента у каждого животного было исследовано более 40 пиальных артерий. Все исследованные пиальные артерии были разбиты на группы: 40–60, 20–40, менее 20 мкм. Исследования реактивности сосудов были проведены через 7, 14 и 21 сут после И/Р головного мозга (см. раздел “группы животных”). Диаметр артерий фиксировали в стандартных условиях при непрерывном орошении поверхности мозга раствором ацетилхолина (ACh) (10^{-7} М/л) (Sigma-Aldrich, USA), блокатором K_{ATФ}-каналов раствором глибенкламида (Glybenclamide, Sigma-Aldrich, 10 мкМ), в растворе диметилсульфоксида (DMSO, Sigma-Aldrich, США), активатором K_{ATФ}-каналов раствором пинацидила (Pinacidil monohydrate, Sigma-Aldrich, 200 мкМ, в растворе DMSO). Концентрация DMSO в применяемом растворе глибенкламида (GB) и пинацидила (PI) не превышала 0.1%. Ранее проведенные исследования показали, что DMSO в такой концентрации не оказывает влияние на тонус церебральных артерий (Soltani et al., 2016). Исследование реакции сосудов на воздействие ACh проводили в отсутствие и на фоне блокады K_{ATФ}-каналов (предварительное орошение поверхности мозга раствором GB в течение 10 мин с последующим добавлением ACh в раствор блокатора). Фоновую реакцию на воздействие ACh в каждой группе анализировали по всему массиву сосудов и принимали за 100%. Проверка по критерию Краскела–Уоллеса показала отсутствие значимых различий между отдельными животными в фоновых реакциях на воздействие ACh внутри каждой из исследованных групп. Относительно этого уровня фиксировали изменение диаметра пиальных артерий при воздействии ACh на фоне блокатора K_{ATФ}-каналов GB.

Статистическая оценка данных. Математическая обработка полученных данных проведена с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2003 и программы InStat 3.02 (GraphPad Software Inc., США). Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Сравнение средних данных независимых выборок при нормальном характере распределения вариант в

совокупности данных (выборке) рассчитывали при помощи дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Тьюки. При распределении вариант в выборке, отличном от нормального, при сравнении групп применяли критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Данна.

Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ культуры МСКч методом проточной цитофлуориметрии показал, что она состояла на 99.7% из CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD44⁺-клеток (собственно МСК), на 0.3% CD45⁺, CD34⁺-клеток (клетки гемопоэтического ряда) и на 0.5% из CD14⁺, CD11b⁺, HLA-DR⁺, 7AAD⁺-клеток (нежизнеспособных) было не более 0.9–1%.

Констрикторная реакция пиальных артерий разного диаметра на воздействие глибенкламидом (GB) представлена на рис. 1. У ЛО животных на действие GB уменьшением диаметра ответило 46–57% пиальных артерий. В этой группе не было выявлено статистически значимой разницы в реактивности пиальных артерий внутри одного калибра (40–60, 20–40, менее 20 мкм) на разных сроках послеоперационного периода, поэтому для сравнения с другими экспериментальными группами представлены усредненные данные по всем результатам в течение эксперимента с 7 до 21 сут.

Через 7 сут после И/Р головного мозга констрикторная реакция пиальных артерий на воздействие GB была выражена гораздо слабее, чем у ЛО крыс: уменьшением диаметра ответило 10–24% исследованных артерий. Такой же результат был получен и для группы клеточной терапии (рис. 1а). Через 14 сут после И/Р на воздействие GB сужением ответило 27–40% пиальных артерий. В группе клеточной терапии – 50–60% (рис. 1б). Через 21 сут после И/Р после применения GB диаметр уменьшили 35–60% пиальных артерий; в группе клеточной терапии – 45–67% (рис. 1в).

Дилататорная реакция пиальных артерий разного диаметра на воздействие пинацидила (PI) представлена на рис. 2. У ЛО крыс на данное воздействие расширением ответило 56–82% пиальных артерий. Выявлена статистически значимая зависимость дилататорной реакции от исходного диаметра сосудов: чем мельче артерии, тем больше они расширяются под воздействием PI.

Через 7 сут после И/Р головного мозга на воздействие PI расширением ответило 57–65% пиальных артерий. Примерно такой же результат был получен и в группе клеточной терапии (48–67%) (рис. 2а). На данном сроке статистически значимая разница в дилататорной реакции между ЛО и другими экспери-

ментальными группами животных имела место у артерий диаметром менее 40 мкм.

Через 14 сут после И/Р головного мозга дилатация на PI выявлена у 27–31% пиальных артерий, что примерно в 2 раза меньше, чем в ЛО группе, причем на сосудах всех диаметров. В группе клеточной терапии в ответ на аппликацию PI расширилось 49–69% пиальных артерий. Для сосудов диаметром более 20 мкм нет статистически значимой разницы с группой ЛО животных. Для артерий диаметром менее 20 мкм эта разница составила примерно 1.2 раза (рис. 2б).

Через 21 сут после И/Р в ответ на воздействие PI расширилось 46–56% пиальных артерий. У сосудов диаметром 40–60 мкм не было выявлено статистически значимой разницы с ЛО группой, а в более мелких сосудах расширением на PI ответило в среднем в 1.4 раза меньше артерий, чем у ЛО животных (рис. 2в). В группе клеточной терапии увеличение диаметра на PI было отмечено у 56–73% пиальных артерий, что статистически значимо не отличается от результатов, полученных в ЛО группе.

Функциональную активность K_{ATP}-каналов пиальных артерий оценивали сравнением числа дилататорных реакций на воздействие ACh и ACh на фоне GB (ACh/GB) (рис. 3). У ЛО животных GB подавлял дилататорную реакцию на ACh: на действие ACh/GB расширением ответило в 1.9, 2.1, 4.1 раза меньше пиальных артерий диаметром 40–60, 20–40, менее 20 мкм соответственно. Дилататорная реакция как на чистый ACh, так и на ACh/GB имеет выраженную зависимость от исходного диаметра сосудов: чем мельче артерии, тем больше они расширяются при воздействии ACh и меньше при воздействии ACh/GB.

Через 7 сут после И/Р головного мозга число расширившихся пиальных артерий при воздействии ACh/GB превышало таковое при действии ACh. В группе клеточной терапии крупные артерии прореагировали на ACh и ACh/GB аналогичным образом. У пиальных артерий диаметром менее 20 мкм выявили незначительное уменьшение числа дилатаций при действии ACh/GB по сравнению с ACh (рис. 3а).

Через 14 сут после И/Р головного мозга число расширившихся пиальных артерий с исходным диаметром более 20 мкм на воздействие ACh/GB было больше, чем на ACh, а у мельчайших артерий примерно одинаковым. В группе клеточной терапии наблюдали значительное уменьшение числа дилатаций у пиальных артерий всех диаметров при действии ACh/GB по сравнению с ACh (рис. 3б). Этот результат сопоставим с реакциями в группе ЛО крыс.

Через 21 сут после И/Р число расширившихся пиальных артерий на воздействие ACh и ACh/GB было примерно одинаковым у сосудов диаметром менее 40 мкм. У более крупных сосудов дилататорная реакция на ACh/GB превосходила расширение на ACh. В

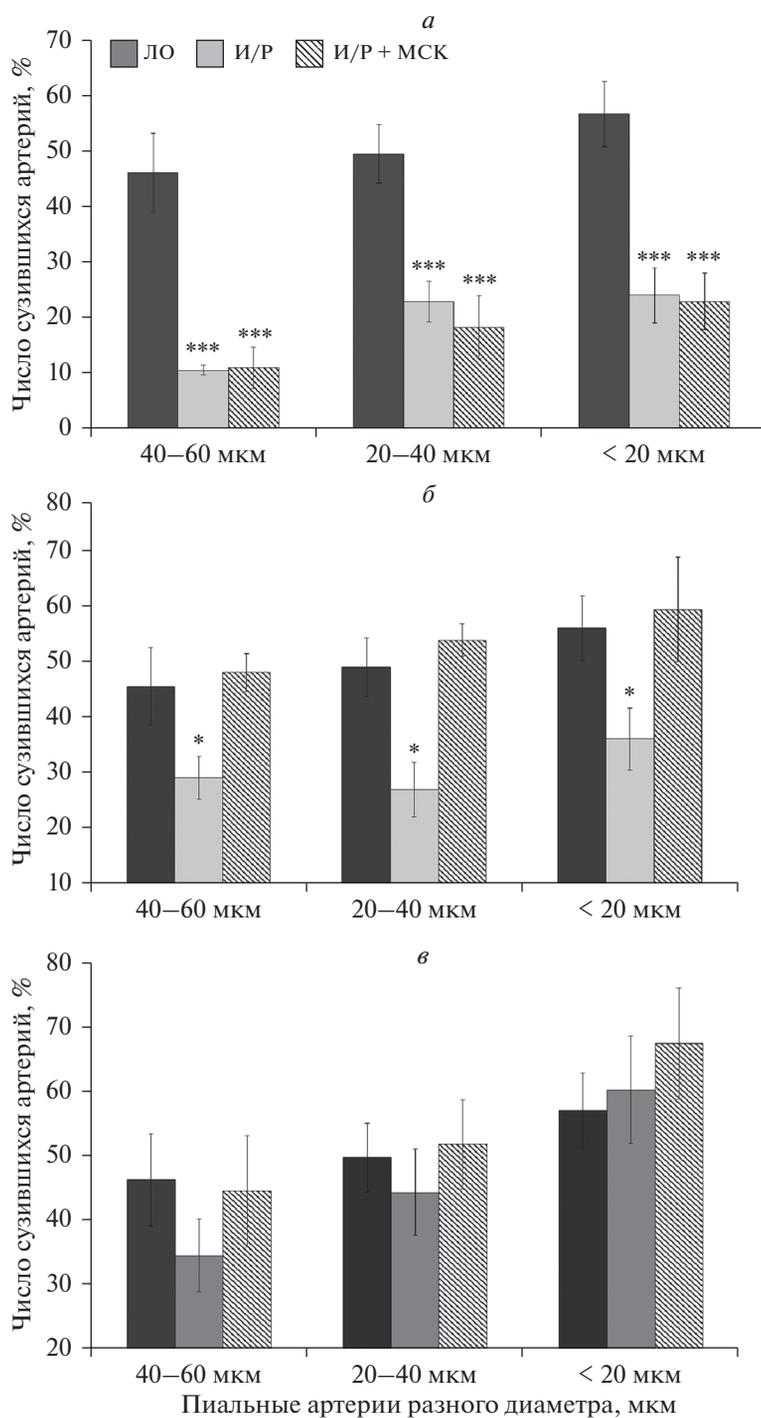


Рис. 1. Констрикторная реакция пиальных артерий на воздействие глибенкламида. Представлена доля (%) сузившихся артерий через 7 сут (а), 14 сут (б) и 21 сут (в) после ишемии/реперфузии головного мозга. Темные столбики – ЛО крысы, светлые столбики – крысы, перенесшие ишемию, заштрихованные столбики – крысы, перенесшие ишемию, которым в день операции была проведена внутривенная трансплантация МСКч. По горизонтали – диаметр пиальных артерий (мкм); по вертикали – число сузившихся артерий (%). Звездочками отмечены значимые изменения по сравнению с соответствующими значениями у ЛО животных данной группы (***) $p < 0.001$, критерий Краскела–Уоллиса).

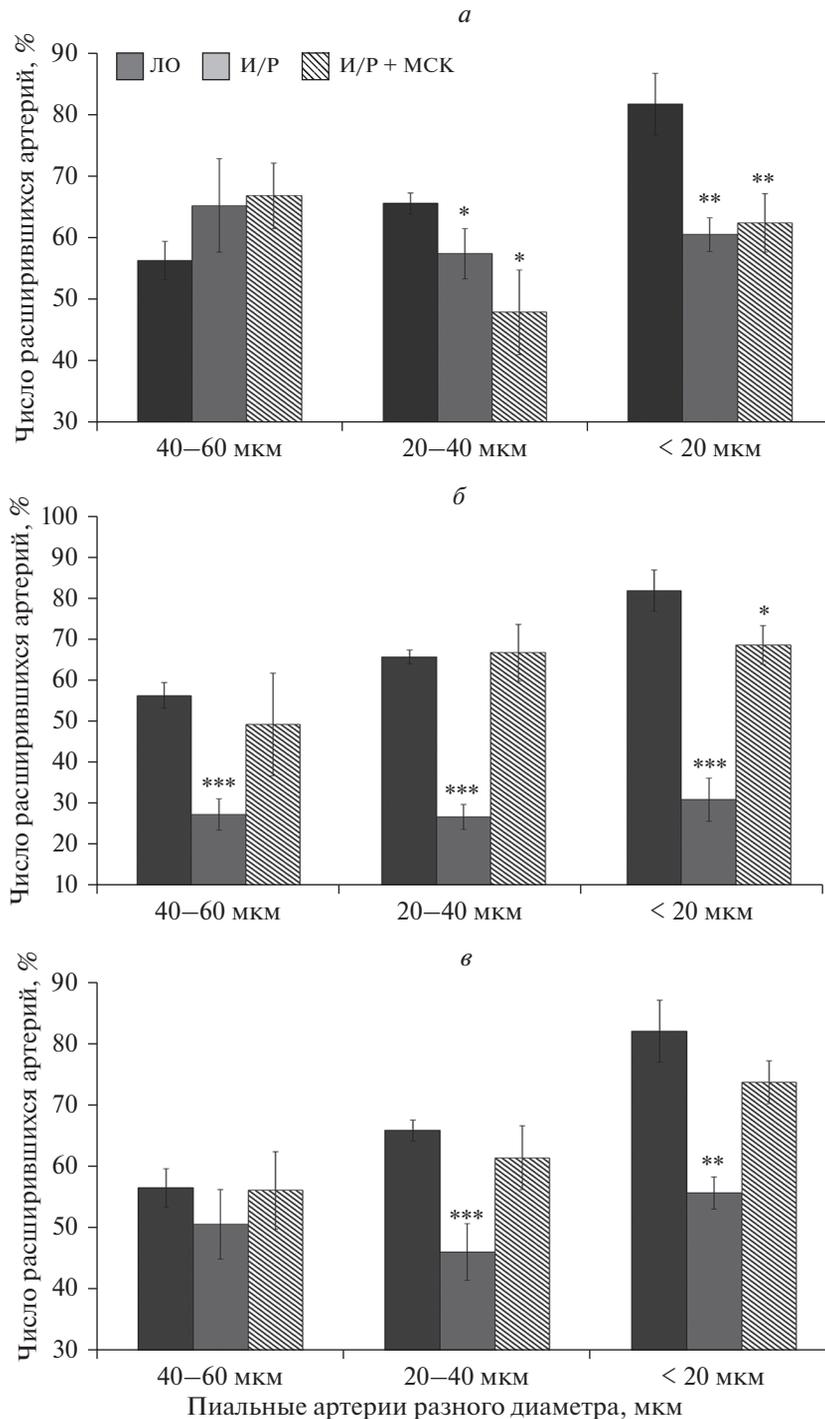


Рис. 2. Дилататорная реакция пиальных артерий на воздействие пинацидила. Представлен процент расширившихся артерий через 7 сут (*а*), 14 сут (*б*) и 21 сут (*в*) после ишемии/реперфузии головного мозга. Темные столбики – ЛО крысы, светлые столбики – крысы, перенесшие ишемию, заштрихованные столбики – крысы, перенесшие ишемию, которым в день операции была проведена внутривенная трансплантация МСКч. По горизонтали – диаметр пиальных артерий (мкм); по вертикали – число расширившихся артерий (%). Звездочками отмечены значимые изменения по сравнению с соответствующими значениями у ЛО животных данной группы (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, критерий Краскела–Уоллиса).

группе клеточной терапии наблюдали выраженное снижение числа дилатаций при воздействии ACh/GV по сравнению с ACh. В этом случае, как и в группе ЛО животных, дилататорная реакция име-

ла зависимость от начального диаметра сосудов: чем мельче артерии, тем больше было расширение на действие ACh и меньше на воздействие ACh/GV (рис. 3в).

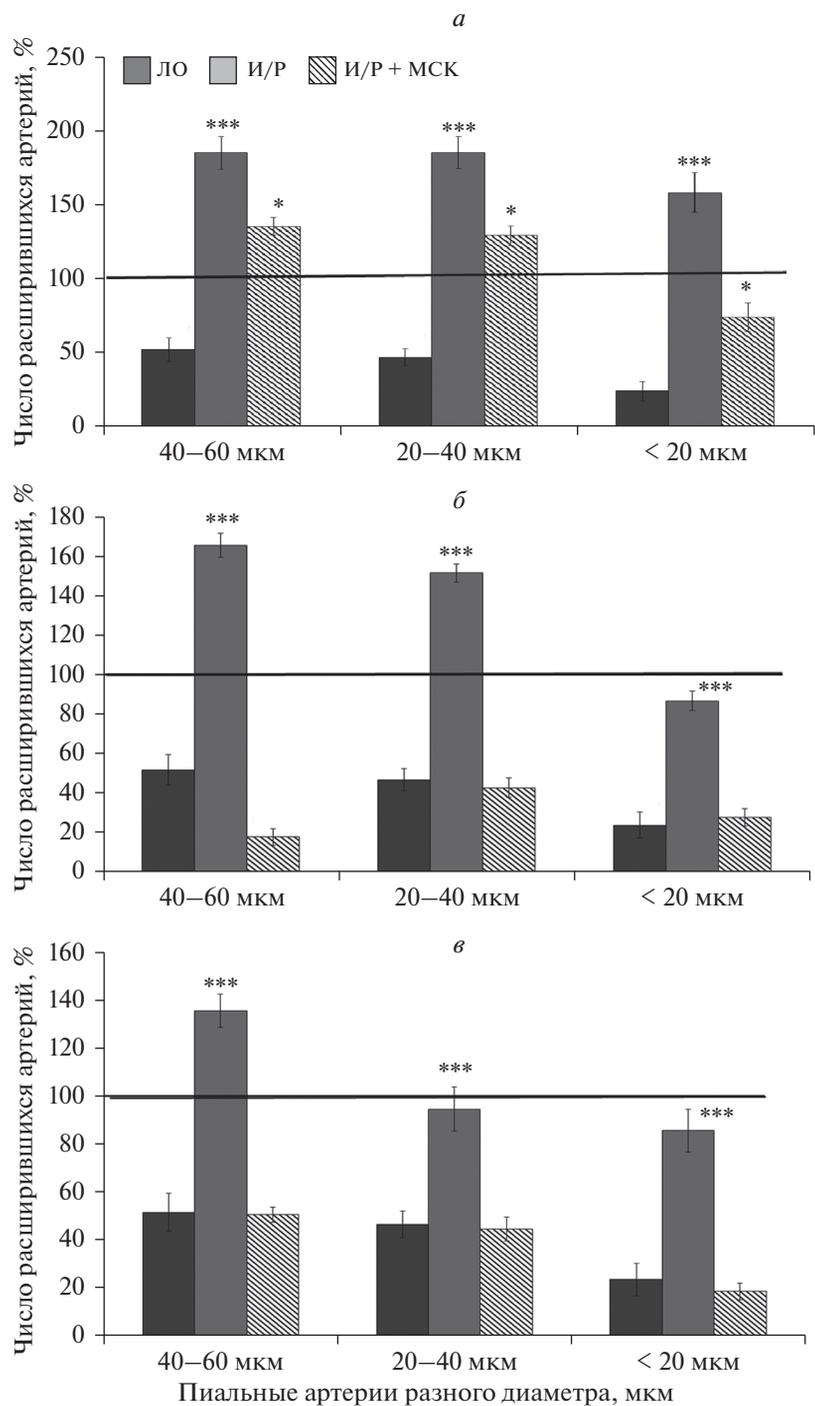


Рис. 3. Дилататорная реакция пиальных артерий на воздействие ацетилхолина на фоне глибенкламида. Представлен процент расширившихся артерий через 7 сут (*а*), 14 сут (*б*) и 21 сут (*в*) после ишемии/реперфузии головного мозга. Темные столбики – ЛО крысы, светлые столбики – крысы, перенесшие ишемию, заштрихованные столбики – крысы, перенесшие ишемию, которым в день операции была проведена внутривенная трансплантация МСКч. По горизонтали – диаметр пиальных артерий (мкм); по вертикали – число расширившихся артерий (%). Звездочками отмечены значимые изменения по сравнению с соответствующими значениями у ЛО животных данной группы (***) $p < 0.001$, критерий Краскела–Уоллиса).

ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточная терапия ишемических повреждений головного мозга с применением МСК имеет боль-

шой лечебный потенциал. Основное направление применения МСК – сохранение/восстановление структуры и функциональности сосудистого русла. Без

адекватного кровоснабжения невозможно предотвратить развитие отдаленных патологических последствий ухудшения мозгового кровотока. К настоящему времени показано, что МСК активируют образование новых сосудов и принимают участие в их стабилизации (Zhou et al., 2012). Представлены данные о дифференцировке МСК в эндотелиальные клетки и ГМК (Oswald et al., 2004; Gong et al., 2008). Экспериментально доказано, что МСК, введенные внутривенно через 24 ч после окклюзии средней мозговой артерии мигрировали в поврежденную мозговую ткань и были выявлены в стенках церебральных сосудах пенумбры (Sheikh et al., 2019). В этой же тканевой зоне наблюдали повышение уровня фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1 α). МСК секретируют факторы, способствующие неоваскуляризации ткани: фактор роста фибробластов 2 (FGF-2), VEGF, трансформирующий ростовой фактор (TGF β), интерлейкины IL-6, IL-8, ангиогенин, фактор роста гепатоцитов (HGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF BB) (Watt et al., 2013). Помимо активации ангиогенеза, МСК могут оказывать протекторное воздействие на клетки церебральных сосудов после ишемического инсульта (Chung et al., 2015; Liu et al., 2019).

Ранее мы показали, что внутривенное введение МСКч в день И/Р головного мозга приводило к сохранению структуры сосудистой сети пиальной оболочки сенсомоторной коры и предотвращало развитие эндотелиальной дисфункции церебральных артерий (Соколова и др., 2021). Для того, чтобы рассматривать клеточную терапию в качестве лечебного мероприятия необходимо выяснить на какие именно механизмы вазодилатации после И/Р головного мозга воздействуют МСК. Один из основных каскадов эндотелий-зависимой вазодилатации: NO (оксид азота)—сGMP (циклический гуанозин монофосфат)—протеинкиназа G (PKG). PKG вызывает расслабление ГМК через несколько механизмов, приводящих к снижению внутриклеточной концентрации Ca²⁺. сGMP активирует кальций-активируемые калиевые каналы и K_{ATФ}-каналы, что приводит к гиперполяризации ГМК, их расслаблению и дилатации артерий (Дзугкоев и др., 2010). Преобладание констрикторной реакции на ACh, которую мы наблюдали у крыс, перенесших И/Р, на 7, 14 и 21 сут после операции (Соколова и др., 2021), может быть вызвано повреждением как эндотелиальных клеток, так и ГМК, в частности структуры и функции K_{ATФ}-каналов. С помощью селективного блокатора K_{ATФ}-каналов глибенкламида (GB) мы показали, что на 7 сут после И/Р головного мозга значительно (в 2–5 раз) снижалось число сузившихся пиальных артерий под воздействием GB по сравнению с контрольной группой (рис. 1а). Одной из причин закрытия K_{ATФ}-каналов на ранних сроках после И/Р может быть увеличение в клетках содержания АТФ, который связыва-

ется с K_{ATФ}6.2 субъединицей и ингибирует канал (Дерягин и др., 2016). Уменьшение числа сузившихся при воздействии GB артерий через 7 сут после И/Р также может быть связано со снижением плотности K_{ATФ}-каналов в ГМК пиальных артерий диаметром менее 40 мкм. Косвенным доказательством этому может служить тот факт, что применение в наших экспериментах активатора K_{ATФ}-каналов пинацидила (PI) через 7 сут после И/Р головного мозга привело к расширению в 1.5 раза большего числа этих сосудов, чем в группе ЛО животных. У более крупных сосудов реакция на PI соответствовала таковой у ЛО крыс (рис. 2а). Итак, на воздействие GB через 7 сут после И/Р головного мозга сузилось в 2–5 раз меньше артерий, чем в ЛО группе, а расширилось при действии PI в 1.5 раза меньше. Вероятно, часть K_{ATФ}-каналов пиальных артерий, которая не прореагировала ни на GB, ни на PI была повреждена в результате И/Р. Введение МСКч в день проведения И/Р головного мозга через 7 сут никак не отразилось на функциональном состоянии K_{ATФ}-каналов: констрикторная реакция на GB и дилататорная на PI в этой группе была такой же, как и у животных, перенесших И/Р (рис. 1а, 2а).

Через 14 сут после И/Р головного мозга мы наблюдали увеличение числа пиальных артерий, ответивших констрикцией на воздействие GB, их было только в 1.5–2 раза меньше, чем у ЛО крыс (рис. 1б). Но при этом уменьшилось число пиальных артерий, ответивших дилатацией на PI (рис. 2б). Вероятно, поддержание адекватного уровня кровотока в этот постишемический период требует увеличения диаметра церебральных артерий, а для этого большинство K_{ATФ}-каналов должно быть открыто. Отсюда улучшение реакции на GB и ухудшение реакции на PI. В группе клеточной терапии на 14 сут после И/Р головного мозга мы наблюдали совершенно иную картину. Число сузившихся пиальных артерий под воздействием GB и расширившихся под воздействием PI практически полностью соответствовало показателям у ЛО крыс (рис. 1б, 2б). Следовательно, после введения МСКч к 14 сут после И/Р головного мозга функциональная активность K_{ATФ}-каналов пиальных артерий полностью восстановилась.

На 21 сут после И/Р головного мозга мы наблюдали полное восстановление реакций пиальных артерий на GB до уровня ЛО крыс. Дилататорная реакция на PI была хуже (в 1.4–1.5 раз) по сравнению с ЛО животными только у пиальных артерий диаметром менее 40 мкм. Мы предполагаем, что через 21 сут большинство K_{ATФ}-каналов открыто. В группе клеточной терапии реактивность пиальных артерий полностью соответствовала показателям в группе ЛО животных (рис. 1в, 2в).

О вкладе K_{ATФ}-каналов в ACh-опосредованную дилататорную реакцию пиальных артерий после И/Р головного мозга можно судить, сопоставляя степень расширения этих сосудов при воздействии

чистым АСh и АСh на фоне блокировки $K_{ATФ}$ -каналов с помощью глибенкламида (АСh/GB). У ЛО животных GB блокирует дилататорную реакцию на АСh во всех исследованных сосудах, независимо от их диаметра. Следовательно $K_{ATФ}$ -каналы принимают участие в формировании дилататорного ответа на воздействие АСh.

В течение всего периода наблюдений после И/Р головного мозга расширение пиальных артерий под воздействием АСh было менее выражено, чем в группе ЛО. Применение АСh на фоне GB привело к росту числа дилатаций через 7–14 сут после И/Р. В литературе имеются сведения о том, что эффективность ингибиторов $K_{ATФ}$ -каналов зависит от уровня внутриклеточных нуклеотидов, при этом особенно важную роль играет Mg-АДФ, уровень которого значительно возрастает при ишемии и гипоксии (Venkatesh et al., 1991). Поэтому существует потенциальная возможность возникновения проблем при использовании этих соединений в условиях измененного постшемического метаболического статуса и повышения уровня внутриклеточного АТФ. GB в этих условиях может, напротив, усиливать калиевый ток (Foster et al., 2016; Syed et al., 2019), что вероятно и является причиной извращения АСh-опосредованных сосудистых реакций в первые 14 сут после И/Р.

Через 21 сут число расширившихся сосудов на воздействие АСh и АСh/GB было одинаковым (рис. 3). Следовательно $K_{ATФ}$ -каналы практически перестают участвовать в осуществлении эндотелий-зависимой дилатации церебральных артерий после И/Р головного мозга.

Внутривенная трансплантация МСКч в день И/Р головного мозга привела, во-первых, к сохранению дилататорной реакции пиальных артерий на АСh: число расширившихся сосудов полностью соответствовала таковому у ЛО крыс на всех сроках наблюдения. Во-вторых, уже через 14 сут после И/Р GB блокировал дилататорную реакцию пиальных артерий на АСh в группе клеточной терапии также, как в ЛО группе (рис. 3).

Итак, установлено, что И/Р коры головного мозга крыс снижает вклад $K_{ATФ}$ -каналов в поддержание базального тонуса пиальных артериальных сосудов. Изменения сохраняются на протяжении 14 сут после ишемического воздействия. Одновременно с этим в период с 7 по 21 сут после И/Р снижается роль $K_{ATФ}$ -каналов в дилатации пиальных артерий на АСh: к 21 сут каналы практически не участвуют в дилататорном ответе. Внутривенная трансплантация МСКч в день проведения И/Р головного мозга приводит к более раннему (уже через 14 сут) восстановлению участия $K_{ATФ}$ -каналов ГМК в поддержании базального тонуса и осуществлении АСh-опосредованной дилатации пиальных артерий.

Восстановление процессов $K_{ATФ}$ -сигнализации и увеличение вклада АТФ чувствительных калиевых

каналов в регуляции сосудистого тонуса после перенесенной И/Р может противодействовать возникновению периодических эпизодов вазоспазма и предотвращать возникновение повторных ишемических состояний, приводящих к более серьезному повреждению нейронов головного мозга.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы “Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения конкурентоспособности общества и государства” (47_110_ДРиОК). Тема 64.1 (0134-2019-0001) “Раскрытие механизмов взаимодействия молекулярно-клеточных и системных регуляций функций внутренних органов”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на крысах проводили в соответствии с регламентом, установленным МЗСР РФ № 708н от 23.08.10 (“Правила лабораторной практики”) и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях, и рекомендациями биоэтической комиссии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гусакова С.В., Смаглий Л.В., Бирулина Ю.Г., Ковалев И.В., Носарев А.В., Петрова И.В., Реутов В.П. 2017. Молекулярные механизмы действия газотрансмиттеров NO, CO, и H₂S в гладкомышечных клетках и влияние NO-генерирующих соединений (нитратов и нитритов) на среднюю продолжительность жизни. Успехи физиологических наук. Т. 48. № 1. С. 24 (Gusakova S.V., Smaglyi L.V., Birulina Y.G., Kovalev I.V., Nosarev A.V., Petrova I.V., Reutov V.P. 2017. Gazo-transmitters: Molecular mechanisms of action in smooth muscle cells. Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk. V. 48. № 1. P. 24)
- Дерягин О.Г., Гаврилова С.А., Буравков С.В., Андрианов В.В., Яфарова Г.Г., Гайнутдинов Х.Л., Кошелев В.Б. 2016. Роль АТФ-чувствительных калиевых каналов и оксида азота в защитном эффекте прекодиционирования мозга. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Т. 116. № 2. С. 16. (Deryagin O.G., Gavrilova S.A., Buravkov S.V., Andrianov V.V., Yafarova G.G., Gainutdinov Kh.L., Koshelev V.B. 2016. The role of ATP-dependent potassium channels and nitric oxide system in the neuroprotective effect of preconditioning. Zh. Nevrol. Psikiatr. im. S.S. Korsakova. V. 116. № 2. P. 16.)
- Дзугкоев С.Г., Дзугкоева Ф.С., Метельская В.А. 2010. Роль оксида азота в формировании эндотелиальной дисфункции при сахарном диабете. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. Т. 9. № 8. С. 63. (Dzugkoev S.G., Dzugkoeva F.S., Metelskaya V.A. 2010. Nitric oxide role and

- endothelial dysfunction development in diabetes mellitus. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. V. 9. № 8. P. 63.)
- Соколова И.Б., Горшкова О.П., Павличенко Н.Н. 2021. Коррекция постишемических изменений микроциркуляции в коре головного мозга крыс с помощью мезенхимных стволовых клеток. *Цитология*. Т. 63. № 5. С. 428. (Sokolova I.B., Gorshkova O.P., Pavlichenko N.N. 2021. Correction of post-ischemic microcirculation disturbances in the rat brain cortex by application of mesenchymal stem cells. V. 63. № 5. P. 428.)
- Шертаев М.М., Ибрагимов У.К., Икрамова С.Х., Якубова Ф.Т., Ибрагимов К.У. 2015. Морфологические изменения в тканях головного мозга при экспериментальной ишемии. *Вестник Новосибирского ГПУ*. Т. 1. № 23. С. 72. <https://doi.org/> (Sher tayev M.M., Ibragimov U.K., Ikr amova S.Kh., Yakubova F.T., Ibragimov K.U. 2015. Morphological changes in brain tissues after experimental ischemia. *Vestnik Novosibirskogo GPU*. V. 1. № 23. P. 72.) <https://doi.org/10.15293/2226-3365.1501.07>
- Azizi S.A., Stokes D., Augelli B.J., DiGirolamo C., Prockop D.J. 1998. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 95. P. 3908.
- Ball S., Shuttleworth C., Kietly C. 2007. Mesenchymal stem cells and neovascularization: role of platelet-derived growth factor receptors. *J. Cell Mol. Med*. V. 11. P. 1012.
- Chung T., Kim J., Choi B. 2015. Adipose-derived mesenchymal stem cells reduce neuronal death after transient global cerebral ischemia through prevention of blood-brain barrier disruption and endothelial damage. *Stem Cells Trans. Med*. V. 4. P. 178.
- Foster M., Coetzee W. 2016. KATP Channels in the cardiovascular system. *Physiol Rev*. V. 96. № 1. P. 177. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003>
- Gong Z., Niklason L. 2008. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). *FASEB J*. V. 22. P. 1635
- Liu K., Guo L., Zhou Z., Pan M., Yan C. 2019. Mesenchymal stem cells transfer mitochondria into cerebral microvasculature and promote recovery from ischemic stroke. *Microvasc. Res*. V. 123. P. 74.
- Oswald J., Boxberger S., Jorgensen B., Feldmann S., Ehninger G., Borhauser M., Werner C. 2004. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. V. 22. P. 377.
- Penforinis P., Pochampally R. 2011. Isolation and expansion of mesenchymal stem cells/multipotential stromal cells from human bone marrow. *Methods Mol. Biol*. V. 698. P. 11.
- Soltani N., Mohammadi E., Allahtavakoli M., Shamsizadeh A., Roohbakhsh A., Haghparast A. 2016. Effects of dimethyl sulfoxid on neuronal response characteristics in deep layers of rat barrel cortex. *Basic and Clinical Neurosciences*. V. 7. P. 213. <https://doi.org/10.15412/J.BCN.03070306>
- Sheikh A., Yano S., Mitaki S., Haque M., Yamaguchi S., Nagai A. 2019. A mesenchymal stem cells line (B10) increases angiogenesis in rat MCAO model. *Exp. Neurol*. V. 311. P. 182.
- Syed A.U., Koide M., Brayden J.E., Wellman G. 2019. Tonic regulation of middle meningeal artery diameter by ATP-sensitive potassium channels. *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism*. V. 39. P. 670. <https://doi.org/10.1177/0271678X17749392>
- Venkatesh N., Lamp S.T., Weiss J. 1991. Sulfonylureas, ATP-sensitive K⁺ channels, and cellular K⁺ loss during hypoxia, ischemia, and metabolic inhibition in mammalian ventricle. *Circul. Res*. V. 69. P. 623. <https://doi.org/10.1161/01.res.69.3.623>
- Watt S., Gullo F., Garde M., Markeson D., Camicia R., Khoo C., Zwaginga J. 2013. The angiogenic properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic potential. *Br. Med. Bull*. V. 108. P. 25.
- Yang Z., Cai X., Xu A., Xu F., Liang Q. 2015. Bone marrow stromal cell transplantation through tail vein injection promotes angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in cerebral infarct area in rats. *Cytotherapy*. V. 17. P. 1200.
- Yang H.Q., Subbotina E., Ramasamy R., Coetzee W.A. 2016. Cardiovascular KATP channels and advanced aging. *Pathobiol. Aging Age Relat. Dis*. V. 6. P. 32517. <https://doi.org/10.3402/pba.v6.32517>
- Zhou B., Tsaknakis G., Coldewell K., Khoo C., Roubelakis M., Chang C., Pepperell E., Watt S. 2012. A novel function from the haemopoietic supportive murine bone marrow MS-5 mesenchymal stromal cell line in promoting human vasculogenesis and angiogenesis. *Br. J. Haematol*. V. 157. P. 299.

The Effect of Intravenous Mesenchymal Cells Transplantation on the Functional Activity of K_{ATP} Channels of Pial Arteries after Brain Ischemia/Reperfusion

I. B. Sokolova^{a,*}, O. P. Gorshkova^a, and N. N. Pavlichenko^b

^a*Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, 199034 Russia*

^b*Trans-Technologies, Ltd, St. Petersburg, 192148 Russia*

**e-mail: SokolovaIB@infran.ru*

The aim of the study was to examine the effect of intravenous transplantation of human mesenchymal stem cells (hMSC) on the function of the K_{ATP} channels of pial arteries at different time points during post-ischemic period. Using a device for intravital visualization of pial vessels, we checked the reaction of the pial arteries to the application of K_{ATP} channels blocker glibenclamide (GB), K_{ATP} channels activator pinacidil (PI), acetylcholine (ACh) and acetylcholine combined with GB (ACh/GB) on the 7, 14, and 21 day after cerebral ischemia/reperfusion and intravenous hMSC transplantation. Two to five time less arteries reacted by contraction to GB application and one-and-a-half times less arteries dilated after PI application on the 7th day after I/R than in sham group. hMSC transplantation

carried out on the day of I/R had no effect on the K_{ATP} channels functions 7 days after I/R: the contraction reaction to GB and dilation reaction to PI were the same as in I/R group. Fourteen days after I/R the number of arteries constricted in response to GB were 1.5–2 times less than in sham group, and number of arteries dilated in response to PI were 2–2.5 times less. At the same time after I/R in the cell therapy group the number of arteries constricted to GB and dilated to PI almost fully matched such in the sham group. The functional state of K_{ATP} channels following I/R was assessed by comparing the dilatory response of pial arteries to the application of ACh and ACh in combination with K_{ATP} channels blocker glibenclamide. GB blocked dilatory reaction to ACh in sham animals. Simultaneous application of ACh and GB induced an increase in dilated arteries 7–14 days after I/R, and twenty-one days after I/R we observed no difference in the number of dilated vessels in response to application of ACh/GB or ACh alone. After MSC application, GB blocked dilation of pial arteries following ACh application in the same way as in sham animals, except for the first 7 days. It may be concluded that cerebral cortex I/R alleviated K_{ATP} channels contribution to the maintenance of the normal tone of pial vessels. These changes retained during 14 days after ischemia. Simultaneously, between 7 and 14 days after I/R the role of K_{ATP} channels in dilation reaction of pial arteries to ACh decreased: by the 21st day the channels take almost no part in dilatory response. Intravenous MSC transplantation on the day of cerebral I/R induced earlier restoration of K_{ATP} channels participation in keeping the normal tone of pial vessels (14 days) and ACh-mediated dilation of pial arteries.

Keywords: ischemia-reperfusion, brain, pial arteries, intravenous transplantation, mesenchymal stem cells, K_{ATP} channels

УДК 576.32/.36

ЛИГАНДЫ РЕЦЕПТОРОВ СИГМА-1 ХЛОРПРОМАЗИН И ТРИФЛУОПЕРАЗИН ПОДАВЛЯЮТ Ca^{2+} -ОТВЕТЫ В ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГАХ КРЫСЫ

© 2022 г. Л. С. Миленина¹, *, З. И. Крутецкая¹, **, В. Г. Антонов², Н. И. Крутецкая¹

¹Кафедра биофизики Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, 199034 Россия

²Кафедра клинической биохимии и лабораторной диагностики Военно-Медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, 194044 Россия

*E-mail: l.milenina@spbu.ru

**E-mail: z.krutetskaya@spbu.ru

Поступила в редакцию 28.09.2021 г.

После доработки 12.10.2021 г.

Принята к публикации 13.10.2021 г.

Рецепторы сигма-1 – повсеместные многофункциональные лигандрегулируемые молекулярные шапероны в мембране эндоплазматического ретикулума, имеющие уникальную историю, структуру и фармакологический профиль. Рецепторы сигма-1 связывают различные по химической структуре и фармакологическому действию лиганды и модулируют широкий спектр клеточных процессов в норме и патологии, включая процессы Ca^{2+} -сигнализации. Для выявления участия рецепторов сигма-1 в процессах Ca^{2+} -сигнализации в макрофагах исследовали влияние лигандов рецепторов сигма-1 нейролептиков фенотиазинового ряда хлорпромазина и трифлуоперазина на Ca^{2+} -ответы, вызываемые ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопьязониновой кислотой, а также дисульфидсодержащими иммуномодуляторами глутоксимом и моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы. С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM впервые показано, что хлорпромазин и трифлуоперазин подавляют обе фазы Ca^{2+} -ответов, индуцируемых глутоксимом, моликсаном, тапсигаргином и циклопьязониновой кислотой в перитонеальных макрофагах крысы. Полученные данные свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, вызываемом глутоксимом или моликсаном и приводящем к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в макрофагах. Результаты свидетельствуют также об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

Ключевые слова: трифлуоперазин, хлорпромазин, рецепторы сигма-1, перитонеальные макрофаги, внутриклеточная концентрация Ca^{2+}

DOI: 10.31857/S0041377122010072

Ион Ca^{2+} является универсальным вторичным мессенджером, действующим в клетках микроорганизмов, растений и животных (Berridge et al., 1998; Sarafoli, Krebs, 2016). Изменения в транспорте и внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, играют ключевую роль в запуске и регуляции общих и специализированных клеточных функций, таких как пролиферация, рост, секреция, сокращение, передача нервного импульса, иммунный ответ и т.д. (Berridge et al., 2000, 2003). В клетках иммунной системы (лимфоцитах, тучных клетках, макрофагах) ионы Ca^{2+} работают на всех стадиях жизни клетки, включая развитие, активацию, дифференцировку, продукцию цитокинов и, наконец, смерть клетки (Vig, Kinet, 2009; Trebak, Kinet, 2019).

Важными участниками процессов Ca^{2+} -сигнализации в клетках являются рецепторы сигма-1, имеющие уникальную историю, структуру, фармакологию и модулирующие широкий спектр клеточных процессов в норме и патологии (Su et al., 2010, 2016; Rousseaux, Greene, 2016; Penke et al., 2018; Schmidt, Kruse, 2019; Aishwarya et al., 2021). Международный союз общей и клинической фармакологии включил рецепторы сигма в список рецепторов только в 2013 г. как лигандрегулируемые неопиоидные внутриклеточные рецепторы (Alexander et al., 2013).

Рецепторы сигма-1 представляют собой уникальные многофункциональные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в мембране эндоплазматического ретикулума, на границе с митохондриями (MAM – mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane) (Su et al., 2010, 2016; Rousseaux, Greene, 2016; Schmidt, Kruse, 2019; Delprat et al., 2020; Aishwarya et al., 2021). Кроме того, они могут транслоцироваться к плазмалемме и взаимодействовать с

Принятые сокращения: $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – внутриклеточная концентрация Ca^{2+} ; ЦПК – циклопьязониновая кислота; ТФП – трифлуоперазин; ХП – хлорпромазин.

ионными каналами и другими рецепторами, а также встречаются в ядерной оболочке, где участвуют в регуляции транскрипции (Su et al., 2016). Эти рецепторы экспрессированы в клетках различных типов, включая клетки иммунной системы (Rousseaux, Greene, 2016; Penke et al., 2018; Aishwarya et al., 2021).

Рецептор сигма-1 был впервые клонирован в 1996 г. из печени морской свинки (Hanner et al., 1996) и клеток хориокарциномы плаценты человека (Kekuda et al., 1996). Оказалось, что рецептор сигма-1 представляет собой белок с молекулярной массой 25 кДа, содержащий 223 аминокислоты. Аминокислотная последовательность сигма-1-рецептора человека уникальна и не имеет гомологов среди других белков млекопитающих (Hanner et al., 1996; Ossa et al., 2017). В 2016 г. в лаборатории Крузе с использованием методов кристаллографии была впервые установлена трехмерная структура сигма-1-рецептора человека (Shmidt et al., 2016; Kruse, 2017). Обнаружено, что этот рецептор является тримером, состоящим из трех идентичных протомеров. Каждый протомер содержит один трансмембранный домен (Shmidt et al., 2016, 2018; Alon et al., 2017; Ossa et al., 2017; Shmidt, Kruse, 2019).

Рецепторы сигма-1 имеют очень широкий фармакологический профиль. Их лигандами являются различные по химической структуре и фармакологическому действию соединения: антидепрессанты (флувоксамин, сертралин, имипрамин), нейролептики (галоперидол, хлорпромазин), анальгетики (пентазоцин), анксиолитики (афобазол), противосудорожные (фенитоин), противикашлевые (дексстрометорфан, карбетапентан) и антигистаминные (хлорфенамин) препараты, наркотические средства (метамфетамин и кокаин) и препараты, применяемые при лечении нейродегенеративных заболеваний (амантадин, мемантин, донепезил) (Cobos et al., 2008; Maurice, Su, 2009; Chu, Ruoho, 2016; Vavers et al., 2019; Voronin et al., 2020). Из общих структурных черт лигандов следует отметить катионную аминогруппу и по меньшей мере одно ароматическое кольцо. Типичные нейролептики (галоперидол, флуфеназин, хлорпромазин, трифлуоперазин) имеют высокое сродство к рецепторам сигма-1 (Tam, Cook, 1984).

Выполняя функции шаперонов, рецепторы сигма-1 взаимодействуют с белками-мишенями (ионными каналами, рецепторами в плазмалемме и др.) и модулируют многие клеточные процессы, включая процессы Ca^{2+} -сигнализации (Su et al., 2010, 2016; Schmidt, Kruse, 2019; Pontisso, Combettes, 2021). В плазмалемме они взаимодействуют с потенциалзависимыми Ca^{2+} -, Na^{+} - и K^{+} -каналами, протон-активируемыми ионными каналами (ASICs), NMDA-рецепторами, рецепторами, связанными с G-белками (мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами, μ -опиоидными и D1- и D2-дофаминовыми рецепторами) и другими белками-мишенями (Su et al., 2010, 2016; Schmidt, Kruse, 2019). В мембране эндоплазма-

тического ретикула рецептор сигма-1 взаимодействует с рецептором инозитол-1,4,5-трифосфата 3-го типа, с другим молекулярным шапероном белком BiP (binding immunoglobulin protein) (Hayashi, Su, 2007) и Ca^{2+} -сенсором белком STIM1 (Srivats et al., 2016). Обнаружено, что взаимодействуя с рецепторами инозитол-1,4,5-трифосфата, рецепторы сигма-1 модулируют процессы Ca^{2+} -сигнализации в клетках: мобилизацию Ca^{2+} из депо (Hayashi et al., 2000; Wu, Bowen, 2008) и вход Ca^{2+} из наружной среды (Monnet, 2005; Hayashi, Su, 2007; Pontisso, Combettes, 2021). Выявлено их участие в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в клетках (Brailoiu et al., 2016; Rosado, 2016; Srivats et al., 2016; Berlansky et al., 2021).

Ранее нами было впервые показано, что антагонист рецепторов сигма-1 нейролептик галоперидол (производное бутирофенона) значительно подавляет обе фазы Ca^{2+} -ответов, вызываемых дисульфидсодержащими иммуномодуляторами глутоксимом® (динатриевая соль окисленного глутатиона с d-металлом в наноконцентрации) и моликсаном® (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина) (Крутецкая и др., 2017) и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопязониковой кислотой (ЦПК) (Крутецкая и др., 2018б) в перитонеальных макрофагах крысы.

Для подтверждения участия рецепторов сигма-1 в регуляции процессов Ca^{2+} сигнализации в макрофагах, представлялось целесообразным исследовать влияние других, структурно отличных, лигандов рецепторов сигма-1 на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые глутоксимом и моликсаном, а также тапсигаргином (Thastrup et al., 1989) и ЦПК (Goeger et al., 1988), в перитонеальных макрофагах крысы, что и составило предмет настоящего исследования.

В экспериментах использовали лиганды рецепторов сигма-1 хлорпромазин (ХП, аминазин, торазин) (Itzhak et al., 1990; Hayashi, Su, 2004) и трифлуоперазин (ТФП, трифтазин, стелазин) (Schuster et al., 1995; Hanner et al., 1996), относящиеся к первому поколению типичных нейролептиков (антипсихотических агентов) фенотиазинового ряда и имеющие долгую историю использования в клинике для терапии шизофрении и других психических заболеваний (Dilsaver, 1993; Ayano, 2016).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделение и культивирование перитонеальных макрофагов крыс. Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar. Содержание животных и все манипуляции выполняли в соответствии с нормативными документами и требованиями Приказа Минздрава России № 267 от 19.06.03 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”.

Резидентные макрофаги выделяли из перитонеальной полости крыс массой 180–250 г по традиционному методу; сразу после выделения клетки имели сферическую форму диаметром 10–20 мкм (Congrad, 1981; Randriamampita, Trautmann, 1987). Суспензию клеток помещали в бакпечатки с кварцевыми стеклами (10 × 10 мм) и культивировали в течение 1–3 сут при 37°C в среде 199 (pH 7.2), содержащей 20% сыворотки крови быка, глутамин (3%), пенициллин (100 Ед./мл) и стрептомицин (100 мг/мл). С помощью теста на α -нафтилэстеразу подтверждали, что по меньшей мере 96% клеток в монослоях являлись макрофагами (Monahan et al., 1981).

Эксперименты проводили при температуре 22–24°C через 1–2 сут после начала культивирования клеток. Кварцевые стекла с клетками помещали в экспериментальную камеру, заполненную физиологическим раствором следующего ионного состава (мМ): 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂ и 5 HEPES-NaOH, pH 7.3–7.4. Бескальциевая среда отличалась тем, что содержала 1 мМ ЭГТА и не содержала CaCl₂. Исследуемые агенты добавляли к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде. Для инициации входа Ca²⁺ в клетки, в среду вводили 2 мМ Ca²⁺.

Измерение [Ca²⁺]_i. Использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Макрофаги инкубировали в течение 45 мин в физиологическом растворе, содержащем 2 мкМ Fura-2AM, при 22–24°C. Стекла с окрашенными клетками отмывали физиологическим раствором и переносили в экспериментальную камеру флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм через объектив микроскопа. Для выделения соответствующих участков спектра использовали узкополосные оптические фильтры. Эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм при помощи специализированной видеокамеры Leica DFC340FX. Для управления экспериментом использовали систему обработки изображения ImageJ (плагин Micro-Manager 1.4).

Результатом измерений являлось отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при облучении светом с длиной волны 340 нм к интенсивности флуоресценции при облучении светом с длиной волны 380 нм (F_{340}/F_{380}), где F_{340} — интенсивность флуоресценции Fura-2AM, связанного с Ca²⁺, а F_{380} — интенсивность флуоресценции Fura-2AM, не связанного с Ca²⁺, отражающая изменения [Ca²⁺]_i в клетках во время измерений (Bruce, Elliott, 2000; Xie et al., 2002). Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. В экспериментах применяли объектив с увеличением 10× и апертурой 8 мм. Значения [Ca²⁺]_i рассчитывали по уравнению Гринкевича (Gryniewicz et al., 1985). Статистический анализ проводили с применением *t*-критерия Стьюдента. Данные

представлены в виде среднего и стандартного отклонения. Каждую регистрацию получали для группы из 40–50 клеток. На рисунках представлены результаты однотипных экспериментов из 6–8 независимых. Достоверными считали различия при $P \leq 0.05$.

Использованные реактивы: все реактивы приобретали в фирме Sigma-Aldrich (США). Маточные растворы Fura-2AM (1 мМ), ЦПК (10 мМ) и тапсигаргина (0.5 мМ) готовили в диметилсульфоксиде. Препараты глутоксим и моликсан были от фирмы ФАРМА-ВАМ (Санкт-Петербург). Маточные растворы глутоксима (50 мг/мл), моликсана (50 мг/мл), ТФП (2 мг/мл) и ХП (25 мг/мл) готовили в воде.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние хлорпромазина и трифлуоперазина на Ca²⁺-ответы, индуцируемые дисульфидсодержащими иммуномодуляторами. Фармакологические аналоги окисленного глутатиона (глутоксим и моликсан) используются как иммуномодуляторы и цитопротекторы в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний (Борисов и др., 2001; Соколова и др., 2002; Антушевич и др., 2013; Толстой и др., 2019). Эти препараты оказывают комплексное влияние на процессы редокс-регуляции в клетках, однако тонкие биофизические механизмы их действия далеки от полного понимания.

В настоящей работе контрольные эксперименты показали, что инкубация макрофагов в течение 20 мин со 100 мкг/мл глутоксима (рис. 1а) или 100 мкг/мл моликсана (рис. 2а) в бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее увеличение [Ca²⁺]_i, отражающее мобилизацию Ca²⁺ из внутриклеточных Ca²⁺-депо. Через 20 мин после добавления агентов [Ca²⁺]_i в среднем увеличивалась от базального уровня, равного 90 ± 18, до 135 ± 18 нМ ($n = 7$; $P < 0.05$) для глутоксима и 134 ± 20 нМ ($n = 6$; $P < 0.05$) для моликсана. При введении в наружную среду 2 мМ Ca²⁺ наблюдали дальнейшее повышение [Ca²⁺]_i, отражающее депозависимый вход Ca²⁺ в цитозоль (рис. 1, 2). В среднем увеличение [Ca²⁺]_i во время входа Ca²⁺ составило 223 ± 22 нМ ($n = 7$; $P < 0.05$) и 202 ± 20 нМ ($n = 6$; $P < 0.05$) для глутоксима и моликсана соответственно.

В наших экспериментах впервые было обнаружено, что преинкубация перитонеальных макрофагов с 25 мкг/мл ХП в течение 10 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима приводила к значительному подавлению как мобилизации Ca²⁺ из депо (на 58.5 ± 4.6%, $n = 7$; $P < 0.05$), так и последующего депозависимого входа Ca²⁺ в клетки (на 59.1 ± 6.1%, $n = 7$; $P < 0.05$), индуцируемых глутоксимом (рис. 1б). Предварительная инкубация клеток с 2 мкг/мл ТФП в течение 15 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима также вызывала подавление фазы мобилизации Ca²⁺ из депо (на 36.2 ± 5.7%, $n = 8$; $P < 0.05$) и депозависи-

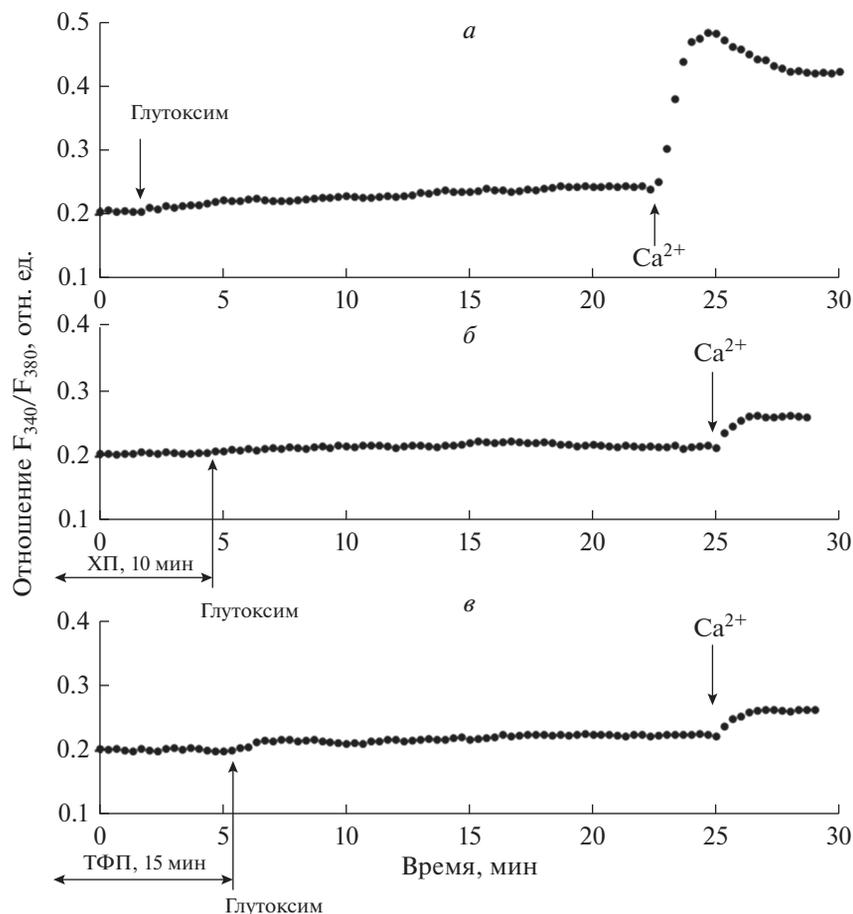


Рис. 1. Влияние хлорпромазина (ХП, 25 мкг/мл) и трифлуоперазина (ТФП, 2 мкг/мл) на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое глутоксимом в перитонеальных макрофагах крысы. Здесь и на рис. 2–4 по оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fuga-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (F_{340}/F_{380} , отн. ед.). Условия стимуляции: *а* – макрофаги инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; *б*, *в* – макрофаги, находящиеся в бескальциевой среде, инкубировали в течение 10 мин с ХП (*б*) или в течение 15 мин с ТФП (*в*), затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . Здесь и на рис. 2–4 каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант из 6–8 независимых экспериментов.

мого входа Ca^{2+} в макрофаги (на $60.7 \pm 7.1\%$, $n = 7$; $P < 0.05$), вызываемых глутоксимом (рис. 1*в*).

Сходные результаты были получены в экспериментах по влиянию ХП и ТФП на Ca^{2+} -ответы, вызываемые в макрофагах 100 мкг/мл моликсана (рис. 2*б*, *в*). Так, подавление фазы мобилизации Ca^{2+} из депо составило в среднем $43.2 \pm 8.9\%$ ($n = 8$; $P < 0.05$) и $63.3 \pm 2.4\%$ ($n = 7$; $P < 0.05$), а подавление депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги – $52.3 \pm 9.1\%$ ($n = 8$; $P < 0.05$) и $65.3 \pm 5.0\%$ ($n = 7$; $P < 0.05$) для ХП и ТФП соответственно.

Влияние фенотиазиновых нейролептиков на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз. В контрольных экспериментах мы обнаружили, что добавление 0.5 мкМ тапсигаргина к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, вызывает незначительное увеличение $[Ca^{2+}]_i$, отра-

жающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо (рис. 3*а*). В среднем увеличение $[Ca^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации составило 26 ± 7 нМ ($n = 7$; $P < 0.05$). При последующем введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдали депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 3*а*). В среднем увеличение $[Ca^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 160.2 ± 20.5 нМ ($n = 7$; $P < 0.05$). Сходные результаты мы получили при использовании 10 мкМ ЦПК (рис. 4*а*): в среднем увеличение $[Ca^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызываемой ЦПК, составило 37.8 ± 9.8 нМ ($n = 7$; $P < 0.05$), а во время депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги – 150.2 ± 23.7 нМ ($n = 7$; $P < 0.05$) (рис. 4*а*).

В наших экспериментах впервые было обнаружено, что преинкубация макрофагов с 25 мкг/мл ХП в номинально бескальциевой среде в течение 10 мин

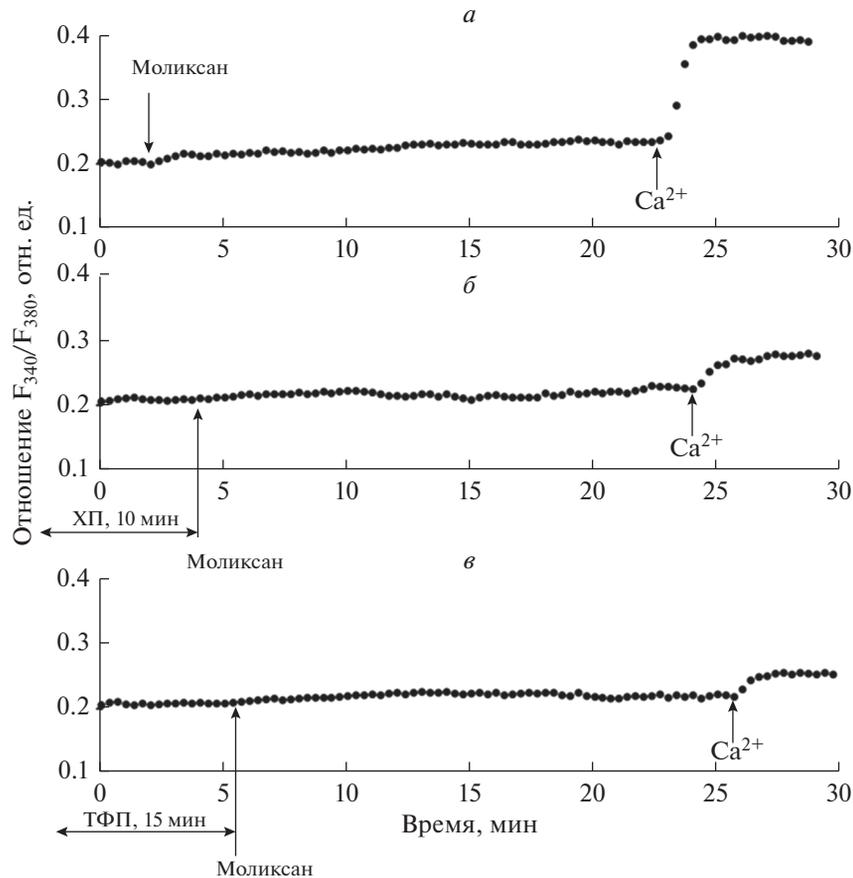


Рис. 2. Влияние ХП и ТФП на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое моликсаном (100 мкг/мл) в перитонеальных макрофагах крысы. *а, б, в* – Условия предварительной стимуляции в бескальциевой среде и последующей инициации входа Ca^{2+} те же, что указаны в подписи к рис. 1.

до введения 0.5 мкМ тапсигаргина вызывает значительное подавление обеих фаз Ca^{2+} -ответов, индуцированных тапсигаргином (рис. 3б). Так, подавление фазы мобилизации Ca^{2+} из депо составило $59.3 \pm 8.2\%$ ($n = 7$; $P < 0.05$), а депозависимого входа Ca^{2+} – $68.2 \pm 10.4\%$ ($n = 7$; $P < 0.05$). Сходные результаты были получены в экспериментах с применением 10 мкМ ЦПК (рис. 4б). Подавление ХП мобилизации Ca^{2+} из депо составило $40.2 \pm 9.1\%$ ($n = 7$; $P < 0.05$), а подавление депозависимого входа Ca^{2+} – $63.4 \pm 11.5\%$ ($n = 7$; $P < 0.05$).

Другой нейролептик фенотиазинового ряда ТФП также значительно подавлял обе фазы Ca^{2+} -ответов, индуцированных тапсигаргином или ЦПК. Показано, что предварительная инкубация клеток с 2 мкг/мл ТФП в течение 10 мин до введения 0.5 мкМ тапсигаргина (рис. 3в) вызывала подавление фазы мобилизации Ca^{2+} из депо (на $59.0 \pm 9.4\%$, $n = 7$; $P < 0.05$) и депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги (на $73.5 \pm 11.2\%$, $n = 7$; $P < 0.05$), вызываемых тапсигаргином (рис. 3в). Сходные данные были получены в экспериментах с применением 10 мкМ ЦПК (рис. 4в). Подавление мобилизации Ca^{2+} из депо ТФП составило

$40.1 \pm 9.7\%$ ($n = 7$; $P < 0.05$), а подавление депозависимого входа Ca^{2+} – $60.4 \pm 10.8\%$ ($n = 7$; $P < 0.05$). Это подтверждает полученные нами ранее данные о том, что преинкубация клеток с ТФП приводит к подавлению депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и ЦПК, в перитонеальных макрофагах крысы (Крутецкая и др., 2018а).

Таким образом, в настоящей работе мы впервые на перитонеальных макрофагах крысы показали, что лиганды рецепторов сигма-1 нейролептики фенотиазинового ряда ХП и ТФП подавляют обе фазы Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксимом или моликсаном, а также тапсигаргином и ЦПК, в перитонеальных макрофагах. Результаты согласуются с данными исследований других авторов, которые обнаружили, что лиганды рецепторов сигма-1 ХП и ТФП подавляют мобилизацию Ca^{2+} из депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемые АТФ или тапсигаргином, в клетках лейкоза человека (линия HL-60) (Harper et al., 1997; Harper, Daly, 1999). Показано также, что ХП ингибирует депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый брадикинином или тапсигаргином в

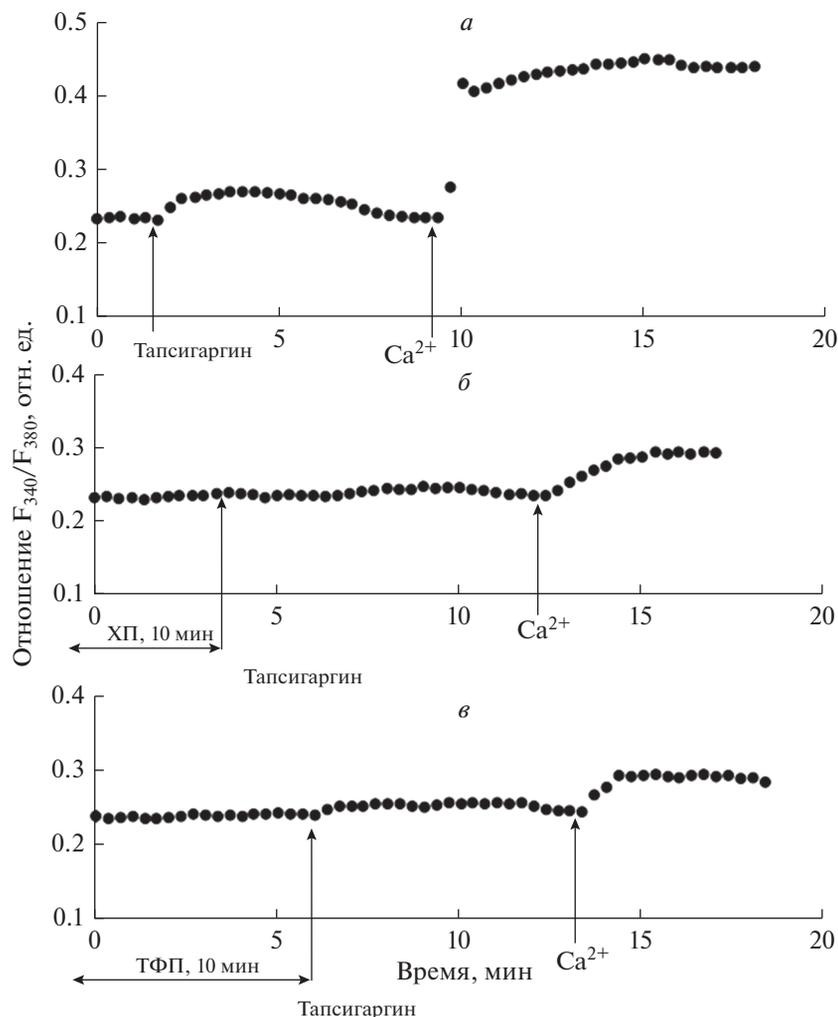


Рис. 3. Влияние ХП (25 мкг/мл) и ТФП (2 мкг/мл) на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые тапсигаргином (0.5 мкМ) в перитонеальных макрофагах крысы. *а, б, в* – Условия эксперимента те же, что указаны в подписи к рис. 1.

клетках феохромоцитомы крысы (линия PC12) (Choi et al., 2001), а преинкубация клеток с ТФП приводит к существенному подавлению депозависимого входа Ca^{2+} , вызываемого тапсигаргином, в клетках эмбриональной почки человека (линия HEK-293) (Wang et al., 2015). Обнаружено также, что антагонисты сигма-1 рецепторов (вещества VD1063 и VD1047) ингибируют депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый гистамином в эндотелиальных клетках подкожной вены ноги человека (Amer et al., 2013), а VD1063 значительно подавляет депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый тапсигаргином, в клетках аденокарциномы молочной железы человека (линия MCF7) (Gasparre et al., 2017). Кроме того, известно, что ХП и ТФП ингибируют потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы в клетках разных типов. Так, ХП обратимо и дозозависимо блокирует потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы L- и T-типов в клетках нейробластомы мыши (линия N1E-115) (Ogata, Narahashi, 1990; Ogata et al., 1990), потенциалзависимые

Ca^{2+} -каналы R-типа в нейронах человека (McNaughton et al., 2001) и Ca^{2+} -каналы L-типа в клетках феохромоцитомы крысы (линия PC12) (Ito et al., 1996), а ТФП блокирует потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы L-типа в гладкомышечных клетках крысы (Nakazawa et al., 1993) и нейронах улитки *Helix aspersa* (Cruzblanca et al., 1998).

Результаты настоящей и более ранних работ (Крутецкая и др., 2017, 2018в) о подавлении лигандами рецепторов сигма-1 Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксимином и моликсаном в макрофагах, свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, запускаемом глутоксимином или моликсаном и приводящем к увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы. Результаты указывают также на нежелательность совместного применения в клинической практике препаратов глутоксима или моликсана и нейролептиков фенотиазинового ряда ХП и ТФП.

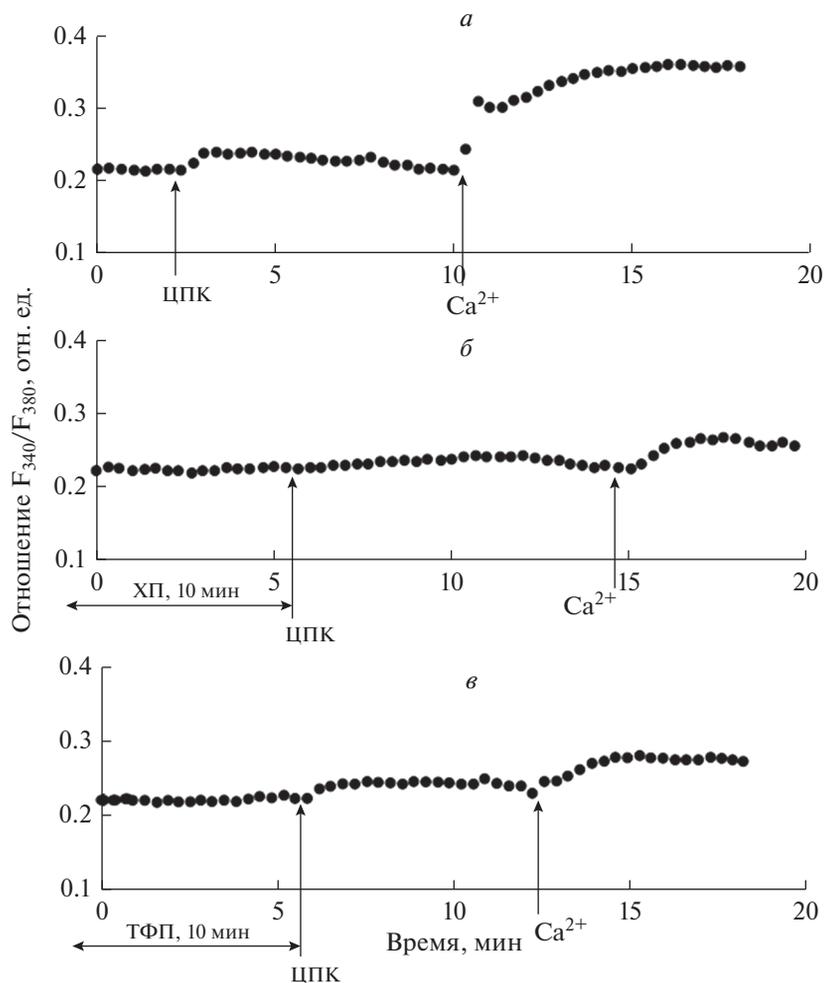


Рис. 4. Влияние ХП (25 мкг/мл) и ТФП (2 мкг/мл) на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые циклопязониковой кислотой (ЦПК, 10 мкМ) в перитонеальных макрофагах крысы. *а, б, в* – Условия эксперимента те же, что указаны в подписи к рис. 1.

Полученные нами данные свидетельствуют также об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого дисульфидсодержащими иммуномодуляторами и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз, в перитонеальных макрофагах крыс и позволяют рассматривать рецепторы сигма-1 в качестве нового регуляторного компонента сигнального комплекса депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах. Рецепторы сигма-1 могут влиять на депозависимый вход Ca^{2+} , модулируя связывание между основными компонентами белкового комплекса депозависимого входа Ca^{2+} – белками STIM1 в мембране эндоплазматического ретикула и Orai1 в плазмалемме (Srivats et al., 2016).

Результаты могут также способствовать более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия фенотиазиновых нейролептиков. Кроме того, полученные данные могут иметь значение для терапии заболеваний, опосредованных нарушением функционирования ре-

цепторов сигма-1. Так, известно, что изменения субклеточной локализации, экспрессии и сигнальных функций рецепторов сигма-1 приводят к развитию широкого ряда заболеваний человека (Su et al., 2010, 2016; Rousseaux, Greene, 2016; Schmidt, Kruse, 2019; Aishwarya et al., 2021). Выявлено участие этих рецепторов в патофизиологии нейропсихиатрических (шизофрении, тревожных расстройств, депрессивных состояний и деменции) (Hayashi, Su, 2004; Tsai et al., 2009, 2014; Ishikawa, Hashimoto, 2010; Hayashi, 2015; Voronin et al., 2020), нейродегенеративных (болезней Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона, бокового амиотрофического склероза) (Ryskamp et al., 2017, 2019; Penke et al., 2018; Hayashi, 2019; Schmidt, Kruse, 2019; Yang et al., 2019; Herrando-Grabulosa et al., 2020; Zhemkov et al., 2021), онкологических (Kim, Maher, 2017; Soriani, Rapetti-Mauss, 2017; Pontisso, Combettes, 2021) и сердечнососудистых (Stracina, Novakova, 2018; Aishwarya et al., 2021) заболеваний, болевых синдромов (Merlos et al., 2017a, 2017b) и ретинопатий (Wang et al., 2017; Smith et al.,

2018). Это позволило рассматривать рецепторы сигма-1 как перспективные фармакологические мишени для терапии этих заболеваний.

В последнее время изучается также возможная роль сигма-1 рецепторов в патофизиологии короновирусной инфекции (COVID-19). Появляются данные, что рецепторы сигма-1 могут быть перспективной терапевтической мишенью при лечении пациентов с COVID-19. Полагают, что рецепторы сигма-1 регулируют ключевые механизмы адаптивного стрессового ответа клеток-хозяев и принимают участие в ранних стадиях репликации вируса (Vela, 2020; Hashimoto, 2021).

Многие перепрофилированные лекарства, включенные в схемы комплексной терапии пациентов с COVID-19, часто идентифицируются как лиганды рецепторов сигма-1. К их числу относятся нейролептики галоперидол, ХП и ТФП (Plaze et al., 2020; Vela, 2020). Полагают, что наиболее перспективным препаратом является ХП (Muric et al., 2020; Nobile et al., 2020; Plaze et al., 2020; Stip, 2020; Stip et al., 2020). Имеются данные, что катионные амфифильные соединения, к которым относятся фенотиазиновые нейролептики, имеют противовирусную активность и подавляют вход и репликацию РНК вирусов (Otręba et al., 2020; Vela, 2020; Gitahy Falcao Faria et al., 2021). Так, показано, что ХП ингибирует репликацию SARS-CoV-2 в клетках обезьяны (линия VeroE6) и клетках эпителия альвеол человека (линия A549-ACE2) (Plaze et al., 2021). Кроме того, лиганды рецепторов сигма-1 галоперидол (Hoertel et al., 2021a) и ХП (Hoertel et al., 2021b) уже прошли клинические испытания в качестве препаратов для терапии пациентов с COVID-19.

Известно также, что вирусы выработали механизмы нарушения Ca^{2+} -гомеостаза клеток хозяев и увеличивают $[Ca^{2+}]_i$, поскольку Ca^{2+} необходим для проникновения вируса в клетку, для репликации, созревания и освобождения вируса (Zhou et al., 2009; Chen et al., 2019). В связи с этим, блокирование вызванного вирусом увеличения $[Ca^{2+}]_i$ путем ингибирования каналов кальциевого выброса в мембране эндоплазматического ретикулума (рецепторов инозитол-1,4,5-трифосфата и риадиноновых рецепторов) или каналов входа Ca^{2+} в плазмалемме (потенциалзависимых и депозависимых Ca^{2+} -каналов) является одним из подходов в терапии вирусных инфекций (Chen et al., 2019). Так, обнаружено, что блокаторы потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов нифедипин и амлодипин снижают смертность и уменьшают риск необходимости искусственной вентиляции легких у пожилых пациентов с COVID-19 и гипертонией (Solaimanzadeh, 2020; Zhang et al., 2020).

Таким образом, полученные нами данные о подавлении лигандами рецепторов сигма-1 (ХП и ТФП) обеих фаз Ca^{2+} -ответов, индуцируемых дисульфидсодержащими иммуномодуляторами и ин-

гибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз в перитонеальных макрофагах крыс, дополнительно подтверждают многогранность эффектов производных фенотиазина и свидетельствуют в пользу терапевтического потенциала фенотиазиновых нейролептиков, как лигандов рецепторов сигма-1.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках плановых тем Кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного университета и Кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики Военно-Медицинской академии им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург), а также Договоров СПбГУ на выполнение научно-исследовательских работ № 01/18-НИОКР от 05.03.2018 и 05/03-20 от 12.03.2020.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных проводили в соответствии с общепринятыми этическими международными нормами (International guiding principles for biomedical research involving animals, 1985) и требованиями приказа Минздрава России № 267 от 19.06.2003 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антушевич А.А., Антонов В.Г., Гребенюк А.Н., Антушевич А.Е., Ладанова Т.В., Бурова Е.Б. 2013. Патофизиологические основы эффективности глутоксима как средства сопровождения лучевой терапии рака ротоглотки. Вестник Рос. Военно-мед. акад. Т. 3. № 43. С. 32. (Antushevich A.A., Antonov V.G., Grebenyuk A.N., Antushevich A.E., Ladanova T.V., Burova E.B. 2013. Pathophysiologic rationale of effectiveness of glutoxim supportive therapy add-on to radiotherapy management of oropharyngeal cancer. Vestnik Rossiiskoi Voenno-medicinskoi akademii. V. 3. № 43. P. 32.)
- Борисов А.Е., Кожемякин Л.А., Антушевич А.Е., Кетлицкая О.С., Кошечко В.А., Чепур С.В., Кацалуха В.В., Васюкова Е.Л., Новиченков А.О., Мотушук И.Е. 2001. Клинико-экспериментальное обоснование регионального и системного введения препаратов группы тиопозтинов при циррозе печени. Вестник хирургии им. И.И. Грекова. Т. 4. № 2. С. 32. (Borisov A.E., Kozhemyakin L.A., Antushevich A.E., Ketliskaya O.S., Kashchenko V.A., Chepur S.V., Katsalucha V.V., Vasyukova E.L., Novichenkov A.O., Motushchuk I.E. 2001. Clinical and experimental grounds of the regional and systemic administration of the thiopoetin group medicines for cirrhosis of the liver. First communication. Vestnik hirurgii im. I.I. Grekova. V. 4. № 2. P. 32.)
- Крутецкая З.И., Миленина Л.С., Наумова А.А., Бутов С.Н., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д. 2017. Антагонист рецепторов сигма-1 галоперидол подавляет Ca^{2+} -ответы в макрофагах, вызываемые глутоксимом и моликса-

- ном. Доклады Академии наук. Т. 472. № 6. С. 723. (*Krutetskaya Z.I., Milenina L.S., Naumova A.A., Butov S.N., Antonov V.G., Nozdrachev A.D.* 2017. Sigma-1 receptor antagonist haloperidol attenuates Ca^{2+} responses induced by glutoxim and molixan in macrophages. *Doklady Biochem. Biophys.* V. 472. № 1. P. 74.)
- Крутецкая З.И., Миленина Л.С., Наумова А.А., Бутов С.Н., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д.* 2018а. Трифлуоперазин подавляет в макрофагах депозависимый вход Ca^{2+} . Доклады Академии наук. Т. 478. № 6. С. 709. (*Krutetskaya Z.I., Milenina L.S., Naumova A.A., Butov S.N., Antonov V.G., Nozdrachev A.D.* 2018а. Trifluoperazine attenuates store-dependent Ca^{2+} entry in macrophages. *Doklady Biochem. Biophys.* V. 478. № 1. P. 44.)
- Крутецкая З.И., Миленина Л.С., Наумова А.А., Бутов С.Н., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д.* 2018б. Антагонист рецепторов сигма-1 галоперидол подавляет депозависимый вход Ca^{2+} в макрофагах. Доклады Академии наук. Т. 480. № 5. С. 613. (*Krutetskaya Z.I., Milenina L.S., Naumova A.A., Butov S.N., Antonov V.G., Nozdrachev A.D.* 2018б. Sigma-1 receptor antagonist haloperidol attenuates store-dependent Ca^{2+} entry in macrophages. *Doklady Biochem. Biophys.* V. 480. № 1. P. 162.)
- Крутецкая З.И., Миленина Л.С., Наумова А.А., Бутов С.Н., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д.* 2018в. Амитриптилин подавляет Ca^{2+} -ответы в макрофагах, вызываемые глутоксимом и моликсаном. Доклады Академии наук. Т. 481. № 5. С. 570. (*Krutetskaya Z.I., Milenina L.S., Naumova A.A., Butov S.N., Antonov V.G., Nozdrachev A.D.* 2018в. Amitriptyline attenuates Ca^{2+} responses induced by glutoxim and molixan in macrophages. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* V. 481. № 1. P. 222.)
- Соколова Г.Б., Синицын М.В., Кожемякин Л.А., Перельман М.И.* 2002. Глутоксим в комплексной терапии туберкулеза. Антибиотики и химиотерапия. Т. 47. № 2. С. 20. (*Sokolova G.B., Sinityn M.V., Kozhemiakin L.A., Perel'man M.I.* 2002. Glutoxim in the complex treatment of tuberculosis. *Antibiot. Khimioter.* V. 47. № 2. P. 20.)
- Толстой О.А., Цыган В.Н., Климов А.Г., Степанов А.В., Антушевич А.Е.* 2019. Экспериментальная оценка эффективности препарата моликсан по восстановлению работоспособности вирусинфицированных лабораторных животных. Известия Рос. военно-мед. акад. Т. 38. № 1. С. 271. (*Tolstoy O.A., Tsygan V.N., Klimov A.G., Stepanov A.V., Antushevich A.E.* 2019. Experimental evaluation of the efficiency of the drug molixan on restoring the operation of virus-infected laboratory animals. *Bull. Russ. Military Med. Acad.* V. 38. № 1. P. 271.)
- Aishwarya R., Abdullah C.S., Morshed M., Remex N.S., Bhuiyan M.S.* 2021. Sigma-1's molecular, cellular, and biological functions in regulating cellular pathophysiology. *Front. Physiol.* V. 12. P. 705575. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.705575>
- Alexander S.P.H., Benson H.E., Faccenda E., Pawson A.J., Sharman J.L., McGrath J.C., Catterall W.A., Spedding M., Peters J.A., Harmar A.J.* 2013. The concise guide to pharmacology 2013/14: overview. *Br. J. Pharmacol.* V. 170. P. 1449. <https://doi.org/10.1111/bph.12444>
- Alon A., Schmidt H., Zheng S., Kruse A.C.* 2017. Structural perspectives on sigma-1 receptor function. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 964. P. 5.
- Amer M.S., McKeown L., Tumova S., Liu R., AL Seymour V., Wilson L.A., Naylor J., Greenhalgh K., Hou B., Majeed Y., Turner P., Sedo A., O'Regan D. J., Li J., Bon R. S., Porter K.E., Beech D.J.* 2013. Inhibition of endothelial cell Ca^{2+} entry and transient receptor potential channels by sigma-1 receptor ligands. *Br. J. Pharmacol.* V. 168. P. 1445.
- Ayano G.* 2016. First generation antipsychotics: pharmacokinetics, pharmacodynamics, therapeutic effects and side effects: A review. *Res. Rev. J. Chem.* V. 5. P. 53.
- Berlansky S., Humer C., Sallinger M., Frischauf I.* 2021. More than just simple interaction between STIM and Orai proteins: CRAC channel function enabled by a network of interactions with regulatory proteins. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 471. <https://doi.org/10.3390/ijms22010471>
- Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P.* 1998. Calcium, a life and death signal. *Nature.* V. 395. P. 645.
- Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L.* 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 4. P. 517.
- Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D.* 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 1. P. 11.
- Brailoiu G.C., Deliu E., Console-Bram L.M., Soboloff J., Abood M.E., Unterwald E.M., Brailoiu E.* 2016. Cocaine inhibits store-operated Ca^{2+} entry in brain microvascular endothelial cells: Critical role for sigma-1 receptors. *Biochem. J.* V. 473. P. 1.
- Bruce J.I.E., Elliott A.C.* 2000. Pharmacological evaluation of the role of cytochrome P450 in intracellular calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Brit. J. Physiol.* V. 131. P. 761.
- Carafoli E., Krebs J.* 2016. Why calcium? How calcium became the best communicator. *J. Biol. Chem.* V. 291. P. 20849.
- Chen X., Cao R., Zhong W.* 2019. Host calcium channels and pumps in viral infections. *Cells.* V. 9. P. 94. <https://doi.org/10.3390/cells9010094>
- Choi S.-Y., Kim Y.-H., Lee Y.-K., Kim K.-T.* 2001. Chlorpromazine inhibits store-operated calcium entry and subsequent noradrenaline secretion in PC12 cells. *British J. Pharmacol.* V. 132. P. 411.
- Chu U.B., Ruoho A.E.* 2016. Biochemical pharmacology of the sigma-1 receptor. *Mol. Pharmacol.* V. 89. P. 142.
- Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., Cendán C.M., Del Pozo E.* 2008. Pharmacology and therapeutic potential of sigma (1) receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.* V. 6. P. 344.
- Conrad R.E.* 1981. Induction and collection of peritoneal exudate macrophages. In: *Manual of macrophages methodology.* N.Y.: Marcell Dekker. P. 5.
- Cruzblanca H., Gamiño S.M., Bernal J., Alvarez-Leefmans F.J.* 1998. Trifluoperazine enhancement of Ca^{2+} -dependent inactivation of L-type Ca^{2+} currents in *Helix aspersa* neurons. *Invert. Neurosci.* V. 3. P. 269.
- Delprat B., Crouzier L., Su T.-P., Maurice T.* 2020. At the crossing of ER stress and MAMs: A key role of sigma-1 receptor? *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 1131. P. 699.
- Dilsaver S.C.* 1993. Antipsychotic agents: A review. *Amer. Fam. Phys.* V. 47. P. 199.
- Gitahy Falcao Faria C., Weiner L., Petriguet J., Hingray C., Ruiz De Pellon Santamaria A., Villoutreix B.O., Beaune P., Lebroyer M., Javelot H.* 2021. Antihistamine and cationic am-

- piphilic drugs, old molecules as new tools against the COVID-19? *Med. Hypotheses*. V. 148: 110508. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2021.110508>
- Gasparre G., Abate C., Carlucci R., Berardi F., Cassano G.* 2017. The σ_1 receptor agonist (+)-pentazocine increases store-operated Ca^{2+} entry in MCF7 σ_1 and SK-N-SH cell lines. *Pharmacol. Rep.* V. 69. P. 542.
- Goeger D.E., Riley R.T., Dorner J.W., Cole R.J.* 1988. Cyclopiazonic acid inhibition of the Ca^{2+} transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem. Pharmacol.* V. 37. P. 978.
- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y.* 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* V. 260. P. 3440.
- Hanner M., Moebius F.F., Flandorfer A., Knaus H.G., Striessnig J., Kempner E., Glossman H.* 1996. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93. P. 8072. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.8072>
- Harper J.L., Daly J.W.* 1999. Inhibitors of store-operated calcium channels: Imidazoles, phenothiazines, and other tricyclics. *Drug Dev. Res.* V. 47. P. 107.
- Harper J.L., Shin Y., Daly J.W.* 1997. Loperamide: A positive modulator for store-operated calcium channels? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 94. P. 14912.
- Hashimoto K.* 2021. Repurposing of CNS drugs to treat COVID-19 infection: Targeting the sigma-1 receptor. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* V. 271. P. 249. <https://doi.org/10.1007/s00406-020-01231-x>
- Hayashi T.* 2015. Sigma-1 receptor: the novel intracellular target of neuropsychotropic drugs. *J. Pharmacol. Sci.* V. 127. P. 2.
- Hayashi T.* 2019. The sigma-1 receptor in cellular stress signaling. *Front. Neurosci.* V. 13: 733. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00733>
- Hayashi T., Maurice T., Su T.-P.* 2000. Ca^{2+} signalling via σ_1 -receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca^{2+} concentration. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* V. 293. P. 788.
- Hayashi T., Su T.-P.* 2004. Sigma-1 receptor ligands: potential in the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Drugs.* V. 18. P. 269.
- Hayashi T., Su T.-P.* 2007. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca^{2+} signaling and cell survival. *Cell.* V. 131. P. 596.
- Herrando-Grabulosa M., Gaja-Capdevila N., Vela J.M., Navarro X.* 2020. Sigma 1 receptor as a therapeutic target for amyotrophic lateral sclerosis. *Br. J. Pharmacol.* V. 178. P. 1336.
- Hoertel N., Sanchez-Rico M., Vernet R., Jannot A.-S., Neuraz A., Blanco C., Lemogne C., Airagnes G., Paris N., Daniel Ch., Gramfort A., Lemaitre G., Bernaux M., Bellamine A., Beeker N., Limosin F.* 2021a. Observational study of haloperidol in hospitalized patients with COVID-19. *PLoS One.* V. 16. P. e0247122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247122>
- Hoertel N., Sanchez-Rico M., Vernet R., Jannot A.-S., Neuraz A., Blanco C., Lemogne C., Airagnes G., Paris N., Daniel Ch., Gramfort A., Lemaitre G., Bernaux M., Bellamine A., Beeker N.* 2021b. Observational study of chlorpromazine in hospitalized patients with COVID-19. *Clin. Drug Investigation.* V. 41. P. 221. <https://doi.org/10.1007/s40261-021-01001-0>
- Ishikawa M., Hashimoto K.* 2010. The role of sigma-1 receptors in the pathophysiology of neuropsychiatric diseases. *J. Receptor, Ligand Channel Res.* V. 3. P. 25.
- Ito K., Nakazawa K., Koizumi S., Liu M., Takeuchi K., Hashimoto T., Ohno Y., Inoue K.* 1996. Inhibition by antipsychotic drugs of L-type Ca^{2+} channel current in PC12 cells. *Eur. J. Pharmacol.* V. 314. P. 143.
- Itzhak Y., Ruhland M., Krahling H.* 1990. Binding of umespiro-1 to the sigma receptor: evidence for multiple affinity states. *Neuropharmacol.* V. 29. P. 181.
- Kekuda R., Prasad P.D., Fei Y.J., Leibach F.H., Ganapathy V.* 1996. Cloning and functional expression of the human type 1 sigma receptor (hSigmaR1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 229. P. 553. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1842>
- Kim F.J., Maher C.M.* 2017. Sigma1 pharmacology in the context of cancer. *Handb. Exp. Pharmacol.* V. 244. P. 237.
- Kruse A.* 2017. Structural insights into sigma1 function. *Handb. Exp. Pharm.* V. 244. P. 13.
- Maurice T., Su T.-P.* 2009. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol. Ther.* V. 124. P. 195.
- McNaughton N.C.L., Green P.J., Randall A.D.* 2001. Inhibition of human α_{1E} subunit-mediated Ca^{2+} channels by the antipsychotic agent chlorpromazine. *Acta Physiol. Scand.* V. 173. P. 401. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28315267>
- Merlos M., Burgueño J., Portillo-Salido E., Plata-Salamán C.R., Vela J.M.* 2017a. Pharmacological modulation of the sigma 1 receptor and the treatment of pain. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 964. P. 85. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50174-1_8
- Merlos M., Romero L., Zamanillo D., Plata-Salamán C., Vela J.M.* 2017b. Sigma-1 receptor and pain. *Handb. Exp. Pharmacol.* V. 244. P. 131.
- Monahan R.A., Dvorak H.F., Dvorak A.M.* 1981. Ultrastructural localization of nonspecific esterase activity in guinea pig and human monocytes, macrophages and lymphocytes. *Blood.* V. 58. P. 1089.
- Monnet F.P.* 2005. Sigma-1 receptor as regulator of neuronal intracellular Ca^{2+} : clinical and therapeutic relevance. *Biol. Cell.* V. 97. P. 878.
- Muric N.N., Arsenijevic N.N., Milica M., Borovcanin M.M.* 2020. Chlorpromazine as a potential antipsychotic choice in COVID-19 treatment. *Front. Psychiatry.* V. 11. P. 612347. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.612347>
- Nakazawa K., Higo K., Abe K., Tanaka Y., Saito H., Matsuki N.* 1993. Blockade by calmodulin inhibitors of Ca^{2+} channels in smooth muscle from rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* V. 109. P. 137.
- Nobile B., Durand M., Courtet P., Van de Perre P., Nagot N., Molès J.P., Olié E.* 2020. Could the antipsychotic chlorpromazine be a potential treatment for SARS-CoV-2? *Schizophrenia Res.* V. 223. P. 373.
- Ogata N., Yoshii M., Narahashi T.* 1990. Differential block of sodium and calcium channels by chlorpromazine in mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol.* V. 420. P. 165.
- Ogata N., Narahashi T.* 1990. Potent blocking action of chlorpromazine on two types of calcium channels in cultured neuroblastoma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* V. 252. P. 1142.

- Ossa F., Schnell J.R., Ortega–Roldan J.L. 2017. A review of the human sigma-1 receptor structure. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 964. P. 15.
- Otreba M., Korsmider L., Rzepecka–Stojko A. 2020. Antiviral activity of chlorpromazine, fluphenazine, perphenazine, prochlorperazine, and thioridazine towards RNA-viruses. A review. *Europ. J. Pharmacol.* V. 887. P. 173553. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173553>
- Penke B., Fulop L., Szucs M., Frecska E. 2018. The role of sigma-1 receptor, and intracellular chaperone in neurodegenerative diseases. *Curr. Neuropharmacol.* V. 16. P. 97.
- Plaze M., Attali D., Petit A.-C., Blatzer M., Simon–Loriere E., Vinckier F., Cachia A., Chretien F., Gaillard R. 2020. Repurposing chlorpromazine to treat COVID-19: The reCoVery study. *L'Encephale.* V. 46. P. 169.
- Plaze M., Attali D., Prot M., Petit A.-C., Blatzer M., Vinckier F., Levillayer L., Chiaravalli J., Perin–Dureau F., Cachia A., Friedlander G., Chretien F., Simon–Loriere E., Gaillard R. 2021. Inhibition of the replication of SARS-CoV-2 in human cells by the FDA-approved drug chlorpromazine. *Int. J. Antimicrobial Agents.* V. 57. P. 106274. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106274>
- Pontisso I., Combettes L. 2021. Role of sigma-1 receptor in calcium modulation: possible involvement in cancer. *Genes.* V. 12. P. 139. <https://doi.org/10.3390/genes12020139>
- Randriamampita C., Trautmann A. 1987. Ionic channels in murine macrophages. *Cell. Biol.* V. 105. P. 761.
- Rosado J.A. 2016. Sigma-1 receptors: a new pathway for the modulation of store-operated calcium entry. *Biochem. J.* V. 473. P. e9–e10. <https://doi.org/10.1042/BJ20151144>
- Rousseaux C.G., Greene S.F. 2016. Sigma receptors [σRs]: Biology in normal and diseased states. *J. Recept. Signal Transduct.* V. 36. P. 327.
- Ryskamp D.A., Korban S., Zhemkov V., Kraskovskaya N., Bezprozvanny I. 2019. Neuronal sigma-1 receptors: signaling functions and protective roles in neurodegenerative diseases. *Front. Neurosci.* V. 13. P. 862. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00862>
- Ryskamp D., Wu J., Geva M., Kusko R., Grossman I., Hayden M., Bezprozvanny I. 2017. The sigma 1 receptor mediates the beneficial effects of pridopidine in a mouse model of Huntington disease. *Neurobiol. Dis.* V. 97. P. 46.
- Schmidt H.R., Betz R.M., Dror R.O., Kruse A.C. 2018. Structural basis for σ1 receptor ligand recognition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* V. 25. P. 981.
- Schmidt H.R., Kruse A.C. 2019. The molecular function of σ receptors: past, present, and future. *Trends Pharmacol. Sci.* V. 40. P. 636.
- Schmidt H.R., Zheng S., Gurpinar E., Koehl A., Manglik A., Kruse A.C. 2016. Crystal structure of the human σ1 receptor. *Nature.* V. 532. P. 527.
- Schuster D.I., Arnold F.J., Murphy R.B. 1995. Purification, pharmacological characterization and photoaffinity labeling of sigma receptors from rat and bovine brain. *Brain Res.* V. 670. P. 14.
- Smith S.B., Wang J., Cui X., Mysona B.A., Zhao J., Bollinger K.E. 2018. Sigma 1 receptor: a novel therapeutic target in retinal disease. *Prog. Retin Eye Res.* V. 67. P. 130. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.07.003>
- Solaimanzadeh I. 2020. Nifedipine and amlodipine are associated with improved mortality and decreased risk for intubation and mechanical ventilation in elderly patients hospitalized for COVID-19. *Cureus.* V. 12. P. e8069. <https://doi.org/10.7759/cureus.8069>
- Soriani O., Rapetti–Mauss R. 2017. Sigma 1 receptor and ion channel dynamics in cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 964. P. 63. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50174-1>
- Srivats S., Balasuriya D., Pasche M., Vistal G., Edwardson J.M., Taylor C.W., Murrell–Lagnado R.D. 2016. Sigma 1 receptors inhibit store-operated Ca²⁺ entry by attenuating coupling of STIM1 to Orai1. *J. Cell Biol.* V. 213. P. 65.
- Stip E. 2020. Psychiatry and COVID-19: The role of chlorpromazine. *Can. J. Psychiatry.* V. 65. P. 739.
- Stip E., Rizvi T.A., Mustafa F., Javaid S., Aburuz S., Ahmed N.N., Abdel Aziz K., Arnone D., Subbarayan A., Al Mugaddam F., Khan G. 2020. The large action of chlorpromazine: translational and transdisciplinary considerations in the face of COVID-19. *Front. Pharmacol.* V. 11. P. 577678. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.577678>
- Stracina T., Novakova M. 2018. Cardiac sigma receptors – an update. *Physiol. Res.* V. 67. P. S561.
- Su T.-P., Hayashi T., Maurice T., Buch S., Ruoho A.E. 2010. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.* V. 31. P. 557.
- Su T.-P., Su T.-C., Nakamura Y., Tsai S.-Y. 2016. The sigma-1 receptor as a pluripotent modulator in living systems. *Trends Pharmacol. Sci.* V. 37. P. 262.
- Tam S.W., Cook L. 1984. Sigma opiates and certain antipsychotic drugs mutually inhibit (+)-[3H]SKF 10,047 and [3H]haloperidol binding in guinea pig brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 81. P. 5618.
- Thastrup O., Dawson A.P., Scharff O., Foder B., Cullen P.J., Drobak B.K., Bjerrum P.J., Christensen S.B., Hanley M.R. 1989. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions.* V. 27. P. 17.
- Trebak M., Kinet J.-P. 2019. Calcium signalling in T cells. *Nat. Rev. Immunol.* V. 19. P. 154.
- Tsai S.-Y., Hayashi T., Mori T., Su T.-P. 2009. Sigma-1 receptor chaperones and diseases. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* V. 9. P. 184.
- Tsai S.-Y., Pokrass M.J., Klauer N.R., De Credico N.E., Su T.-P. 2014. Sigma-1 receptor chaperones in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Expert Opin. Ther. Targets.* V. 18. P. 1461. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.972939>
- Vavars E., Zvejniece L., Maurice T., Dambrova M. 2019. Allosteric modulators of sigma-1 receptor: a review. *Front. Pharmacol.* V. 10. P. 223. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00223>
- Vela J.M. 2020. Repurposing sigma-1 receptor ligands for COVID-19 therapy? *Front. Pharmacol.* V. 11. P. 582310. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.582310>
- Vig M., Kinet J.-P. 2009. Calcium signaling in immune cells. *Nat. Immunol.* V. 10. P. 21.
- Voronin M.V., Vakhitova Y.V., Seredenin S.B. 2020. Chaperone Sigma1R and antidepressant effect. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 7088. <https://doi.org/10.3390/ijms21197088>

- Wang L., Zhang L., Li S., Zheng Y., Yan X., Chen M., Wang H., Putney J.W., Luo D. 2015. Retrograde regulation of STIM1-Orai1 interaction and store-operated Ca^{2+} entry by calsequestrin. *Sci. Rep.* V. 5. P. 1.
- Wang J., Cui X., Roon P., Saul A., Smith S.B. 2017. The role of Sigma1R in mammalian retina. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 964. P. 267.
- Wu Z., Bowen W.D. 2008. Role of sigma-1 receptor c-terminal segment in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor activation. Constitutive enhancement of calcium signaling in mcf-7 tumor cells. *J. Biol. Chem.* V. 283. P. 28198.
- Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J.A. 2002. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.* V. 277. P. 16559.
- Yang K., Wang C., Sun T. 2019. The roles of intracellular chaperone proteins, sigma receptors, in Parkinson's disease (PD) and major depressive disorder (MDD). *Front. Pharmacol.* V. 10. P. 528.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00528>
- Zhang L.-K., Sun Y., Zeng H., Wang Q., Jiang X., Shang W.-J., Wu Y., Li Sh., Zhang Y.-L., Hao Z.-N., Chen H., Jin R., Liu W., Li H., Peng K., Xiao G. 2020. Calcium channel blocker amlodipine besylate therapy is associated with reduced case fatality rate of COVID-19 patients with hypertension. *Cell Discovery.* V. 6. P. 96.
<https://doi.org/10.1038/s41421-020-00235-0>
- Zhemkov V., Geva M., Hayden M.R., Bezprozvanny I. 2021. Sigma-1 receptor (S1R) interaction with cholesterol: mechanisms of S1R activation and its role in neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 4082.
<https://doi.org/10.3390/ijms22084082ps>
- Zhoua Y., Freyb T.K., Yanga J.J. 2009. Viral calciomics: interplays between Ca^{2+} and virus. *Cell Calcium.* V. 46. P. 1.

Sigma-1 Receptor Ligands Chlorpromazine and Trifluoperazine Attenuate Ca^{2+} Responses in Rat Peritoneal Macrophages

L. S. Milenina^{a, *}, Z. I. Krutetskaya^{a, **}, V. G. Antonov^b, and N. I. Krutetskaya^a

^aChair of Biophysics, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

^bChair of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, 194044 Russia

*e-mail: l.milenina@spbu.ru

**e-mail: z.krutetskaya@spbu.ru

Sigma-1 receptors are ubiquitous multifunctional ligand-operated molecular chaperones in the endoplasmic reticulum membrane with a unique history, structure, and pharmacological profile. Sigma-1 receptors bind ligands of different chemical structure and pharmacological effect and modulate a wide range of cellular processes in health and disease, including Ca^{2+} signaling processes. To elucidate the involvement of sigma-1 receptors in Ca^{2+} signaling processes in macrophages, the effect of sigma-1 receptor ligands, phenothiazine neuroleptics chlorpromazine and trifluoperazine, on Ca^{2+} responses induced by endoplasmic Ca^{2+} -ATPase inhibitors thapsigargin and cyclopiazonic acid, as well as by disulfide-containing immunomodulators glutoxim and molixan, was investigated in rat peritoneal macrophages. Using Fura-2AM microfluorimetry we have shown for the first time that chlorpromazine and trifluoperazine suppress both phases of Ca^{2+} responses induced by glutoxim, molixan, thapsigargin and cyclopiazonic acid. The data obtained indicate the involvement of sigma-1 receptors in the complex signaling cascade triggered by glutoxim or molixan and leading to intracellular Ca^{2+} concentration increase in macrophages. The results also suggest the involvement of sigma-1 receptors in the regulation of store-dependent Ca^{2+} entry in macrophages.

Keywords: trifluoperazine, chlorpromazine, sigma-1 receptors, peritoneal macrophages, intracellular Ca^{2+} concentration

УДК 576.7

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНСУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ИНТАКТНЫХ КРЫС

© 2022 г. Т. С. Булавинцева¹ *, Б. Г. Юшков¹, И. Г. Данилова¹

¹Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, 620049 Россия

*E-mail: bulavincevat@gmail.com

Поступила в редакцию 12.08.2021 г.

После доработки 27.08.2021 г.

Принята к публикации 01.09.2021 г.

Исследование посвящено сравнению морфофункциональных особенностей, соотношения процессов апоптоза и пролиферации в популяциях инсулин-синтезирующих клеток (ИСК) поджелудочной железы различной локализации (панкреатические островки (ПО), одиночные ИСК и их агломераты) в физиологических условиях. На гистологических препаратах поджелудочной железы проводили количественную оценку распределения ИСК различной локализации, интенсивности иммуофлюоресцентного мечения инсулина, соотношения процессов пролиферации и апоптоза. Одиночные ИСК ацинарного эпителия в сравнении с ИСК другой локализации обладают наибольшим синтетическим потенциалом, на что указывают максимальные значения интенсивности флюоресценции инсулина и площади цитоплазмы. Ki-67⁺-ИСК присутствуют только в ПО, в то время как вне островковой части они не выявляются. Наибольшая доля TUNEL⁺-ИСК характерна для агломератов, среди одиночных ИСК TUNEL⁺-ИСК отсутствуют. Выявляется прямая взаимосвязь между интенсивностью флюоресценции инсулина β -клеток островков и количеством Ki-67⁺-ИСК в них. Островки с высокой интенсивностью флюоресценции инсулина содержат также наибольшее количество TUNEL⁺-ИСК по сравнению с другими ПО, что свидетельствует о значительном уровне их самообновления. В то же время ПО с низким содержанием инсулина характеризуются значительным преобладанием процесса апоптоза над пролиферацией. Таким образом, наши данные свидетельствуют, что строение и функциональная активность ИСК зависят от особенности их локализации, а их неоднородность создает основу для пластичности в условиях патологии.

Ключевые слова: инсулин, панкреатический островок, внеостровковые инсулин-синтезирующие клетки

DOI: 10.31857/S0041377122010035

Поджелудочная железа включает в себя две части — эндокринную, главным образом осуществляющую регуляцию углеводного обмена, и экзокринную, участвующую в пищеварении. Эндокринная часть представлена панкреатическими островками (ПО), окруженных ацинусами, что способствует их тесному морфофункциональному взаимодействию. ПО представляют собой “микроорганы” округлой формы, включающие в себя 5 типов эндокриноцитов, секретирующих свои гормоны (инсулин, глюкагон, соматостатин, панкреатический полипептид и грелин) в кровеносное русло и осуществляющих регуляцию углеводного обмена и пищеварения (Islam, 2008). Инсулин синтезирующие клетки (ИСК) в составе поджелудочной железы также находятся вне ПО в виде отдельно расположенных клеток или их агломератов. Агломераты представляют собой скоп-

ления от 2 до 5 ИСК, не включающие в свой состав другие гормон-синтезирующие клетки и не ограниченные капсулой из базальной мембраны, как ПО (Bouwens, Pipeleers, 1998), при этом они легче, чем последние переносят гипоксию (Merkwitz et al., 2013). Эти морфологические особенности позволяют рассматривать агломераты ИСК в качестве переходного этапа формирования ПО из функциональных предшественников эндокринных клеток (Merkwitz et al., 2013). Одиночные ИСК располагаются в составе ацинарного или протокового эпителия и имеют морфологические особенности, сходные с клетками ткани, в которой располагаются (Bouwens, Pipeleers, 1998; Bertelli et al., 2001; Можейко, 2007). Вне островковые ИСК принято считать одним из источников регенерации β -клеток ПО поджелудочной железы в условиях патологии (Merkwitz et al., 2013).

В совокупности островковые β -клетки и вне островковые ИСК (агломераты и одиночные клетки) могут рассматриваться в качестве единой инсулин-

Принятые сокращения: ИСК — инсулин-синтезирующая клетка; ПО — панкреатический островок; ЯЦО — ядерно-цитоплазматическое отношение.

синтезирующей системы, формирование которой начинается в период эмбрионального развития, завершается к двум месяцам после рождения и контролируется различными механизмами регуляции дифференцировки популяции клеток-предшественников в эндокринные клетки (Islam, 2008).

Достаточно много работ посвящено изучению клеточной архитектуры ПО. Однако до сих пор остаются не до конца изученными морфофункциональные особенности и соотношение процессов апоптоза и пролиферации ИСК различной локализации (ПО и вне островковые ИСК) в физиологических условиях. Исследование основ гетерогенности ИСК различной локализации в поджелудочной железе в физиологических условиях будут способствовать более полному пониманию реакции этих клеток в условиях патологии и разработке новых методов и подходов к лечению сахарного диабета.

Цель настоящей работы – сравнить морфофункциональные особенности, а также соотношение процессов апоптоза и пролиферации инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы различной локализации (панкреатические островки, одиночные инсулин-синтезирующие клетки и их агломераты) в физиологических условиях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. Исследование проведено на интактных крысах Вистар ($n = 7$) обоего пола в возрасте 3 мес. в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС. Исследования одобрены Этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (протокол № 04/19 от 18.12.2019). Животных из эксперимента выводили с помощью внутримышечного введения золетила в дозе 15 мг/кг (Virbac Sante Animale, Франция).

Морфометрическое исследование. Для гистологического исследования образцы поджелудочной железы фиксировали в 10%-ном забуференном формальдегиде, далее осуществляли стандартную проводку образцов с последующей заливкой в парафин и подготовкой серийных срезов (толщиной 3 мкм).

Визуализацию изображения осуществляли на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710 (CARL ZEISS, Германия), а морфометрический анализ с помощью программного обеспечения ZEN2010.

В ходе морфометрического исследования в 1 мм^2 паренхимы поджелудочной железы ($\text{N}/\text{мм}^2$) подсчитывали общее количество ИСК, количество ИСК, локализованных в панкреатических островках, агломератах или в виде одиночных ИСК, в составе ацинарного эпителия или в перидуктальной области. Также определяли относительное количество пролиферирующих ИСК (Ki-67^+ -ИСК) и ИСК, вступивших в апоптоз (TUNEL^+ -ИСК), в процентах от общего количества ИСК различной локализации.

Пролиферацию ИСК различной локализации (ПО и внеостровковые) выявляли путем двойного иммунофлуоресцентного иммуномечения последовательным методом (Kumar, 2009). На первом этапе осуществляли демаскировку в цитратном буфере (рН 6.0) в течение 10 мин в микроволновой печи с последующим остыванием. Далее после отмывки демаскирующего буфера проводили этап иммуномечения маркера пролиферации с использованием первичных мышинных антител к Ki-67 крысы (BD, США) в разведении 1 : 150. Инкубацию с антителами проводили во влажной камере при 4°C в течение ночи, после отмывки осуществляли инкубацию в темноте (как и все последующие этапы окрашивания во избежание выгорания флуорофоров) со вторичными иммуноглобулинами козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с Texas Red (Abcam, США) в разведении 1 : 100 в течение 40 мин при 37°C во влажной камере. На третьем этапе после отмывки осуществляли иммуномечение инсулина с использованием мышинных первичных антител к инсулину крысы (clone E11D7; Millipore, Германия) в разведении 1 : 200. Препараты инкубировали с первичными антителами 1.5 ч во влажной камере, после отмывки инкубировали с иммуноглобулинами козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с Alexa Flore 488 (Abcam, США) в разведении 1 : 100 в течение 40 мин при 37°C во влажной камере. Ядра окрашивали NucRed Dead 647 (LifeTec, Germany) в течение 10 мин во влажной камере, защищенной от света.

Оценку апоптоза ИСК осуществляли путем выявления фрагментации ДНК методом TUNEL с использованием набора реагентов Thermo Fisher (США) с последующим иммунофлуоресцентным мечением инсулина, как было описано выше.

Негативный контроль окрашивания с помощью антител производили на аналогичных срезах поджелудочной железы по соответствующим протоколам, исключая первичные антитела (Kumar, 2009; Seeburger et al., 2014).

Во всех ИСК рассчитывали площадь цитоплазмы (мкм^2) и ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО).

Содержание инсулина в ИСК различной локализации оценивали путем измерения интенсивности флуоресценции инсулин-позитивной области клеток (чем больше инсулина содержит клетка, тем больше антител с ней связывается и тем интенсивнее она флуоресцирует) (Carvalho et al., 2006). В зависимости от интенсивности флуоресценции инсулина все ПО были разделены на три типа: I тип – ПО с высоким содержанием инсулина (интенсивность флуоресценции инсулина от 41 усл. ед.); II тип – ПО со средним содержанием инсулина (интенсивность флуоресценции инсулина от 21 до 40 усл. ед.); III тип – ПО с низким содержанием инсулина (интенсивность флуоресценции до 20 усл. ед.).

В ПО всех типов определяли диаметр их сечения (мкм), общую плотность клеток, количество β -клеток, Ki-67⁺ β -клеток и TUNEL⁺ β -клеток в расчете на 1 мм² эндокринной ткани (N/мм²) и в процентах от общего количества β -клеток островка.

Статистический анализ. Полученные данные анализировали с помощью программы STATISTICA 10. Вычисляли среднее арифметическое и ошибку среднего. Достоверность различий между группами оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни (U), рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика ИСК различной локализации.

Большая часть ИСК поджелудочной железы выявляется в составе ПО, а вне островков – около 2% в виде клеточных агломератов и одиночных клеток в составе ацинусов и протокового эпителия (рис. 1, табл. 1). β -клетки островков характеризуются округлой формой с центрально расположенным ядром. Одиночные ацино-инсулярные клетки имеют пирамидальную форму, ядро смещено ближе к базальной части клетки, цитоплазма равномерно окрашивается с помощью антител к инсулину. Одиночные ИСК перидуктальной области имеют округлую, вытянутую форму с эксцентрично расположенным ядром и равномерно окрашиваются с помощью антител к инсулину. ИСК агломератов обладают морфологическими признаками ацинарных и/или протоковых эпителиоцитов (рис. 1). Сравнительный морфометрический анализ ИСК различной локализации свидетельствует, что, несмотря на отсутствие различий в размерах их ядер, одиночные ИСК в составе ацинарного эпителия характеризуются наибольшими площадью цитоплазмы и интенсивностью флуоресцентного мечения инсулина по сравнению с оди-

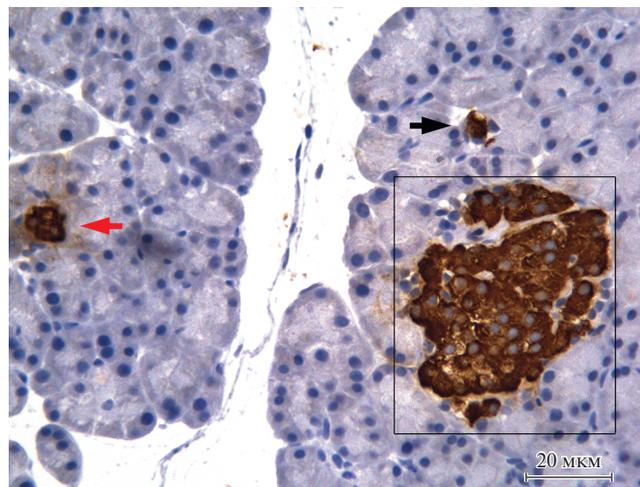


Рис. 1. Инсулин-синтезирующие клетки с различной локализацией в паренхиме поджелудочной железы intactных животных. *Рамкой* выделен панкреатический островок, *красной стрелкой* – клеточный агломерат, *черной стрелкой* – одиночная клетка. Иммуногистохимическое выявление инсулина, ув. об. 40 \times .

ночными ИСК перидуктальной области, ИСК агломератов и ПО. Эти данные свидетельствуют о высоком содержании инсулина в данном типе клеток (табл. 1).

Доля ИСК, вступивших в апоптоз, в агломератах значительно превышает данный показатель в ПО. Среди одиночных ИСК TUNEL⁺-клетки не выявляются (рис. 2). Пролиферирующие ИСК локализуются в ПО, среди вне островковых ИСК Ki-67⁺-ИСК не обнаруживаются (табл. 1, рис. 2).

Морфофункциональная характеристика панкреатических островков. Несмотря на то, что ПО характеризуются сходными показателями общего количе-

Таблица 1. Характеристика ИСК с различной локализацией в паренхиме поджелудочной железы

Показатель	Панкреатический островок	Агломераты	Одиночные ИСК	
			Ацинусы	Перидуктальная область
Количество ИСК в 1 мм ² паренхимы	107.1 \pm 10.5	1.6 \pm 0.2 ^a	0.42 \pm 0.06 ^{a, b}	0.21 \pm 0.04 ^{a, b, c}
Доля ИСК от общего количества ИСК, %	97.8 \pm 0.3	0.6 \pm 0.1 ^a	0.37 \pm 0.07 ^{a, b}	0.18 \pm 0.04 ^{a, b, c}
Интенсивность флуоресценции инсулина ИСК, усл. ед.	33.7 \pm 1.7	32.8 \pm 4.4	43.3 \pm 4.0 ^{a, b}	28.9 \pm 1.8 ^c
S цитоплазмы, мкм ²	48.6 \pm 3.4	50.1 \pm 5.4	87.8 \pm 8.0 ^{a, b}	63.7 \pm 6.1 ^c
S ядра, мкм ²	24.5 \pm 0.6	25.6 \pm 1.0	23.4 \pm 1.1	21.7 \pm 2.2
ЯЦО ИСК	0.35 \pm 0.01	0.36 \pm 0.03	0.23 \pm 0.01 ^a	0.30 \pm 0.03 ^c
Доля TUNEL ⁺ -ИСК от общего количества ИСК, %	1.9 \pm 0.4	22.5 \pm 2.3 ^a	Не опред.	Не опред.
Доля Ki-67 ⁺ -ИСК от общего количества ИСК, %	0.49 \pm 0.05	Не опред.	Не опред.	Не опред.

S – площадь; ИСК – инсулин-синтезирующая клетка. Приводятся средние значения по группам и их стандартные ошибки. Отличия достоверны для $P \leq 0.05$ от группы: ^a – панкреатический островок; ^b – агломерат ИСК; ^c – одиночные ИСК ацинусов.

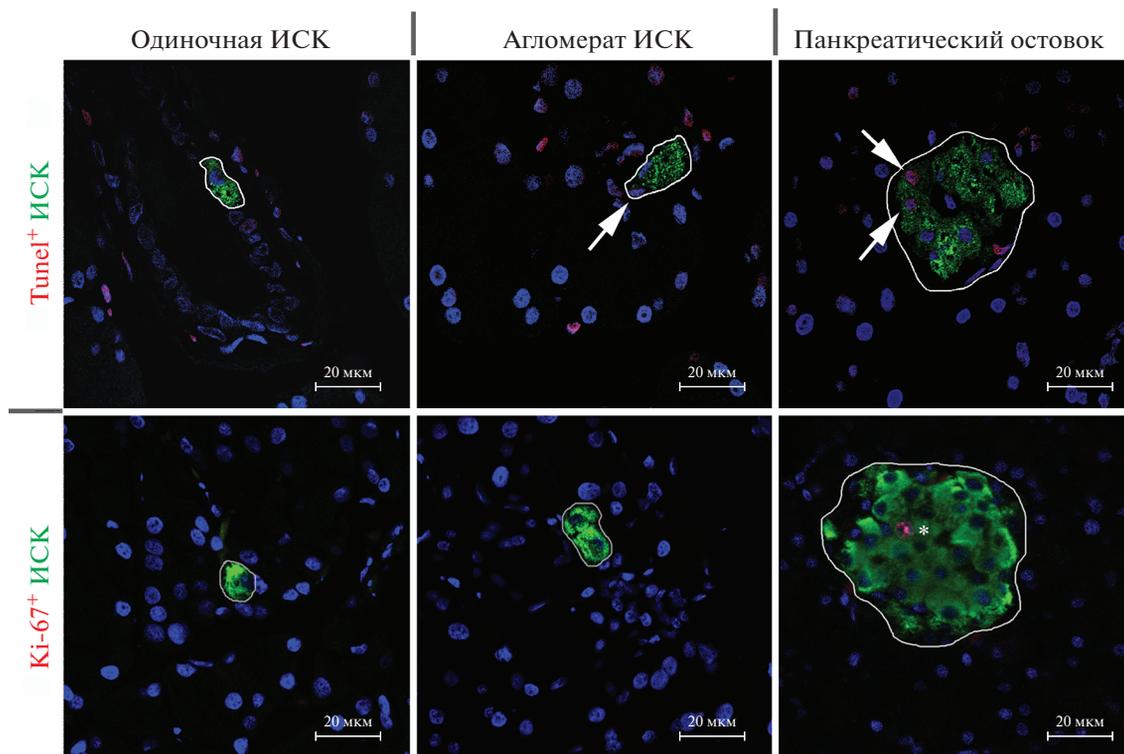


Рис. 2. Инсулин-синтезирующие клетки с различной локализацией в паренхиме поджелудочной железы интактных животных. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: верхняя панель — выявление фрагментации ДНК (TUNEL) и инсулина, *стрелками* указаны двойные положительные клетки; нижняя панель — иммунофлуоресцентное выявление маркера пролиферации Ki-67 и инсулина. * — пролиферирующая ИСК панкреатического островка.

ства клеток, содержания β-клеток, а также размеров ядра и цитоплазмы β-клеток, ПО обладают значительной гетерогенностью (табл. 2). Основное количество ПО представлено островками с высокой (I тип) и средней (II тип) интенсивностью флюоресценции иммуномеченого инсулина в β-клетках (37 ± 3 и $45 \pm 3\%$ соответственно), доля ПО с низкой интенсивностью флюоресценции инсулина (III тип) составляет $18 \pm 3\%$ от общего количества. В результате сравнительного анализа ПО с различной интенсивностью иммуномечения инсулина выявлено:

ПО I типа (островки с высоким уровнем флюоресценции инсулина) характеризуются минимальными размерами, наибольшим количеством пролиферирующих β-клеток (Ki-67⁺-ИСК) и высоким уровнем апоптоза β-клеток;

ПО II типа (островки со средним уровнем флюоресценции инсулина) обладают средним количеством пролиферирующих β-клеток (Ki-67⁺-ИСК) и наименьшим уровнем апоптоза β-клеток;

ПО III типа (островки с низким уровнем флюоресценции инсулина) занимают наименьшую долю от общего количества островков, при этом в них выявляется наименьшее количество пролиферирующих β-клеток (Ki-67⁺-ИСК). Анализ соотношения апоптоза и пролиферации демонстрирует значи-

тельное преобладание уровня апоптоза над пролиферацией (табл. 2).

Корреляционный анализ свидетельствует, что количество Ki-67⁺-ИСК коррелирует (коэффициент корреляции 0.927) с интенсивностью флюоресценции инсулина в ПО, т.е. чем выше содержание инсулина в островках, тем больше пролиферативная активность их β-клеток. Анализ корреляции между интенсивностью флюоресценции инсулина и уровнем апоптоза выявил наличие слабой связи между этими параметрами (коэффициент корреляции 0.500).

ОБСУЖДЕНИЕ

В физиологических условиях ИСК поджелудочной железы располагаются в составе ПО, агломератов и в виде одиночных клеток, расположенных в ацинусах и протоковом эпителии.

Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют, что ИСК ПО характеризуются выраженной морфофункциональной неоднородностью. Можно выделить три основных типа ПО по интенсивности флюоресценции иммуномеченого инсулина в их β-клетках, при этом показана прямая взаимосвязь между данным показателем и пролиферативной активностью β-клеток. Вместе с этим, островки с высоким содержанием инсулина характери-

Таблица 2. Сравнительная характеристика панкреатических островков с различной синтетической активностью

Показатель	I тип (от 41 усл. ед.)	II тип (21–40 усл. ед.)	III тип (до 20 усл. ед.)
Доля от общего количества ПО, %	37 ± 3	45 ± 3	18 ± 3 ^{a, b}
Характеристика островка			
Диаметр ПО, мкм	54 ± 4	73 ± 6 ^a	73 ± 7 ^a
Общее количество клеток ПО в 1 мм ² ПО	11313 ± 677	11064 ± 407	10912 ± 828
Количество β-клеток в 1 мм ² ПО	7098 ± 226	7000 ± 233	7947 ± 405
Доля β-клеток, % от общего количества клеток	60 ± 4	59 ± 2	66 ± 2
Количество Ki-67 ⁺ β-клеток в 1 мм ² ПО	42.6 ± 4.1	28.2 ± 3.4 ^a	14.9 ± 3.3 ^{a, b}
Доля Ki-67 ⁺ β-клеток, % от всех β-клеток	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1 ^a	0.3 ± 0.01 ^{a, c}
Количество TUNEL ⁺ β-клеток/мм ² ПО	234 ± 56	108 ± 18 ^a	172 ± 39
Доля TUNEL ⁺ β-клеток, % от всех β-клеток	3.4 ± 1.0	1.6 ± 0.3 ^a	2.2 ± 0.7
TUNEL ⁺ β-клеток/Ki-67 ⁺ β-клеток	5.3 ± 0.8	4.3 ± 0.3	14.8 ± 3.4 ^{a, b}
Характеристика β-клеток островка			
S ядра β-клеток, мкм ²	22.6 ± 1.2	24.9 ± 0.6	24.4 ± 0.9
S цитоплазмы β-клеток, мкм ²	44.31 ± 4.25	43.67 ± 3.70	41.13 ± 2.62
ЯЦО β-клеток	0.34 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.36 ± 0.02

S – площадь; ПО – панкреатический островок; ИСК – инсулин-синтезирующая клетка. Приводятся средние значения по группам и их стандартные ошибки. Отличия достоверны при $P \leq 0.05$ от группы: ^a – панкреатический островок; ^b – агломерат ИСК; ^c – одиночные ИСК ацинусов.

зуются не только наибольшей митотической активностью β-клеток, но также и высоким уровнем апоптоза ИСК по сравнению с другими ПО, что свидетельствует о значительном уровне их самообновления. Можно предположить, что такие ПО являются недавно образованными (наиболее онтогенетически “молодыми”). Эта гипотеза согласуется с результатами других исследований (Peng et al., 2009), свидетельствующими, что у мышей образование ПО продолжается и после рождения, замедляется по мере взросления и останавливается к двухмесячному возрасту, при этом митотическая активность β-клеток островка коррелирует с длиной теломеров в ИСК (Peng et al., 2009). С другой стороны, крупные ПО с низким содержанием инсулина и значительным сдвигом соотношения пролиферации и апоптоза в сторону преобладания последнего можно рассматривать в качестве островков, образованных в наиболее ранние сроки онтогенеза. Это согласуется с данными об увеличении размеров ПО у старых крыс, снижении в них уровня пролиферации β-клеток (Kehm et al., 2018) и интенсификации процессов апоптоза (Shuang et al., 2013).

Согласно результатам морфометрического анализа ИСК различной локализации, клетки ацинарного эпителия в сравнении с ИСК другой локализации обладают наибольшим синтетическим потенциалом, а именно большим количеством инсулина и

объемом цитоплазмы. Морфофункциональная неоднородность ИСК, вероятно, является результатом морфогенеза органа. Большая часть ИСК (около 80%) образуется на эмбриональном этапе в результате дифференцировки клеток-предшественников, локализованных в протоковом эпителии, и конверсии ациноцитов в эндокринные клетки (Islam, 2008; Gittes, 2009).

Также существует мнение, что агломераты ИСК представляют собой структуру незаконченного эмбрионального этапа формирования островков из клеток-предшественников (Merkwitz et al., 2013). С одной стороны, это подтверждается общностью морфофункциональных характеристик ИСК агломератов и β-клеток островка. С другой стороны, следуя данной гипотезе, ожидается наличие в агломератах пролиферирующих ИСК. Однако в нашем исследовании не удалось выявить митотически активные ИСК в агломератах, напротив, здесь отмечается высокая доля ИСК, вступивших в апоптоз. Поскольку литературные данные свидетельствуют, что у мышей формирование ПО заканчивается в течение двух месяцев после рождения (Peng et al., 2009), а наши исследования выполнены на 3-х месячных животных, когда необходимая масса ИСК уже набрана и дальнейшее ее наращивание не требуется, отсутствие пролиферации ИСК и высокий уровень апоптоза в

агломератах можно рассматривать как фактор, ограничивающий новообразование островков.

Одиночные ИСК располагаются в составе ацинарного или протокового эпителия. Содержание инсулина в ацино-инсулярных клетках соответствует уровню ПО с высокой синтетической активностью. Вместе с этим данные клетки содержат два типа секреторных гранул (зимогена и инсулина), основная их масса контактирует с перикапиллярным пространством и только немногие имеют связь с выводными протоками (Яглов, Яглова, 2010). Имеются данные, свидетельствующие о локализации большей части митотически делящихся ациноцитов вблизи ПО, кроме того, эти клетки характеризуются повышенной функциональной активностью (Можейко, 2007), что обусловлено паракринным действием инсулина, который облегчает поступление глюкозы и аминокислот в клетку (Qaid, 2016). ПО обычно окружает базальная мембрана, отделяя его от экзокринной паренхимы (Можейко, 2007), в то время как вне островковой зоны клетки способны секретировать инсулин непосредственно в межклеточное пространство и образовывать межклеточные контакты с клетками ациноцитов, тем самым осуществляя паракринную регуляцию экзокринной функции поджелудочной железы (Bertelli et al., 2001). В то же время достаточно много исследований посвящено изучению ациноцитов в качестве пула клеток, способного к трансформации в инсулин-секретирующие клетки в условиях патологии (Baeuens et al., 2009). При этом одиночные ИСК протокового эпителия представляются в качестве начальной стадии дифференцировки клеток-предшественников инсулоцитов (Scharfmann et al., 2008; Desgraz et al., 2011), поскольку существует много свидетельств повышения их числа при ожирении и во время беременности (Bouwens, Pipeleers, 1998).

Таким образом, в физиологических условиях популяция ИСК поджелудочной железы характеризуется выраженной гетерогенностью морфологии и функциональной активности, которая зависит от особенностей их локализации. Эта неоднородность создает основу для пластичности в условиях патологии. Можно предположить, что ИСК поджелудочной железы разной локализации представляют единую систему. Однако механизмы взаимодействия между отдельными инсулин-синтезирующими клетками требуют дальнейших исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственной темы ИИФ УрО РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены при проведении исследования. Все эксперименты на животных были одобрены Эти-

ческим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (№ 04/19 от 18.12.2019) и выполнены в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Можейко Л.А. 2007. Эндокринно-экзокринные взаимоотношения поджелудочной железы: история вопроса. Журн. ГрГМУ. № 3. С. 7. (Mozheyko L.A. 2007. Interrelation between the exocrine and endocrine parts of the pancreas: history of the problem. J. GrGMU. № 3. P. 7.)
- Яглов В.В., Яглова Н.В. 2010. Актуальные проблемы биологии ациноостровковых клеток поджелудочной железы. Вестник российской АМН. № 7. С. 28 (Yaglov V.V., Yaglova N.V. 2010. Actual problems of biology of acino-islet cells of the pancreas. Vestnik rossiiskoi AMN. № 7. P. 28.)
- Baeuens L., Bonne S., Bos T., Rooman I., Peleman C., Lathoutte T., German M., Heimberg H., Bouwens L. 2009. Notch signaling as gate-keeper of rat acinar-to-beta-cell conversion in vitro. Gastroenterology. V. 136. P. 1750. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.047>
- Bertelli E., Regoli M., Orazioli D., Bendayan M. 2001. Association between islets of Langerhans and pancreatic ductal system in adult rat. Where endocrine and exocrine meet together? Diabetologia. V. 44. P. 575. <https://doi.org/10.1007/s001250051663>
- Bouwens L., Pipeleers D.G. 1998. Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. Diabetologia. V. 41. P. 629.
- de Carvalho P.F.C., Martins J.C.R., da Cunha D.A., Boschero A.C., Collares-Buzato C.B. 2006. Histomorphology and ultrastructure of pancreatic islet tissue during in vivo maturation of rat pancreas. Anat. Anz. V. 188. P. 221.
- Desgraz R., Bonal C., Herrera P.L. 2011. b-Cell regeneration: the pancreatic intrinsic faculty. Trends Endocrinol. Metab. V. 22. P. 34.
- Gittes G.K. 2009. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. Dev. Biol. V. 326. P. 4. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.024>
- Islam S. 2009. Islet of Langerhans. Springer. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.024>
- Kehm R., König J., Nowotny K., Jung T., Deubel S., Gohlke S., Schulz T. J., Höhn A. 2018. Age-related oxidative changes in pancreatic islets are predominantly located in the vascular system. Redox Biol. V. 15. P. 387.
- Kumar G.L., Rudbeck L. 2009. Education guide. Immunohistochemical (IHC) staining methods. California: Dako North.
- Merkwitz C., Blaschuk O.W., Schulz A., Lochhead P., Meister J., Ehrlich A., Ricken A.M. 2013. The ductal origin of structural and functional heterogeneity between pancreatic islets. Prog. Histochem. Cytochem. V. 48. P. 103.
- Peng S.-W., Zhu L.-Y., Chen M., Zhang M., Li D.-Z., Fu Y.-C., Chen S.-R., Wei C.-J. 2009. Heterogeneity in mitotic activity and telomere length implies an important role of young

- islets in the maintenance of islet mass in the adult pancreas. *Endocrinology*. V. 150. P. 3058. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1731>
- Qaid M.M., Abdelrahman M.* 2016. Role of insulin and other related hormones in energy metabolism. *Cogent Food and Agriculture*. V. 2. 1267691. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1267691>
- Scharfmann R., Xiao X., Heimberg H., Mallet J., Ravassard P.* 2008. Beta cells within single human islets originate from multiple progenitors. *PLoS ONE*. V. 3. P. 3559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003559>
- Seeberger K.L., Anderson S.J., Ellis C.E., Yeung T.Y., Korbutt G.S.* 2014. Identification and differentiation of PDX1 β -cell progenitors within the human pancreatic epithelium. *World J. Diabetes* V. 5. P. 59.
- Shuang W., Qian-qian S., Bing X., Xiu-Jun L.* 2013. Pancreatic islet cell autophagy during aging in rats. *Clin. Invest. Med.* V. 36. P. 72. <https://doi.org/10.25011/cim.v36i2.19569>

Morphofunctional Characteristics of Insulin-Synthesizing Cells of Different Localization in the Pancreas of Intact Rats

T. S. Bulavintseva^{a, *}, B. G. Yushkov^a, and I. G. Danilova^a

^a*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620049 Russia*

^{*}*e-mail: bulavincevat@gmail.com*

The study is devoted to the comparison of morphofunctional features, the ratio of the processes of apoptosis and proliferation of insulin-synthesizing cells (ISC) population of the pancreas of different localization (pancreatic islets (PIs), single ISC and their agglomerates) in physiological conditions. On histological preparations of the pancreas, the quantitative analyses of ISCs of different localization, the intensity of insulin fluorescence, the ratio of the processes of their proliferation and apoptosis were determined. Single ISCs of the acinar epithelium, in comparison with ISCs of other localization, have the highest synthetic potential, expressed in the maximum values of the intensity of insulin fluorescence and the area of the cytoplasm. The study of the ratio of the processes of proliferation (Ki-67) of the ISC indicates that Ki-67⁺ ISCs are present only in the PIs, while they are not detected outside the PIs. The largest ratio of TUNEL⁺ ISCs from the total number of ISCs is determined in agglomerates and is absent in single ISCs. A direct relationship was revealed between the intensity of insulin fluorescence of β -cells of the islets and the amount of Ki-67 + ISCs in them. Islets with a high intensity of insulin fluorescence also have the highest amount of TUNEL + ISCs in comparison with other PIs, which indicates a significant level of their self-renewal. At the same time, PIs with a low insulin content are characterized by a significant predominance of apoptosis over proliferation. Our data indicate that the structure and functional activity of ISCs depend on the peculiarities of their localization, and their heterogeneity creates the basis for plasticity in pathological conditions.

Keywords: insulin, pancreatic islet, extraisletal insulin-synthesizing cells

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СФЕРОИДОВ ИЗ PANC-1 ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ *IN VITRO* И СОЗДАНИЯ ОПУХОЛЕВОЙ МОДЕЛИ *IN VIVO*

© 2022 г. С. Ш. Каршиева^{1, 2}, С. П. Кудан³, Ю. Д. Хесуани¹, В. С. Покровский², В. А. Миронов^{1, 4}, Е. В. Кудан¹, *

¹Лаборатория биотехнологических исследований “3Д Биопринтинг Солюшенс”, Москва, 115409 Россия

²ФГБУ НМИЦ Онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115478 Россия

³Школа № 1568 им. Пабло Неруды, Москва, 127221 Россия

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

*E-mail: koudan1980@gmail.com

Поступила в редакцию 10.08.2021 г.

После доработки 31.08.2021 г.

Принята к публикации 01.09.2021 г.

В последнее время сфероиды привлекают широкое внимание исследователей в качестве 3D моделей для тестирования лекарственных препаратов. Одной из ключевых особенностей сфероидов является то, что они могут состоять как из одного, так и из нескольких типов клеток. Существует гипотеза, что использование гетеросфероидов из нескольких типов клеток при тестировании противоопухолевых препаратов может позволить лучше воспроизвести структуру опухоли и, как следствие, повысить предиктивность исследования. Для проверки этой гипотезы в настоящей работе проведено тестирование активности восьми противоопухолевых препаратов на гомосфероидах, состоящих из клеток рака поджелудочной железы PANC-1, и гетеросфероидах из трех типов клеток: клеток рака поджелудочной железы PANC-1, первичных фибробластов человека и клеток эндотелия пупочной вены человека HUVEC. Установлено, что использование гетеросфероидов из нескольких типов клеток более точно отражающих микроокружение опухоли, не приводит к заметному изменению активности препаратов. Также проведена подкожная трансплантация сфероидов из PANC-1 иммунодефицитным мышам и показано, что полученная модель рака поджелудочной железы более эффективно воспроизводит агрессивный фенотип опухоли по сравнению с трансплантацией клеток в суспензии.

Ключевые слова: сфероиды, противоопухолевые препараты, антипролиферативная активность, цитотоксичность, опухолевая модель

DOI: 10.31857/S0041377122010059

Несмотря на стремительный прогресс в методах диагностики и улучшение показателей выживаемости многих видов рака, заболеваемость и смертность от рака поджелудочной железы продолжает расти во всем мире. Рак поджелудочной железы по-прежнему характеризуется высокой летальностью, низкой пятилетней выживаемостью, агрессивным течением заболевания и трудностями раннего выявления. По глобальным прогнозам, заболеваемость раком поджелудочной железы увеличится до 18.6% на 100000 человек в 2050 г. при среднегодовом приросте на 1.1% (Hu et al., 2021). В связи с этим использование моделей, релевантных клинической ситуации, для тестирования противоопухолевых препаратов имеет большое значение для эффективного лечения рака.

Монослойная 2D культура клеток широко используется в исследовательских лабораториях и фармкомпаниях для тестирования лекарственных препаратов. Это объясняется простотой работы с клетками в монослое, низкой стоимостью анализов и наличием отработанных протоколов. Однако в последнее время все большее распространение получают работы, в которых для тестирования лекарственных средств используют 3D культуры клеток, в частности сфероиды (Brajša et al., 2016a; Fang, Eglen, 2017). 3D модели лучше отражают архитектуру тканей и органов, обеспечивают все виды клеточных взаимодействий и взаимодействий клеток с внеклеточным матриксом (Akasov et al., 2016; Тригуб и др., 2019).

В большинстве работ наблюдается повышенная устойчивость сфероидов к химиотерапевтическим

препаратам по сравнению с монослоем клеток (Балалаева и др., 2017; Uematsu et al., 2018). Это может объясняться многими факторами, связанными с их внутренней организацией, такими как гипоксия, изменение клеточного метаболизма, кислая среда, клеточная гетерогенность, межклеточные взаимодействия и взаимодействия с внеклеточным матриксом (Weigelt et al., 2010; Liao et al., 2014; Hoffmann et al., 2015). Хотя большинство исследований продемонстрировали, что клетки в сфероиде более устойчивы к химиотерапии, чем клетки в 2D-монослоях, в некоторых исследованиях сфероиды оказались сравнимо или даже более чувствительны к противоопухолевым агентам, чем их двухмерные монослойные аналоги (Frankel et al., 2000; Brajša et al., 2016b).

Еще одним фактором, который может влиять на результаты тестирования, является диаметр используемых сфероидов. Известно, что кислород и питательные вещества могут проникать на расстояние, не превышающее 100–150 мкм (Kinney et al., 2014). Это означает, что для эффективного проникновения противоопухолевых препаратов в сфероид, его диаметр не должен превышать 250–300 мкм.

На сегодняшний день среди исследователей нет единого мнения относительно того, могут ли сфероиды состоять только из опухолевых клеток или необходимо добавление и других типов клеток.

Для применения в высокопроизводительном скрининге *in vitro* модель должна быть максимально простой и воспроизводимой. С этой точки зрения использование сфероидов, состоящих из одного типа клеток, значительно упрощает и ускоряет процесс тестирования. С другой стороны, создание смешанных сфероидов из нескольких типов клеток с целью воспроизведения микроокружения опухоли может улучшить предиктивность исследования.

Для тестирования противоопухолевых препаратов *in vivo* широко используются модели перевиваемых опухолей человека и животных. В настоящее время при подкожной трансплантации ксенографтов опухолей человека иммунодефицитным мышам используют суспензию опухолевых клеток. Однако не все опухолевые клетки человека обладают достаточной туморогенностью и способны формировать опухоли у животных. В ряде случаев происходит рассасывание трансплантированной клеточной суспензии. Такие же трудности возникают при адаптации к росту *in vivo* фрагментов опухолевых тканей, полученных от пациентов. Использование для трансплантации сфероидов, представляющих собой трехмерные структуры с активно делящимися клетками и микросредой, характерной для опухолевого окружения, может позволить избежать рассасывания трансплантата.

В настоящей работе проведен сравнительный анализ активности восьми противоопухолевых препаратов на гомосфероиде, состоящих только из опухолевых клеток, и гетеросфероиде, состоящих

из опухолевых клеток, фибробластов и эндотелия. Также протестирована возможность создания опухолевой модели *in vivo* путем подкожного введения сфероидов иммунодефицитным мышам.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Формирование сфероидов из клеточной линии рака поджелудочной железы PANC-1 и смешанных сфероидов из PANC-1, первичных фибробластов человека HF и клеток эндотелия пупочной вены человека HUVEC. В работе использовали клетки рака поджелудочной железы PANC-1 (ATCC), первичные фибробласты человека HF (LONZA) и клетки эндотелия пупочной вены человека HUVEC (PromoCell). PANC-1 и HF культивировали в среде DMEM (Gibco, США), содержащей 2 mM L-глутамин (Панэко, Россия) и 1-кратный раствор антибиотика-антимикотика (Gibco, США), с добавлением 10% (v/v) фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) при 37°C и 5% CO₂. HUVEC культивировали в среде M200 (Gibco, США), содержащей 1-кратный раствор добавки для роста (LSGS; low serum growth supplement; Gibco, США) и 1-кратный раствор антибиотика-антимикотика (Gibco, США) при 37°C и 5% CO₂. Для снятия клеток с подложки использовали раствор Версена (Панэко, Россия) и 0.25%-ный раствор трипсина-ЭДТА (Gibco, США).

Сфероиды получали с помощью 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием фирмы Corning (США). Для получения сфероидов из PANC-1 готовили суспензию клеток в культуральной среде с концентрацией 2500 клеток на миллилитр. В каждую ячейку планшетов вносили по 100 мкл суспензии. Для получения смешанных сфероидов из PANC-1, HF и HUVEC, готовили суспензии клеток в соответствующих культуральных средах с концентрацией 2500 клеток на миллилитр, после чего смешивали суспензии в отношении PANC-1 : HF : HUVEC = 1 : 9 : 4 и в каждую ячейку планшетов вносили по 100 мкл полученной смешанной суспензии. Для получения смешанных сфероидов из HF и HUVEC, готовили суспензии клеток в соответствующих культуральных средах с концентрацией 2500 клеток на миллилитр, после чего смешивали суспензии в отношении HF : HUVEC = 9 : 4 и в каждую ячейку планшетов вносили по 100 мкл полученной смешанной суспензии. Для формирования сфероидов планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 72 ч.

Оценка жизнеспособности сфероидов, обработанных противоопухолевыми препаратами. В исследовании использовали восемь противоопухолевых препаратов: доксорубин, фторурацил, винкристин (Тева, Нидерланды); цисплатин, эпозид (Эбеве Фарма, Австрия); оксалиплатин (Санofi, Франция); циклофосфамид (Бакстер, Германия); гемцитабин (Лилли, Франция). С помощью 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием сформи-

ровали сфероиды с первоначальной концентрацией 250 клеток на сфероид. Через 72 ч к сфероидам добавили препараты в тестируемых концентрациях (10^{-3} – 10^{-8} М для доксорубина, цисплатина, этопозида и оксалиплатина; 10^{-2} – 10^{-7} М для фторурацила и циклофосфамида; 10^{-5} – 10^{-10} М для винкристина и гемцитабина, шаг разбавления 3.16) и инкубировали в течение 72 ч. Через 72 ч в каждую лунку планшетов добавили тест-систему на живые клетки CellTiter-Glo 3D (Promega, США) в соотношении 1:1 по объему и инкубировали на протяжении 60 мин. Интенсивность люминесценции измеряли с помощью мультифункционального ридера Victor X3 (Perkin Elmer, США), далее абсолютные значения люминесценции нормализовали следующим образом: сигнал люминесценции сфероидов, необработанных противоопухолевыми препаратами, принимали за 100% жизнеспособности. Жизнеспособность рассчитывали как процентное отношение сигналов люминесценции обработанных и необработанных препаратами сфероидов. Для каждого препарата рассчитывали IC_{50} – концентрацию, при которой жизнеспособность равна 50%.

Эксперименты на животных. В опытах были использованы 8-недельные иммунодефицитные мыши-самки линии Balb/c nude весом 20–22 г ($n = 8$) из разведения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Животных содержали в стерильном боксовом помещении с естественным освещением в клетках индивидуального содержания животных со свободным доступом к брикетированному корму и воде. В помещении поддерживали $26 \pm 2^\circ\text{C}$ температуры и $55 \pm 15\%$ влажности окружающего воздуха. Трансплантацию PANC-1 в виде клеточной суспензии проводили под кожу правого бока по 3.0×10^6 клеток в 500 мкл натрий-фосфатного буфера на мыш. С помощью агарозных форм были сформированы сфероиды из PANC-1, с концентрацией 2000 клеток на сфероид, согласно методике, описанной ранее (Кудан и др., 2021). 1-дневные сфероиды вводили с использованием иглы диаметром 18G по 1500 сфероидов на мыш. Измерение опухолевого узла проводили после введения опухолевых клеток 2 раза в неделю в течение 40 дней. Объем опухолевого узла определяли по формуле:

$$V = \frac{\pi}{6}LWH, \text{ где } L, W, H - \text{линейные размеры опухоли.}$$

Индекс прироста опухоли (I) вычисляли по формуле:

$$I_i = V_i/V_0, \text{ где } I - \text{индекс прироста опухоли, } i - \text{сутки эксперимента, } V_0 - \text{объем опухоли в день начала лечения.}$$

После последнего измерения на 40-е сут после трансплантации опухоли проводили эвтаназию животных путем цервикальной дислокации шейных позвонков. Все манипуляции с лабораторными животными были выполнены в соответствии с Между-

народными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (Большаков и др., 2002).

Анализ данных. Обработку экспериментальных данных и статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Все исследуемые концентрации препаратов тестировали в квадруплетах. Расчет IC_{50} проводили методом нелинейной регрессии с использованием трехпараметрической модели доза–эффект. Все эксперименты были проведены в четырех независимых повторах. В качестве описательных статистик в работе приведены среднее арифметическое, стандартная ошибка среднего (SEM) и стандартное отклонение (SD). Для сравнения количественных признаков в группах применяли одновариантный дисперсионный анализ ANOVA с post hoc тестом Тьюки и критерий Манна–Уитни. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Формирование сфероидов. Для оценки суммарной антипролиферативной и цитотоксической активности противоопухолевых препаратов доксорубина, цисплатина, фторурацила, этопозида, оксалиплатина, циклофосфамида, винкристина и гемцитабина было сформировано два вида сфероидов: сфероиды, состоящие только из клеток рака поджелудочной железы PANC-1, и сфероиды, состоящие из PANC-1, первичных фибробластов человека HF и клеток эндотелия пупочной вены человека HUVEC. Добавление к опухолевым клеткам двух других типов клеток позволило более точно воспроизвести состав опухоли и оценить, влияет ли более сложный состав сфероидов на полученные значения активности препаратов.

Для оценки цитотоксической активности тестируемых препаратов были использованы смешанные сфероиды, состоящие из HF и HUVEC. Оба типа клеток не пролиферируют в составе сфероидов, поэтому снижение количества метаболически активных клеток в сфероидах, обработанных препаратами, было результатом гибели клеток, а не торможения их пролиферации.

Как уже было упомянуто ранее, для полного проникновения тестируемых препаратов в центр сфероидов диаметр последних не должен превышать 250–300 мкм. Для исследования нами были сформированы сфероиды трех типов, состоящие из 250 клеток суммарно. Диаметры 3-дневных сфероидов из PANC-1, PANC-1 : HF : HUVEC и HF : HUVEC составляли 278 ± 26 , 196 ± 21 и 193 ± 19 мкм соответственно (рис. 1).

Влияние противоопухолевых препаратов на пролиферацию и жизнеспособность клеток в сфероидах. Тестируемые препараты были добавлены к 3-дневным сфероидам в различных концентрациях и через 72 ч

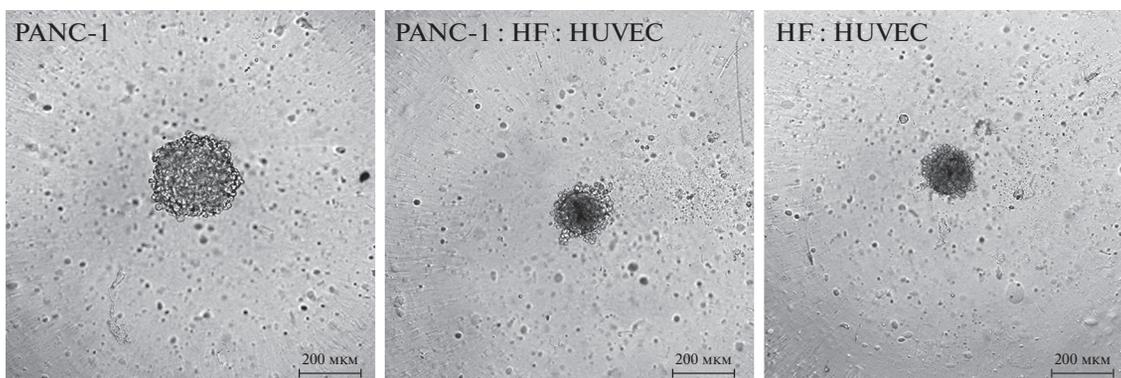


Рис. 1. Внешний вид 3-дневных сфероидов из PANC-1, PANC-1 : HF : HUVEC и HF : HUVEC. Фазово-контрастная микроскопия.

проведен анализ количества живых метаболически активных клеток с помощью тест-системы CellTiter-Glo 3D. Кривые зависимости жизнеспособности клеток от концентрации тестируемых препаратов приведены на рис. 2. Значения полуингибиторных концентраций (IC_{50}), рассчитанных на основании кривых, указаны в табл. 1.

Как видно из рис. 2 и табл. 1, наибольшая активность препаратов проявляется на сфероиде, сформированном из трех типов клеток. Однако статистический анализ показывает, что разница между значениями IC_{50} для сфероидов из PANC-1 и сфероидов из PANC-1 : HF : HUVEC статистически не значима для всех препаратов, кроме винкристина. Но и в случае винкристина полученные значения IC_{50} очень близки и составляют 2.3 и 1.6 нМ.

Значения IC_{50} для сфероидов из HF : HUVEC значительно выше, чем для двух других типов сфероидов, поскольку они отражают только цитотоксическую активность исследуемых препаратов. Наибольший разрыв в значениях IC_{50} между сфероидом, содержащим и не содержащим опухолевые клетки, наблюдается для оксалиплатина, винкристина и гемцитабина.

Сравнительный анализ динамики роста опухолей при трансплантации клеток и сфероидов из PANC-1 иммунодефицитным мышам. Для создания перевиваемых опухолевых моделей эквивалентные количества PANC-1, находящихся в виде клеточной суспензии и в составе 1-дневных сфероидов, были подкожно трансплантированы мышам Balb/c nude, после чего была изучена динамика роста опухолей. На 8 сут после трансплантации опухолевые узлы пальпировались у всех животных в группе

Таблица 1. Оценка активности противоопухолевых препаратов на сфероиде из PANC-1, PANC-1 : HF : HUVEC и HF : HUVEC

Соединение	$IC_{50} \pm SD$, мкМ			<i>p</i> -значение*		
	PANC-1	PANC-1 : HF : HUVEC	HF : HUVEC	PANC-1 vs PANC-1 : HF : HUVEC	PANC-1 vs HF : HUVEC	PANC-1 : HF : HUVEC vs HF : HUVEC
Доксорубин	0.15 ± 0.01	0.071 ± 0.001	0.61 ± 0.28	ns	<0.001	<0.001
Цисплатин	369 ± 126	229 ± 110	2458 ± 1016	ns	<0.001	<0.001
Фторурацил	12.1 ± 1.7	10.5 ± 1.7	519 ± 123	ns	<0.0001	<0.0001
Этопозид	3.6 ± 1.6	1.3 ± 0.8	104 ± 12	ns	<0.0001	<0.0001
Оксалиплатин	1.5 ± 0.2	0.96 ± 0.15	112 ± 15	ns	<0.0001	<0.0001
Циклофосфамид	866 ± 118	120 ± 10	3427 ± 1130	ns	<0.0001	<0.0001
Винкристин	0.0023 ± 0.0003	0.0016 ± 0.0002	>10	<0.001	<0.0001	<0.0001
Гемцитабин	0.0082 ± 0.0016	0.0071 ± 0.0010	5.6 ± 1.2	ns	<0.0001	<0.0001

* Для сравнения количественных признаков в группах применяли одновариантный дисперсионный анализ ANOVA с post hoc тестом Тьюки. ns (non significant) – статистически незначимое различие между значениями IC_{50} .

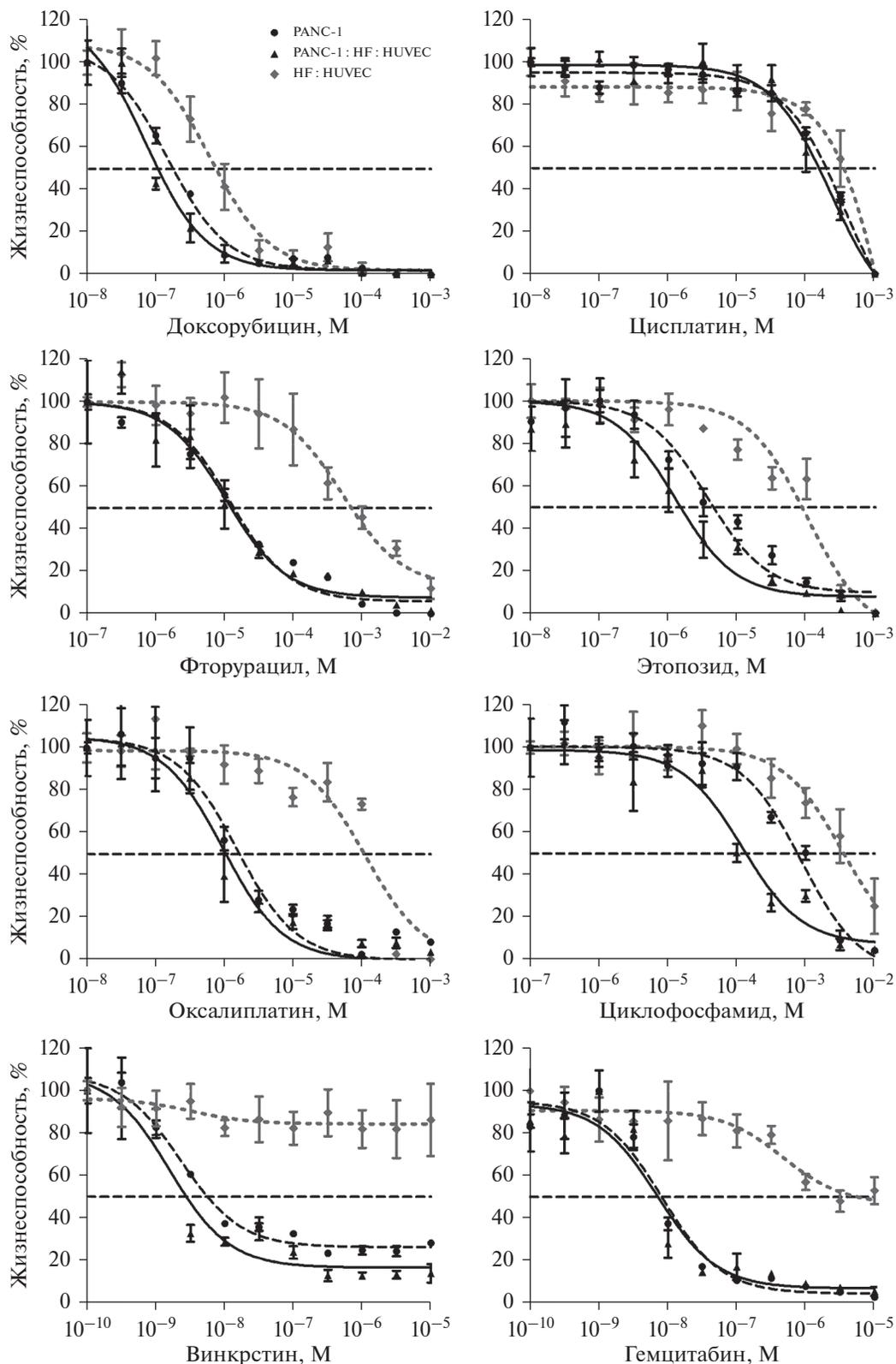


Рис. 2. Кривые зависимости жизнеспособности сфероидов из PANC-1, PANC-1 : HF : HUVEC и HF : HUVEC от концентрации противоопухолевых препаратов. Штриховая кривая (кружки) – сфероиды из PANC-1, сплошная кривая (треугольники) – сфероиды из PANC-1 : HF : HUVEC, штриховая кривая (ромбы) – сфероиды из HF : HUVEC. Показаны средние значения \pm SEM, $n = 4$.

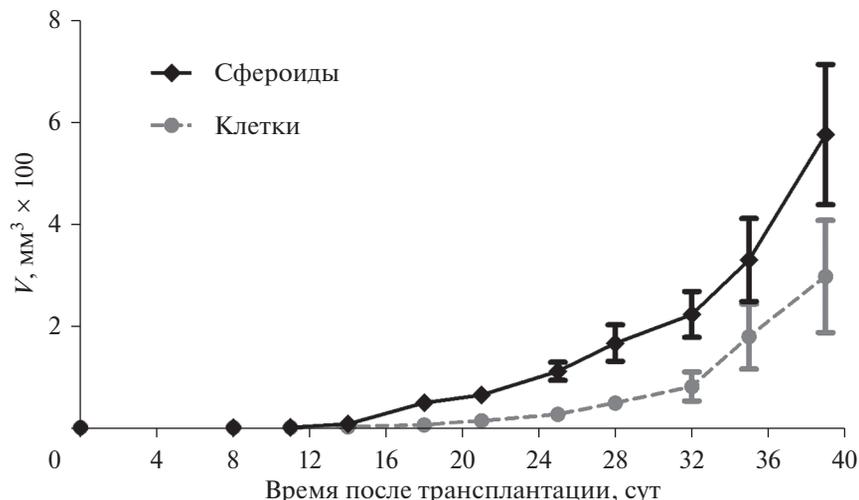


Рис. 3. Динамика роста объемов (V) подкожных ксенографтов из клеток и сфероидов из PANC-1 у мышей-самок Balb/c nude. Штриховая кривая (кружки) – клетки, сплошная (ромбы) – сфероиды. Показаны средние значения \pm SEM, $n = 4$. Для точек 18, 21, 25, 28 и 32 сут различия между объемами опухолей для клеток и сфероидов достоверны ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни).

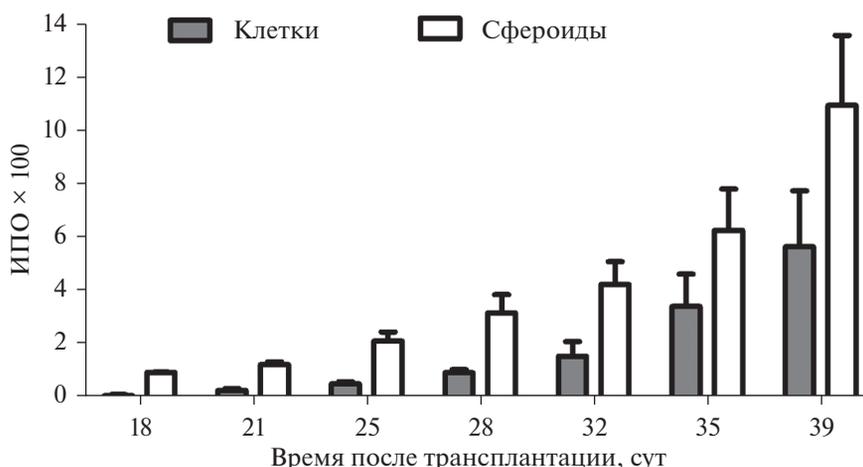


Рис. 4. Зависимость индекса прироста опухоли (ИПО) от времени для клеток и сфероидов из PANC-1 при подкожной трансплантации мышам-самкам Balb/c nude. Серые столбцы – клетки, белые столбцы – сфероиды. Показаны средние значения \pm SEM, $n = 4$. Для точек 18, 21, 25, 28 и 32 сут различия между ИПО для клеток и сфероидов достоверны ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни).

со сфероидами, и только у 50% животных в группе с клетками. В группе мышей с клетками наблюдали более длительную латентную фазу роста, составляющую 25 сут, по сравнению с группой со сфероидами, в которой латентная фаза была равна 18 сут (рис. 3). Индекс прироста опухоли (ИПО) на 18 сут для клеток составил 9.7, а для сфероидов – 92.7 (рис. 4). К концу наблюдения ИПО для сфероидов был в 2 раза выше по сравнению с ИПО для клеток, составляя 1095 против 564 соответственно. Таким образом, динамика роста опухоли при подкожной трансплантации сфероидов из PANC-1 отличается более корот-

кой латентной фазой и высокой скоростью в экспоненциальной фазе по сравнению с трансплантацией клеток в виде суспензии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сфероиды находят все более широкое применение в качестве *in vitro* моделей для тестирования противоопухолевых препаратов. Создание гетеросфероидов из нескольких типов клеток открывает возможности для гораздо более точного воссоздания структуры опухоли, чем в случае гомосфероидов.

Существует большое количество работ, подчеркивающих важность использования именно таких гетеросфероидов для исследований. Однако работы, в которых бы проводилось сравнение активности препаратов на сфероидах, состоящих только из опухолевых клеток и из опухолевых клеток в смеси с другими типами клеток, практически отсутствуют (Lazragi et al., 2018).

В настоящей работе проведено сравнение активности восьми противоопухолевых препаратов на сфероидах из клеток рака поджелудочной железы PANC-1 и смешанных сфероидах из PANC-1 : HF : HUVEC. Исходное суммарное количество клеток в сфероидах было равно 250 клеток и подобрано таким образом, чтобы на момент добавления препаратов диаметр всех сфероидов не превышал 300 мкм и допускал полное проникновение препаратов внутрь сфероидов.

Полученные результаты продемонстрировали, что активность препаратов на двух типах сфероидов практически не различалась. Наблюдали незначительное и статистически недостоверное увеличение активности на сфероидах, состоящих из PANC-1 : HF : HUVEC, по сравнению со сфероидами из PANC-1. Такое увеличение активности скорее связано с разницей в диаметрах гомо- и гетеросфероидов, нежели с их разным составом. В конце инкубации с противоопухолевыми препаратами диаметр контрольных сфероидов составлял 455 ± 27 и 274 ± 17 мкм для PANC-1 и PANC-1 : HF : HUVEC соответственно.

Для оценки цитотоксической активности препаратов было проведено их тестирование на гетеросфероидах из HF : HUVEC. Было установлено, что наибольший разрыв между суммарной (антипролиферативной и цитотоксической) и чистой цитотоксической активностью препаратов наблюдался для оксалиплатина, гемцитабина и винкристина. Важно отметить, что именно оксалиплатин и гемцитабин являются классическими препаратами для лечения рака поджелудочной железы. Наиболее интересный результат был получен для винкристина. Данный препарат проявил самую высокую суммарную активность, при этом он не демонстрировал цитотоксической активности в концентрации 10 мкМ и ниже. Наши данные по суммарной активности оксалиплатина, гемцитабина и винкристина на сфероидах из PANC-1 хорошо согласуются с результатами работ других авторов (Melisi et al., 2011; Bhagwandin et al., 2016), в которых оценивали активность тех же препаратов на монослое клеток.

Сравнительный анализ динамики роста подкожных ксенографтов из клеток и сфероидов из PANC-1 показал, что сфероиды, трансплантированные подкожно, обладают более стабильным и быстрым темпом роста по сравнению с суспензией клеток. Высокая скорость роста сфероидов из PANC-1, вероятно, связана с более сложной структурой и микроокруже-

нием, что позволяет им быстро адаптироваться и расти в условиях *in vivo*. Ранее было показано, что более тесное взаимодействие клеток в сфероидах из PANC-1 по сравнению с 2D-культурой способствует более активному экзосомному межклеточному транспорту веществ, в том числе белка глипикана-1 и ряда микроРНК, являющихся маркерами более агрессивного роста рака поджелудочной железы (Tu et al., 2021).

Таким образом, в настоящей работе проведено тестирование восьми противоопухолевых препаратов на гомосфероидах из PANC-1 и гетеросфероидах из PANC-1, HF и HUVEC. Согласно полученным данным, препараты проявляли одинаковую активность на гомо- и гетеросфероидах, свидетельствующую о том, что добавление дополнительных типов клеток к опухолевым клеткам не является необходимым требованием при тестировании и не оказывает значительного влияния на результаты исследования. Важно подчеркнуть, что для получения интерпретируемых результатов необходимо использовать сфероиды маленького диаметра, допускающего полное проникновение тестируемых препаратов внутрь сфероида. Также показано, что подкожная трансплантация опухолевых сфероидов из PANC-1 иммунодефицитным мышам приводит к более раннему и быстрому росту опухоли по сравнению с трансплантацией клеток в суспензии. Можно предположить, что описанный метод создания перевиваемой *in vivo* модели путем подкожной трансплантации сфероидов позволит получать опухоли у иммунодефицитных мышей в тех случаях, когда трансплантация клеточной суспензии не является эффективной.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена за счет собственных средств Лаборатории биотехнологических исследований “ЗД Биопринтинг Солюшенс”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Балалаева И.В., Соколова Е.А., Пужихина А.Д., Брилкина А.А., Деев С.М. 2017. Сфероиды HER2-положительной аденокарциномы молочной железы человека как модель для тестирования противоопухолевых иммунотоксинов. *Acta Naturae*. Т. 9. № 1. С. 38. (Balalaeva I.V., Sokolova E.A., Puzhikhina A.D., Brilkina A.A., Deyev S.M. 2017. Spheroids of HER2-positive breast adenocarcinoma for studying anticancer immunotoxins in vitro. *Acta Naturae*. V. 9. № 1. P. 38.)

- Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. 2002. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика. Т. 1. С. 58. (Bolshevik O.P., Neznanov N.G., Babakhanyan R.V. 2002. Didactic and ethical aspects of research on biomodels and laboratory animals. Kachestvennaya klinicheskaya praktika. V. 1. P. 58.)
- Кудан Е.В., Кудан С.П., Каршиева С.Ш., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А., Буланова Е.А. 2021. Определение активности цитостатиков в 3D условиях культивирования в сравнении с монослойной культурой. Цитология. Т. 63. № 3. С. 244. (Koudan E.V., Kudan S.P., Karshieva S.Sh., Khesuani Yu.D., Mironov V.A., Bulanova E.A. 2021. The determination of cytostatic activity on a 3D spheroids-based model in comparison with conventional monolayer culture. Tsitologiya. V. 63. № 3. P. 244.)
- Тригуб М.М., Филатова Н.В., Арешидзе Д.А., Сень В.Д., Терентьев А.А. 2019. Сравнение действия комплексов платины(IV) на сфероиды и монослойную культуру клеток HeLa. Клеточные технол. биол. мед. № 4. С. 273. (Trigub M.M., Filatova N.V., Areshidze D.A., Sen' V.D., Terentiev A.A. 2019. Comparison of the effect of platinum(IV) complexes on spheroids and monolayer culture of HeLa cells. Bull. Exp. Biol. Med. № 4. P. 273.)
- Akasov R., Zaytseva-Zotova D., Burov S., Leko M., Dontenwill M., Chipier M., Vandamme T., Markvicheva E. 2016. Formation of multicellular tumor spheroids induced by cyclic RGD-peptides and use for anticancer drug testing *in vitro*. Int. J. Pharm. V. 506. P. 148.
- Bhagwandin V.J., Bishop J.M., Wright W.E., Shay J.W. 2016. The metastatic potential and chemoresistance of human pancreatic cancer Stem cells. PLoS One. V. 11. P. e0148807.
- Brajša K., Trzun M., Zlatař I., Jelić D. 2016a. Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. Period. Boil. V. 118. P. 59.
- Brajša K., Vujanović I., Jelić D., Trzun M., Zlatař I., Karminski-Zamola G., Hranjec M. 2016b. Antitumor activity of amidino-substituted benzimidazole and benzimidazo[1,2-a]quinoline derivatives tested in 2D and 3D cell culture systems. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. V. 31. P. 1139.
- Fang Y., Eglen R.M. 2017. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. SLAS Discovery. V. 22. P. 456.
- Frankel A., Man S., Elliott P., Adams J., Kerbel R.S. 2000. Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. Clin. Cancer Res. V. 6. P. 3719.
- Hoffmann O.I., Ilmberger C., Magosch S., Joka M., Jauch K.W., Mayer B. 2015. Impact of the spheroid model complexity on drug response. J. Biotechnol. V. 205. P. 14.
- Hu J.X., Zhao C.F., Chen W.B., Liu Q.C., Li Q.W., Lin Y.Y., Gao F. 2021. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. World J. Gastroenterol. V. 27. P. 4298.
- Kinney M.A., Hookway T.A., Wang Y., McDevitt T.C. 2014. Engineering three-dimensional stem cell morphogenesis for the development of tissue models and scalable regenerative therapeutics. Ann. Biomed. Eng. V. 42. P. 352.
- Lazzari G., Nicolas V., Matsusaki M., Akashi M., Couvreur P., Mura S. 2018. Multicellular spheroid based on a triple co-culture: A novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity. Acta Biomater. V. 78. P. 296.
- Liao J., Qian F., Tchabo N., Mhawech-Fauceglia P., Beck A., Qian Z., Wang X., Huss W.J., Lele S.B., Morrison C.D., Odunsi K. 2014. Ovarian cancer spheroid cells with stem cell-like properties contribute to tumor generation, metastasis and chemotherapy resistance through hypoxia-resistant metabolism. PLoS One. V. 9. P. e84941.
- Melisi D., Xia Q., Paradiso G., Ling J., Moccia T., Carbone C., Budillon A., Abbruzzese J.L., Chiao P.J. 2011. Modulation of pancreatic cancer chemoresistance by inhibition of TAK1. J. Natl. Cancer Inst. V. 103. P. 1190.
- Tu J., Luo X., Liu H., Zhang J., He M. 2021. Cancer spheroids derived exosomes reveal more molecular features relevant to progressed cancer. Biochem. Biophys. Rep. V. 26. P. 101026.
- Uematsu N., Zhao Y., Kiyomi A., Yuan B.O., Onda K., Tanaka S., Sugiyama K., Sugiura M., Takagi N., Hayakawa A., Hirano T. 2018. Chemo-sensitivity of two-dimensional monolayer and three-dimensional spheroid of breast cancer MCF-7 cells to daunorubicin, docetaxel, and arsenic disulfide. Anticancer Res. V. 38. P. 2101.
- Weigelt B., Lo AT, Park C.C., Gray J.W., Bissell M.J. 2010. HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. Breast Cancer Res. Treat. V. 122. P. 35.

The Use of PANC-1 Spheroids for Testing Antitumor Drugs *In Vitro* and Creating a Tumor Model *In Vivo*

S. Sh. Karshieva^{a, b}, S. P. Kudan^c, Y. D. Khesuani^a, V. S. Pokrovsky^b, V. A. Mironov^{a, d}, and E. V. Koudan^{a, *}

^aLaboratory for Biotechnological Research 3D Bioprinting Solutions, Moscow, 115409 Russia

^bBlokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 115478 Russia

^cPablo Neruda School №1568, Moscow, 127221 Russia

^dSechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

*e-mail: koudan1980@gmail.com

Recently, spheroids have attracted widespread attention of researchers as 3D models for drug testing. One of the key features of spheroids is that they can be composed of one or several types of cells. There is a hypothesis that the use of heterospheroids from different types of cells in testing anticancer drugs can better reproduce the 3D architecture

of the tumor and, as a consequence, increase the predictiveness of the research. To verify this hypothesis, in this study, we tested the activity of eight anticancer drugs on homo-spheroids consisting of pancreatic cancer cells (PANC-1) and heterospheroids consisting of a triple co-culture of PANC-1, primary human fibroblasts and endothelial cells (HUVEC). It was found that the use of heterospheroids from several types of cells, which more accurately reflect the heterogeneous tumor microenvironment, does not lead to a noticeable change in the activity of the drugs. Also, we subcutaneously transplanted spheroids from PANC-1 to immunodeficient mice. Our data demonstrated that the obtained tumor model reproduce a more aggressive phenotype of human pancreatic cancer compared to cell transplantation in suspension.

Keywords: spheroids, antitumor drugs, antiproliferative activity, cytotoxicity, tumor model

УДК 57.013

СТРУКТУРНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ НА ОСНОВЕ ЛИЗОЦИМА

© 2022 г. Н. М. Мельникова¹, М. И. Сулацкий¹, И. М. Кузнецова¹,
К. К. Туроверов^{1, *}, А. И. Сулацкая^{1, **}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: kkt@incras.ru

**E-mail: ansul@mail.ru

Поступила в редакцию 30.07.2021 г.

После доработки 26.08.2021 г.

Принята к публикации 26.08.2021 г.

Согласно современным представлениям, полиморфизм амилоидных фибрилл может быть причиной различий в их цитотоксичности, а также вариабельности амилоидозов. Целью данной работы стало изучение структуры и свойств амилоидных фибрилл на основе модельного амилоидогенного белка лизоцима, полученных при различных условиях фибриллогенеза (при различной концентрации денатурирующего агента гуанидингидрохлорида) с применением широкого спектра физико-химических методов, в том числе специально разработанных. В результате проведенных исследований были показаны различия по следующим параметрам: 1) склонность фибриллярных волокон к взаимодействию друг с другом и размер формирующихся кластеров; 2) вторичная структура и микроокружение триптофановых остатков амилоид-формирующих белков; 3) характеристики взаимодействия фибрилл с тиофлавином Т (ThT) — амилоид-специфическим флуоресцентным зондом; 4) устойчивость амилоидов к воздействию ионного детергента додецилсульфата натрия и кипячению. Полученные результаты свидетельствуют о полиморфизме исследуемых белковых агрегатов. Результаты работы позволили сделать заключение о том, что полученные амилоидные фибриллы являются перспективным объектом для проведения дальнейших исследований, направленных на выявление связи структуры амилоидов с их цитотоксичностью.

Ключевые слова: амилоидные фибриллы, лизоцим, структурный полиморфизм, тиофлавин Т, гуанидингидрохлорид, равновесный микродиализ

DOI: 10.31857/S0041377122010060

Долгое время агрегацию белков в процессе фолдинга считали артефактом (Jahn, Radford, 2008). Ситуация заметно изменилась, когда было показано, что нарушения на пути сворачивания белка или изменение их нативной структуры в результате каких-либо внешних воздействий могут быть причиной патологической агрегации белков, которая приводит к развитию амилоидозов (например, системного лизоцимового, инсулинового, гемодиализного амилоидозов) и сопутствует ряду нейродегенеративных заболеваний, таких как, болезнь Альцгеймера, прионные болезни, болезнь Гентингтона и др. (Prusiner et al., 1983; Vassar et al., 1999; Chartier-Harlin et al., 2004; Valentine et al., 2005; Warby et al., 2009). К настоящему времени известно более пятидесяти белков (пептидов), накапливающихся в агрегированной форме

при различных заболеваниях (Westermarck et al., 2005; Chiti, Dobson, 2006; Eisenberg, Jucker, 2012). Причиной аномальной агрегации белков считается переход белка из нативной конформации в патологическую, в которой молекулы могут взаимодействовать друг с другом и формировать упорядоченные белковые агрегаты — амилоидные фибриллы (Nelson et al., 2005; Jahn, Radford, 2008). Увеличение концентрации этих белковых агрегатов и их накопление в тканях и органах может происходить бесконтрольно и приводить к существенному ухудшению качества жизни пациентов или к летальному исходу.

Термин амилоид долгое время ассоциировался только с патологическими процессами. Однако результаты недавних исследований свидетельствуют о том, что белки в фибриллярной форме также могут выполнять важнейшие физиологические функции (защитную, строительную, запасающую, сигнальную, транспортную и многие др.), которые необходимы для нормального функционирования клеток и тканей бактерий, грибов, растений, насекомых и млекопитающих (Collinson et al., 1991; Costerton et al., 1999;

Принятые сокращения: КД — круговой дихроизм; GdnHCl — гуанидингидрохлорид; SDS — додецилсульфат натрия; SDS-PAGE — электрофорез в полиакриламидном геле; ThT — тиофлавин Т; RLS — рэлеевское светорассеяние (Rayleigh light scattering).

Barnhart, Chapman, 2006; Fowler et al., 2007; Pham et al., 2014; Avni et al., 2019; Otzen, Riek, 2019). В связи с многообразием функций и уникальными механическими свойствами (высокой растяжимостью и прочностью) амилоидов (Cherny, Gazit, 2008), а также их широкой распространенностью в природе, изучение этих белковых агрегатов в настоящее время является весьма актуальной задачей.

Несмотря на различие структуры амилоидогенных белков, все амилоиды имеют схожую морфологию: они представляют собой длинные, неразветвленные образования, богатые β -складчатой структурой, в которой β -листы ориентированы перпендикулярно оси фибриллы (Sunde et al., 1997; Ivanova et al., 2006; Nelson, Eisenberg, 2006). В связи с этим долгое время предполагали, что структура амилоидов на основе различных белков полностью идентична. Однако позднее были показаны различия в структурной организации как амилоидов на основе различных белков, так и фибрилл, сформированных при разных условиях на основе одного и того же белка (Fandrich et al., 2009; Sneideris et al., 2015; Sulatskaya et al., 2015; Iadanza et al., 2018). При этом недавние исследования показали, что структура амилоидов может влиять на их цитотоксичность (Stefani, 2010; Туско, 2015), в связи с чем выявление внешних факторов, способных приводить к полиморфизму амилоидов, стало важнейшей прикладной задачей.

Цель настоящей работы заключалась в изучении полиморфизма амилоидных фибрилл на основе модельного амилоидогенного белка лизоцима, полученных в присутствии денатурирующего агента гуанидинхлорида (GdnHCl) в различных концентрациях, с использованием различных физико-химических методов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалы. В работе использовали тиофлавин Т (ThT) (UltraPure Grade; AnaSpec, США), лизоцим, KH_2PO_4 , NaOH и GdnHCl (Sigma, США). ThT и компоненты буфера растворяли в деионизированной воде.

Получение амилоидных фибрилл. Для получения амилоидных фибрилл на основе лизоцима использовали буферный раствор – 50 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (рН 6.3), не содержащий денатурирующего агента GdnHCl и содержащий его в концентрации 0.05 и 3 М (Vernaglia et al., 2004; Sulatskaya et al., 2017). Белок в концентрации 2 мг/мл инкубировали в буферном растворе в термостате при температуре 57°C и интенсивном перемешивании на магнитной мешалке в течение 2 сут. Далее сформированные белковые агрегаты перевели в дистиллированную воду с помощью диализа. Подготовленные образцы визуализировали с использованием просвечивающей электронной микроскопии.

Равновесный микродиализ. Равновесный микродиализ (Kuznetsova et al., 2012c) проводили с использованием приспособления фирмы Harvard Apparatus/Amika (США), которое состоит из двух камер равного объема (500 мкл), разделенных мембраной, непроницаемой для частиц массой больше 12 000 Да.

Абсорбционная спектроскопия. Спектры поглощения образцов регистрировали с использованием спектрофотометра U-3900H (Hitachi, Япония). Для определения концентрации свободного ThT и лизоцима использовали коэффициент молярной экстинкции 31589 ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) при длине волны 412 нм и 37752 ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) при длине волны 280 нм соответственно. Мутность образцов, содержащих фибриллы, контролировали путем измерения оптической плотности при 350 нм. При обработке зарегистрированных спектров поглощения ThT в присутствии амилоидных фибрилл из измеренных спектров был исключен вклад светорассеяния амилоидных фибрилл с использованием стандартного протокола (Vladimirov, Litvin, 1964).

Спектры кругового дихроизма (КД). Спектры КД в дальней ультрафиолетовой области регистрировали с использованием спектрополяриметра J-810 (Jasco, Япония).

Флуоресцентная спектроскопия. Спектры флуоресценции регистрировали с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, Австралия). Коррекцию зарегистрированных спектров флуоресценции на эффект первичного внутреннего фильтра проводили с использованием специально разработанной методики (Fonin et al., 2014). Для определения рэлеевского светорассеяния (RLS) флуоресценцию в образцах с фибриллами возбуждали и регистрировали при длине волны 530 нм.

Для оценки времени жизни возбужденного состояния ThT, встроенного в амилоидные фибриллы, измеряли кривые затухания флуоресценции красителя с использованием спектрометра Fluo Time 300 (PicoQuant GmbH, Германия) при длине волны возбуждения 440 нм.

Электронная микроскопия. Для получения электронных микрофотографий использовали метод негативного контрастирования 1%-ным водным раствором уранилацетата. Суспензию фибрилл наносили на медные сетки, покрытые формвар-карбоновой пленкой.

Конфокальная флуоресцентная микроскопия. Для визуализации амилоидных фибрилл в присутствии флуоресцентного зонда ThT использовали конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Olympus FV 3000 (Olympus, Япония). Была выбрана фиксированная длина волны возбуждения лазера (405 нм), регистрацию флуоресцентного света проводили в диапазоне 420–520 нм. Использовали иммерсионный объектив с увеличением 60 \times и числовой апертурой NA 0.6.

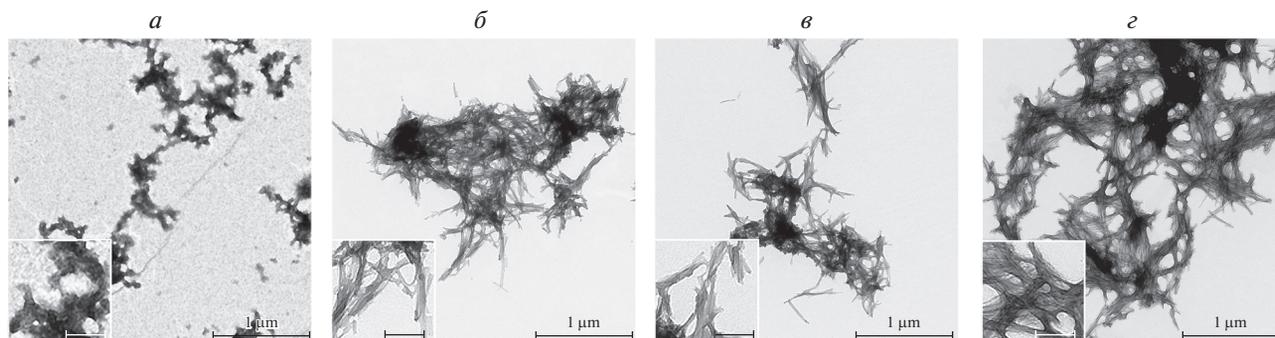


Рис. 1. Визуализация аморфных агрегатов и амилоидных фибрилл на основе лизоцима, полученных в отсутствие (*а*, *б*) и в присутствии GdnHCl в концентрации 0.05 М (*в*) и 3 М (*г*). Просвечивающая электронная микроскопия; масштабная линейка: 1 мкм. На *вставках* – фрагменты изображений в увеличенном масштабе; масштабная линейка: 200 нм.

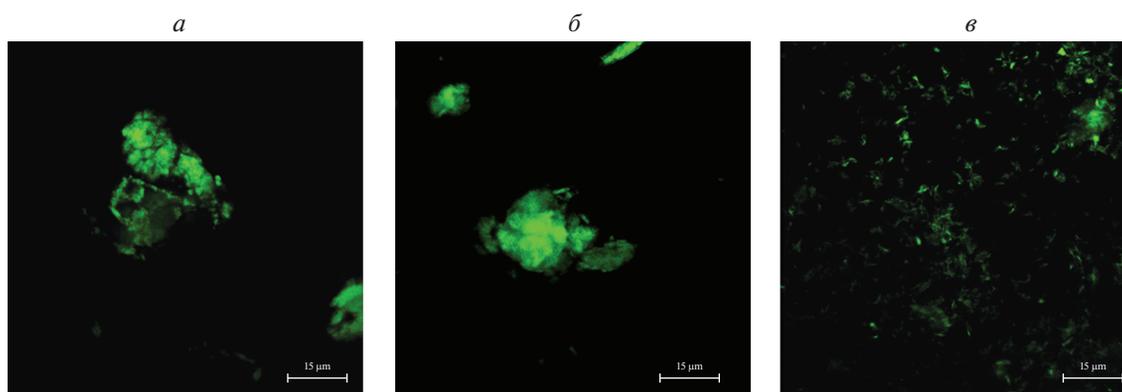


Рис. 2. Визуализация кластеров амилоидных фибрилл на основе лизоцима, полученных в отсутствие (*а*) и в присутствии GdnHCl в концентрации 0.05 М (*б*) и 3 М (*в*). Конфокальная флуоресцентная микроскопия в присутствии тιοфлавина Т (ThT). Масштабная линейка: 15 мкм.

SDS-электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Для оценки стабильности амилоидных фибрилл на основе лизоцима образцы инкубировали в буфере Лэммли, содержащем 2% ионного детергента додецилсульфата натрия (SDS), и кипятили в течение 5 мин. Образцы исследовали с помощью SDS-электрофореза в 17% полиакриламидном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология агрегатов на основе лизоцима, сформированных в отсутствие и в присутствии GdnHCl. Согласно данным, полученным с использованием просвечивающей электронной микроскопии, в образце, инкубированном в отсутствие GdnHCl, наряду с фибриллярными структурами (рис. 1*б*) были обнаружены неупорядоченные белковые агрегаты (рис. 1*а*). При этом образцы, полученные в присутствии 0.05 и 0.3 М GdnHCl (рис. 1*в–г*) оказались гомогенными и содержали только упорядоченные амилоидные фибриллы. Оказалось, что амилоиды, сформировавшиеся в отсутствие, а также в присутствии GdnHCl в различной концентрации, имеют схожую морфологию:

они представляют собой длинные тонкие неразветвленные волокна, склонные к взаимодействию друг с другом и образованию кластеров (рис. 1*б–г*).

Полученные образцы были исследованы с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (рис. 2*а–в*). Согласно данным конфокальной флуоресцентной микроскопии образцов в присутствии амилоид-специфического флуоресцентного зонда тιοфлавина Т (ThT), степень кластеризации фибрилл различается: фибриллы, полученные в отсутствие GdnHCl (рис. 2*а*) и в присутствии 0.05 М GdnHCl (рис. 2*б*), образуют более крупные и плотные сгустки, чем амилоиды, полученные в присутствии 3 М GdnHCl (рис. 2*в*).

Таким образом, оказалось, что молекула лизоцима в отсутствие GdnHCl может формировать два альтернативных типа агрегатов: амилоидные фибриллы и аморфные агрегаты. Присутствие GdnHCl, по-видимому, смещает равновесие в сторону образования амилоидных фибрилл, причем их волокнистая морфология не зависит, а склонность к кластеризации, напротив, зависит от концентрации денатурирующего агента.

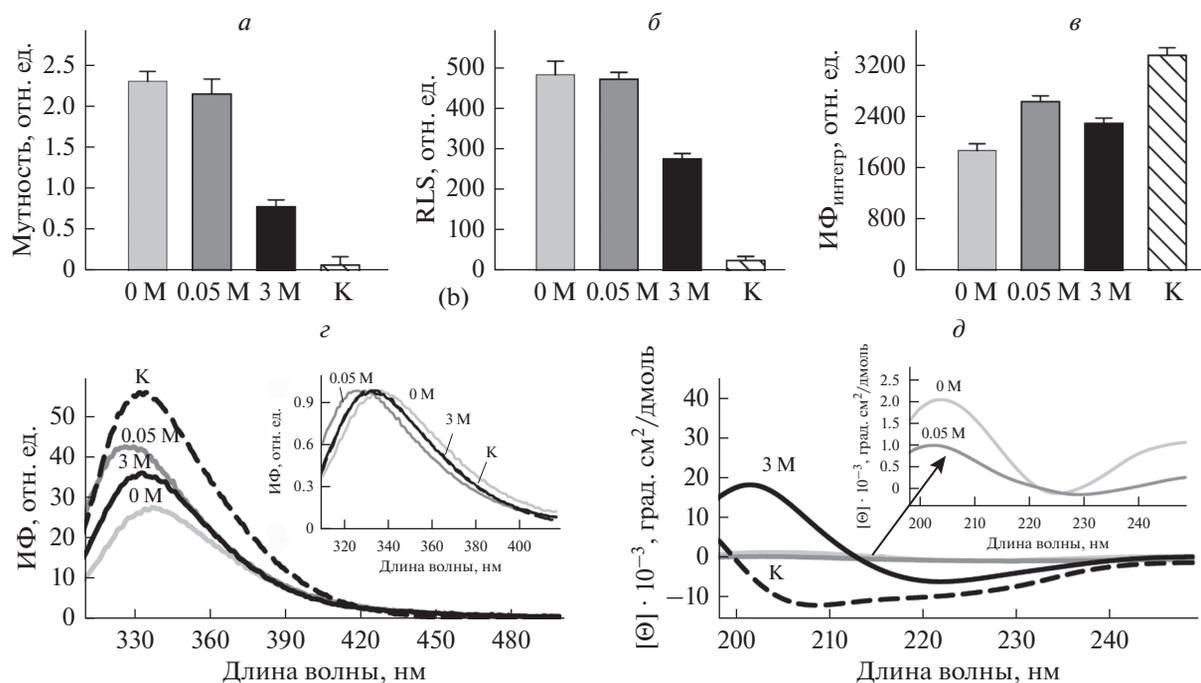


Рис. 3. Спектральные и фотофизические свойства мономерного нативного лизоцима (К) и амилоидных фибрилл на его основе, полученных в отсутствие GdnHCl (0 М) и в его присутствии в концентрации 0.05 и 3 М. *а* – RLS, *б* – мутность; *в* – интегральная интенсивность флуоресценции (ИФ) (ИФ_{интегр} – площадь под кривой спектра флуоресценции), *г* – спектры флуоресценции, на *вставке* – нормированные спектры флуоресценции триптофана в амилоидных фибриллах, полученных при различных концентрациях GdnHCl; *д* – спектры кругового дихроизма, на *вставке* – спектры кругового дихроизма фибрилл, полученных в отсутствие (0 М) и в присутствии 0.5 М GdnHCl, в увеличенном масштабе.

Спектральные и фотофизические характеристики амилоидных фибрилл на основе лизоцима. Для подтверждения сделанного предположения о различной степени кластеризации исследуемых белковых агрегатов мы проанализировали мутность и RLS образцов (рис. 3*а, б*). Было показано, что значения RLS, которые характеризуют размер и количество агрегатов в образце, для фибрилл, полученных при различных условиях фибрилlogenеза, заметно различаются. Оказалось, что наиболее низкое значение RLS имеет образец, полученный в присутствии 3 М GdnHCl (рис. 3*а*), что согласуется с наименьшим размером фибриллярных кластеров в этом образце, согласно данными конфокальной микроскопии (рис. 2*в*). Аналогичные результаты были получены при анализе мутности исследуемых образцов: наиболее низкое значение мутности было показано для образца, полученного в 3 М GdnHCl (рис. 3*б*). Таким образом, результаты проведенных исследований подтверждают различие линейных размеров фибриллярных агрегатов лизоцима в образцах, полученных при различных условиях фибрилlogenеза.

Далее мы зарегистрировали и проанализировали собственную флуоресценцию исследуемых амилоидных фибрилл (рис. 3*в, г*). Показано заметное различие интегральной интенсивности флуоресценции (рис. 3*в*) и положения спектров флуоресценции (рис. 3*г, вставка*) лизоцима в мономерной и фиб-

риллярных формах. Оказалось, что максимум спектра флуоресценции образца, полученного в присутствии 0.05 М GdnHCl, сдвигается в коротковолновую область, а максимум спектра флуоресценции образца, полученного в отсутствие GdnHCl, сдвигается в длинноволновую область по сравнению со спектром мономерного лизоцима. При этом максимум спектра флуоресценции образца, полученного в присутствии 3 М GdnHCl, практически совпадает с максимумом спектра мономерного белка. Обнаруженные различия спектров флуоресценции амилоидных фибрилл, полученных при разных условиях, вероятно, обусловлены различным микроокружением и подвижностью аминокислотных остатков триптофана в исследуемых образцах, что может свидетельствовать о различии их вторичной структуры.

Для того, чтобы подтвердить сделанное предположение о различии вторичной структуры исследуемых амилоидных фибрилл, были зарегистрированы спектры КД образцов в дальней ультрафиолетовой области (рис. 3*д*). Оказалось, что минимум спектров КД амилоидных фибрилл на основе лизоцима, полученных в отсутствие и в присутствии 0.05 М GdnHCl (рис. 3*д, вставка*), существенно менее выражен по сравнению с минимумом спектров мономерного белка и амилоидов, полученных в присутствии 3 М GdnHCl (рис. 3*д*). Вероятно, это обусловлено чрезвычайно высоким светорассеянием этих фибрилл

Таблица 1. Анализ вторичной структуры нативного мономерного лизоцима и амилоидных фибрилл на его основе, полученных при различных концентрациях GdnHCl

Фибриллы, полученные при концентрации GdnHCl, M	α -Спираль, %	β -Листы, %	β -Повороты, %	Неупорядоченная структура, %
0	2.7 \pm 0.4	44.4 \pm 0.4	19.0 \pm 0.3	33.9 \pm 0.3
0.05	3.3 \pm 0.3	43.7 \pm 0.3	20.1 \pm 0.4	33.0 \pm 0.4
3.0	3.3 \pm 0.2	54.4 \pm 0.7	16.5 \pm 0.3	25.9 \pm 0.3
Нативный белок	33.3 \pm 0.5	17.8 \pm 0.3	21.6 \pm 0.3	27.3 \pm 0.5

(рис. 3а, б). При этом форма и положение (минимум около 220–230 нм) этих спектров, как и спектра фибрилл, полученных при максимальной концентрации GdnHCl, характерны для амилоидных фибрилл на основе различных амилоидогенных белков (Greenfield, 2006).

С использованием различных базисных наборов белков и специального программного обеспечения CDPro (Provencher, Glockner, 1981; Sreerama, Woody, 2000) было определено содержание элементов вторичной структуры (α -спиралей, β -листов, β -поворотов и неупорядоченной структуры) в исследуемых образцах (табл. 1). Анализ вторичной структуры мономерного лизоцима и амилоидных фибрилл на его основе показал, что в процессе фибриллогенеза мономерный лизоцим, имеющий высокую долю α -спиралей, переходит в состояние, богатое β -складчатой структурой, что хорошо согласуется с данными из литературы, полученными для других амилоидогенных белков (Sunde et al., 1997; Juarez et al., 2009; Nagada, Kuroda, 2011). При этом содержание β -листов и β -поворотов в амилоидных фибриллах, полученных в отсутствие и в присутствии 0.05 M GdnHCl, заметно отличается от содержания β -структуры в фибриллах, полученных в присутствии 3 M GdnHCl, что свидетельствует о различной структуре фибриллярного остова агрегатов, сформированных при различных условиях. Интересно, что именно для амилоидов, сформировавшихся в присутствии максимальной концентрации денатурирующего агента и имеющих наименьшее содержание неупорядоченной структуры (табл. 1), мы обнаружили наименьшую склонность к формированию кластеров. Возможно, элементы неупорядоченной вторичной структуры, не входящей в остов фибриллы, играют роль во взаимодействии амилоидных волокон друг с другом.

Таким образом, в результате анализа спектральных и фотофизических характеристик амилоидов на основе лизоцима было показано, что условия фибриллогенеза оказывают влияние не только на склонность фибрилл взаимодействовать друг с другом, но и на вторичную структуру белка (как участков, фор-

мирующих остов фибриллы, так и фрагментов вне упорядоченного волокна).

Взаимодействие амилоидных фибрилл на основе лизоцима со специфическим флуоресцентным зондом ThT. Для подтверждения предположений о различии структуры фибриллярного остова амилоидов на основе лизоцима, полученных при различных условиях, мы исследовали их взаимодействие с бензгидроазольным красителем ThT. Существенной особенностью этого флуоресцентного зонда является то, что его взаимодействие с фибриллами высоко специфично, так как ThT не взаимодействует с белками в нативном (за исключением ацетилхолинэстеразы (De Ferrari et al., 2001) и сывороточных альбуминов (Sen et al., 2009; Rovnyagina et al., 2018)), развернутом или частично-свернутом состояниях, а также с олигомерами и аморфными агрегатами белков. В свободном состоянии в водном растворе ThT имеет чрезвычайно низкий квантовый выход флуоресценции (0.0001), который при взаимодействии красителя с амилоидными фибриллами может увеличиваться в несколько тысяч раз (Sulatskaya et al., 2010).

Благодаря этим уникальным свойствам, ThT уже долгое время используется в качестве удобного и эффективного инструмента для диагностики возникновения амилоидов *in vivo* и *in vitro* (Biancalana et al., 2009; Wu et al., 2009; Biancalana, Koide, 2010; Sulatsky et al., 2020). Кроме того, за последнее десятилетие накопились данные о том, что ThT может быть использован не только для диагностики образования амилоидных фибрилл, но и для изучения структуры этих белковых агрегатов (Sulatskaya et al., 2015, 2017), что обусловлено взаимодействием красителя непосредственно с фибриллярным остовом амилоида (Krebs et al., 2005). Согласно современным представлениям, краситель встраивается в бороздки, образованные боковыми цепями аминокислот, вдоль длинной оси волокна фибриллы перпендикулярно β -листам (Krebs et al., 2005). Таким образом, анализ спектральных характеристик красителя, связанного с фибриллами, может позволить сделать заключение об их структурном полиморфизме.

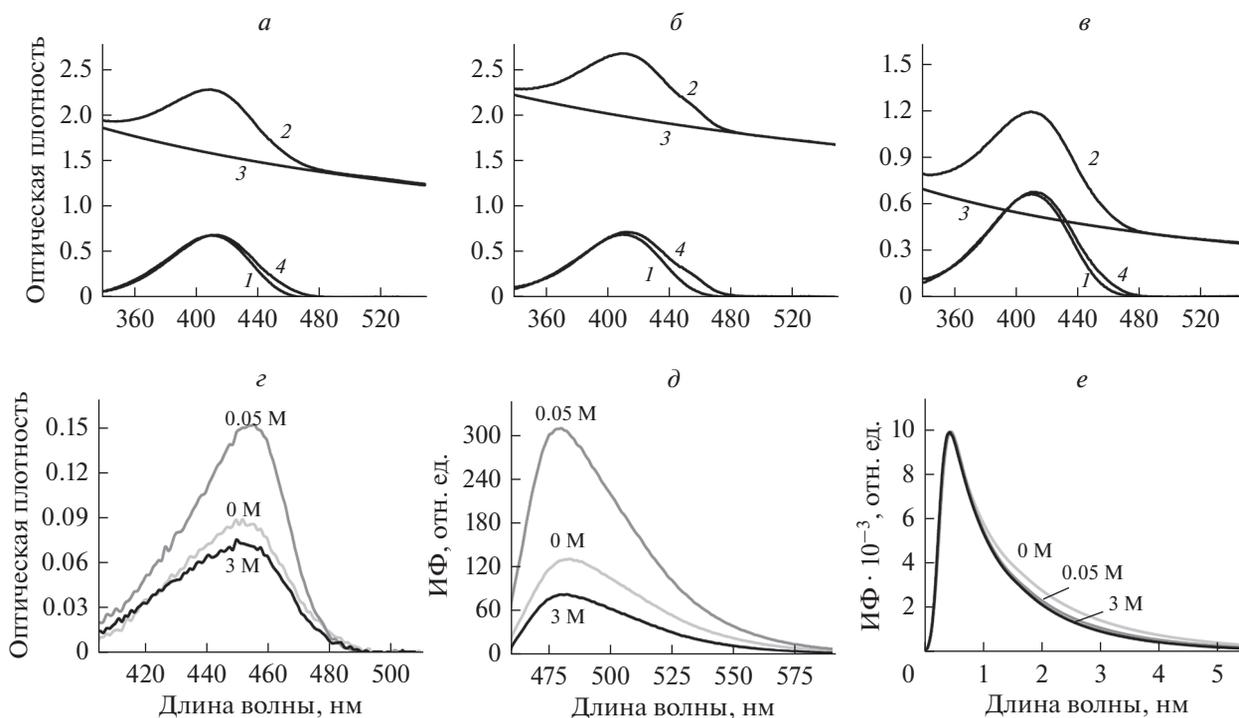


Рис. 4. Характеристики взаимодействия флуоресцентного зонда тиюфлавина Т (ThT) с амилоидными фибриллами на основе лизоцима. *a–в* – Спектры поглощения ThT после проведения равновесного микродиализа в 2-камерной системе (см. раздел “Материал и методика”) в присутствии амилоидных фибрилл на основе лизоцима, полученных в отсутствие (*a*) и в присутствии GdnHCl в концентрации 0.05 М (*б*) и 3 М (*в*): *кривая 1* – спектр поглощения свободного красителя в камере 2, *кривая 2* – суммарный спектр поглощения свободного и встроенного в амилоидные фибриллы ThT, *кривая 3* – светорассеяние амилоидных фибрилл в образце в камере 1, *кривая 4* – спектр поглощения свободного и связанного с фибриллами красителя после исключения светорассеяния фибрилл. *г* – Спектры поглощения, *д* – спектры флуоресценции, *е* – кривые затухания флуоресценции ThT, связанного с амилоидными фибриллами; у кривых указана концентрация GdnHCl.

Сложность в исследовании взаимодействия ThT с амилоидными фибриллами состоит в том, что образец всегда представляет собой равновесную систему свободного и связанного с амилоидами красителя. При этом фотофизические характеристики этих фракций красителя существенно различаются. Для того, чтобы определить фотофизические характеристики каждой из фракций красителя, присутствующих в образце, мы использовали специально разработанный подход, основанный на подготовке тестируемых образцов методом равновесного микродиализа (Kuznetsova et al., 2012a, 2012b, 2012c). Равновесный микродиализ был выполнен с помощью специального приспособления, которое состоит из двух камер равного объема (объем каждой составляет 500 мкл), разделенных мембраной, проницаемой для ThT и непроницаемой для амилоидных фибрилл. ThT помещали в одну из камер (камера 2), а образец с амилоидными фибриллами в том же растворе помещали в другую камеру (камера 1). После достижения равновесия спектр поглощения раствора в камере 2 представлял собой спектр поглощения свободного красителя (рис. 4*a–в*, *кривая 1*). Спектр поглощения в камере 1 (рис. 4*a–в*, *кривая 2*) представлял собой суммарный спектр поглощения сво-

бодного и связанного с амилоидными фибриллами красителя (рис. 4*a–в*, *кривая 4*) на фоне “кажущегося поглощения”, обусловленного светорассеянием фибрилл (рис. 4*a–в*, *кривая 3*).

На рис. 3*г* представлены спектры поглощения ThT, связанного с фибриллами на основе лизоцима, полученными при различных условиях фибрилlogenеза, которые представляют собой разность спектров поглощения образцов из камер 1 (рис. 4*a–в*, *кривая 4*) и 2 (рис. 4*a–в*, *кривая 1*). Анализ полученных результатов показал, что поглощение красителя, связанного с фибриллами, полученными в присутствии 0.05 М GdnHCl, превышает поглощение ThT, связанного с фибриллами, сформированными в отсутствие и в присутствии 3 М GdnHCl. Также показана различная величина сдвига спектров поглощения красителя, связанного с фибриллами, в длинноволновую область (максимум спектра ThT, встроенного в фибриллы, полученные в отсутствие и в присутствии GdnHCl в концентрации 0.05 и 3 М, регистрируется при длинах волн 451, 455 и 449 нм соответственно) по сравнению со спектром свободного ThT (максимум спектра при длине волны 412 нм). Это, вероятно, обусловлено различной гидрофобно-

Таблица 2. Квантовый выход флуоресценции (q) и время жизни возбужденного состояния ($\langle\tau\rangle$) ThT, связанного с амилоидными фибриллами, полученными при различных концентрациях GdnHCl

[GdnHCl], М	q	$\langle\tau\rangle$, нс
0	$(2.7 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	1.40 ± 0.06
0.05	$(3.5 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	1.16 ± 0.04
3.0	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	1.29 ± 0.05

стью микроокружения молекул ThT при встраивании в бороздки амилоидных фибрилл.

Для образцов, подготовленных методом равновесного микродиализа, были зарегистрированы и скорректированы на эффект первичного внутреннего фильтра (Fonin et al., 2014) спектры флуоресценции ThT (рис. 4д). Показано, что интенсивность флуоресценции красителя, связанного с фибриллами, полученными в присутствии 0.05 М GdnHCl, превышает интенсивность флуоресценции ThT, связанного с фибриллами, сформированными в отсутствие и в присутствии 3 М GdnHCl. С использовани-

ем зарегистрированных спектров флуоресценции (рис. 4д) и кривых затухания флуоресценции (рис. 4е) ThT мы рассчитали квантовый выход флуоресценции и время жизни возбужденного состояния красителя, связанного с фибриллами (табл. 2). Различие значений кантового выхода флуоресценции и времени жизни возбужденного состояния ThT, связанного с различными типами амилоидов на основе лизоцима, вероятно, обусловлено различным ограничением подвижности фрагментов связанного красителя друг относительно друга в возбужденном состоянии. Это, в свою очередь, может быть связано с различной жесткостью микроокружения молекул ThT, а, значит, структурным полиморфизмом фибриллярных волокон, полученных при различных условиях.

Устойчивость амилоидных фибрилл на основе лизоцима к воздействию внешних факторов. Для сравнения стабильности амилоидных фибрилл на основе лизоцима, полученных при различных условиях, мы исследовали их устойчивость к воздействию ионного детергента SDS и кипячения с помощью SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) (рис. 5).

На дорожке 1 (рис. 5), куда был загружен нативный лизоцим в качестве контроля, обнаружена одна интенсивная полоса, соответствующая молекулярной массе мономерного белка (14.3 кДа). При этом аналогичные полосы для образцов, полученных в отсутствие и в присутствии 0.05 М GdnHCl, оказались заметно менее интенсивными (рис. 5, дорожки 2, 3). Образцу, полученному в присутствии максимальной концентрации GdnHCl (рис. 5, дорожка 4), соответствует наиболее слабая полоса на геле, что свидетельствует о том, что большая часть этих фибрилл не деградировала при термическом и химическом воздействии и не вошла в гель. Таким образом, устойчивость исследуемых амилоидных фибрилл на основе лизоцима к воздействию ионного детергента и кипячения оказалась различной. Фибриллы, полученные в присутствии 3 М GdnHCl, являются наиболее стабильными из исследованных амилоидов, что может быть обусловлено более жесткой и стабильной структурой фибриллярного волокна этих фибрилл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования амилоидов на основе лизоцима, полученных при различной концентрации денатурирующего агента GdnHCl, с применением широкого спектра физико-химических методов (в том числе специально разработанных) были показаны различия следующих параметров: склонности фибрилл к кластеризации; вторичной структуры как фрагментов белка, формирующих β -складчатый остов фибриллы, так и участков белка все этого остова; микроокружения триптофановых остатков амилоид-формирующих белков; характеристик взаимодействия фибрилл со специфическим флуоресцентным зондом ThT; устойчивости амилоидов к

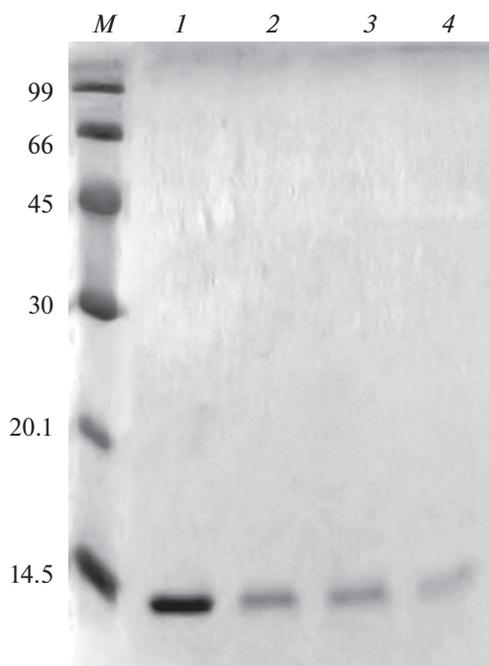


Рис. 5. Электрофореграмма мономерного лизоцима (дорожка 1) и амилоидных фибрилл на основе лизоцима, полученных в отсутствие (дорожка 2) и в присутствии GdnHCl в концентрации 0.05 М (дорожка 3) и 3 М (дорожка 4). М — маркерные белки, мол. масса (кДа) указана слева. Мол. масса лизоцима — 14.3 кДа. SDS-электрофорез в полиакриламидном геле.

воздействию ионного детергента SDS и кипячения. Полученные данные свидетельствуют о структурном полиморфизме этих белковых агрегатов, который, вероятно, обусловлен различной степенью денатурации белка в присутствии GdnHCl в различных концентрациях, а, значит, формированием фибриллярного волокна на основе мономерных молекул лизоцима с различной вторичной и третичной структурой. Результаты работы позволили сделать заключение о том, что полученные амилоидные фибриллы на основе лизоцима являются привлекательным объектом для проведения дальнейших исследований, направленных на выявление связи их структуры с цитотоксичностью.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-74-10100).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Avni A., Swasthi H.M., Majumdar A., Mukhopadhyay S. 2019. Intrinsically disordered proteins in the formation of functional amyloids from bacteria to humans. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* V. 166. P. 109.
- Barnhart M.M., Chapman M.R. 2006. Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.* V. 60. P. 131.
- Biancalana M., Koide S. 2010. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochem. Biophys. Acta.* V. 1804. P. 1405.
- Biancalana Wu.C., Koide M., Shea S., Shea J.E. 2009. Binding modes of thioflavin-T to the single-layer beta-sheet of the peptide self-assembly mimics. *J. Mol. Biol.* V. 394. P. 627.
- Biancalana M., Makabe K., Koide A., Koide S. 2009. Molecular mechanism of thioflavin-T binding to the surface of beta-rich peptide self-assemblies. *J. Mol. Biol.* V. 385. P. 1052.
- Chartier-Harlin M.C., Kachergus J., Roumier C., Mouroux V., Douay X., Lincoln S., Levecque C., Larvor L., Andrieux J., Hulihan M., Waucquier N., Defebvre L., Amouyel P., Farrer M., Destée A. 2004. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet.* V. 364. P. 1167.
- Cherny I., Gazit E. 2008. Amyloids: not only pathological agents but also ordered nanomaterials. *Angew. Chem.* V. 47. P. 4062.
- Chiti F., Dobson C.M. 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* V. 75. P. 333.
- Collinson S.K., Emody L., Muller K.H., Trust T.J., Kay W.W. 1991. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. *J. Bacteriol.* V. 173. P. 4773.
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science.* V. 284. P. 1318.
- De Ferrari G.V., Mallender W.D., Inestrosa N.C., Rosenberry T.L. 2001. Thioflavin T is a fluorescent probe of the acetylcholinesterase peripheral site that reveals conformational interactions between the peripheral and acylation sites. *J. Biol. Chem.* V. 276. P. 23282.
- Eisenberg D., Jucker M. 2012. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell.* V. 148. P. 1188.
- Fandrich M., Meinhardt J., Grigorieff N. 2009. Structural polymorphism of Alzheimer Abeta and other amyloid fibrils. *Prion.* V. 3. P. 89.
- Fonin A.V., Sulatskaya A.I., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K. 2014. Fluorescence of dyes in solutions with high absorbance. Inner filter effect correction. *PloS One.* V. 9. e103878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103878>
- Fowler D.M., Koulov A.V., Balch W.E., Kelly J.W. 2007. Functional amyloid—from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* V. 32. P. 217.
- Greenfield N.J. 2006. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.* V. 1. P. 2876.
- Harada T., Kuroda R. 2011. CD measurements of beta-amyloid (1-40) and (1-42) in the condensed phase. *Biopolymers.* V. 95. P. 127.
- Iadanza M.G., Silvers R., Boardman J., Smith H., Karamanos T., Debelouchina G., Su Y., Griffin R., Ranson N., Radford S. 2018. The structure of a beta2-microglobulin fibril suggests a molecular basis for its amyloid polymorphism. *Nat. Commun.* V. 9. P. 4517. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06761-6>
- Ivanova M.I., Thompson M.J., Eisenberg D. 2006. A systematic screen of beta(2)-microglobulin and insulin for amyloid-like segments. *PNAS.* V. 103. P. 4079.
- Jahn T.R., Radford S.E. 2008. Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 469. P. 100.
- Juarez J., Taboada P., Mosquera V. 2009. Existence of different structural intermediates on the fibrillation pathway of human serum albumin. *Biophys. J.* V. 96. P. 2353.
- Krebs M.R., Bromley E.H., Donald A.M. 2005. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J. Struct. Biol.* V. 149. P. 30.
- Kuznetsova I.M., Sulatskaya A.I., Povarova O.I., Turoverov K.K. 2012a. Reevaluation of ANS binding to human and bovine serum albumins: key role of equilibrium microdialysis in ligand – receptor binding characterization. *PloS One.* V. 7. e40845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040845>
- Kuznetsova I.M., Sulatskaya A.I., Uversky V.N., Turoverov K.K. 2012b. Analyzing thioflavin T binding to amyloid fibrils by an equilibrium microdialysis-based technique. *PloS One.* V. 7. e30724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030724>

- Kuznetsova I.M., Sulatskaya A.I., Uversky V.N., Turoverov K.K.* 2012c. A new trend in the experimental methodology for the analysis of the thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Mol. Neurobiol.* V. 45. P. 488.
- Nelson R., Eisenberg D.* 2006. Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* V. 16. P. 260.
- Nelson R., Sawaya M.R., Balbirnie M., Madsen A.O., Riekel C., Groth R., Eisenberg D.* 2005. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature.* V. 435. P. 773.
- Otzen D., Riek R.* 2019. Functional Amyloids. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 11. a033860. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033860>
- Pham C.L., Kwan A.H., Sunde M.* 2014. Functional amyloid: Widespread in nature, diverse in purpose. *Essays Biochem.* V. 56. P. 207.
- Provencher S.W., Glockner J.* 1981. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry.* V. 20. P. 33.
- Prusiner S.B., McKinley M.P., Bowman K.A., Bolton D.C., Bendheim P.E., Groth D.F., Glenner G.G.* 1983. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell.* V. 35. P. 349.
- Rovnyagina N.R., Sluchanko N.N., Tikhonova T.N., Fadeev V.V., Litskevich A.Y., Maskevich A.A., Shirshin E.A.* 2018. Binding of thioflavin T by albumins: An underestimated role of protein oligomeric heterogeneity. *Int. J. Biol. Macromol.* V. 108. P. 284.
- Sen P., Fatima S., Ahmad B., Khan R.H.* 2009. Interactions of thioflavin T with serum albumins: spectroscopic analyses. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* V. 74. P. 94.
- Sneideris T., Darguzis D., Botyriute A., Grigaliunas M., Winter R., Smirnovas V.* 2015. pH-Driven Polymorphism of insulin amyloid-like fibrils. *PLoS One.* V. 10. e0136602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136602>
- Sreerama N., Woody R.W.* 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* V. 287. P. 252.
- Stefani M.* 2010. Structural polymorphism of amyloid oligomers and fibrils underlies different fibrillization pathways: Immunogenicity and cytotoxicity. *Curr. Prot. Pept. Sci.* V. 11. P. 343.
- Sulatskaya A.I., Maskevich A.A., Kuznetsova I.M., Uversky V.N., Turoverov K.K.* 2010. Fluorescence quantum yield of thioflavin T in rigid isotropic solution and incorporated into the amyloid fibrils. *PLoS One.* V. 5. e15385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015385>
- Sulatskaya A.I., Rodina N.P., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K.* 2017. Different conditions of fibrillogenesis cause polymorphism of lysozyme amyloid fibrils. *J. Mol. Struct.* V. 1140. P. 52.
- Sulatskaya A.I., Rodina N.P., Polyakov D.S., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K.* 2015. Investigation of amyloid fibrils on the basis of full-length and truncated forms of beta-2-microglobulin with the use of equilibrium microdialysis. *Proc. Europ. Conf. Biol. Med. Sci.* P. 11.
- Sulatsky M.I., Sulatskaya A.I., Povarova O.I., Antifeeva I.A., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K.* 2020. Effect of the fluorescent probes ThT and ANS on the mature amyloid fibrils. *Prion.* V. 14. P. 67.
- Sunde M., Serpell L.C., Bartlam M., Fraser P.E., Pepys M.B., Blake C.C.* 1997. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* V. 273. P. 729.
- Tycko R.* 2015. Amyloid polymorphism: Structural basis and neurobiological relevance. *Neuron.* V. 86. P. 632.
- Valentine J.S., Doucette P.A., Zittin Potter S.* 2005. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Rev. Biochem.* V. 74. P. 563.
- Vassar R., Bennett B.D., Babu-Khan S., Kahn S., Mendiaz E.A., Denis P., Teplow D.B., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J. et al.* 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* V. 286. P. 735.
- Vernaglia B.A., Huang J., Clark E.D.* 2004. Guanidine hydrochloride can induce amyloid fibril formation from hen egg-white lysozyme. *Biomacromol.* V. 5. P. 1362.
- Vladimirov Y.A., Litvin F.F.* 1964. Photobiology and spectroscopic methods. *Handbook Gen. Biophys.* V. 8. P. 88.
- Warby S.C., Montpetit A., Hayden A.R., Carroll J.B., Butland S.L., Visscher H., Collins J.A., Semaka A., Hudson T.J., Hayden M.R.* 2009. CAG expansion in the Huntington disease gene is associated with a specific and targetable predisposing haplogroup. *Am. J. Hum. Genet.* V. 84. P. 351.
- Westermarck P., Benson M.D., Buxbaum J.N., Cohen A.S., Frangione B., Ikeda S., Masters C.L., Merlini G., Saraiva M.J., Sipe J.D.* 2005. Amyloid: Toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid.* V. 12. P. 1.

Structural Polymorphism of Lysozyme Amyloid Fibrils

N. M. Melnikova^a, M. I. Sulatsky^a, I. M. Kuznetsova^a, K. K. Turoverov^{a,*}, and A. I. Sulatskaya^{a,**}

^aInstitute of Cytology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

*e-mail: kkt@incras.ru

**e-mail: ansul@mail.ru

According to the modern concepts, polymorphism of amyloid fibrils can be the cause of the differences in its cytotoxicity, as well as the variability of amyloidosis. The aim of this work was to study the structure and properties of the lysozyme amyloid fibrils obtained under various conditions (at different concentrations of the denaturing agent guanidine hydrochloride) using a wide range of physicochemical methods, including specially elaborated ones. As a

result, the difference was shown: 1) the propensity of amyloid fibers to interact with each other and the size of their clusters; 2) secondary structure and microenvironment of tryptophan residues of amyloid-forming proteins; 3) the characteristics of the fibrils interaction with the amyloid-specific probe thioflavin T (ThT), as well as 4) the resistance of amyloids to the action of the ionic detergent sodium dodecyl sulfate and boiling. Our results indicate the polymorphism of the studied protein aggregates. The results of the work allowed us to conclude that the obtained amyloid fibrils are an attractive object for further research aimed at identifying the relationship between the structure of amyloids and their cytotoxicity.

Keywords: amyloid fibrils, lysozyme, structural polymorphism, thioflavin T, guanidine hydrochloride, equilibrium microdialysis

УЛУЧШЕНИЕ КИСЛОТНО-ЩЕЛОЧНОГО СОСТАВА СРЕДЫ ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО И ОБРАТИМОГО КРИОСОХРАНЕНИЯ СРЕЗОВ МОЗГА КРЫС

© 2022 г. А. А. Мокрушин*

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*E-mail: mok@inbox.ru

Поступила в редакцию 30.07.2021 г.

После доработки 25.08.2021 г.

Принята к публикации 27.08.2021 г.

Ранее было обнаружено, что активность глутаматергических ионотропных *N*-метил-D-аспаратных рецепторов (NMDAR) после длительного криосохранения срезов мозга при температуре -10°C снижалась или блокировалась. Срезы обонятельной коры крыс использовали для изучения механизмов криповреждения NMDAR. Для восстановления активности NMDAR после криосохранения исследовали эффекты изменения внеклеточного pH замораживающей среды при регистрации NMDA-потенциалов, вызываемых электрической стимуляцией латерального обонятельного тракта. Обнаружено, что после криосохранения замораживающая среда закислялась до pH 6.5, при этом амплитуда NMDA-потенциалов снижалась по сравнению с амплитудами до криосохранения. Для сохранения активности NMDAR после криосохранения была усилена буферная емкость замораживающего раствора применением гибридной буферной системы, включающей карбонатный буфер (NaHCO_3), фосфатный (KH_2PO_4) и трис(гидроксиметил)аминометан ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$); солевой состав при использовании такой буферной системы не менялся. После криосохранения срезов в такой среде амплитуда NMDA-потенциалов составляла $22 \pm 7\%$ по сравнению с амплитудой до криосохранения. Дополнительно использовали способ увеличения pH среды до 7.6–7.7 в процессе замораживания срезов в интервале температур 20–22 $^{\circ}\text{C}$. Это сопровождалось восстановлением активности NMDAR. Таким образом, применение гибридной буферной системы в замораживающей среде и одновременное увеличение ее pH до 7.6–7.7 способствовало восстановлению NMDAR после криосохранения.

Ключевые слова: срезы мозга, NMDA-потенциалы, криосохранение, буферные системы

DOI: 10.31857/S0041377122010084

Криосохранение – перспективная биотехнология, позволяющая длительное время сохранять биологический материал в жизнеспособном состоянии при низких температурах и создавать криобанк для трансплантатов (Ichikawa et al., 2007; Morris, 2007; Raunter, 2008; Ma et al., 2010). Методы криосохранения сложноорганизованных органов и тканей, например, нервной системы, пока детально не разработаны. Срезы головного мозга являются оптимальными объектами для экспериментального изучения закономерностей длительного и обратимого криосохранения нервной ткани.

Ранее наши эксперименты показали, что при медленных скоростях охлаждения срезов обонятель-

ной коры ($0.1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) активность глутаматергического ионотропного *N*-метил-D-аспаратного рецептора (NMDAR) сохранялась, однако при длительном криосохранении она блокировалась (Mokrushin et al., 2014; Мокрушин, 2016).

NMDAR относят к семейству ионотропных глутаматергических механизмов. Эти рецепторы являются ключевыми структурами возбуждающей глутаматергической медиаторной системы в мозге. Они участвуют в различных формах адаптивных реакций, таких как обучение, формирование следов памяти, а также при развитии патологий (инсульт, травма, эпилепсия) (Obrenovitch, Urenjak, 1997; Cull-Candy, Leszkiewicz, 2004; Traynelis et al., 2010). NMDAR являются наиболее уязвимыми структурами по сравнению с AMPAR и проводящими волокнами латерального обонятельного тракта (ЛОТ) при различных стрессорных воздействиях, включая замораживание (Мокрушин, 2016).

Принятые сокращения: ЛОТ – латеральный обонятельный тракт; Трис-HCl – трис(гидроксиметил)аминометан; ФП – фокальные потенциалы; AMPA – альфа-амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота; AMPAR – рецептор AMPA; CNQX – 6-циано-7-нитрохиноксалин-2,3-дион; D-APV – D-2-амино-5-фосфоновалериат; NMDA – *N*-метил-D-аспарат; NMDAR – рецептор NMDA.

Нами была высказана гипотеза, что в процессе криосохранения и последующего отогревания клетки срезов мозга (без их электрической активации) выделяют во внеклеточную среду метаболиты, которые изменяют внеклеточное значение pH и, соответственно, активность рецепторных структур. Очевидно, что для устранения нарушений функций NMDAR во время криосохранения необходимо оптимизировать состав замораживающей среды и, прежде всего, ее кислотно-щелочные показатели.

Цель нашей работы заключалась в сохранении активности NMDAR после длительного криосохранения (30 сут) при низкотемпературном замораживании (-10°C) при помощи изменения pH замораживающей среды.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. Все эксперименты проводили на белых крысах-самцах линии Wistar массой 180–200 г. Использовано 29 животных. Они содержались в помещении вивария (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН) при свободном доступе к воде и пище с 12-часовым циклом ночь/день. Эксперименты с животными проводили в соответствии с рекомендациями по этике, предложенными Директивой Совета Европейских сообществ (86/609 ЕЕС).

Приготовление срезов. Исследования проведены на тангенциальных срезах обонятельной коры головного мозга крыс-самцов толщиной 400–500 мкм. Срезы мозга включают нейроны пириформной коры, глутаматергические синапсы и проводящие нервные волокна латерального обонятельного тракта (ЛОТ). Приготовление срезов происходило следующим образом. Крыс декапитировали при помощи гильотины (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН). Хирургическими инструментами извлекали головной мозг и помещали его на фильтровальную бумагу, покрывающую металлический столик, охлажденный до 4°C . При помощи специального резака (Митюшов и др., 1986; Мокрушин, 1997) готовили срезы обонятельной коры мозга. Кисточкой срез переносили во флакон с искусственной цереброспинальной аэрированной жидкостью (состав см. ниже) объемом 1 мл. Длительность всей процедуры приготовления среза от момента декапитации до его помещения в среду составляла 1–1.5 мин.

После помещения среза во флакон газовую атмосферу над жидкостью со срезом в течение 1 мин продувания заменяли на кислород. Флакон со срезом устанавливали в аппарат Варбурга (Германия) с частотой качаний 120 в 1 мин при температуре 37°C в месте нахождения среза до его перемещения в регистрирующую камеру электрофизиологической установки (Мокрушин, Боровиков, 2017). Искусственный церебральный раствор для поддержания жизнедеятельности срезов и последующего их замораживания имел следующий состав (мМ): 124.0 NaCl; 5.0 KCl;

2.6 CaCl₂; 1.24 KH₂PO₄; 1.2 MgSO₄; 3.0 NaHCO₃; 10.0 глюкозы; pH 7.3 при 37°C .

Определение активности NMDAR. В ответ на электрическую стимуляцию ЛОТ в нормотермических условиях внеклеточно регистрируются фокальные потенциалы (ФП), которые отражают суммарную активность нейронов пириформной коры и волокон ЛОТ. Без стимуляции ЛОТ спонтанная активность в срезах не регистрируется. ФП является многокомпонентным потенциалом и состоит из пресинаптического компонента, который отражает активность проводящих волокон ЛОТ – суммарный потенциал действия ЛОТ (ПД-ЛОТ), и постсинаптических компонентов, которые отражают активацию глутаматергических ионотропных механизмов – AMPAR и NMDAR (рис. 1). В настоящей работе изучали изменения только активности NMDAR. Эти потенциалы были идентифицированы ранее (Мокрушин, 1997; Mokrushin, Pavlinova, 2013). Выявление NMDA-компонента в ФП в нормотермических условиях производили при воздействии специфического антагониста D-APV (50 мкМ) (рис. 1).

Измерение pH среды. Измерение pH замораживающей среды осуществляли с помощью pH-метра Seven Compact S220 (Mettler Toledo, США). Значения pH определяли с точностью до 0.1. Температуру среды со срезами до и после замораживания при регистрации NMDA-потенциалов измеряли с помощью прибора “Измеритель пид-регулятор ТРМ12” (Россия). Модификацию pH замораживающей среды и регистрацию NMDA-потенциалов до и после криосохранения проводили в параллельных экспериментах. Одновременное измерение этих параметров на срезах приводило к неконтролируемому искажению данных как pH, так и NMDA-потенциалов.

Протокол криосохранения срезов заключался в следующем. Искусственный цереброспинальный раствор с ионным составом (описан выше) приготавливали на гибридной буферной системе: карбонатный буфер (NaHCO₃), фосфатный буфер (KH₂PO₄) и Трис-HCl.

В срезах до замораживания регистрировали амплитуды NMDA-потенциалов (мкВ) стеклянными микроэлектродами, заполненными 1 М NaCl, с сопротивлением 1–5 МОм. Эти потенциалы регистрировали в ответ на одиночные электрические импульсы (ЭСУ-1, Россия) ЛОТ прямоугольной формы, длительностью 0.1 мс, интенсивностью 1–3 В и частотой 0.003 Гц при 37°C в течение 20 мин. Регистрацию проводили в проточной камере электрофизиологической установки (Мокрушин, Боровиков, 2017) с использованием усилителя (НТО, Россия). Потенциалы оцифровывали на аналого-цифровом приборе (Е 20–10, Россия) и обрабатывали с помощью компьютерной программы “Анализ электрической активности нейронов” (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Россия). Полученные значения амплитуд NMDA-потенциалов (мкВ) рассматривали как контрольные перед замораживанием и

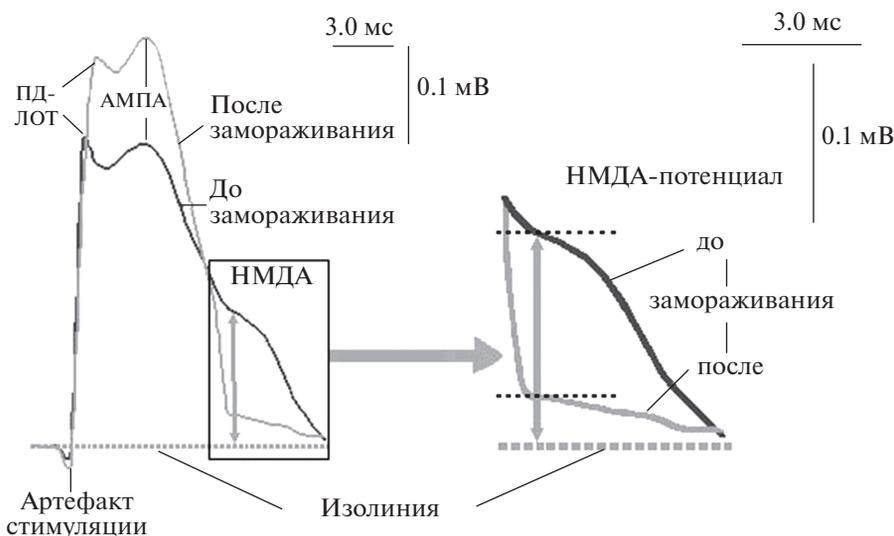


Рис. 1. Потенциалы, регистрируемые в нейронах срезов обонятельной коры крыс в ответ на электрическую стимуляцию латерального обонятельного тракта (ЛОТ). На потенциалах даны обозначения всех компонентов. Артефакт стимуляции отражает нанесение электрического стимулирующего импульса; пресинаптический суммарный потенциал действия (ПД-ЛОТ) — активацию проводящих волокон ЛОТ; постсинаптические компоненты: ранний АМРА-потенциал и поздний NMDA-потенциал. Проанализированы изменения только NMDA-потенциалов. Потенциалы зарегистрированы до (*серая линия*) и после (*черная линия*) криосохранения (КС) (30 сут при -10°C). *Вертикальная серая стрелка* — амплитуда NMDA-потенциалов в точке 8 мс от артефакта стимуляции. На *вставке* в увеличенном масштабе показаны амплитуды NMDA-потенциалов до и после КС. *Черные штриховые горизонтальные линии* — амплитуды NMDA-потенциалов до и после КС. Калибровка указана.

принимали за 100%. Затем срезы замораживали при медленной скорости ($0.1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) до -10°C и хранили в морозильнике термостата “ThermoStat plus” (Eppendorf, Германия). Через 30 сут криосохранения срезы отогревали до 37°C с такой же скоростью, при этом солевой состав среды не менялся. Вновь регистрировали NMDA-потенциалы (мкВ) и выражали в % по отношению к значениям до замораживания.

Химические реактивы предоставлены компанией Химреактив (Россия).

Статистическую обработку изменения амплитуд NMDA-потенциалов проводили с использованием непараметрического параметра Вилкоксона—Манна—Уитни (*U*-критерия). Цифровые данные выражали как среднее значение и его стандартная ошибка. Уровень статистической значимости составлял $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для устранения нарушений функций NMDAR при криосохранении и последующем отогревании были исследованы эффекты гибридной буферной системы, состоящей из трех компонентов: карбоната (NaHCO_3), фосфата (KH_2PO_4) и Трис- HCl в замораживающей среде для криосохранения срезов мозга. Солевой состав среды до и после криосохранения и последующего отогревания не изменялся.

На рис. 1 представлены ФП, записанные после 30 сут криосохранения и последующего отогревания до температуры 37°C в среде такого же состава, как при замораживании. Амплитуда NMDA-потенциала (рис. 1, *вставка*) уменьшалась после отогревания и составляла 28 ± 7 против 130 ± 11 мкВ до замораживания ($p \leq 0.05$, $U = 7$, $n = 12$). Среднее снижение амплитуд NMDA-потенциалов составило 78% по сравнению с амплитудой до криосохранения. При исследовании ранее эти потенциалы отсутствовали, что указывает на ингибирование активности NMDAR (Mokrushin, 2016; Мокрушин, Боровиков, 2017). Следовательно, усиление буферной емкости замораживающей среды при помощи Трис- HCl , который играет ключевую роль в долгосрочном поддержании кислотно-щелочного баланса в срезах мозга, не способствует полному восстановлению активности NMDAR после криосохранения.

Для выяснения причин снижения активности NMDAR после криосохранения и отогревания мы исследовали изменение внеклеточного pH замораживающей среды. Результаты выявили, что после продолжительного криосохранения (-10°C при медленной скорости замораживания $-0.1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) и последующего отогревания с той же скоростью происходит закисление pH среды при отогревании до значений pH 6.5–6.7. Мы полагали, что такое снижение pH среды приводит к редукции амплитуд NMDA-потенциалов. Действительно при этих значениях pH

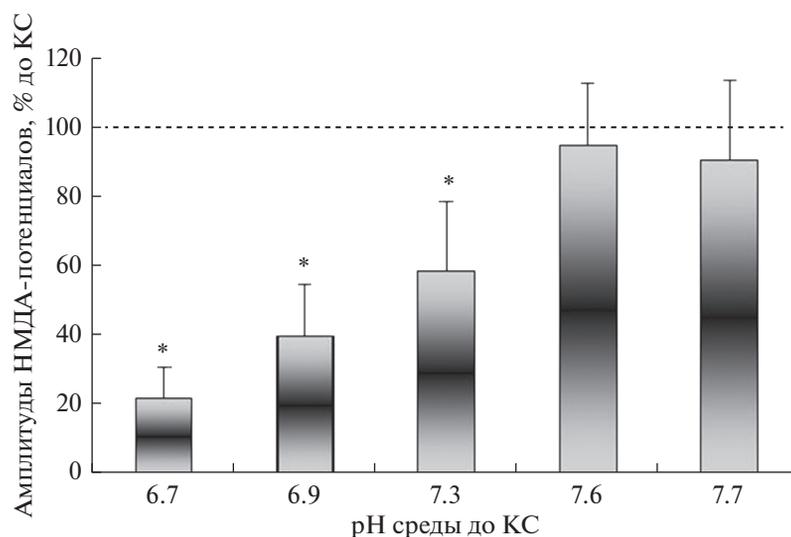


Рис. 2. Амплитуда NMDA-потенциалов до криосохранения (КС) при 37°C в зависимости от значения рН замораживающей среды. $n = 5$ (при рН 6.7 и 7.7); $n = 7$ (рН 6.9); $n = 12$ (рН 7.3); $n = 9$ (рН 7.6). Амплитуда NMDA-потенциалов выражена в % от значения до КС, принятого за 100% (горизонтальная штриховая линия). Различия амплитуд NMDA-потенциалов по сравнению с значениями до КС определяли с помощью непараметрического U -критерия Вилкоксона–Манна–Уитни, $p \leq 0.05$ (*).

амплитуда NMDA-потенциалов снижалась. Так, до замораживания амплитуда NMDA-потенциала составляла 140 мкВ, а при отогревании снижалась и становилась равной 36 мкВ ($p \geq 0.05$, $U = 11$, $n = 12$), то есть редукция NMDA-потенциалов составляла 75% по отношению к значениям до замораживания. Отметим, что при этом солевой состав замораживающей среды не менялся.

Для проверки изменения активности NMDAR и устранения криповреждения их функций мы исследовали эффекты замораживающих сред с различными значениями рН. Эксперименты проводили в следующей последовательности. Перед замораживанием срезы содержали в средах с различными значениями рН. В каждой среде измеряли амплитуды NMDA-потенциалов при 37°C (рис. 2). Было выявлено, что амплитуда NMDA-потенциала возрастала с увеличением рН среды перед криосохранением. Важно отметить, что амплитуда NMDA-потенциалов при рН 7.6–7.7 в среде после отогревания статистически не отличалась от значений до криосохранения (рис. 2). Следовательно, интервал значений рН среды 7.6–7.7 является оптимальными для длительного криосохранения и последующего отогревания срезов.

Однако необходимо учитывать, что срезы до замораживания находятся в среде, у которой рН 7.3 (оптимальный для функционирования NMDAR), поэтому для защиты активности NMDAR мы использовали метод увеличения значения рН до 7.6–7.7 при достижении температуры 20–22°C в процессе замораживания срезов от 37°C.

Используя прием смены замораживающей среды, мы обнаружили, что амплитуда NMDA-потенциалов составляла 131 ± 9 мкВ, а после криосохранения и последующего отогревания была 121 ± 10 мкВ (рис. 3). Статистически эти значения не отличались от значений до криосохранения ($p \geq 0.05$, $U = 29$, $n = 12$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы изучали действие кислотно-щелочных характеристик замораживающей среды на сохранение активности NMDAR при длительном криосохранении. На функционирование NMDAR влияет множество факторов, к которым относятся скорость замораживания/отогревания, состав замораживающей среды и наличие в ней криопротекторов. В настоящей работе было обнаружено, что после криосохранения срезов значение рН замораживающей среды снижалось ниже оптимального уровня сохранения активности NMDAR.

Известно, что активность NMDAR избирательно ингибируется протонами при нормотермических значениях рН. Протоны снижают частоту открытия NMDA-каналов, и это приводит к редуцированию амплитуды NMDA-потенциалов (Traynelis, Cull-Candy, 1990). Кроме того, обнаружено, что протонный сенсор находится в N-концевом домене (NTD) субъединицы GluN2A рецептора NMDAR и аллостерически связан с воротами канала. В результате, протоны подавляют активность субъединиц GluN1–GluN2A рецептора NMDAR (Zhang et al., 2018). Очевидно, что такой механизм также вовлекается в ин-

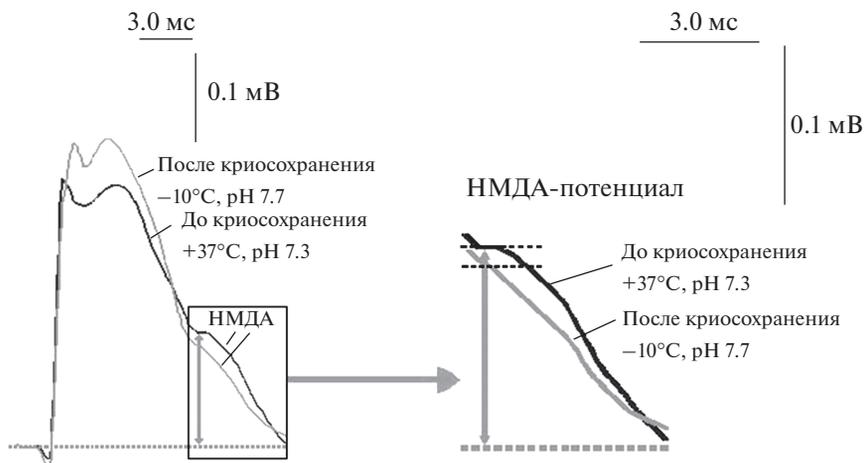


Рис. 3. Потенциалы, регистрируемые в нейронах срезов обонятельной коры в ответ на электрическую стимуляцию ЛОТ и NMDA-потенциалы до и после КС при изменении pH замораживающей среды с 7.3 до 7.6–7.7 в интервале 22–24°C в процессе КС (слева). Справа показаны NMDA-потенциалы в увеличенном масштабе; горизонтальные черные штриховые линии – амплитуды NMDA-потенциалов до и после КС. Вертикальная серая стрелка – амплитуда NMDA-потенциалов.

гибирование активности NMDAR после криосохранения и последующего отогревания.

Принимая во внимание приведенные выше данные о протонной регуляции активности NMDAR и значительное закисление pH замораживающей среды после криосохранения срезов, мы увеличили ее буферную емкость. Это было достигнуто применением гибридной буферной системы замораживающего раствора при неизменном солевом составе среды. В результате исследований было получено повышение активности NMDAR после криосохранения, однако достичь полного восстановления активности NMDAR этим приемом не удалось. С целью сохранения активности NMDAR после криосохранения мы применили дополнительный способ для минимизации ингибирования активности NMDAR, вызываемого протонами – увеличили pH замораживающей среды для срезов с 7.3 до 7.6–7.7 с помощью добавления в среду 0.1 н раствора NaOH объемом 0.3 мл и контролировании pH.

Замену замораживающей среды со значением pH 7.6–7.7 производили в процессе замораживания срезов в интервалах положительных температур 20–22°C в начале процесса замораживания. Этот способ основан на результатах наших предыдущих исследований, что в этом диапазоне температур NMDAR становились нечувствительными к воздействиям гипоксии (Мокрушин, 2016). В результате было выявлено, что активность NMDAR после криосохранения оставалась на уровне, равной активности до замораживания. Следовательно, использование гибридной буферной системы и повышение значения pH до 7.6–7.7 при замораживании срезов были оптимальными условиями для восстановления активности NMDAR

при отогревании после длительного криосохранения (–10°C, 30 сут).

Рассматривая способы защиты активности NMDAR в процессе криосохранения и последующего отогревания необходимо отметить другие механизмы. Прежде всего, это вовлечение астроглиального механизма, который способствует защите внеклеточной среды от увеличения концентрации протонов. Эксперименты *in vivo* и *in vitro* показали, что астроциты поддерживают локальный гомеостаз внеклеточного pH в ткани мозга от перегрузок протонами при помощи высвобождения бикарбоната глиальными клетками (Theparambil et al., 2020). Однако в настоящей работе, как мы полагаем, в процессе криосохранения астроглиальный механизм в срезах обонятельной коры, по-видимому, ингибируется и не способствует сохранению активности NMDAR.

Другой возможный способ защиты активности NMDAR – применение криопротекторов. Однако выявлено, что традиционно используемые криопротекторы оказывают побочное негативное воздействие на активность нейронов (Пичугин, 2013). Полагаем, что это связано с применением препаратов, не имеющих эндогенного происхождения. При поиске эндогенных протекторов обнаружено, что эндогенный дипептид *L*-карнозин способствовал сохранению активности NMDAR при криосохранении срезов обонятельной коры мозга. Защитный эффект *L*-карнозина усиливался с увеличением концентрации эндогенного дипептида (Mokrushin, Pavlinova, 2016). Можно надеяться, что *L*-карнозин самостоятельно или в комбинации с другими веществами может быть использован в качестве нетоксичного криопротектора для длительного криосохранения.

Таким образом, нами предложен новый метод протекции активности NMDAR после длительного криосохранения. Метод не использует криопротекторы, вызывающие блокаду активности NMDAR. Мы полагаем, что этот метод криосохранения можно использовать для создания криобанка нервной ткани.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор признателен Г.П. Смирновой за помощь в проведении экспериментов и С.Е. Боровикову за техническую помощь в настройке и обслуживании электрофизиологической установки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 гг. (ГП-14, раздел 65.2).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе с животными были соблюдены все международные и национальные инструкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН по уходу и использованию животных в эксперименте, а также рекомендации по этике, предложенные Директивой Советом Европейских сообществ (86/609 ЕЕС).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Митюшов М.И., Емельянов Н.А., Мокрушин А.А., Войнер И.А., Багаева Т.Р.* 1986. Переживающий срез мозга как объект нейрофизиологического и нейрхимического исследования. Л.: Наука. 127 с. (*Mityushov M.I., Emelyanov N.A., Mokrushin A.A., Voiner I.A., Bagaeva T.R.* 1986. The surviving slice of the brain as an object of neurophysiological and neurochemical research. L.: Science. 127 p.).
- Мокрушин А.А.* 1997. Пептид-зависимые механизмы нейрональной пластичности в обонятельной коре. Дис. ... д-ра биол. наук Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН. СПб. 397 с. (*Mokrushin A.A.* 1997. Peptide-dependent mechanisms of neuronal plasticity in the olfactory cortex. Diss. Dr. Biol. Sci Institute of Physiology. I.P. Pavlova RAS. St. Petersburg. 397 p.).
- Мокрушин А.А.* 2016. Эффекты глубокого замораживания и отогревания на ионотропные глутаматергические рецепторные механизмы *in vitro*. Бюлл. экспер. биол. мед. Т. 161. С. 36. (*Mokrushin A.A.* 2016. Effects of deep freezing and rewarming on ionotropic glutamatergic receptor mechanisms *in vitro*. Bull. Exper. Biol. Med. V. 161. P. 28).
- Мокрушин А.А., Боровиков С.Е.* 2017. Установка для изучения гипотермических эффектов на переживающих срезах мозга теплокровных. Междунар. журн. прикладных фундам. исслед. Т. 2. С. 214. (*Mokrushin A.A., Borovikov S.E.* 2017. Device for the study of hypothermic effects on the surviving brain slices of homeotherms. Int. J. Applied Basic Res. V. 2. P. 214).
- Пичугин Ю.И.* 2013. Теоретические и практические аспекты современной криобиологии. М.: Научно-технический центр криобиологии и анабиоза. С. 60. (*Pichugin Y.I.* 2013. Theoretical and practical aspects of modern cryobiology. Moscow: Nauchno-Tekhn. Tsentr Kriobiol. Anabioz. P. 60.)
- Cull-Candy S.C., Leszkiewicz D.N.* 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. SciSTKE. V. 255. <https://doi.org/10.1126/stke.2552004re16>
- Ichikawa J., Yamada R.X., Muramatsu R., Ikegaya Y., Matsuki N., Koyama R.* 2007. Cryopreservation of granule cells from the postnatal rat hippocampus. J. Pharmacol. Sci. V. 104. P. 387.
- Ma X.H., Shi Y., Hou Y., Liu Y., Zhang L., Fan W.-X.* 2010. Slow-freezing cryopreservation of neural stem cell spheres with different diameters. Cryobiology. V. 60. P. 184.
- Mokrushin A.A., Pavlinova L.I.* 2013. Effects of the blood components on the AMPA and NMDA synaptic responses in brain slices in the onset of hemorrhagic stroke. Gen. Physiol. Biophys. V. 32. P. 489.
- Mokrushin A.A., Pavlinova L.I., Borovikov S.E.* 2014. Influence of cooling rate on activity of ionotropic glutamate receptors in brain slices at hypothermia. J. Therm. Biol. V. 44. P. 5.
- Mokrushin A., Pavlinova L.* 2016. Neurotropic and protective effects of *L*-carnosine: studies *in vitro*. In: Carnosine: Physiological effects and research insights. N.-Y.: Nova Science Publishers. P. 113.
- Morris C.B.* 2007. Cryopreservation of animal and human cell lines. Methods Mol. Biol. V. 368. P. 227.
- Obrenovitch T.P., Urenjak J.* 1997. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. Progress Neurobiol. V. 51. P. 39.
- Paynter S.J.* 2008. Principles and practical issues for cryopreservation of nerve cells. Brain Res. Bull. V. 75. P. 1.
- Theparambil S.M., Hosford P.S., Ruminot I., Kopach O., Reynolds J.R., Sandoval P.Y., Rusakov D.A., Barros L.F., Gourine A.V.* 2020. Astrocytes regulate brain extracellular pH via a neuronal activity-dependent bicarbonate shuttle. Nature Commun. V. 11. P. 1.
- Traynelis S.F., Cull-Candy S.G.* 1990. Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. Nature. V. 345. P. 347.
- Traynelis S.E., Lonni P.W., Chris J.Mc.B., Frank S.M., Katie M.V., Kevin K.O.* 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. Pharmacol. Rev. V. 62. P. 40.
- Zhang J.B., Chang S., Xu P., Miao M., Wu H., Zhang Y., Zhang T., Wang H., Zhang J., Xie C., Song N., Luo C., Zhang X., Zhu S.* 2018. Structural basis of the proton sensitivity of human GluN1–GluN2A NMDA receptors. Cell Rep. V. 25. P. 3582.

Improvement of the Acid-Alkaline Composition of the Medium for Prolonged and Reversible Cryopreservation of Rat Brain Slices

A. A. Mokrushin*

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, 199034 Russia

**e-mail: mok@inbox.ru*

Previously, it was found that the activity of glutamatergic ionotropic *N*-methyl-*D*-aspartate receptors (NMDAR) after long-term cryopreservation of brain slices at a temperature of -10°C decreased or blocked. The slices of the olfactory cortex of rats were used to study the mechanisms of NMDAR cryodestruction. To recover after cryopreservation NMDAR activity examined the effects of pH changes in extracellular freezing media during registration NMDA-potentials induced by electrical stimulation of the lateral olfactory tract. It was found that, after cryopreservation, the freezing medium was acidified to pH 6.5, while the amplitude of the NMDA potentials decreased in comparison with the amplitudes before cryopreservation. To preserve the NMDAR activity after cryopreservation, the buffer capacity of the freezing medium was increased by using a hybrid buffer system: carbonate (NaHCO_3), phosphate (KH_2PO_4) tris(hydroxymethyl)aminomethane ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$), the salt composition did not change when using such a buffer system. After cryopreservation of the slices in such a medium, the amplitude of the NMDA potentials was $22 \pm 7\%$ compared to the amplitude before cryopreservation. Additionally, a method was used to increase the pH of the medium to 7.6–7.7 in the process of freezing the slices in the temperature range $20\text{--}22^{\circ}\text{C}$. This was followed by recovery NMDAR activity. Thus, the use of a hybrid buffer system in a freezing medium and a simultaneous increase in its pH to 7.6–7.7 promoted the recovery of NMDAR after cryopreservation.

Keywords: brain slices, NMDA potentials, cryopreservation, buffer systems