

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ISSN 0041-3771

ЦИТОЛОГИЯ

TSITOLOGIYA

2023. Том 65

2023. Vol. 65

5



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

СОДЕРЖАНИЕ

Том 65, номер 5, 2023

Функциональные взаимодействия VAF и LEM-белков в процессах формирования половых клеток <i>И. О. Боголюбова, Д. С. Боголюбов</i>	407
Получение и сравнительная характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из пульпы молочного зуба детей разного пола <i>А. С. Мусорина, В. И. Турилова, А. Н. Шатрова, Т. К. Яковлева, Г. Г. Полянская</i>	420
Исследование эндотелиальных клеток линии EA.hy926 методами атомно-силовой и сканирующей ион-проводящей микроскопии <i>С. Н. Плескова, Н. А. Безруков, Е. Н. Горшкова, С. З. Бобык, Е. В. Лазаренко</i>	437
Влияние синтетического поликатиона поли-2-диметиламиноэтилметакрилата на биологическую активность резидентных и нерезидентных клеток млекопитающих <i>В. П. Иванова, Л. Л. Алексеенко, О. В. Назарова, И. В. Миндукшев</i>	447
Цитокиновый профиль клеток миокарда при ишемической болезни сердца и ишемической кардиомиопатии <i>А. И. Стельмашенко, С. Л. Андреев, Л. С. Литвинова, В. В. Малащенко, Н. М. Тодосенко, Н. Д. Газатова, И. А. Хлусов, В. М. Шипулин</i>	461
Влияние гликоделина на уровень Т-регуляторных лимфоцитов и белков острой фазы воспаления у крыс Wistar при введении аллогенных клеток костного мозга <i>С. А. Заморина, М. С. Бочкова, В. П. Тимганова, С. В. Ужвиюк, К. Ю. Шардина, В. В. Власова, М. Б. Раев</i>	475
Иммуногистохимическое исследование матриксных металлопротеиназ 2 и 9 в левом желудочке сердца преждевременно рожденных крыс в отдаленном периоде онтогенеза <i>В. В. Иванова, О. Н. Серебрякова, А. В. Ерохина, А. Д. Никонова, И. В. Мильто</i>	483
Влияние перинатальной гипоксии (асфиксии) на распределение субъединицы $\alpha 1$ GABA _A -рецептора в неокортексе новорожденных крыс <i>Л. И. Хожай</i>	490
Интенсивность деградации и синтеза межклеточного матрикса дермы у крыс после локальной холодовой травмы на фоне метаболического синдрома <i>Н. А. Шутский, Л. Н. Горбатова, С. Л. Кашутин, Н. С. Холопов, Л. Л. Шагров, А. Л. Зашихин</i>	499

Contents

Vol. 65, No. 5, 2023

Functional interactions of BAF and LEM proteins in the formation of germ cells <i>I. O. Bogolyubova, D. S. Bogolyubov</i>	407
The derivation and comparative characterization of mesenchymal stem cell lines, isolated from human pulp of a deciduous tooth of children of different sexes. <i>A. S. Musorina, V. I. Turilova, A. N. Shatrova, T. K. Yakovleva, G. G. Poljanskaya</i>	420
Study of EA.hy926 endothelial cells by atomic force and scanning ion-conductance microscopy <i>S. N. Pleskova, N. A. Bezrukov, E. N. Gorshkova, S. Z. Bobyk, E. V. Lazarenko</i>	437
The effect of synthetic polycation poly-2-dimethylaminoethylmethacrylate on biological activity of mammalian resident and nonresident cells <i>V. P. Ivanova, L. L. Alekseenko, O. V. Nazarova, I. V. Mindukshev</i>	447
Cytokine profile of myocardial cells in coronary heart disease and ischemic cardiomyopathy <i>A. I. Stelmashenko, S. L. Andreev, L. S. Litvinova, V. V. Malashchenko, N. M. Todosenko, N. D. Gazatova, I. A. Khlusov, V. M. Shipulin</i>	461
Effect of glycodeclin on the level of T-regulatory lymphocytes and acute phase proteins in wistar rats after introduction of allogeneous bone marrow cells <i>S. A. Zamorina, M. S. Bochkova, V. P. Timganova, S. V. Uzhviyuk, K. Yu. Shardina, V. V. Vlasova, M. B. Rayev</i>	475
Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the left ventricle of preterm rats heart in the late postnatal development <i>V. V. Ivanova, O. N. Serebryakova, A. V. Erokhina, A. D. Nikonova, I. V. Milto</i>	483
Effect of perinatal hypoxia (asphyxia) on the distribution of the $\alpha 1$ GABA _A receptor subunit in the neocortex of newborn rats <i>L. I. Khozhai</i>	490
The intensity of degradation and synthesis of derma intercellular matrix in rats after local cold injury in the presence of metabolic syndrome <i>N. A. Shutskiy, L. N. Gorbatova, S. L. Kashutin, N. S. Kholopov, L. L. Shagrov, A. L. Zashihin</i>	499

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ BAF И LEM-БЕЛКОВ В ПРОЦЕССАХ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК

© 2023 г. И. О. Боголюбова¹, Д. С. Боголюбов¹, *

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: dbogol@mail.ru

Поступила в редакцию 27.04.2023 г.

После доработки 27.05.2023 г.

Принята к публикации 12.06.2023 г.

Восстановление структуры ядра после деления клетки требует особых взаимодействий между интегральными белками внутренней ядерной мембраны, имеющими особый LEM-домен (LEMD), белками ядерной ламины (ламинами) и консервативным белком BAF, который выступает в качестве центрального звена в этих взаимодействиях, обеспечивающих топологические взаимоотношения хроматина и ядерной оболочки. Динамические преобразования этих белковых ансамблей в митотическом цикле детально охарактеризованы на молекулярном уровне, однако меньшее внимание уделяется формирующимся половым клеткам, претерпевающим мейотические деления, несмотря на то, что их ядра (особенно в случае дипло-тенных ооцитов) по своей структуре существенно отличаются от соматических клеток. В настоящем обзоре обобщены пока еще относительно немногочисленные экспериментальные данные, доказывающие значимость функциональных взаимодействий BAF и LEMD-белков для формирования гамет, начиная с выделения клеток зародышевой линии и заканчивая превращением гаплоидных сперматид в морфологически зрелые сперматозоиды.

Ключевые слова: ядерная архитектура, ядерная оболочка, гаметогенез, мейоз, клетки зародышевой линии, BAF, LEMD-белки, VRK1

DOI: 10.31857/S0041377123050036, EDN: PISDQF

Формирование половых клеток является одним из наиболее сложных процессов клеточной дифференцировки, который начинается еще на ранних этапах эмбриогенеза, когда происходит выделение клеток зародышевого пути (или первичных половых клеток) и их миграция в формирующиеся гонады. Здесь после ряда митотических делений клеток, называемых гониями (спермато- и оогониями), и последующего мейоза, который претерпевают спермато- и ооциты, образуются высокоспециализированные гаплоидные половые клетки (гаметы). При оплодотворении в результате слияния мужской и женской гаметы образуется тотипотентная зигота,

дающая начало всем клеткам многоклеточного организма. Очевидно, что формирование зрелых (функционально компетентных) мужских и женских половых клеток требует сложного и динамичного контроля — как процессов дифференциальной экспрессии генов, так и поэтапного преобразования хромосомного аппарата развивающихся гамет. Одним из важнейших компонентов этой многоаспектной регуляторной системы является ламина (nuclear lamina) — подстилающая внутреннюю мембрану ядерной оболочки структурная сеть промежуточных филаментов.

По современным представлениям, ламина не просто служит структурно-механическим “каркасом”, определяющим физические (упруго-механические) свойства ядра, но является связующим звеном между хроматином и цитоплазмой, будучи вовлеченной напрямую в процессы структурно-функциональной реорганизации хроматина и регуляции экспрессии генов (Wong et al., 2022). В частности, ламина обеспечивает связывание хроматина с периферией ядра, контроль репарации ДНК и трансмембранную передачу сигналов. Ведущую роль в функционировании ядерной ламины играют белки, содержащие специфический LEM-домен (LAP2–emerin–MAN1 domain, LEMD), и их функциональные взаимодействия с белком BAF, известным также как BANF1 (Barrier-

Принятые сокращения: а. о. — аминокислотный остаток; Ankle — белок, содержащий анкириновый повтор (Ank) и LEM-домен (Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein); BAF (BANF) — Barrier-to-Autointegration [Nuclear] Factor; CENP — центромерный белок (centromere protein); LAP — белок, ассоциированный с ламиной (lamina-associated protein); LEM — LAP2–emerin–MAN1; LEMD — LAP2–emerin–MAN1-домен; MAN — белок внутренней ядерной мембраны (inner nuclear membrane protein); MSC — С-концевая последовательность MAN1/Src1p/C-terminal motif; NHK — киназа гистонов нуклеосом, (nucleosome histone kinase); Ob-B — обтусилактон В (бутанолид растительного происхождения); PP — фосфатаза белков (protein phosphatase); VRK — серинтреониновая протеинкиназа (Vaccinia-related kinase).

to-Autointegration Nuclear Factor) (Brachner, Foisner, 2011; Barton et al., 2015).

BAF традиционно рассматривают как важное (можно сказать центральное) звено, интегрирующее хроматин, ламину и белки внутренней ядерной мембраны в единую функциональную систему, а его взаимодействия с LEMD-белками и хроматином имеют решающее значение для регуляции динамического состояния ядерных структур в физиологических условиях, прежде всего во время митоза, а также в патологических процессах (Burla et al., 2020). Иными словами, именно BAF в контексте трехмерной ядерной архитектуры опосредует функциональные корреляции между специфической структурой хроматина и уровнем экспрессии тех или иных генов, объединяя ДНК (хроматин) и экстрахромосомные элементы ядра, включая ядерную оболочку, в единую структурно-функциональную систему (Segura-Totten, Wilson, 2004).

Поскольку BAF участвует в поддержании структуры хроматина и стабильности генома, его можно рассматривать как один из жизненно важных ядерных компонентов (Jamin, Wiebe, 2015). Критическое влияние на процессы конденсации (деконденсации) хромосом оказывают взаимодействия BAF с хроматином с одной стороны и с LEMD-белками с другой, при этом высокие концентрации BAF приводят к гиперкомпактизации хроматина (Segura-Totten et al., 2002). В неделящихся клетках взаимодействия между LEMD-белками и BAF лежат в основе прикрепления хромосом к элементам ядерной оболочки (Jamin, Wiebe, 2015; Barrales et al., 2016). В делящихся клетках благодаря этим взаимодействиям осуществляется контроль сборки и локализации веретена деления, а также формирование ядерной оболочки *de novo* и восстановление целостности ядра в конце митоза (Furukawa et al., 2003; Qi et al., 2015; Samwer et al., 2017).

Практически с самого начала своего изучения BAF привлекал внимание исследователей в связи с патогенезом некоторых видов прогерий (см., например, обзор: Marcelot et al., 2021b). В частности, рецессивная миссенс-мутация в гене *BANFI*, кодирующем BAF, приводит к развитию одного из вариантов прогерии — синдрома Нестора–Гильермо (NGPS) (Cabanillas et al., 2011; Puente et al., 2011; Paquet et al., 2014). Как и в случае других прогерий, для NGPS характерны такие фенотипические последствия, как деформация ядер и абнормальная локализация ряда ядерных белков (Cabanillas et al., 2011; Paquet et al., 2014). В последнее время показана связь BAF с развитием некоторых видов рака, например, трижды негативного рака молочной железы (Zhang, 2020), рака желудка (Li et al., 2018), гепатоцеллюлярной карциномы (Shen et al., 2018) и другими злокачественными новообразованиями (Li et al., 2017).

Поскольку дисфункции BAF имеют прямое отношение к развитию злокачественных опухолей, значительное внимание сегодня уделяют поиску его

возможных лигандов, которые можно было бы использовать как таргетные терапевтические агенты. Так, из древесины бобового растения цезальпинии (*Caesalpinia sappan*) было выделено связывающееся с BAF тетрациклическое фенольное соединение, названное бразилином (Correia Soeiro et al., 2022). Другим соединением с противоопухолевой активностью является обтусилактон В (Ob-B), специфический ингибитор эволюционно консервативной нуклеосомной серин-треониновой протеинкиназы (VRK1), ключевой мишенью которой служит BAF. Кроме того, идентифицировано еще несколько природных соединений с BAF-связывающей способностью, потенциально превосходящей таковую Ob-B, например, махубанолид, котомолид В, эпилиценолид D2 и некоторые другие растительные препараты с противоопухолевой активностью (Bailly, Vergoten, 2021).

Гораздо меньше внимания уделяется роли взаимодействий BAF с его функциональными партнерами, в частности с LEMD-белками, при формировании мужских и женских половых клеток в процессе мейоза. Однако, как известно, в ходе мейотических делений ядерная оболочка и связанная с ней ламина задействованы в уникальных процессах, поддерживаемых с помощью особых молекулярных механизмов, обеспечивающих правильную сегрегацию (разделение) хромосом и формирование функциональных гамет (Zetka et al., 2020).

В связи с этим целью настоящего обзора является обобщение данных о значимости функциональных взаимодействий BAF и LEMD-белков для формирования гамет. Особый интерес в данном аспекте представляет процесс образования женских половых клеток, где вне зависимости от специфики мейоза (Богданов, Гришаева, 2020) и типа оогенеза (Дондуа, 2018) начало роста ооцита сопровождается отделением хромосом от ядерной оболочки. Такое состояние принципиально отличает структуру ядра ооцита (зародышевого пузырька) от ядра соматических клеток, в отношении которых динамика взаимодействий хромосом и ядерной оболочки, а также белковые ансамбли, обеспечивающие эти динамические преобразования в митотическом цикле, детально охарактеризованы на молекулярном уровне.

БЕЛОК BAF (BARRIER-TO-AUTOINTEGRATION FACTOR)

BAF — один из наиболее консервативных ДНК-связывающих белков, в изобилии представленный в ядре. Он описан в клетках многоклеточных животных, начиная от нематоды, плодовой мушки и заканчивая человеком, но отсутствует в клетках дрожжей и растений (Cohen et al., 2001). Это небольшой по размеру белок (примерно 10 кДа), который в клетках человека и большинства других исследованных видов (например, нематоды *Caenorhabditis elegans*, рыбы-зебры *Danio rerio* и мыши) состоит из 89 аминокислотных остатков (а. о.), а у *Drosophila* и

Xenopus имеет дополнительные остатки серина (S2), то есть состоит из 90 а. о. (Segurra-Totten, Wilson, 2004). Аминокислотная последовательность BAF на 60% идентична у таких “далеких” организмов, как нематода и человек (Cai et al., 1998), и на 69% у человека и дрозофилы (Segurra-Totten, Wilson, 2004). В клетке молекулы BAF обычно образуют димеры (Zheng et al., 2000).

Недавнее исследование (Marcelot et al., 2022), выполненное с помощью техники ядерно-магнитного резонанса, показало, что в растворах N-концевая область молекулы BAF способна изгибаться и эта способность зависит от ионной силы и pH, снижаясь в результате фосфорилирования S4, а также (в большей степени) от фосфорилирования по остаткам S4 и T3. Важным фактором снижения гибкости молекулы BAF является наличие двух отрицательных зарядов остатков фосфорной кислоты. Депротонирование H7 также снижает гибкость BAF в его N-концевой области. Таким образом, конформация внутренне неупорядоченной N-концевой области BAF является тонко регулируемой, что, вероятно, обеспечивает потенциальную широту межбелковых взаимодействий BAF и, как следствие, разнообразные функции.

Несмотря на то что BAF первоначально был описан как цитоплазматический белок (Lee, Craigie, 1998), он имеет преимущественно ядерную локализацию и выполняет ядерные функции, прежде всего как хроматинсвязывающий белок. От уровня BAF напрямую зависит состояние хроматина. В интерфазных клетках дрозофилы, несущих мутантный ген *baf*, появляются аномальные глыбки гетерохроматина, многие из которых ассоциированы с ядерной оболочкой; при этом полная утрата BAF летальна для эмбриона (Furukawa et al., 2003). Снижение уровня BAF у *C. elegans* также приводит к изменению структуры ядра, аномалиям митотического деления (абберрантной сегрегации хромосом во время анафазы) и гибели ранних эмбрионов (Liu et al., 2000).

Ядерные функции BAF, влияющие на состояние хроматина, определяются способностью BAF неспецифически связываться с двухцепочечной ДНК, однако он не связывает одноцепочечную ДНК или РНК (Zheng et al., 2000). При этом каждый из димеров BAF имеет два сайта, определяющих его связывание с ДНК за счет взаимодействий с фосфатным остовом на поверхности малой бороздки ее молекулы (Bradley et al., 2005). У человека идентифицировано несколько модификаций BAF, которые не влияют на вторичную структуру самого BAF, но отдельные варианты а. о. на N- и C-концах оказывают прямое влияние на аффинность связывания BAF с ДНК, не нарушая, однако, ни локализации BAF, ни структуры ядра в целом (Rose et al., 2021). Связываясь как с ДНК, так и с белками ядерной оболочки, например, ламином A и LEMD-белками, за счет чего, собственно, обеспечивается связь ядерной ламины с хроматином (Barton et al., 2015), BAF оказывает

существенное влияние на динамику хромосом (Vivante et al., 2019). В упрощенном виде сложные межмолекулярные взаимодействия с участием BAF представлены на рис. 1.

В соматических клетках дрозофилы небольшая фракция BAF ассоциирована с центромерами. Оказалось, что центромерный BAF необходим для правильной сборки центромер, а также сегрегации хромосом в митозе (Torras-Llort et al., 2020). Авторы цитируемой работы установили, что фосфатаза PP4, которую рекрутирует к центромерам белок CENP-C, во время митоза предотвращает фосфорилирование центромерного BAF и его высвобождение из центромерного хроматина. При этом нарушение центромерной локализации BAF препятствует инактивации в митозе фосфатазы PP2A, нарушая нормальное широкомасштабное фосфорилирование BAF, что, в свою очередь, ведет к устойчивой ассоциации BAF с хроматином, задержке наступления анафазы и дефектам формирования ядерной оболочки. Полученные результаты показывают, что центромерный BAF совместно с PP4 и CENP-C формирует особую, опосредованную центромерами, функциональную систему, которая контролирует сегрегацию митотических хромосом и правильное прохождение митотических делений. Имеет ли место подобный механизм в мейозе, остается неизвестным.

Функции BAF и динамика ядерных структур напрямую зависят от статуса его фосфорилирования. В соматических клетках нематоды *C. elegans* (Gorjánac et al., 2007) и млекопитающих (Molitor, Traktman, 2014) фосфорилирование BAF протеинкиназой VRK1 запускает отсоединение BAF от хроматина и LEMD-белков. Если BAF не фосфорилирован (в случае, например, деплеции VRK1 или экспрессии нефосфорилируемой формы BAF), нарушается разборка ядра в митозе. Одним из ключевых ферментов, осуществляющих дефосфорилирование BAF в позднем митозе, является серинтреониновая фосфатаза PP2A, связыванию которой с BAF способствует белок LEM4 (Asencio et al., 2012). Другой фосфатазой, дефосфорилирующей BAF, служит PP4 (Zhuang et al., 2014).

Как показано в одной из недавних работ (Marcelot et al., 2021a), VRK1 последовательно фосфорилирует BAF по а. о. S4 и T3. Авторы обнаружили, что кристаллическая структура BAF очень похожа до и после фосфорилирования. Однако гибкость N-концевой спирали $\alpha 1$ и петли $\alpha 1$ – $\alpha 2$ в молекуле BAF, как уже отмечалось, сильно снижается в молекуле BAF, фосфорилированной сразу по двум а. о. (дифосфорилированной), из-за взаимодействий между фосфорилированными остатками и положительно заряженной C-концевой спиралью $\alpha 6$. Эти области участвуют в связывании BAF и с ДНК, и с ламином A/C. Установлено, что фосфорилирование BAF вызывает 5000-кратную (!) потерю его сродства к двухцепочечной ДНК, однако не нарушает связывания с иммуноглобулиновым (Ig-fold) доменом ламины

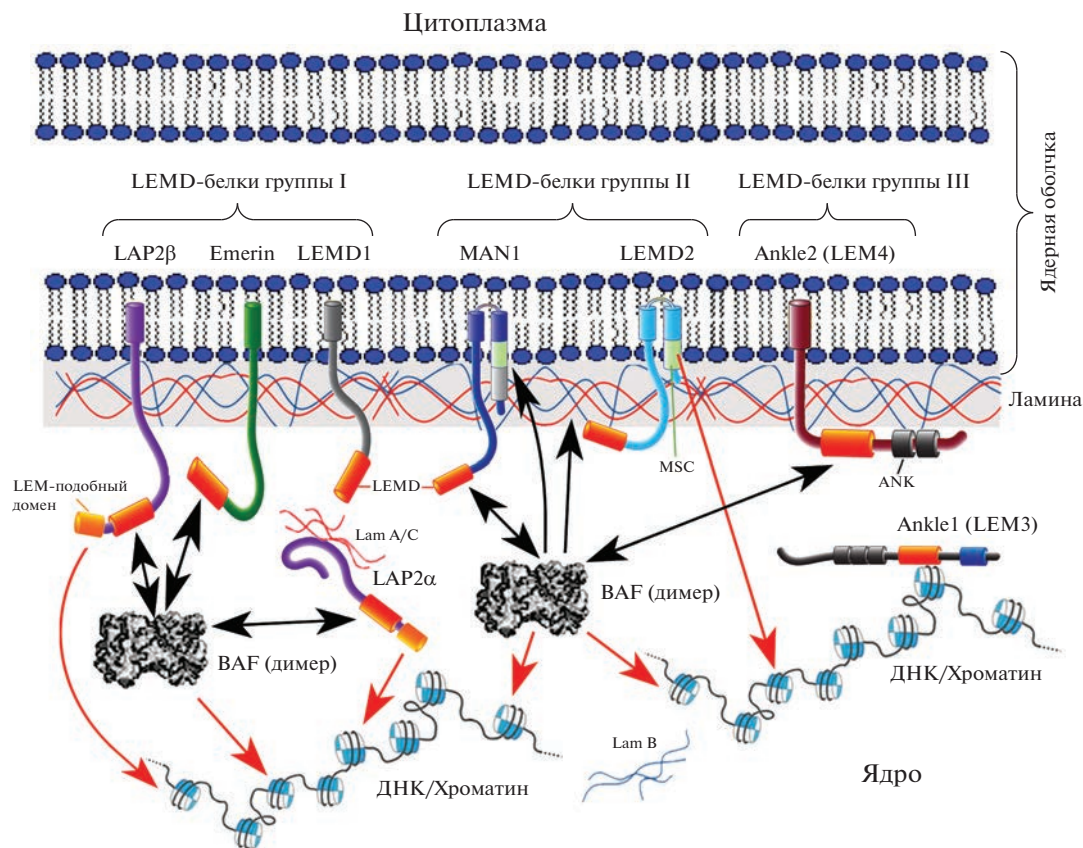


Рис. 1. Упрощенная схема, демонстрирующая взаимоотношения между BAF, LEMD-белками, ламинной (ламинами) и хроматином. Показаны три класса LEMD-белков, их LEM- и другие характерные домены; черные стрелки — межбелковые взаимодействия, красные стрелки — взаимодействия белков с хроматином (показаны не все взаимодействия, чтобы не усложнять рисунок); Lam A/C и Lam B — нуклеоплазматические ламины.

A/C, а также с нуклеоплазматическим фрагментом молекулы эмерина (Marcelot et al., 2021a) — одного из ключевых мембраноассоциированных LEMD-белков.

БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ LEM-ДОМЕН (LEM-D PROTEINS)

Среди уникального набора интегральных белков ядерной оболочки особое место занимает быстро растущее семейство неродственных белков, называемых LEM-белками, которые объединяет присутствие в их молекулах характерного LEM-домена (Wagner, Krohne, 2007). Аббревиатуру LEM образуют первые буквы в названиях главных белков семейства — ламин-ассоциированного пептида 2 (LAP2), эмерина (emerin) и белка внутренней мембраны MAN1. LEM-домен (LEMD) состоит примерно из 40 а. о., имеет глобулярную структуру и образован двумя параллельными α -спиралями, соединенными петлей. По завершении митоза различные компоненты ядра, «демонтированные» в процессе деления, быстро и эффективно взаимодействуют с дочерними хромосомами и восстанавливают структуру ядра в ранней фазе G_1 (Foisner, 2003). Структурная роль LEMD-бел-

ков обеспечивает не только правильную сборку функционального постмитотического ядра в целом, но и необходима для приобретения ДНК компетентности к репликации (Gant et al., 1999; Martins et al., 2003).

В зависимости от локализации в мембране и некоторым другим особенностям LEMD-белки условно подразделяют на 3 группы (табл. 1). Подробно не останавливаясь на молекулярных характеристиках LEMD-белков и разнообразных их функциях (Barton et al., 2015), отметим, что некоторые LEMD-белки группы I не являются мембранными, хотя многие имеют одиночный С-концевой трансмембранный домен. Кроме N-концевого LEM-домена, характерного для всех LEMD-белков, молекулы LEMD-белков первой группы характеризуются наличием крупного нуклеоплазматического участка молекул. Наиболее известными белками этой группы являются LAP2 и эмерин. LEMD-белки группы II, представителем которой являются MAN1 и LEMD2, отличаются присутствием двух трансмембранных доменов и С-концевого спирального (winged helix) домена MSC (MAN1/Src1p/C-terminal motif), который способен напрямую связываться с ДНК (Caputo et al., 2006). К третьей группе LEMD-белков относятся

белки LEM3 (Ankle-1) и LEM4 (Ankle-2), молекулы которых, кроме LEM-домена, содержат множественные анкириновые (ANK) повторы. По сравнению с остальными LEMD-белками, белки группы III имеют ряд необычных особенностей. Например, Ankle-1, который не имеет трансмембранного домена, представляет собой членистый белок, курсирующий между ядром и цитоплазмой (Brachner et al., 2012), а Ankle-2, который обладает трансмембранным доменом, в клетках человека локализуется в мембранах эндоплазматического ретикулума, а в составе ядерной мембраны — в клетках нематоды *C. elegans* (Asencio et al., 2012).

Состав этих трех групп LEMD-белков несколько различается у разных многоклеточных животных — нематоды, плодовой мушки и млекопитающих. Например, у дрозофилы описано четыре белка, содержащих LEM-домен (Barton et al., 2015; Duan et al., 2020a), из них три связаны с ядерной ламиной (Wagner et al., 2006). Это два ортолога эмерина: эмерин 1 и эмерин 2 (известные у дрозофилы как отефин и Bocksbeutel соответственно) и dMAN1 (Wagner, Krohne, 2007). У *C. elegans* описаны три консервативных LEMD-белка: Се-эмерин и СеMAN1, имеющие трансмембранные домены, а также LEM-3 (ортолог Ankle-1), у которого трансмембранный домен отсутствует (Lee et al., 2000).

Благодаря дополнительному LEM-подобному (LEM-like) домену, некоторые LEMD-белки могут напрямую взаимодействовать с хроматином, к чему не способен канонический LEM-домен, обеспечивающий связь LEMD-белков с хроматином посредством BAF (рис. 1). N-концевой LEM-подобный домен имеет, например, трансмембранный белок LAP2 β (Cai et al., 2001). Все исследованные LEMD-белки млекопитающих (LAP2 α , LAP2 β , эмерин и MAN1), кроме того, имеют отдельный домен, который обеспечивает прямое связывание с ламинами А или В-типа (Mattout-Drubezki, Gruenbaum, 2003). При этом главной особенностью всех белков семейства является способность их LEM-домена связывать белок BAF, что в свою очередь обеспечивает опосредованную связь LEMD-белков с хроматином.

Кстати, BAF человека первоначально был идентифицирован именно как “партнер” LAP2 β — трансмембранной изоформы LAP2 (Furukawa, 1999), а позднее — и других LEMD-белков, например, эмерина (Holaska et al., 2003), необходимого для правильного формирования веретена деления и сегрегации хромосом в митозе (Duan et al., 2021). При этом BAF имеет множество других “партнеров” по взаимодействию, не содержащих LEM-домена, например, некоторые транскрипционные факторы (Wang et al., 2002). И наоборот, LEMD-белки могут выполнять тканеспецифические функции, которые не зависят от связывания BAF (Huber et al., 2009). Однако ключевую роль для успешного осуществления ядерных функций играет способность разных LEMD-

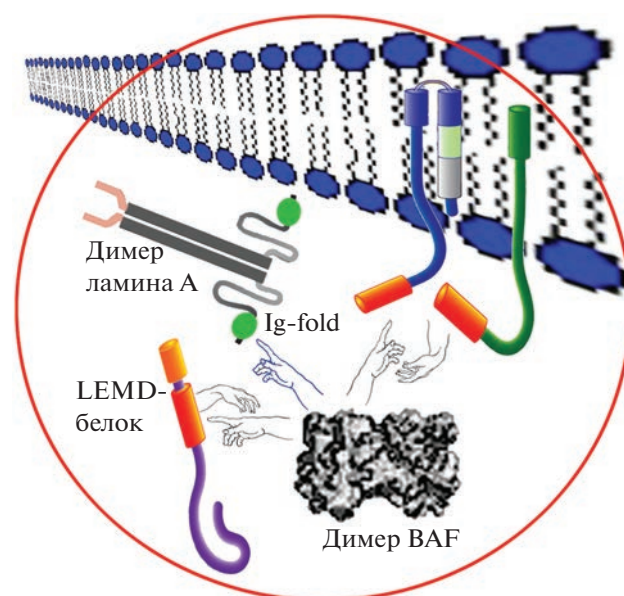


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая молекулярный комплекс, образованный димерами BAF, LEMD-белками и ламинами А. Обратите внимание на взаимодействие BAF с Ig-fold-доменом ламина А.

белков формировать единый молекулярный комплекс с BAF и ламинном А (рис. 2), в котором димеры BAF одновременно связываются как с LEM-доменом различных белков, так и с Ig-подобным доменом (Ig-fold) ламина А-типа (Samson et al., 2018).

Общепризнано, что взаимодействие LEMD-белков и BAF играет критическую роль в сборке ядерной оболочки после завершения митоза. Так, на клетках HeLa было показано, что дефицит эмерина вызывает аномальную агрегацию ламина А на периферии ядра в телофазе, нарушение сборки ядерной мембраны и накопление BAF в центральной части телофазных ядер (Snyers et al., 2022).

Локализация LEMD-белка эмерина в формирующейся ядерной мембране по завершении митоза также напрямую зависит от его способности к взаимодействию с BAF (Haraguchi et al., 2001), а диссоциация комплекса эмерин–BAF регулируется фосфорилированием эмерина по S175, как было показано на бесклеточной системе — экстракте яиц *Xenopus* (Hirano et al., 2005).

LEMD-белок LAP2 обычно представлен несколькими изоформами, которые образуются в результате альтернативного сплайсинга (Wagner, Krohne, 2007). В клетках млекопитающих существует 6 изоформ LAP2 — α , β , γ , δ , ϵ и ζ ; у других животных их меньше, например, 3 у *Xenopus* (Dechat et al., 2000). В мужских половых клетках млекопитающих наиболее широко распространены α -, β - и γ -изоформы LAP2. Их локализация различна: LAP2 β и LAP2 γ входят в состав внутренней ядерной мембраны, тогда как LAP2 α локализуется в нуклеоплазме, где взаимодействует с

Таблица 1. Репрезентативные представители LEMD-белков

Группа	Название		Альтернативное название	Главные домены	Локализация	Ключевые партнеры по взаимодействию	Ключевой процесс (функция)	Источник литературы
I	LAP2 ^a	LAP2 α		LEM-like LEMD	NP	BAF ламин A	Восстановление ядерной оболочки после деления; регуляция репликации и транскрипции, стабилизация структуры хроматина и связывание мембран с хромосомами	Dechat et al., 2000
		LAP2 β		TM LEM-like LEMD	INM	BAF хроматин		
	Эмерин			TM LEMD	INM	BAF	Передача сигнала; поддержание структурной целостности ядра; позиционирование центромера и формирование веретена деления в митозе	Berk et al., 2013
							Дифференцировка половых клеток	Barton et al., 2013
							Поддержание структурной целостности ядра	Wagner et al., 2004; Barton et al., 2014
	LEMD1		CT50 LEMP-1	TM LEMD	INM	Не охарактеризованы	Неизвестна; характеризуется гиперэкспрессией в клетках различных опухолей, что усиливает их пролиферацию посредством сигнальных путей p53, mTORC1 и PI3K/AKT	Yuki et al., 2004; Cao et al., 2022; Li et al., 2022
II	MAN1		LEMD3 SANE (у <i>Xenopus</i>)	2 $\times$ TM LEMD MSC UHM	INM	BAF	Передача сигнала, регуляция транскрипции	Paulin-Levasseur et al., 1996; Lin et al., 2000
	LEMD2		NET25	2 $\times$ TM LEMD MSC	INM	BAF хроматин	Передача сигнала	Brachner et al., 2005
III	Ankle-1		LEM3	ANK LEMD GIY-YIG	CP и NP	Хроматин	Ответ на повреждения ДНК	Brachner et al., 2012
	Ankle-2		LEM4	TM ANK LEMD	ER и INM	Не охарактеризованы	Сборка ядерной оболочки после деления; необходим для дефосфорилирования BAF, подавляя активность киназы VRK1	Asencio et al., 2012

Примечание. (a) – У млекопитающих существует 6 изоформ LAP2; мы приводим здесь только две репрезентативные – LAP2 α (нуклеоплазматическую) и LAP2 β (трансмембранную). Обозначения доменов белков: ANK – анкириновый домен (анкирины обеспечивают связь между интегральными белками мембраны с актин-спектриновым цитоскелетом); GIY-YIG – эндонуклеазный домен; LEM-like – LEM-подобный домен; MSC – MAN1-Src1-p-C-концевой домен; TM – трансмембранный домен; UHM – U2AF-гомологичный мотив (U2AF – вспомогательный для U2 snPHK фактор сплайсинга, U2 associated/auxiliary factor). Другие обозначения: CP – цитоплазма; ER – эндоплазматический ретикулум; INM – внутренняя ядерная мембрана; NP – нуклеоплазма; NP-Lam B – нуклеоплазматические ламины группы B. Полужирным шрифтом выделен LEM-домен (LEMD), присутствующий в молекулах LEMD-белков всех трех групп.

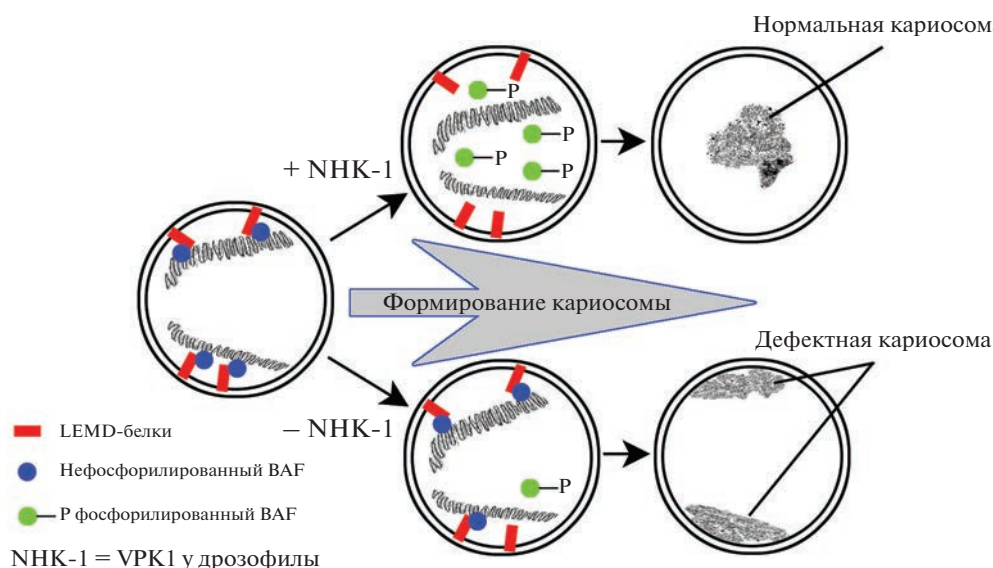


Рис. 3. Схема, демонстрирующая роль фосфорилирования BAF киназой NHK-1/VRK1 в формировании кариосомы (гетерохроматиновой структуры, необходимой для правильного протекания мейотического редукционного деления), в ядре дипло-тенных ооцитов *Drosophila melanogaster* (по: Lancaster et al., 2007).

нуклеоплазматическими ламинами класса А, являясь их специфическим партнером по связыванию (Naetar et al., 2017), а также с BAF и хроматином (Brachner, Foissner, 2011). Показано, что в соматических клетках взаимодействие LAP2 с BAF и ламинами координирует постмитотическую сборку ядерной оболочки (Dechat et al., 2000; Wagner, Krohne, 2007), при этом комплексы, образованные LAP2α и ламинами А, необходимы для поддержания клетками их пролиферативного статуса (Pekovic et al., 2007).

В повторной сборке ядерной оболочки после митоза также участвует LEMD-белок LEM4/Ankle-2, который опосредует дефосфорилирование BAF за счет связывания с фосфатазой PP2A (Snyers et al., 2018). В клетках с дефицитом Ankle-2, полученных, например, с использованием CRISPR/Cas9-редактирования, наблюдается нарушение постмитотической реассоциации белков BAF, LAP2α и ламина А с хромосомами. Эти нарушения снижают механическую стабильность ядерной оболочки, а также стабильность хромосом в телофазных клетках, что приводит к увеличению числа гиперплоидных клеток. Ассоциация BAF и LAP2α с хромосомами может быть восстановлена с помощью повышения уровня LEM4/ANKLE-2 в клетках путем трансфекции. Однако такого восстановления не происходит при введении в клетки мутантных генов *LEM4/ANKLE-2*, кодирующих белки с укороченными N- или C-концами, которые не способны связывать PP2A (Snyers et al., 2018).

BAF И LEMD-БЕЛКИ В ФОРМИРОВАНИИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК

Как и в соматических клетках, функциональная активность BAF в развивающихся половых клетках в первую очередь определяется его фосфорилированием с помощью эволюционно консервативной серинтреониновой протеинкиназы VRK1. Так, в ооцитах дрозофилы фосфорилирование BAF с помощью NHK-1 (nucleosome histone kinase 1), являющейся ортологом VRK1 в клетках *Drosophila*, играет критическую роль в формировании кариосомы — компактного “клубка” конденсированных хромосом ооцита на стадии диплотеи мейоза (подробнее о кариосоме см. обзор: Bogolyubov, 2018). При этом решающее значение для фосфорилирования BAF имеет некаталитический домен NHK-1/VRK1. Предполагается, что фосфорилирование BAF нарушает прикрепление хромосом к ядерной оболочке, делая возможным правильное формирование кариосомы (рис. 3). Снижение уровня NHK-1 в ооцитах или экспрессия нефосфорилируемого BAF, наоборот, приводит к сохранению ассоциации хромосом с ядерной оболочкой, что выражается в формировании дефектной кариосомы (Lancaster et al., 2007).

В контексте проблемы развития половых клеток среди LEMD-белков дрозофилы лучше всего охарактеризован эмерин (отефин), мутации в гене которого приводят к женскому и мужскому бесплодию (Jiang et al., 2008; Barton et al., 2016). Отефин и LAP2β связываются с белком GCL (germ cell-less) (Nili et al 2001; Holaska et al., 2003) — репрессором транскрипции, необходимым для формирования клеток зародышевой линии (Leatherman et al., 2002). При этом в гонадах дрозофилы отефин необходим не только для

формирования и выживания мужских и женских половых клеток, но и для поддержания их соматических ниш (Barton et al., 2016).

По сравнению с другими LEMD-белками, для эмерина (отефина) характерно наиболее выраженное взаимодействие с BAF. С одной стороны, эмерин (отефин) необходим для привлечения BAF к ядерной ламине. С другой стороны, нокдаун BAF в клетках зародышевой линии в яичнике дрозофилы приводит к формированию фенотипов, характерных для мутантов по гену отефина. Нокдаун BAF вызывает нарушение структуры ядерной ламины, остановку дифференцировки и гибель клеток зародышевой линии. При этом их фенотипы частично восстанавливаются при инактивации киназ ATR и Chk2 (Duan et al., 2020b).

На клетках зародышевой линии самок дрозофилы было показано, что отефин вовлечен в регуляцию структуры centrosом. В мутантных по отефину клетках женской зародышевой линии centrosомы остаются встроенными в интерфазную ядерную ламину и сохраняют большое количество периферического материала, который дает начало микротрубочкам веретена (Duan et al., 2021).

На примере млекопитающих показано, что LEMD-белки участвуют в процессах формирования не только женских, но и мужских половых клеток, в особенности в спермиогенезе — процессе преобразования сперматид в зрелые спермии. Как известно, во время этого процесса ядро сперматиды удлиняется и резко уменьшается в размерах, а в составе хроматина протамины заменяют гистоны, существенно повышая степень его конденсации (Pereira et al., 2019).

С помощью ПЦР в реальном времени, иммунофлуоресцентной микроскопии и Вестерн-блоттинга было показано, что сперматиды человека характеризуются особым набором LEMD-белков (Elkhatib et al., 2017). В них присутствуют: короткая изоформа LAP2 (белок группы I), LEMD2 (белок группы II), Ankle-2 (белок группы III), а также их функциональные партнеры — BAF и BAF-подобный белок BAF-L, характерный для клеток семенников. Кроме того, сперматиды человека содержат трансмембранный белок LEMD1, не относящийся к семейству LEMD-белков. Однако такие характерные LEMD-белки, как эмерин и MAN1 (LEMD3), в них отсутствуют. По сравнению со сперматидами, в эякулированных сперматозоидах удалось обнаружить только BAF и BAF-L, которые могут способствовать формированию ядра сперматозоида и его последующему преобразованию в мужской пронуклеус. В ядерной оболочке зрелых сперматозоидов не выявляется LEMD1, а LAP2β перестает выявляться уже в сперматиде, после того как они начали удлиняться (Elkhatib et al., 2017). Таким образом, спектр белков, осуществляющих взаимодействие между ядерной ламиной и хроматином, в сперматиде и спермие

человека отличается от характерного для соматических клеток набора белков.

В процессы формирования мужских половых клеток и координацию процессов перераспределения хроматина во время спермиогенеза млекопитающих, по данным Серрано с соавторами (Serrano et al., 2017), вовлечены не только вышеперечисленные LEMD-белки, например LAP2, но и не относящиеся к ним белки LAP1 и LBR (рецептор ламина В). У мыши и человека на постмейотических стадиях сперматогенеза процессы уплотнения и изменения формы ядер сперматид сопровождаются перераспределением LAP1 к заднему полюсу ядерной оболочки удлиняющихся сперматид. К моменту достижения ими полного созревания и превращения в морфологически сформированные сперматозоиды LAP1 постепенно перестает выявляться в ядрах (Serrano et al., 2017). Аналогичная поляризация распределения описана для LEMD-белка LAP2 в ядерной оболочке сперматид крыс (Alzheimer et al., 1998) и мышей (Göb et al., 2010). Показано, что по мере завершения спермиогенеза в поздних сперматиде крыс происходит постепенная потеря LAP2β и LAP2γ, тогда как не ассоциированный с мембраной LAP2α продолжает выявляться даже в зрелых сперматозоидах (Alzheimer et al., 1998). Предполагают, что подобное вытеснение LEMD-белков из внутренней ядерной мембраны в процессе спермиогенеза может быть связано с экспрессией BAF и его паралога BAF-L. Считают также, что LAP2β (а также LEMD1) может связываться с гетеродимерами BAF–BAF-L, образование которых способно предотвращать взаимодействие гомодимеров BAF с хроматином, способствуя тем самым формированию более открытой конфигурации хроматина, что в частности может облегчать процесс замены гистонов на протамины (Elkhatib et al., 2017). Другое объяснение основывается на экспрессии в семенниках альтернативных изоформ LEMD-белков, не имеющих трансмембранного домена, что показано, например, в отношении LEMD1 (Pereira et al., 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Даже относительно немногочисленные экспериментальные данные убедительно доказывают значимость белка BAF и его основных функциональных партнеров, в первую очередь LEMD-белков, для процессов формирования половых клеток, начиная с выделения клеток зародышевой линии и заканчивая превращением гаплоидных сперматид в морфологически зрелые сперматозоиды (рис. 4). Очевидно, что дальнейшие исследования в этом направлении могут способствовать расшифровке молекулярных механизмов снижения как мужской, так и женской фертильности и, возможно, объяснить, по крайней мере, некоторые случаи идиопатического бесплодия.

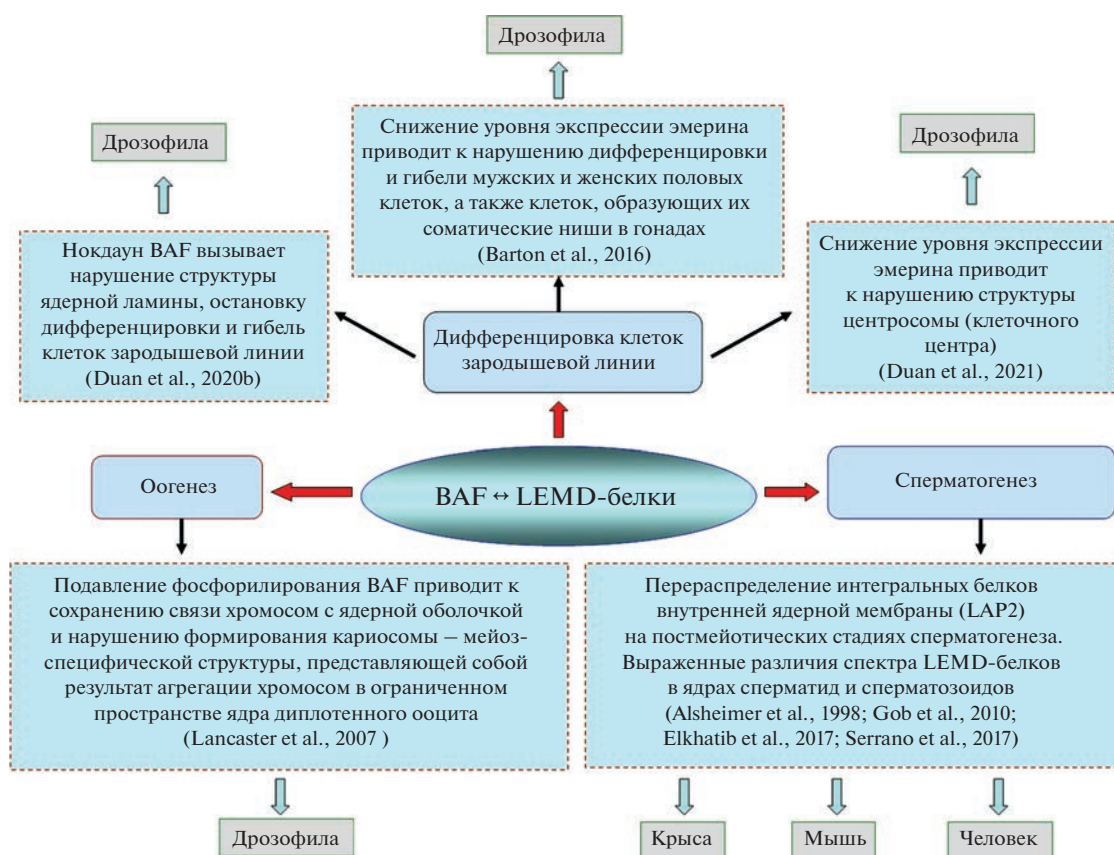


Рис. 4. Основные пути участия BAF и LEM-белков в формировании половых клеток. Приведены ссылки на работы, в которых содержатся соответствующие экспериментальные доказательства.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00380).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При подготовке работы авторы не проводили какие-либо исследования с использованием животных или людей в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Богданов Ю.Ф., Гришаева Т.М. 2020. Консерватизм, изменчивость и эволюция мейоза. М.: Товарищество научных изданий КМК. 345 с. (Bogdanov Yu.F., Grishaeva T.M. 2020. Conservation, variation an evolution of meiosis. Moscow: KMK Scientific Press. 345 p.)
- Дондуа А.К. 2018. Биология развития. СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та. 812 с. (Dondua A.K. 2018. Developmental biology. Saint Petersburg: Saint Petersburg University Publishing House. 812 p.)

- Alzheimer M., Fecher E., Benavente R. 1998. Nuclear envelope remodelling during rat spermiogenesis: distribution and expression pattern of LAP2/thymopoietins. J. Cell Sci. V. 111. P. 2227. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.15.2227>
- Asencio C., Davidson I.F., Santarella-Mellwig R., Ly-Hartig T.B.N., Mall M., Wallenfang M.R., Mattaj J.W., Gorjánác M. 2012. Coordination of kinase and phosphatase activities by Lem4 enables nuclear envelope reassembly during mitosis. Cell. V. 150. P. 122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.043>
- Bailly C., Vergoten G. 2021. Interaction of obtusilactone B and related butanolide lactones with the barrier-to-autointegration factor 1 (BAF1). A computational study. Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov. V. 2: 100059. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2021.100059>
- Barrales R.R., Forn M., Georgescu P.R., Sarkadi Z., Braun S. 2016. Control of heterochromatin localization and silencing by the nuclear membrane protein Lem2. Genes Dev. V. 30. P. 133. <https://doi.org/10.1101/gad.271288.115>
- Barton L.J., Lovander K.E., Pinto B.S., Geyer P.K. 2016. Drosophila male and female germline stem cell niches require the nuclear lamina protein Otefin. Dev. Biol. V. 415. P. 75. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.05.001>

- Barton L.J., Soshnev A.A., Geyer P.K. 2015. Networking in the nucleus: a spotlight on LEM-domain proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* V. 34. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.03.005>
- Bogolyubov D. 2018. Karyosphere (karyosome): a peculiar structure of the oocyte nucleus. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* V. 337. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.12.001>
- Brachner A., Foisner R. 2011. Evolvement of LEM proteins as chromatin tethers at the nuclear periphery. *Biochem. Soc. Trans.* V. 39. P. 1735.
<https://doi.org/10.1042/BST20110724>
- Brachner A., Braun J., Ghodgaonkar M., Castor D., Zlopasa L., Ehrlich V., Jiricny J., Gotzmann J., Knasmüller S., Foisner R. 2012. The endonuclease Ankle-1 requires its LEM and GIY-YIG motifs for DNA cleavage *in vivo*. *J. Cell Sci.* V. 125. P. 1048.
<https://doi.org/10.1242/jcs.098392>
- Bradley C.M., Ronning D.R., Ghirlando R., Craigie R., Dyda F. 2005. Structural basis for DNA bridging by barrier-to-autointegration factor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* V. 12. P. 935.
<https://doi.org/10.1038/nsmb989>
- Burla R., La Torre M., Maccaroni K., Verni F., Giunta S., Saggio I. 2020. Interplay of the nuclear envelope with chromatin in physiology and pathology. *Nucleus.* V. 11. P. 205.
<https://doi.org/10.1080/19491034.2020.1806661>
- Cabanillas R., Cadinanos J., Villameyide J.A., Perez M., Longo J., Richard J.M., Alvarez R., Duran N.S., Illan R., Gonzalez D.J., López-Otín C. 2011. Nestor-Guillermo progeria syndrome: a novel premature aging condition with early onset and chronic development caused by BANF1 mutations. *Am. J. Med. Genet. A.* V. 155A. P. 2617.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34249>
- Cai M., Huang Y., Ghirlando R., Wilson K.L., Craigie R., Clore G.M. 2001. Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF and the other binds DNA. *EMBO J.* V. 20. P. 4399.
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.16.4399>
- Cai M., Huang Y., Zheng R., Wei S.-Q., Ghirlando R., Lee M.S., Craigie R., Gronenborn A.M., Clore G.M. 1998. Solution structure of the cellular factor BAF responsible for protecting retroviral DNA from autointegration. *Nature Struct. Biol.* V. 5. P. 903.
<https://doi.org/10.1038/2345>
- Caputo S., Couprie J., Duband-Goulet I., Kondé E., Lin F., Braud S., Gondry M., Gilquin B., Worman H.J., Zinn-Justin S. 2006. The carboxyl-terminal nucleoplasmic region of MAN1 exhibits a DNA binding winged helix domain. *J. Biol. Chem.* V. 281. P. 18208.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M601980200>
- Cohen M., Lee K.K., Wilson K.L., Gruenbaum Y. 2001. Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. *Trends Biochem. Sci.* V. 26. P. 41.
[https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01727-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01727-8)
- Correia Soeiro M.N., Vergoten G., Bailly C. 2022. Molecular docking of brazilin and its analogs to barrier-to-autointegration factor 1 (BAF1). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* V. 1511. P. 154.
<https://doi.org/10.1111/nyas.14742>
- Dechat T., Vlcek S., Foisner R. 2000. Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J. Struct. Biol.* V. 129. P. 335.
<https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4212>
- Duan T., Cupp R., Geyer P.K. 2021. *Drosophila* female germline stem cells undergo mitosis without nuclear breakdown. *Curr. Biol.* V. 31. P. 1450–1462.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.033>
- Duan T., Green N., Tootle T.L., Geyer P.K. 2020a. Nuclear architecture as an intrinsic regulator of *Drosophila* female germline stem cell maintenance. *Curr. Opin. Insect. Sci.* V. 37. P. 30–38.
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.11.007>
- Duan T., Kitzman S.C., Geyer P.K. 2020b. Survival of *Drosophila* germline stem cells requires the chromatin-binding protein Barrier-to-autointegration factor. *Development.* V. 147: dev186171.
<https://doi.org/10.1242/dev.186171>
- Elkhatib R.A., Paci M., Boissier R., Longepied G., Auguste Y., Achard V., Bourgeois P., Levy N., Branger N., Mitchell M.J., Metzler-Guillemain C. 2017. LEM-domain proteins are lost during human spermiogenesis but BAF and BAF-L persist. *Reproduction.* V. 154. P. 387.
<https://doi.org/10.1530/REP-17-0358>
- Foisner R. 2003. Cell cycle dynamics of the nuclear envelope. *Scientific World J.* V. 3. P. 1.
<https://doi.org/10.1100/tsw.2003.06>
- Furukawa K. 1999. LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *J. Cell Sci.* V. 112. P. 2485.
<https://doi.org/10.1242/jcs.112.15.2485>
- Furukawa K., Sugiyama S., Osouda S., Goto H., Inagaki M., Horigome T., Omata S., McConnell M., Fisher P.A., Nishida Y. 2003. Barrier-to-autointegration factor plays crucial roles in cell cycle progression and nuclear organization in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* V. 116. P. 3811.
<https://doi.org/10.1242/jcs.00682>
- Gant T.M., Harris C.A., Wilson K.L. 1999. Roles of LAP2 proteins in nuclear assembly and DNA replication: truncated LAP2 β proteins alter lamina assembly, envelope formation, nuclear size, and DNA replication efficiency in *Xenopus laevis* extracts. *J. Cell Biol.* V. 144. P. 1083.
<https://doi.org/10.1083/jcb.144.6.1083>
- Gorjánác M., Klerkx E.P., Galy V., Santarella R., López-Iglesias C., Askjaer P., Mattaj J.W. 2007. *Caenorhabditis elegans* BAF-1 and its kinase VRK-1 participate directly in post-mitotic nuclear envelope assembly. *EMBO J.* V. 26. P. 132.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601470>
- Göb E., Schmitt J., Benavente R., Alsheimer M. 2010. Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS One.* V. 5: e12072.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012072>
- Haraguchi T., Koujin T., Segura-Totten M., Lee K.K., Matsuoka Y., Yoneda Y., Wilson K.L., Hiraoka Y. 2001. BAF is required

- for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. *J. Cell Sci.* V. 114. P. 4575.
<https://doi.org/10.1242/jcs.114.24.4575>
- Hirano Y., Segawa M., Ouchi F.S., Yamakawa Y., Furukawa K., Takeyasu K., Horigome T. 2005. Dissociation of emerin from barrier-to-autointegration factor is regulated through mitotic phosphorylation of emerin in a *Xenopus* egg cell-free system. *J. Biol. Chem.* V. 280. P. 39925.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m503214200>
- Holaska J.M., Lee K.K., Kowalski A.K., Wilson K.L. 2003. Transcriptional repressor germ cell-less (GCL) and barrier-to-autointegration factor (BAF) compete for binding to emerin *in vitro*. *J. Biol. Chem.* V. 278. P. 6969.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M208811200>
- Huber M.D., Guan T., Gerace L. 2009. Overlapping functions of nuclear envelope proteins NET25 (Lem2) and emerin in regulation of extracellular signal-regulated kinase signaling in myoblast differentiation. *Mol. Cell Biol.* V. 29. P. 5718.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00270-09>
- Jamin A., Wiebe M.S. 2015. Barrier to autointegration factor (BANF1): interwoven roles in nuclear structure, genome integrity, innate immunity, stress responses and progeria. *Curr. Opin. Cell Biol.* V. 34. P. 61.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.05.006>
- Jiang X., Xia L., Chen D., Yang Y., Huang H., Yang L., Zhao Q., Shen L., Wang J., Chen D. 2008. Otefin, a nuclear membrane protein, determines the fate of germline stem cells in *Drosophila* via interaction with Smad complexes. *Dev. Cell.* V. 14. P. 494.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.02.018>
- Lancaster O.M., Cullen C.F., Ohkura H. 2007. NHK-1 phosphorylates BAF to allow karyosome formation in the *Drosophila* oocyte nucleus. *J. Cell Biol.* V. 179. P. 817.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200706067>
- Leatherman J.L., Levin L., Boero J., Jongens T.A. 2002. *germ cell-less* Acts to repress transcription during the establishment of the *Drosophila* germ cell lineage. *Curr. Biol.* V. 12. P. 1681.
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01182-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01182-X)
- Lee K.K., Gruenbaum Y., Spann P., Liu J., Wilson K.L. 2000. *C. elegans* nuclear envelope proteins emerin, MAN1, lamin, and nucleoporins reveal unique timing of nuclear envelope breakdown during mitosis. *Mol. Biol. Cell.* V. 11. P. 3089.
<https://doi.org/10.1091/mbc.11.9.3089>
- Lee M.S., Craigie R. 1998. A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 95. P. 1528.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1528>
- Li J., Hu B., Fang L., Gao Y., Shi S., He H., Liu X., Yuan C. 2018. Barrier-to-autointegration factor 1: A novel biomarker for gastric cancer. *Oncol. Lett.* V. 16. P. 6488.
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.9432>
- Li J., Wang T., Pei L., Jing J., Hu W., Sun T., Liu H. 2017. Expression of VRK1 and the downstream gene *BANF1* in esophageal cancer. *Biomed. Pharmacother.* V. 89. P. 1086.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.095>
- Liu J., Rolef-Ben Shahr T., Riemer D., Treinin M., Spann P., Weber K., Fire A., Gruenbaum Y. 2000. Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. *Mol. Biol. Cell.* V. 11. P. 3937.
<https://doi.org/10.1091/mbc.11.11.3937>
- Marcelot A., Petitot A., Ropars V., Le Du M.H., Samson C., Dubois S., Hoffmann G., Miron S., Cuniassse P., Marquez J.A., Thai R., Theillet F.X., Zinn-Justin S. 2021a. Di-phosphorylated BAF shows altered structural dynamics and binding to DNA, but interacts with its nuclear envelope partners. *Nucleic Acids Res.* V. 49. P. 3841.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab184>
- Marcelot A., Worman H.J., Zinn-Justin S. 2021b. Protein structural and mechanistic basis of progeroid laminopathies. *FEBS J.* V. 288. P. 2757.
<https://doi.org/10.1111/febs.15526>
- Marcelot A., Zinn-Justin S., Cuniassse P. 2022. The conformation of the intrinsically disordered N-terminal region of Barrier-to-autointegration factor (BAF) is regulated by pH and phosphorylation. *J. Mol. Biol.* V. 435: 167888.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167888>
- Martins S., Eikvar S., Furukawa K., Collas P. 2003. HA95 and LAP2 β mediate a novel chromatin–nuclear envelope interaction implicated in initiation of DNA replication. *J. Cell Biol.* V. 160. P. 177.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200210026>
- Mattout-Drubezki A., Gruenbaum Y. 2003. Dynamic interactions of nuclear lamina proteins with chromatin and transcriptional machinery. *Cell Mol. Life Sci.* V. 60. P. 2053.
<https://doi.org/10.1007/s00018-003-3038-3>
- Molitor T.P., Traktman P. 2014. Depletion of the protein kinase VRK1 disrupts nuclear envelope morphology and leads to BAF retention on mitotic chromosomes. *Mol. Biol. Cell.* V. 25. P. 891.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E13-10-0603>
- Naetar N., Ferraioli S., Foisner R. 2017. Lamins in the nuclear interior – life outside the lamina. *J. Cell Sci.* V. 130. P. 2087.
<https://doi.org/10.1242/jcs.203430>
- Nili E., Cojocar G.S., Kalma Y., Ginsberg D., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Berger R., Shakrai S., Amariglio N., Brok-Simoni F., Simon A.J., Rechavi G. 2001. Nuclear membrane protein, LAP2 β , mediates transcriptional repression alone and together with its binding partner GCL (germ-cell-less). *J. Cell Sci.* V. 114. P. 3297.
<https://doi.org/10.1242/jcs.114.18.3297>
- Paquet N., Box J.K., Ashton N.W., Suraweera A., Croft L.V., Urquhart A.J., Bolderson E., Zhang S.D., O'Byrne K.J., Richard D.J. 2014. Néstor-Guillermo Progeria Syndrome: A biochemical insight into Barrier-to-autointegration factor 1, alanine 12 threonine mutation. *BMC Mol. Biol.* V. 15: 27.
<https://doi.org/10.1186/s12867-014-0027-z>
- Pereira C.D., Serrano J.B., Martins F., da Cruz E. Silva O.A.B., Rebelo S. 2019. Nuclear envelope dynamics during mammalian spermatogenesis: new insights on male fertility. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* V. 94. P. 1195.
<https://doi.org/10.1111/brv.12498>
- Pekovic V., Harborth J., Broers J.L., Ramaekers F.C., van Engelen B., Lammens M., von Zglinicki T., Foisner R., Hutchison C.,

- Markiewicz E. 2007. Nucleoplasmic LAP2 α –lamin A complexes are required to maintain a proliferative state in human fibroblasts. *J. Cell Biol.* V. 176. P. 163.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200606139>
- Puente X.S., Quesada V., Osorio F.G., Cabanillas R., Cadiñanos J., Fraile J.M., Ordóñez G.R., Puente D.A., Gutiérrez-Fernández A., Fanjul-Fernández M., Lévy N., Freije J.M.P., López-Otín C. 2011. Exome sequencing and functional analysis identifies BANF1 mutation as the cause of a hereditary progeroid syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* V. 88. P. 650.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.04.010>
- Qi R., Xu N., Wang G., Ren H., Li S., Lei J., Lin Q., Wang L., Gu X., Zhang H., Jiang Q., Zhang C. 2015. The laminA/C–LAP2 α –BAF1 protein complex regulates mitotic spindle assembly and positioning. *J. Cell Sci.* V. 128. P. 2830.
<https://doi.org/10.1242/jcs.164566>
- Rose M., Bai B., Tang M., Cheong C.M., Beard S., Burgess J.T., Adams M.N., O'Byrne K.J., Richard D.J., Gandhi N.S., Bolderson E. 2021. The impact of rare human variants on barrier-to-auto-integration factor 1 (Banf1) structure and function. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 9: 775441.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.775441>
- Samson C., Petitot A., Celli F., Herrada I., Ropars V., Le Du M.H., Nhiri N., Jacquet E., Arteni A.-A., Buendia B., Zinn-Justin S. 2018. Structural analysis of the ternary complex between lamin A/C, BAF and emerin identifies an interface disrupted in autosomal recessive progeroid diseases. *Nucleic Acids Res.* V. 46. P. 10460.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky736>
- Samwer M., Schneider M.W.G., Hoefler R., Schmalhorst P.S., Jude J.G., Zuber J., Gerlich D.W. 2017. DNA cross-bridging shapes a single nucleus from a set of mitotic chromosomes. *Cell.* V. 170. P. 956–972.e923.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.038>
- Segura-Totten M., Kowalski A.K., Craigie R., Wilson K.L. 2002. Barrier-to-autointegration factor: major roles in chromatin decondensation and nuclear assembly. *J. Cell Biol.* V. 158. P. 475.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200202019>
- Segura-Totten M., Wilson K.L. 2004. BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol.* V. 14. P. 261.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.03.004>
- Serrano J.B., Martins F., Sousa J.C., Pereira C.D., van Pelt A.M., Rebelo S., da Cruz E., Silva O.A. 2017. Descriptive analysis of LAP1 distribution and that of associated proteins throughout spermatogenesis. *Membranes (Basel).* V. 7: 22.
<https://doi.org/10.3390/membranes7020022>
- Shen Q., Eun J.W., Lee K., Kim H.S., Yang H.D., Kim S.Y., Lee E.K., Kim T., Kang K., Kim S., Min D.H., Oh S.N., Lee Y.J., Moon H., Ro S.W. et al. 2018. Barrier to autointegration factor 1, procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3, and splicing factor 3b subunit 4 as early-stage cancer decision markers and drivers of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* V. 67. P. 1360.
<https://doi.org/10.1002/hep.29606>
- Snyers L., Erhart R., Laffer S., Pusch O., Weipoltshammer K., Schöfer C. 2018. LEM4/ANKLE-2 deficiency impairs post-mitotic re-localization of BAF, LAP2 α and LaminA to the nucleus, causes nuclear envelope instability in telophase and leads to hyperploidy in HeLa cells. *Eur. J. Cell Biol.* V. 97. P. 63.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.12.001>
- Snyers L., Löhnert R., Weipoltshammer K., Schöfer C. 2022. Emerin prevents BAF-mediated aggregation of lamin A on chromosomes in telophase to allow nuclear membrane expansion and nuclear lamina formation. *Mol. Biol. Cell.* V. 33: ar137.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E22-01-0007>
- Torras-Llort M., Medina-Giró S., Escudero-Ferruz P., Lipinski Z., Moreno-Moreno O., Karman Z., Przewłoka M.R., Azorín F. 2020. A fraction of barrier-to-autointegration factor (BAF) associates with centromeres and controls mitosis progression. *Commun. Biol.* V. 3: 454.
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-01182-y>
- Vivante A., Brozgoł E., Bronshtein I., Levi V., Garini Y. 2019. Chromatin dynamics governed by a set of nuclear structural proteins. *Genes Chromosomes Cancer.* V. 58. P. 437.
<https://doi.org/10.1002/gcc.22719>
- Wagner N., Kagermeier B., Loserth S., Krohne G. 2006. The *Drosophila melanogaster* LEM-domain protein MAN1. *Eur. J. Cell Biol.* V. 85. P. 91.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2005.10.002>
- Wagner N., Krohne G. 2007. LEM-domain proteins: new insights into lamin-interacting proteins. *Int. Rev. Cytol.* V. 261. P. 1.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)61001-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)61001-8)
- Wang X., Xu S., Rivolta C., Li L.Y., Peng G.-H., Swain P.K., Sung C.-H., Swaroop A., Berson E.L., Dryja T.P., Chen S. 2002. Barrier to autointegration factor interacts with the cone-rod homeobox and represses its transactivation function. *J. Biol. Chem.* V. 277. P. 43288.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M207952200>
- Wong X., Melendez-Perez A.J., Reddy K.L. 2022. The nuclear lamina. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 14: a040113.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040113>
- Zetka M., Paouneskou D., Jantsch V. 2020. The nuclear envelope, a meiotic jack-of-all-trades. *Curr. Opin. Cell Biol.* V. 64. P. 34.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.12.010>
- Zhang G. 2020. Expression and prognostic significance of BANF1 in triple-negative breast cancer. *Cancer Manag. Res.* V. 12. P. 145.
<https://doi.org/10.2147/CMAR.S229022>
- Zheng R., Ghirlando R., Lee M.S., Mizuuchi K., Krause M., Craigie R. 2000. Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 97. P. 8997.
<https://doi.org/10.1073/pnas.150240197>
- Zhuang X., Semenova E., Maric D., Craigie R. 2014. Dephosphorylation of barrier-to-autointegration factor by protein phosphatase 4 and its role in cell mitosis. *J. Biol. Chem.* V. 289. P. 1119.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.492777>

Functional Interactions of BAF and LEM Proteins in the Formation of Germ Cells**I. O. Bogolyubova^a and D. S. Bogolyubov^{a, *}**^a*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*^{*}*e-mail: dbogol@mail.ru*

Recovery of the nuclear structure after cell division requires special interactions between the integral proteins of the inner nuclear membrane having a special LEM domain (LEMD), nuclear lamina proteins (lamins) and the conserved BAF protein that serves as a central link in these interactions, providing topological relationships between chromatin and nuclear envelope. The dynamic transformations of these protein ensembles in the mitotic cycle are characterized in detail at the molecular level, however, less attention is paid to the developing germ cells undergoing meiotic divisions, despite of their nuclei, especially in diplotene oocytes, differ significantly in structure from the somatic nucleus. This review summarizes the still relatively scarce experimental data proving the significance of functional interactions between BAF and LEMD proteins for gamete formation, from the selection of germline cells to the transformation of haploid spermatids into morphologically mature spermatozoa.

Keywords: nuclear architecture, nuclear envelope, gametogenesis, meiosis, germ cells, BAF, LEM-D proteins, VRK1

УДК 57.085.23

ПОЛУЧЕНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПУЛПЫ МОЛОЧНОГО ЗУБА ДЕТЕЙ РАЗНОГО ПОЛА

© 2023 г. А. С. Мусорина¹, *, В. И. Турилова¹, А. Н. Шатрова¹, Т. К. Яковлева¹, Г. Г. Полянская¹, **

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: anam18@inbox.ru

**E-mail: gpolanskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 01.06.2023 г.

После доработки 27.06.2023 г.

Принята к публикации 28.06.2023 г.

Получены и охарактеризованы 2 новые неиммортизированные фибробластоподобные клеточные линии (MSC-DP-1 и MSC-DP-2), выделенные из пульпы молочных зубов разнополюх 6-летних детей. С целью подтверждения статуса мезенхимных стволовых клеток был проведен сравнительный анализ ряда характеристик этих линий на ранних и поздних пассажах. В процессе длительного культивирования выявлены существенные межлинейные различия по характеру репликативного старения (РС) и по ростовым характеристикам. Линия MSC-DP-1 характеризовалась более поздним вхождением в активную стадию РС и более активной пролиферацией по сравнению с линией MSC-DP-2. Кариотипический анализ показал, что обе линии на ранних пассажах имеют нормальный диплоидный кариотип человека. На позднем (18-м пассаже) в стадии активного РС линия MSC-DP-2 сохраняет нормальный кариотип. А линия MSC-DP-1, которая вступает в активную стадию РС гораздо позже (на 42-м пассаже), имеет аномальный кариотип с большим количеством клональных и неклональных хромосомных перестроек. Показана в обеих линиях высокая доля клеток, несущих поверхностные антигены, характерные для МСК человека: CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, и низкая частота клеток с антигенами CD34, CD45 и HLA-DR. Клетки полученных линий на раннем пассаже обладают способностью дифференцироваться в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. Но линия MSC-DP-2 проявляет более слабую дифференцировку в адипогенном направлении, чем линия MSC-DP-1. В процессе РС в линии MSC-DP-1 имеет место значительное ослабление адипогенной дифференцировки, а в линии MSC-DP-2 она исчезает. Активность остальных дифференцировок не изменяется в процессе РС. В целом, полученные результаты подтверждают статус МСК для полученных линий и свидетельствуют о межлинейных различиях в процессе РС. Тем не менее проведенное сравнение с ранее полученной линией — MSC-DP не свидетельствуют о гендерной природе наблюдаемых различий между этими линиями. По-видимому, они связаны с генетическими особенностями разных доноров.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки человека, репликативное старение, пролиферативная активность, поверхностные клеточные маркеры, кариотип, дифференцировка

DOI: 10.31857/S0041377123050061, **EDN:** KJQHDE

В настоящее время значительно расширяется использование мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека разного происхождения как для фундаментальных исследований клеточных процессов, так и для биомедицинских исследований, связанных с широким спектром заболеваний (Liu et al., 2020; Кольцова и др., 2020, 2022; Hezan et al., 2022; Hoang et al., 2022; Jayasinghe et al., 2022; Navarro et al., 2022; Pischiutta et al., 2022; Rahmani-Moghadam et al., 2022; Sharma et al., 2022; Tesiye et al., 2022; Yang et al., 2022;

Zhang et al., 2022; Chen et al., 2023; Hatore et al., 2023; Mou et al., 2023; Sousa et al., 2023 Turano et al., 2023).

Согласно требованиям Международного общества клеточной терапии, статус МСК, полученных из любых источников, определяется рядом обязательных характеристик: адгезивностью к культуральному пластику; активной пролиферацией; экспрессией определенной панели поверхностных антигенов или маркеров (CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC) и отсутствием экспрессии антигенов, нехарактерных для МСК: CD34, CD45 и HLA-DR; способностью к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях; нормальным кариотипом человека, согласно установ-

Принятые сокращения: ДХ — дицентрическая хромосома; ИП — индекс пролиферации; ИФА — иммунофлуоресцентный анализ; МСК — мезенхимные стволовые клетки; РС — репликативное старение; ЭСК — эмбриональные стволовые клетки.

ленным критериям (Dominici et al., 2006; Sensebé et al., 2010; Barkholt et al., 2013).

В настоящее время проводится широкий спектр сравнительных исследований характеристик МСК человека, выделенных из разных источников. Эти источники включают, в частности, разные ткани одного донора, одинаковые ткани разной локализации одного донора, одинаковые ткани разных доноров, различающихся возрастом, полом и другими особенностями. Такие исследования необходимы как для углубления знаний о механизмах биологических процессов в клетке, так и для расширения возможностей использования МСК в регенеративной медицине. Важность этих исследований связана с особенностями взаимодействия клеток с их уникальным микроокружением, характерным для конкретной ткани. Микроокружение постоянно находится под влиянием генетических, эпигенетических и внешних факторов, регулирует пролиферацию, выживаемость, миграцию, старение, дифференцировочный потенциал и другие клеточные функции. Таким образом, источник получения МСК может определять их функциональные характеристики. (Poljanskaya et al., 2022).

Сравнительный анализ характеристик МСК, выделенных из разных источников, свидетельствует о количественных различиях между линиями по важнейшим характеристикам (Stanko et al., 2014; Topoluk et al., 2017; Li et al., 2018; Полянская, 2018; Jin et al., 2019; Мусорина и др., 2019; Кольцова и др., 2020; Semenova et al., 2021; Shin et al., 2021; Tai et al., 2021; Yigitbilek et al., 2021; Wu et al., 2022; Yi et al., 2022; Zou et al., 2022).

Линии мезенхимных стволовых клеток, как и любые неиммортизированные клеточные линии, в процессе длительного культивирования подвергаются репликативному старению (РС), представляющему собой сложный комплексный процесс, индуцированный генетическими и эпигенетическими нарушениями. Он характеризуется рядом существенных изменений клеточных свойств. РС начинается на ранних пассажах и постепенно усиливается в процессе культивирования, вступая в активную стадию (Poljanskaya et al., 2022). При получении новой линии МСК, представляется существенным охарактеризовать эту линию не только на ранних пассажах, но и проанализировать ее свойства в процессе РС, включая сроки наступления его активной стадии. Такое исследование способствует расширению фундаментальных знаний о клеточных процессах, а также регламентирует сроки использования данной линии в биомедицинских технологиях.

В последнее время расширяется спектр МСК, выделение которых не требует применения инвазивных процедур, связанных, в частности, с этическими проблемами (Bongso, Fong, 2013). К таким источникам МСК, в частности, относятся постоянные линии эмбриональных стволовых клеток, внезароды-

шевые органы, десна, зубная ткань, грудное молоко (Крылова и др., 2012; Кольцова и др., 2018, 2019, 2022; Poljanskaya et al., 2022; Rahmani-Moghadam et al., 2022). Следует подчеркнуть, что образование ниши стволовых клеток в пульпе молочных зубов начинается до рождения ребенка. В связи с этим пульпа молочных зубов является источником более здоровых стволовых клеток по сравнению с пульпой постоянных зубов взрослого организма (Kerkis, Caplan, 2012). Учитывая также важность микроокружения для функциональной активности МСК, в частности разное микроокружение у генетически разных доноров, представляло интерес провести выделение МСК из пульпы зуба двух шестилетних доноров разного пола. В предыдущих исследованиях было показано, что имеют место гендерные различия по дифференцировочному потенциалу в остеогенном и хондрогенном направлениях МСК, выделенных из разных источников (Aksu et al., 2008; Payne et al., 2010; Scibetta et al., 2019). В ранее проведенной нами сравнительной характеристике двух линий МСК, выделенных из Вартонова студня пупочного канатика (MSCW-1 и MSCW-2) у разнополых доноров, был получен ряд различий по некоторым характеристикам (Кольцова и др., 2017). Тем не менее утверждать, что причиной наблюдаемых различий является именно разный пол доноров, сложно. Надо учитывать, что микроокружение клеточного материала, связано с широким спектром генотипических, эпигенетических и внешних условий. Поэтому первоочередной задачей работы является получение линий, выделенных из зубной ткани разных доноров, сравнение их между собой по статусным характеристикам МСК, а также с ранее полученной линией из пульпы молочного зуба.

Таким образом, в работе поставлены следующие задачи: 1. выделение из пульпы зуба двух доноров фибробластоподобных клеток; 2. сравнительный анализ активности фермента SA-β-галактозидазы, характеризующий процесс РС; 3. сравнительный анализ характеристик, подтверждающих статус МСК на ранних 6–7-м и более поздних пассажах – ростовые характеристики, кариотипическая изменчивость, экспрессия маркеров недифференцированных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и дифференцировочного потенциала клеток при длительном культивировании. Все полученные характеристики в процессе обсуждения результатов будут сравнены с ранее полученной линией МСК (MSC-DP), выделенной из пульпы зуба шестилетней девочки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделение клеток. Использовали пульпы выпавших естественным образом молочных зубов двух разнополых шестилетних детей. Материал использовали с разрешения родственников ребенка. Сразу после выпадения зубы помещали в пробирку с транспортной средой, содержащей DMEM/F12 (Биолот, Россия) и раствор антибиотиков и антимикотика в 50-

кратном разведении (Antibiotic Antimycotic Solution, Sigma, Израиль). До начала работы, пробирка с материалом хранилась при 4°C не более 24 ч.

Выделение клеток из пульпы зубов проводили механическим методом. Все содержимое пульпы вычищали через корневой канал при помощи одноразовой стерильной инъекционной иглы (23G, Apexmed, Нидерланды). Затем канал многократно промывали ростовой средой, содержащей DMEM/F12 (Биолот, Россия), 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США) и раствор антибиотиков и антимикотика в 50-кратном разведении (Antibiotic Antimycotic Solution, Gibco, США). Выделенные из пульпы зубов фрагменты ткани культивировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 10–14 дней. За время культивирования адгезировавшие к поверхности культурального пластика фибробластоподобные клетки образовали обширные зоны роста. Для пересева клеток на другую чашку использовали 0.25%-ный раствор Трипсин-ЭДТА (Gibco, Великобритания).

На 2-м пассаже при отсутствии явных признаков контаминации бактериями и грибами прекращали добавление в ростовую среду раствора антибиотиков и антимикотика. Криоконсервировали клетки на 4-м пассаже в кондиционированной среде, содержащей 10% криопротектора диметилсульфоксида (Биолот, Россия). Микробиологический анализ, проведенный через 10 пассажей после снятия клеток с антибиотиков и антимикотика, подтвердил отсутствие бактериальной, грибковой и микоплазменной контаминации. Таким образом, были получены две клеточные линии: MSC-DP-1 (от мальчика) и MSC-DP-2 (от девочки). Основные характеристики получали на 6-м и 7-м пассажах; динамику их изменений отслеживали при длительном культивировании.

Репликативное старение клеток. Оценивали активность фермента SA-β-галактозидазы. Клетки выращивали в чашках Петри (3.5 мм: Nunc, Дания) в течение 24–48 ч до образования субконфлюента. Затем среду удаляли и окрашивали клетки с помощью набора реактивов (Senescence Cells Histochemical Staining Kit, SIGMA, США), согласно инструкции. У клеток, вступающих в фазу РС, цитоплазма окрашивается в ярко синий цвет. Анализ проводили с помощью инвертированного микроскопа Nikon TS100 (Япония) на пассажах 6, 16, 25, 32, 42 для линии MSC-DP-1 и на пассажах 6 и 18 для линии MSC-DP-2. Долю окрашенных клеток (в %) определяли при подсчете не менее 1000 клеток в разных полях зрения на одну временную точку.

Характеристика пролиферативной активности.

1) **Эффективность клонирования** клеточных линий определяли в чашках Петри в условиях редкого посева (4 кл./см² — 100 клеток на 1 чашку 60 мм). Через 21 сут клетки окрашивали 1%-ным водным раствором кристалл-виолета и считали колонии. Эффективность клонирования определяли в % как отношение числа выросших колоний (клонов) к числу посе-

янных клеток. Учитывали колонии, состоящие из не менее 50 клеток. Эффективность клонирования анализировали на 6-, 16-, 24- и 39-м пассажах для линии MSC-DP-1 и на 6-, 16- и 18-м пассажах для линии MSC-DP-2.

2) **Индекс пролиферации (ИП)** — отношение числа клеток в текущий момент к исходному числу посеянных клеток. Строили кривые роста клеточных популяций согласно ИП в определенный момент времени. Для измерения среднего времени удвоения клеточной популяции каждый экспериментальный вариант повторяли 3 раза, ежедневно считали клетки в течение 120–192 ч. Среднее время одного удвоения клеточной популяции (a_0) определяли по формуле (Седова, 2008): $a_0 = t \ln 2 / \ln(M_t/M_0)$, где M_t — число клеток в момент времени t ; M_0 — начальное число клеток; t — время логарифмической фазы роста клеточной культуры. Анализ проводили на пассажах 6, 24 и 32 для линии MSC-DP-1, и на пассажах 6, и 18 для линии MSC-DP-2.

Кариотипический анализ полученных клеточных популяций. Для получения препаратов метафазных хромосом за 2 ч до фиксации в культуру вводили коллечимид (Demecolcine solution 10 мкг/мл в HBSS; Sigma, США) до конечной концентрации 0.1 мкг/мл, снимали клетки с субстрата смесью трипсина и версена (1 : 3), проводили гипотоническую обработку смесью 0.075 М раствора KCl и 1%-ного раствора цитрата натрия. Клетки фиксировали смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3 : 1). Для количественного кариотипического анализа препараты метафазных хромосом окрашивали водным раствором Гимза (1 : 50). Модальное число хромосом и пределы изменчивости клеток по числу хромосом определяли при анализе 100 метафазных пластинок; долю полиплоидных клеток оценивали при анализе 1000 метафазных пластинок для клеточных линий MSC-DP-1 и MSC-DP-2.

Для структурного кариотипического анализа проводили дифференциальное G-окрашивание хромосом в соответствии с ранее описанной методикой (Ozkinay, Mitelman, 1979). Анализировали 100 метафаз в каждом варианте. Клетки линии MSC-DP-1 анализировали на пассажах 6, 15, 24, 33, 42; клетки линии MSC-DP-2 — на пассажах 7 и 18. Кариотипы анализировали с помощью микроскопа Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, Германия) с системой автоматического кариотипирования Ikaros 4 Karyotyping System (MetaSystems, Germany) и описывали в соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека ICSCN (McGowan-Jordan et al., 2016).

Иммунофлуоресцентный анализ. Для иммунофлуоресцентного анализа (ИФА) наличия поверхностных маркеров, характерных для ЭСК, и маркеров ранней дифференцировки в производные 3-х зародышевых листков использовали антитела против SSEA-4, TRA-1-60 (Chemicon, США), SOX-2 и транскрипционного фактора Oct-4 (Santa Cruz, США). Для иммунофлуоресцентного анализа присутствия

маркеров ранней дифференцировки в производные 3-х зародышевых листков, использовали антитела против α -актина и гладкомышечного актина (тест на мезодерму), α -фетопротеина (тест на энтодерму) (Sigma, США) и нестина (тест на эктодерму) (Chemicon, США). Клетки выращивали на покровных стеклах, фиксировали 10%-ным раствором формалина (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин при комнатной температуре, пермеабелизовали 0.1%-ным раствором Тритона X100 в течение 15 мин при комнатной температуре, неспецифичные сайты связывания антител блокировали 0.1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем инкубировали с перечисленными выше антителами в течение ночи при 4°C. Все антитела разводили в соотношении 1 : 50. Для выявления локализации связанных с белками антител инкубировали препараты в течение ночи при 4°C с антителами против иммуноглобулинов мыши (FITC; Chemicon, США), разведенных в соотношении 1 : 500. Каждому этапу предшествовала трехкратная отмывка препаратов в PBS. Для выявления ядер препараты инкубировали с красителем Hoechst 33342 в концентрации 0.1 мкг/мл в течение 10 мин при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, инкубированные только с антителами против иммуноглобулинов мыши (FITC; Chemicon, США). Визуализацию проводили с помощью микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal (Германия). Анализировали на пассажах 6 и 39 (линия MSC-DP-1) и на пассажах 6 и 17 (линия MSC-DP-2).

Определение статуса МСК с помощью проточной цитофлуориметрии. Наличие поверхностных антигенов анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на цитометре Beckman Coulter (США). Присутствие каждого маркера оценивали по результатам 3-х экспериментов для клеток, находящихся на пассажах 6, 43 (линия MSC-DP-1) и на пассажах 6, 18 (линия MSC-DP-2). Иммунофенотипирование полученных клеточных линий проводили с помощью панели конъюгатов CD-маркерных моноклональных антител с флуорохромами. В работе использовали моноклональные антитела против CD-34, HLA-ABC и HLA-DR (Caltac, США), CD-44, CD-73, CD-105 (Beckman Coulter, США), CD-90 (Chemicon, США). В качестве негативного контроля использовали очищенные мышинные антитела IgG1/FITC и IgG1/RFE (DAKO, Дания). Клетки снимали с поверхности чашки с помощью 0.05%-ного раствора трипсина с версеном (Gibco, США) и отмывали от него раствором PBS, не содержащем ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (Биолот, Россия). Полученную суспензию клеток (1 млн/мл) в PBS делили на пробы по 30 мкл, добавляли к каждой из них по 3 мкл антител и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Далее пробы доводили до оптимального объема (0.3–0.4 мл) буфером FACS (PBS, содержащий 1% BSA и 0.05% азида натрия).

Индукция остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировки для определения статуса МСК. Использовали модифицированный метод (Reyes et al., 2001). Клетки высевали на покровные стекла, помещенные в культуральные чашки Петри диаметром 35 мм (50000 клеток на чашку). Через 1 сут меняли обычную ростовую среду на среду для адипогенной и остеогенной дифференцировок (StemPro; Gibco, США). Хондрогенную дифференцировку проводили в культуре микромасс в хондрогенной дифференцировочной среде (StemPro, Gibco, США). Индукцию проводили в течение трех недель, меняя среду каждые 7 сут.

Для идентификации остеогенной дифференцировки использовали выявление кальция по модифицированному методу Мак-Ги–Рассела (Луппа, 1980). Для этого клетки однократно промывали PBS без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} и фиксировали 10%-ным раствором формалина (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин. Окрашивание (красителем Alizarin Red Solution; Merck, Германия) в течение 30 с–5 мин (до проявления окраски) и визуализацию окрашенных в оранжево-красный цвет отложений кальция проводили под контролем микроскопа (Zeiss LSM 5 Pascal, Германия). Отмытые и высушенные стекла монтировали на предметное стекло.

Для идентификации адипогенной дифференцировки клетки промывали PBS без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , фиксировали в метаноле в течение 2 мин при –20°C. Затем клетки промывали 50%-ным этанолом и окрашивали красным масляным (Oil Red O solution; SIGMA, США) в течение 10 мин. Далее клетки промывали 50%-ным этанолом, затем дистиллированной водой и монтировали на предметные стекла. Визуализировали окрашенные капли жира (оранжево-красные) под микроскопом Zeiss LSM 5 Pascal (Германия).

Для идентификации хондрогенной дифференцировки из сформированных микромасс готовили мазки на трех предметных стеклах, фиксировали их содержимое 10%-ным раствором формалина (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин. Далее каждый из мазков окрашивали в течение 30 мин при комнатной температуре 1%-ным раствором толуидинового синего в 50%-ном изопропанол, или 0.1%-ным водным раствором сафранина, или 1%-ным раствором альцианового синего в 3%-ной уксусной кислоте (Sigma, США). Окрашенные мазки промывали дистиллированной водой, высушивали и монтировали под покровное стекло.

Идентификацию дифференцировок для линии MSC-DP-1 проводили на 6-м и 40-м пассажах; для линии MSC-DP-2 — на 6-м и 18-м пассажах.

Полученные в работе количественные результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $p < 0.05$.

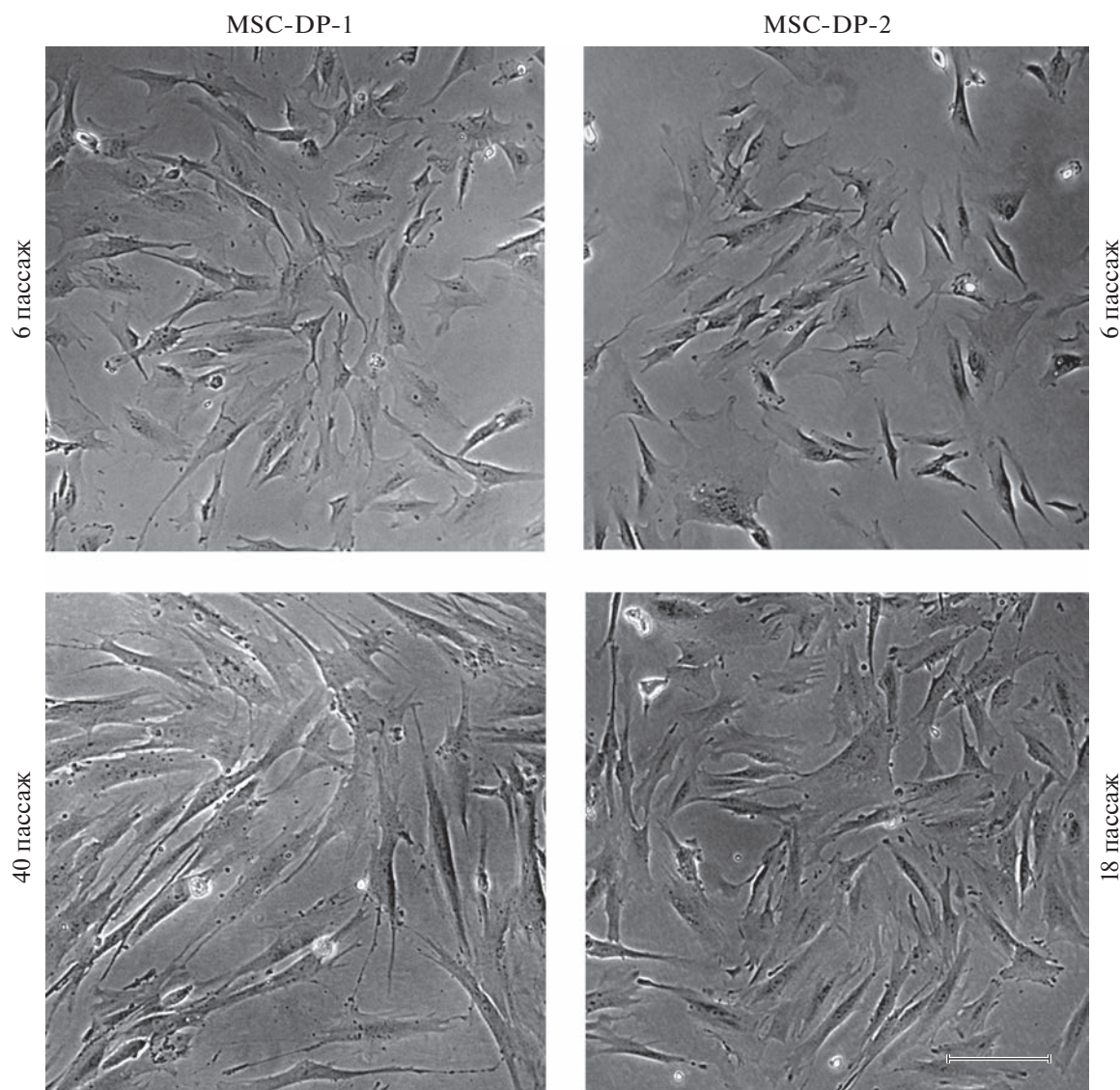


Рис. 1. Прижизненные фотографии клеточных линий MSC-DP-1 и MSC-DP-2 на пассажах 6, 40 и 6, 18 соответственно инвертированный световой микроскоп Nikon Eclipse TS100, Япония. Масштабная линейка: 200 мкм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологический анализ. Проведено культивирование выделенных из пульпы молочных зубов двух доноров фибробластоподобных клеток в течение 6 пассажей. В результате получены 2 линии, названные, согласно источнику получения, MSC-DP-1 (от мальчика) и MSC-DP-2 (от девочки). Морфологический анализ этих линий показал однородность клеточных популяций со средними по размеру вытянутыми фибробластоподобными клетками (рис. 1).

Репликативное старение клеток. Репликативное старение клеток оценивали по активности SA- β -галактозидазы в клеточных линиях MSC-DP-1 и MSC-DP-2 (табл. 1). В клетках линии MSC-DP-1 на пассажах 6, 16 и 25 обнаружена небольшая доля стареющих клеток, что свидетельствует об отсутствии

активного РС. При продолжении культивирования на пассаже 32 наблюдается значительное увеличение доли стареющих клеток, достигающее максимума на пассаже 42. В клетках линии MSC-DP-2 уже на 6-м пассаже наблюдается небольшая, но более высокая доля стареющих клеток по сравнению с клетками MSC-DP-1 ($p < 0.05$). К пассажу 18 эта доля клеток значительно увеличивается, что свидетельствует о вступлении клеток в активную стадию РС. Таким образом, установлен разный характер РС в процессе длительного культивирования исследуемых линий.

Проведенный сравнительный анализ характера РС с линией MSC-DP, ранее полученной из пульпы зуба 6-ти летней девочки (Кольцова и др., 2018), свидетельствует о различиях как между линиями МСК, выделенными из доноров женского пола, так и из до-

Таблица 1. Доля клеток с выраженной активностью β -галактозидазы (β -гал) в клетках линий MSC-DP-1 и MSC-DP-2 в процессе культивирования

Пассаж	MSC-DP-1		MSC-DP-2	
	число клеток	доля клеток с активностью β -гал, %	число клеток	доля клеток с активностью β -гал, %
6	1224	4.80 ± 0.60	1351	11.00 ± 0.85
16	1313	5.30 ± 0.62	—	—
18	—	—	1227	43.80 ± 1.41
25	1213	5.03 ± 0.63	—	—
32	1216	32.10 ± 1.30	—	—
42	1239	47.13 ± 1.42	—	—

Примечание. Показана доля клеток (%) и их ошибки при подсчете не менее 1000 клеток.

нора мужского пола. Эти результаты свидетельствуют, по-видимому, о генетических различиях между донорами, не связанными с их полом. Кроме усиления активности SA- β -галактозидазы, в клеточных линиях в процессе длительного культивирования существенно изменяется морфология клеток, выражающаяся в увеличении размеров и степени их распластанности, что тоже свидетельствует об активном РС (рис. 1). Эта характеристика одинакова во всех трех линиях. Еще одной характеристикой активного РС является наличие дебриса во всех линиях.

Ростовые характеристики. Эффективность клонирования клеток MSC-DP-1 на 6-м пассаже составляет $15.3 \pm 1.8\%$. Затем она снижается ($p < 0.05$) и составляет на 16- и 24-м пассажах соответственно 7.3 ± 0.7 и $6.0 \pm 1.2\%$. Надо отметить, что на этих сроках культивирования еще не наступает активное РС. По-видимому, нет однозначной корреляции между клоногенной активностью и уровнем РС. Тем не менее на 39-м пассаже, на стадии активного РС, клоногенная активность отсутствует.

Эффективность клонирования клеток MSC-DP-2 на 6-м пассаже составляет $16.6 \pm 2.8\%$, что совпадает с линией MSC-DP-1, несмотря на повышенную долю стареющих клеток в линии MSC-DP-2. Это еще раз подтверждает отсутствие связи между уровнем РС и клоногенной активностью. На 16-м пассаже на стадии активного РС имеет место снижение клоногенной активности до $6.6 \pm 0.9\%$, которая исчезает на 18-м пассаже. В целом эти результаты подтверждают ранее полученные данные о снижении уровня клоногенной активности в процессе РС и свидетельствуют о ее больших колебаниях между разными линиями (Lo Surdo et al., 2013; Szepesi et al., 2016; Кольцова и др., 2018, 2020; Мусорина и др., 2019).

Клеточная линия MSC-DP-1 на 6-м пассаже характеризуется активной пролиферацией (рис. 2). Анализ индексов пролиферации (ИП) в течение 120 ч позволяет сделать вывод о том, что логарифмическая фаза роста составляет 96 ч (от 0 до 96). Среднее время одного удвоения клеточной популяции

составляет 26.6 ± 0.32 ч. В процессе культивирования на 24-м пассаже логарифмическая фаза роста составляет 96 ч (от 0 до 96). Среднее время одного удвоения клеточной популяции составляет 30.1 ± 0.25 ч. Анализ ИП на 33-м пассаже свидетельствует о снижении пролиферативной активности (рис. 2, кривая 3). Так, логарифмическая фаза продолжается от 24 до 48 ч, затем наступает плато до 72 ч и последующее увеличение ИП до 96 ч, т.е. в целом она составляет 72 ч. Среднее значение ИП снижается и составляет на 24-м пассаже 6.38 ± 1.18 , на 33-м пассаже — 1.65 ± 0.24 ($p < 0.05$) (рис. 2, кривые 2 и 3). Эти результаты свидетельствуют о наступлении активной стадии РС. Среднее время одного удвоения клеточной популяции составляет 65.9 ± 5.4 . Таким образом, в процессе РС значительно увеличивается среднее время удвоения ($p < 0.05$), что характерно для большинства линий MCK (Garcia et al., 2016; de Witte et al., 2017; Кольцова и др., 2017, 2019; Koltsova et al., 2021).

Клеточная линия MSC-DP-2 на пассаже 6 характеризуется значительной пролиферативной активностью (рис. 3). Анализ (ИП) в течение 192 ч позволяет сделать вывод о том, что логарифмическая фаза роста составляет 72 ч (от 48 до 120 ч). Среднее время одного удвоения клеточной популяции составляет 37.5 ± 2.2 ч. В процессе культивирования на пассаже 18 логарифмическая фаза роста составляет 24 ч (от 72 до 96 ч). Среднее время одного удвоения клеточной популяции — 16.7 ± 0.4 . Таким образом, в отличие от линии MSC-DP-1, клетки линии MSC-DP-2 не увеличивают среднее время удвоения в процессе РС, а значительно снижают этот параметр. Отсутствие увеличения времени удвоения в процессе РС мы наблюдали еще в 2-х линиях: в линии MSC-DP, выделенной ранее из пульпы зуба, наблюдали сходство длительности времени удвоения на ранних и поздних пассажах, а в линии SC7-MSC, выделенной из линии ЭСК, этот параметр значительно снижался в процессе РС, подобно линии MSC-DP-2.

На основании формулы расчета среднего времени удвоения клеточной популяции (Седова, 2008) причиной отсутствия увеличения этого параметра в

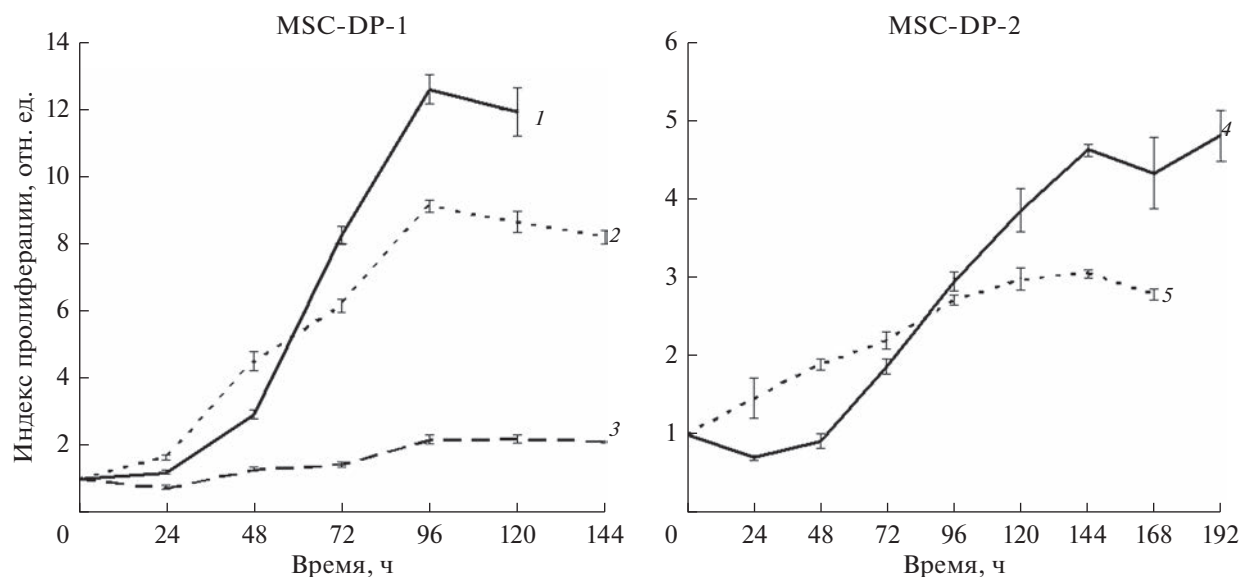


Рис. 2. Кривые роста клеток линии MSC-DP-1 на пассаже 6 (кривая 1), на пассаже 24 (кривая 2), на пассаже 33 (кривая 3) и клеток линии MSC-DP-2 на пассаже 6 (кривая 4), на пассаже 18 (кривая 5).

процессе РС можно считать несоответствие длительности логарифмической фазы величине ИП в некоторых линиях. По-видимому, изменение среднего времени удвоения клеточной популяции не является обязательным признаком РС. Проведенный в настоящей работе сравнительный анализ двух новых линий МСК с ранее полученной линией MSC-DP (Кольцова и др., 2018) свидетельствует о сходстве линий от одного пола (MSC-DP и MSC-DP-2) по отсутствию увеличения среднего времени удвоения клеточной популяции в стадии активного РС и о различии по этому параметру между линиями разного пола (MSC-DP и MSC-DP-1). Но на клетках линии SC7-МСК, выделенной из ЭСК мужского пола, также показано отсутствие увеличения времени удвоения популяции в активной стадии РС (Кольцова и др., 2022).

Таким образом, в нашей работе, проведенной на небольшом числе линий, нельзя связать характер пролиферативной активности с полом донора. Кроме этого, линии MSC-DP-1 и MSC-DP-2 значительно различаются между собой по пролиферативной активности на раннем 6-м пассаже. Средние ИП составляют на 6-м пассаже 7.29 ± 2.25 и 3.01 ± 0.59 соответственно ($p < 0.05$) (рис. 2, кривые 1 и 4). А линия MSC-DP (от девочки) совпадает по ИП с линией MSC-DP-1 (от мальчика) и значительно отличается от линии MSC-DP-2 (от девочки). Это также косвенно подтверждает неоднозначность гендерных различий. На стадии активного РС величины ИП в клетках MSC-DP-1 и MSC-DP-2 уменьшаются и составляет 1.65 ± 0.24 и 2.44 ± 0.22 соответственно ($p < 0.05$) (рис. 2, кривые 3 и 5).

Кариотипический анализ. Проведен кариотипический анализ линии MSC-DP-1 на пассажах 6, 15, 24,

33 и 42 и линии MSC-DP-2 на пассажах 7 и 18. Клетки линии MSC-DP-1 сохраняли нормальный диплоидный кариотип мужского пола 46,XY с модальным диплоидным числом хромосом 46 на пассажах 6, 15, 24 и 33. На пассаже 42 наблюдаются отличия распределения клеток по числу хромосом от нормального кариотипа: пределы изменчивости по числу хромосом составляют 44–47 с модальным числом хромосом 45 (54.0 ± 5.0) и субмодальным числом хромосом 46 (31.0 ± 4.6). Доля полиплоидных клеток на 4-х пассажах, не имеющих кариотипических аномалий,

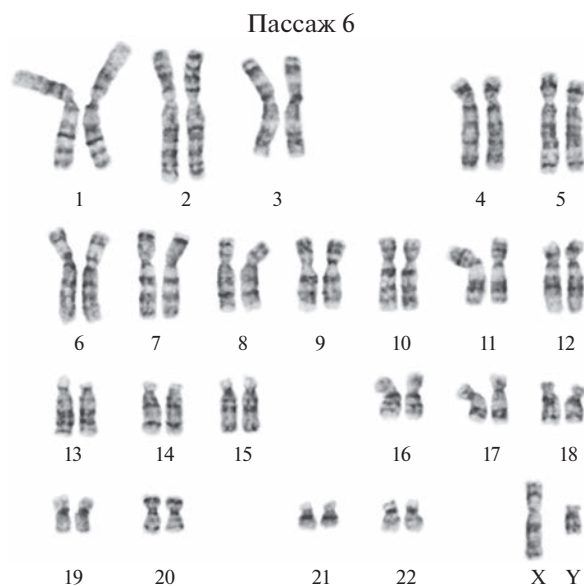


Рис. 3. Кариотип клеточной линии MSC-DP-1 на 6-м пассаже. Нормальный кариотип: 46,XY.

составила в среднем 4.6%, а на пассаже 42 — 3.0%. Таким образом, принципиальных различий не обнаружено.

Структурный анализ кариотипа линии MSC-DP-1 на 6-м, 15-м, 24-м и 33-м пассажах не выявил хромосомных перестроек. Для иллюстрации нормального кариотипа этой линии представлен кариотип на 6-м пассаже на рис. 3. На 42-м пассаже нормальный диплоидный кариотип (46,XY) был обнаружен только в 23% клеток при анализе 100 метафазных пластинок (рис. 4а). В 77% клеток обнаружены 104 структурные перестройки хромосом: 40.4% транслокаций, 39.4% дицентрических хромосом (ДХ), преимущественно по типу теломерных ассоциаций, а также 12.5% аномальных хромосом с неидентифицированным дополнительным материалом и 2.9% маркерных хромосом. Далее рассмотрим подробнее типы и количество обнаруженных 104-х хромосомных изменений.

В клеточной линии MSC-DP-1 на 42-м пассаже выявлен структурный вариант кариотипа (СВК) с перестройками хромосом 14 и 20 (44 клетки). Так, в 12-ти клетках присутствовала ДХ dic(14;20)(p13;q13.3) (рис. 4б); в 32-х клетках — дериват хромосомы 20, der(20)t(14;20)(q11.1;q13.3), образовавшийся, по-видимому, в результате утраты короткого плеча и центромерного района хромосомы 14 (рис. 4в). Кроме того, в двух клетках с ДХ dic(14;20)(p13;q13.3) и в 9 клетках с der(20)t(14;20)(q11.1;q13.3) обнаружены дополнительные перестройки других хромосом, в том числе клональная перестройка, ДХ dic(15;21)(q26;p13) (рис. 4б, в).

В 33-х клетках обнаружены различные клональные и неклональные перестройки хромосом (рис. 4г, д).

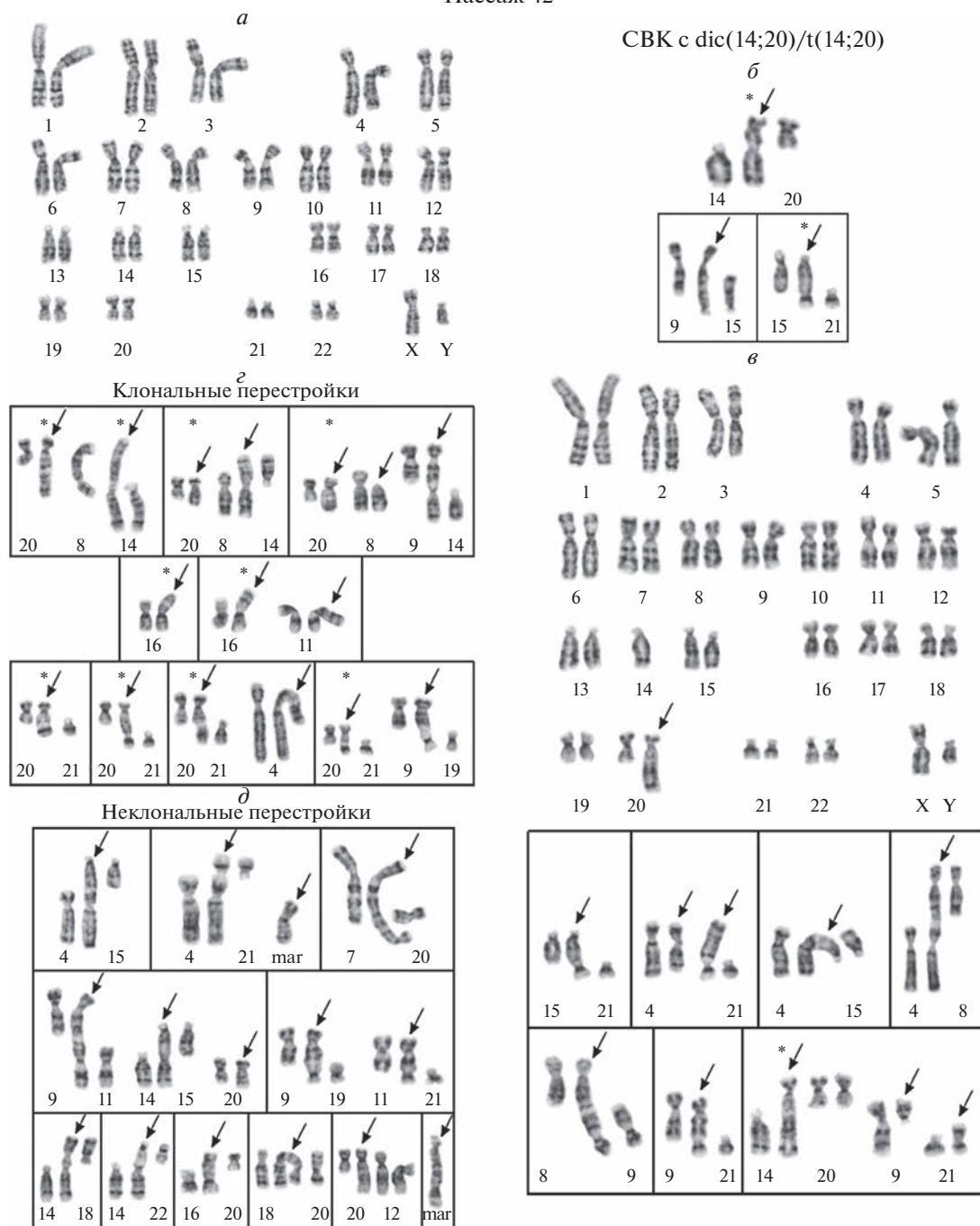
Клональные перестройки выявлены в 13-ти клетках (рис. 4е): в 4-х клетках обнаружена транслокация хромосом 8 и 20 с разными точками разрыва в прицентромерном районе хромосомы 8. Короткое плечо хромосомы 8 обнаруживали либо в составе ДХ dic(8;20)(q11.2;q13.3) в сочетании с транслокацией хромосом 8 и 14, t(8;14)(q11.2;p13) (2 клетки), либо в составе деривата хромосомы 20 der(20)t(8;20)(p11.2;q13.3) в сочетании с ДХ dic(8;14)(p11.2;p13) в одной клетке, или ДХ dic(9;14)(q34;p13) и делецией хромосомы 8, del(8)(p11.2) — в другой. В 3-х клетках обнаружена аномальная хромосома 16, add(16)(p13.3) с появлением неидентифицированного дополнительного материала на коротком плече. В одной из таких клеток обнаружена аномальная хромосома 11 с дополнительным, также неидентифицированным, материалом на коротком плече, add(11)(p15). В 6-ти клетках выявлена ДХ dic(20;21)(q13.3;p13), в одной из которых эта аномалия сочеталась с перестройкой хромосомы 4, а в другой — с ДХ dic(9;19)(q34;p13.3).

В остальных 20-ти клетках выявлены неклональные перестройки (рис. 4д). В перестройках преимущественно участвовали хромосомы 20 (57.7%) и 14 (51.9%), с меньшей частотой — хромосомы 21 (15.4%), 9 (10.6%), 15 (7.7%), 4 (6.7%) и 8 (6.7%). В перестройки избирательно вовлекались терминальные районы хромосом 20q13.3, 21p13, 15q26, 9q34, терминальные и прицентромерные районы хромосом 14, 8 и 4.

В клетках линии MSC-DP-2 на пассаже 7 имеет место нормальный диплоидный кариотип женского пола, 46,XX, который выявлен в 98 клетках (рис. 6). В двух клетках обнаружена клональная перестройка хромосом 1 и 12 (2%), приводящая к трисомии по длинному

Рис. 4. Кариотип клеточной линии MSC-DP-1 на 42-м пассаже. *а* — Нормальный кариотип, 46,XY. *б* — Дицентрическая хромосома (ДХ) dic(14;20)(20pter→20q13.3::14p13→14qter) в СВК 45,XY,dic(14;20)(p13;q13.3). На врезке показаны аномалии хромосом, выявленные в двух клетках с dic(14;20)(p13;q13.3) и числом хромосом 44: ДХ dic(9;15)(9pter→9q22::15q26→15pter); ДХ dic(15;21)(15pter→15q26::21p13→21qter). *в* — Кариотип клеток с транслокацией хромосом 14 и 20, 45,XY,t(14;20)(20pter→20q13.3::14q11.1→14qter); на врезке показаны аномалии хромосом, выявленные в клетках с t(14;20)(q11.1;q13.3); *в верхнем ряду* — ДХ dic(15;21)(15pter→15q26::21p13→21qter); транслокации хромосом 4, 14 и 21 с образованием ДХ dic(4;14)(4pter→4q12::14p13→14qter) и деривата хромосомы 21 der(21)(4qter→4q12::21p13→21qter); ДХ dic(4;15)(15pter→15q26::4p16→4qter); ДХ dic(4;8)(8pter→8q24.3::4p16→4qter); *в нижнем ряду* — ДХ dic(8;9)(8pter→8q24.3::9q34→9pter); ДХ dic(9;21)(9pter→9q34::21p13→21qter); дополнительная копия хромосомы 20, делеция хромосомы 9 del(9)(pter→q12::) и изодицентрическая хромосома idic(21)(qter→p13::p13→qter) в клетке с транслокацией t(14;20)(q11.1;q13.3) и числом хромосом 46. *г* — На врезке показаны выявленные клональные перестройки хромосом; *в верхнем ряду* — транслокации хромосом 8, 14 и 20 с образованием ДХ dic(8;20)(20pter→20q13.3::8q11.2→8pter) и деривата хромосомы 14 der(14)(8qter→8q11.2::14p13→14qter); транслокации хромосом 8, 14 и 20 с образованием деривата хромосомы 20 der(20)(20pter→20q13.3::8p11.2→8pter) и ДХ dic(8;14)(8qter→8p11.2::14p13→14qter); транслокация хромосом 8 и 20 с образованием der(20)(20pter→20q13.3::8p11.2→8pter), делеция хромосомы 8 del(8)(p11.2→qter), ДХ dic(9;14)(9pter→9q34::14p13→14qter); *в среднем ряду* — хромосома 16 с дополнительным неидентифицированным материалом на коротком плече add(16)(p13.3→qter); add(16)(p13.3→qter) и хромосома 11 с дополнительным неидентифицированным материалом на коротком плече add(11)(p15→qter); *в нижнем ряду* — ДХ dic(20;21)(20pter→20q13.3::21p13→21qter); ДХ dic(20;21)(20pter→20q13.3::21p13→21qter); ДХ dic(20;21)(q13.3;p13) и хромосома 4 с дополнительным неидентифицированным материалом на коротком плече add(4)(p16→qter); ДХ dic(20;21)(q13.3;p13) и ДХ dic(9;19)(9pter→9q34::19p13.3→19qter). *д* — На врезке показаны некоторые неклональные перестройки хромосом, выявленные в отдельных клетках; *в верхнем ряду* — ДХ dic(4;15)(15pter→15q26::4p16→4qter); ДХ dic(4;21)(21qter→21p13::4p16→4qter) и маркерная хромосома; ДХ dic(7;20)(7pter→7q36::20q13.3→20pter); *в среднем ряду* — ДХ dic(9;11)(9pter→9q34::11p15→11qter), ДХ dic(14;15)(15pter→15q26::14p13→14qter) и хромосома 20 с дополнительным неидентифицированным материалом на длинном плече add(20)(pter→q13.3::); ДХ dic(9;19)(9pter→9q34::19q13.4→19pter) и ДХ dic(11;21)(11pter→11q25::21p13→21qter); *в нижнем ряду* — ДХ dic(14;18)(18qter→18p11.3::14p13→14qter); ДХ dic(14;22)(22pter→22q13::14p13→14qter); ДХ dic(16;20)(20pter→20q13.3::16p13.3→16qter); ДХ dic(18;20)(20pter→20q13.3::18p11.3→18qter); дериват хромосомы 20 с дополнительным материалом длинного плеча хромосомы 12 der(20)(20pter→20q13.3::12q13→12qter); маркерная хромосома. *Стрелками* указаны структурно перестроенные хромосомы; *звездочкой* отмечены клональные перестройки хромосом.

Пассаж 42



плечу хромосомы 1, der(12)t(1;12)(q12;q24.3) (рис. 6, врезка), но количественно не превышающая установленные критерии для кариотипически нормальных линий (Barkholt et al., 2013). На пассаже 18 клетки имели нормальный диплоидный кариотип 46,XX. Доля полиплоидных клеток составляла 6.0% на 7-м пассаже и 0.8% на 18 пассаже.

Проведенный структурный кариотипический анализ при длительном культивировании показал

появление ДХ на основе теломерных ассоциаций в процессе активного РС. Подобное явление ранее было обнаружено и в некоторых других линиях в процессе РС. Причем обнаружено преимущественное участие в образовании теломерных ассоциаций 14 и 21 хромосом (Кольцова и др., 2018, Мусорина и др., 2019). Появление теломерных ассоциаций было ранее показано в разных “безмаркерных” иммортализованных и неиммортализованных диплоидных линиях при стрессовых ситуациях и при старении. Надо отме-

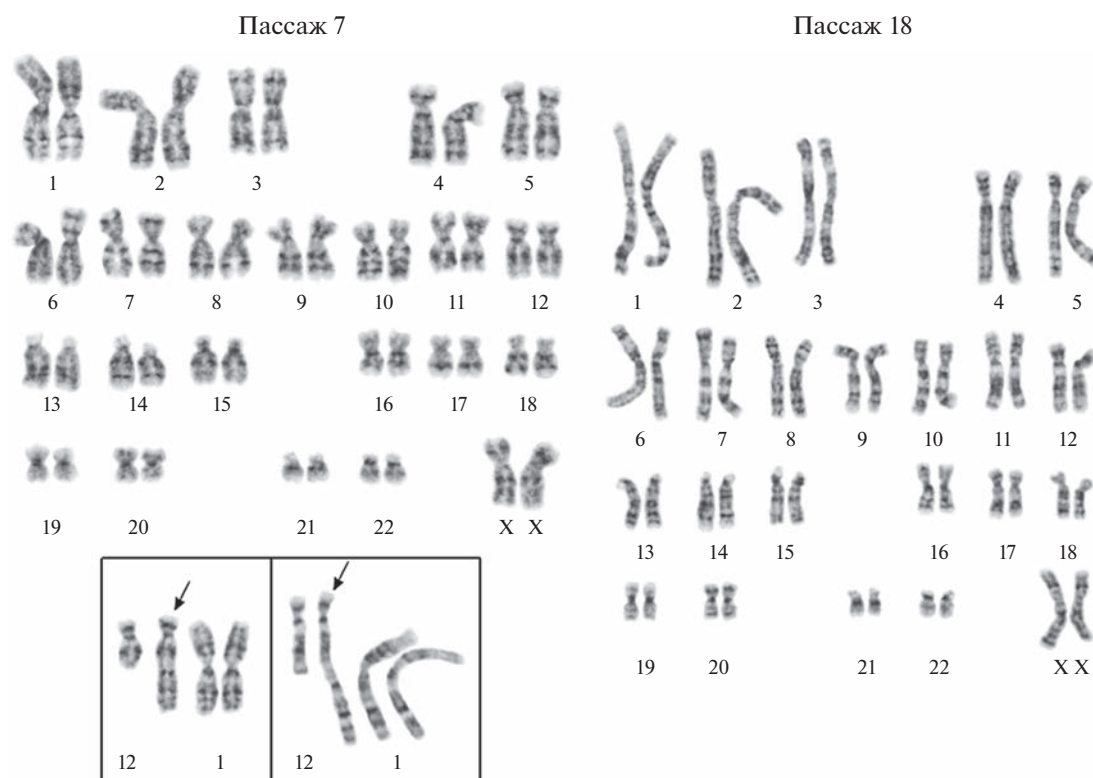


Рис. 5. Кариотипы клеточной линии MSC-DP-2 на 7-м и 18-м пассажах. Пассаж 7: нормальный кариотип: 46,XX. На врезке показана структурная перестройка хромосом 1 и 12, приводящая к трисомии по длинному плечу хромосомы 1, обнаруженная в двух клетках: дериват хромосомы 12 $\text{der}(12)(12\text{pter} \rightarrow 12\text{q}24.3::1\text{q}12 \rightarrow 1\text{qter})$ разной степени конденсации (стрелки). Пассаж 18: нормальный кариотип: 46,XX.

тить, что РС нельзя считать индуцированным разными воздействиями стрессом. Но тем не менее процесс РС постепенно способствует ухудшению и, в конечном счете, остановке клеточных процессов, характерных для МСК на ранних и средних пассажах. По-видимому, в процессе РС происходит завершение генетической программы онтогенеза данных клеток. Анализ характерных черт теломерных ассоциаций, включая и преимущественное участие определенных хромосом в их образовании, проведенный на большом “безмаркерном” клеточном материале, позволил сделать вывод, что роль теломерных ассоциаций в таких клеточных линиях, по-видимому, состоит не в создании кариотипической нестабильности, что связано с обычными хромосомными aberrациями, а в образовании генетических структур, обеспечивающих систему адаптации клеточной популяции к неблагоприятным факторам (Benn, 1976; Matsumura et al., 1979; Хейфлик, 1997; Полянская, 2000; Полянская, Вахтин, 2003). Возможно, что этот механизм имеет место и при РС. Но, исходя из нерегулярности появления этих структур в процессе РС в разных линиях МСК, нельзя сделать вывод об этом явлении, как обязательном при РС.

Результаты ИФА. Показана экспрессия маркеров ранней дифференцировки ЭСК в производные трех

зародышевых листков в обеих линиях с помощью иммунофлуоресцентного анализа (рис. 7). Идентифицированы следующие маркеры: альфа-актинин (маркер мезодермы), альфа-фетопротейн (маркер энтодермы) и нестин (маркер эктодермы). Эти результаты совпадают с более ранними данными, полученными на других линиях МСК, включая линию MSC-DP. Причем, наличие экспрессии этих маркеров в МСК разного происхождения было показано при использовании разных методов. Предположительно, функциональная роль этих маркеров связана либо с дифференцировочной пластичностью МСК, либо с эмбриональным происхождением МСК. Известно, что МСК могут дифференцироваться не только в производные мезодермы, но и в производные эктодермы и энтодермы (Riekstina et al., 2009; Huang et al., 2010; Sensebé et al., 2010; Antonucci et al., 2011; Mamidi et al., 2011; Кольцова и др., 2015, 2018; Ding et al., 2015).

Существенно отметить, что на ранних и поздних пассажах в обеих линиях отсутствуют клетки, несущие маркеры недифференцированных ЭСК: SSEA-4, Oct-4, SOX2. Исключение составляет TRA-1-60, который присутствует на ранних и поздних пассажах в линии MSC-DP-1 (данные не представлены). Информация о наличии этих маркеров в разных МСК противоречива. Есть исследования, свидетельству-

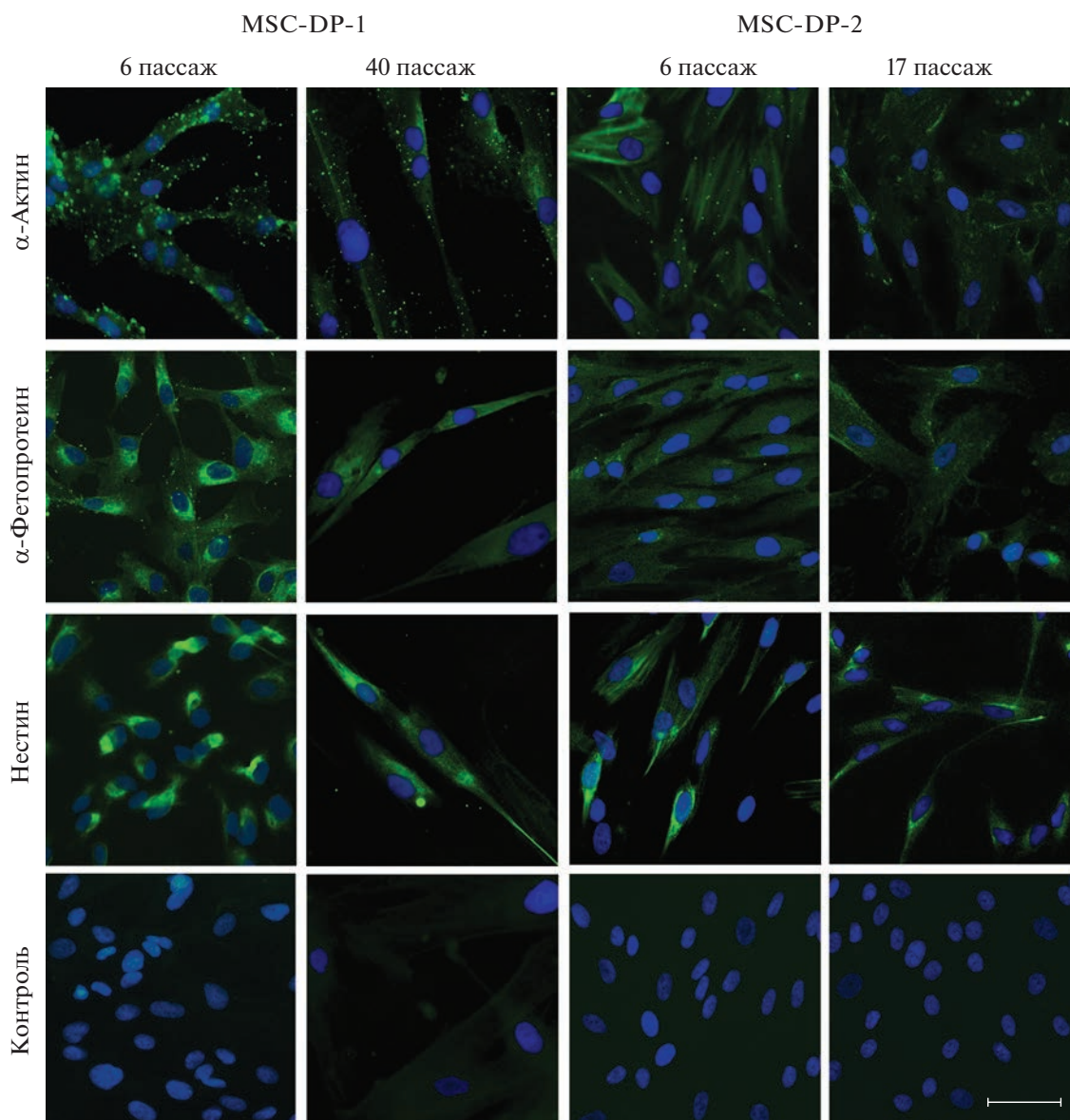


Рис. 6. Флуоресценция маркеров ранней дифференцировки ЭСК в линиях мезенхимных стволовых клеток MSC-DP-1 на пассажах 6, 40 и MSC-DP-2 на пассажах 6, 17. Показаны маркеры мезодермы (α -актина), энтодермы (α -фетопротеина) и эктодермы (нестина). Окраска соответствующими моноклональными антителами. Масштабная линейка: 50 мкм.

ющие об их отсутствии или присутствии некоторых из них. Есть данные, предположительно подтверждающие их участие в процессах пролиферации и дифференцировки МСК, согласно наличию корреляции между уровнем экспрессии некоторых маркеров и уровнем пролиферации и дифференцировки некоторых МСК (Крылова и др., 2012; Кольцова и др., 2017; Полянская, 2018). Но, исходя из полученных в этом исследовании результатов, сложно провести корреляцию между указанными параметрами. Так, несмотря на отсутствие этих маркеров, наблюдается высокая пролиферативная активность в линии MSC-DP-1, а присутствие маркера TRA-1-60 не спо-

собствует ее увеличению в этой линии на поздних пассажах. Сравнение экспрессии этих маркеров в клетках линий MSC-DP и MSC-DP-1 показало различия только по наличию в линии MSC-DP экспрессии маркера SSEA-4 на раннем пассаже, что не привело к увеличенной пролиферативной активности или увеличению дифференцировочного потенциала по сравнению с линией MSC-DP-1. Таким образом, вопрос о роли Oct-4, SSEA-4, SOX2 и TRA-1-60 в функциональной деятельности МСК пока остается открытым.

Анализ поверхностных антигенов для определения статуса МСК. Поверхностные антигены МСК полу-

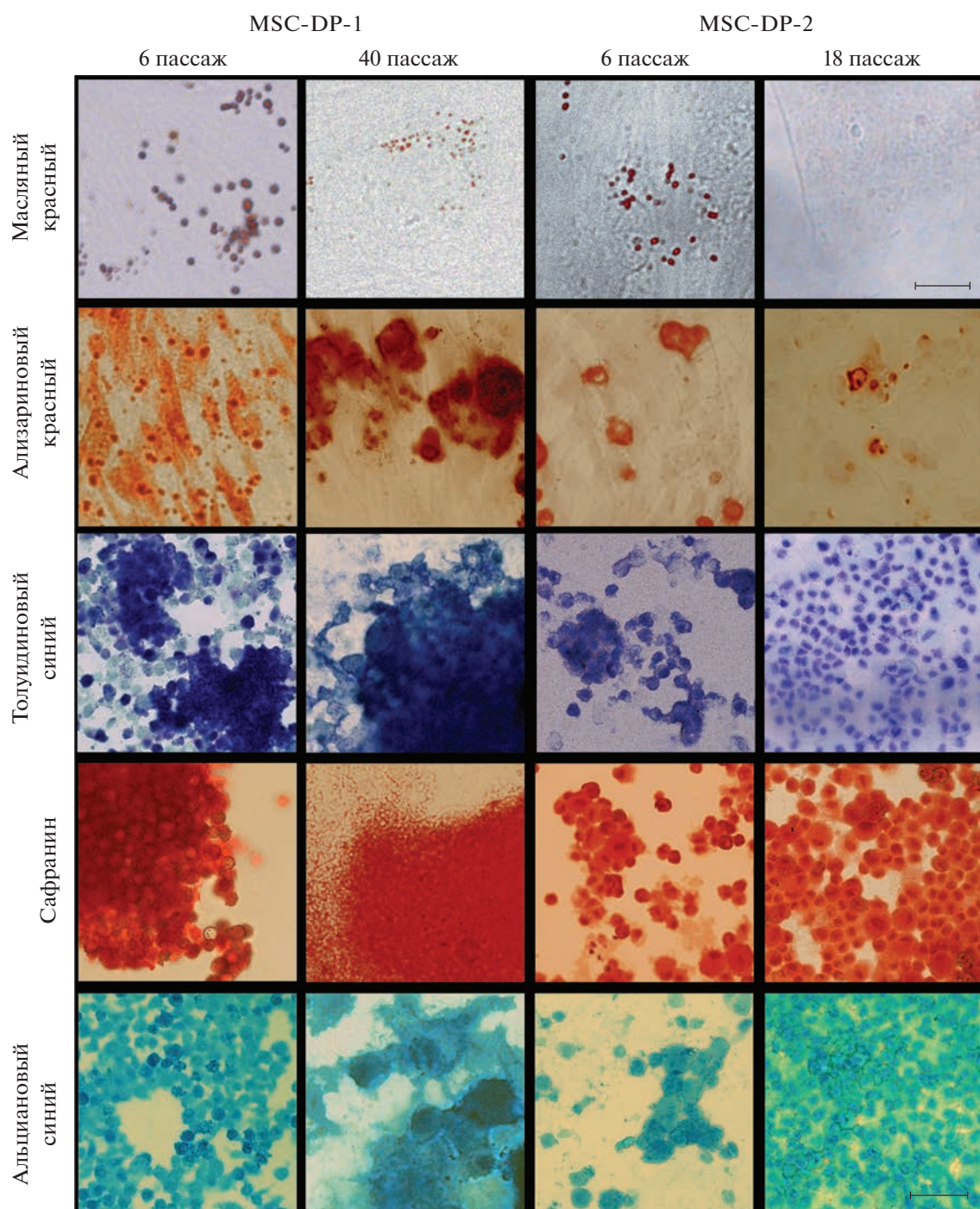


Рис. 7. Дифференцировка клеточных линий MSC-DP-1 и MSC-DP-2 в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях на пассажах 6, 40 и на пассажах 6, 18 соответственно. Показаны окрашивание жировых включений масляным красным (адипогенез), окрашивание ализариновым красным комплексов с кальцием (остеогенез) и окрашивание толуидиновым синим сульфатированных глюкозаминогликанов, сафранином протеогликанов и альциановым синим кислых глюкозаминогликанов (хондрогенез). Масштабная линейка: 10 мкм для адипогенеза и 50 мкм для остеогенеза и хондрогенеза.

ченных линий анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии и подтвердили наличие у них статуса МСК (табл. 2). Для популяций обеих линий и ранее полученной линии MSC-DP характерна большая доля клеток, несущих характерные для

МСК антигены CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC и небольшая часть клеток с антигенами CD34, CD45 и HLA-DR. Никаких принципиальных различий между линиями на ранних и поздних пассажах не обнаружено.

Таблица 2. Доля клеток (%), несущих разные поверхностные маркеры в линиях MSC-DP-1 и MSC-DP-2

Маркер	MSC-DP-1, пассаж 6	MSC-DP-1, пассаж 43	MSC-DP-2, пассаж 6	MSC-DP-2, пассаж 18
CD44	99.99 ± 0.007	99.84 ± 0.16	99.98 ± 0.02	99.90 ± 0.04
CD73	99.86 ± 0.03	99.76 ± 0.18	99.93 ± 0.00	99.54 ± 0.15
CD90	99.91 ± 0.04	99.96 ± 0.04	100.00 ± 0.00	99.88 ± 0.05
CD105	91.67 ± 2.38	97.46 ± 1.50	96.90 ± 0.49	99.46 ± 0.10
HLA-ABC	100.00 ± 0.00	95.62 ± 0.76	99.66 ± 0.07	99.68 ± 0.13
HLA-DR	0.62 ± 0.12	0.97 ± 0.45	0.18 ± 0.11	0.28 ± 0.09
CD45	0.52 ± 0.01	1.32 ± 0.42	0.54 ± 0.18	0.53 ± 0.04
CD34	0.67 ± 0.11	1.19 ± 0.49	0.58 ± 0.12	1.19 ± 0.08

Примечание. Даны средние значения доли клеток (несущих маркер) и их ошибки (%) из 3 экспериментов.

Индукция остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировки для определения статуса МСК. Результаты анализа дифференцировочного потенциала в клеточных линиях MSC-DP-1 и MSC-DP-2 представлены на рис. 8. Представленные данные свидетельствуют о наличии адипогенной дифференцировки клеток в линии MSC-DP1 на 6-м пассаже, уровень которой снижается на позднем 40-м пассаже. В отличие от этих клеток, в клетках MSC-DP-2 наблюдается ослабленный характер этой дифференцировки на 6-м пассаже и ее полное отсутствие на позднем 18-м пассаже. Остеогенная и хондрогенная дифференцировки присутствуют в обеих линиях на раннем и позднем пассажах. Таким образом, полученные результаты в целом подтверждают положение о том, что обе линии по этой характеристике соответствуют статусу МСК на раннем пассаже. Далее в процессе РС происходит ослабление или исчезновение дифференцировочного потенциала, что также характеризует МСК. Как правило, это относится не ко всем 3-м дифференцировкам, а отдельным в разных линиях. В нашем случае это явление затронуло адипогенную дифференцировку: частично в линии MSC-DP-1 и полностью — в линии MSC-DP-2. Сравнение этих линий с MSC-DP свидетельствует о различиях между ними, которые связаны с полным отсутствием адипогенной дифференцировки на раннем и позднем пассажах клеток MSC-DP (Кольцова и др., 2018).

В целом сравнительный анализ клеточных популяций, выделенных из двух линий МСК, полученных из пульпы зуба разных доноров, свидетельствует о наличии межлинейных различий по разным статусным характеристикам МСК в процессе РС.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны А.М. Кольцовой (ИНЦ РАН) за предоставление МСК на раннем пассаже.

В работе было использовано оборудование ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, имеющего финансовую поддержку Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-683).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания (№ АААА-А19-119020-190093-9) Института цитологии РАН и поддержана Министерством науки и высшего образования РФ по проекту 15.БРК.21.0011 (соглашение № 075-15-2021-1063).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не было экспериментов с участием животных и людей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2018. Получение и характеристика линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из пульпы молочного зуба человека. Цитология. Т. 60. № 12. С. 955. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2018. The derivation and characterization of mesenchymal stem cell line, isolated from human pulp of a deciduous tooth. Tsitologiya. V. 60. P. 955.) <https://doi.org/10.1134/S0041377118120015>
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2015. Характеристика новой линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эмбриональных стволовых клеток человека. Цитология. Т. 57. № 11. С. 761. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2015. Characteristics of new mesenchymal stem cell line derived from human embryonic stem cells. Tsitologiya. V. 57. № 11. P. 761.)
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Петросян М.А., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2020. Получение и характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из разных областей плаценты одного донора. Цитология. Т. 62. № 9. С. 713. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Petrosyan M.A., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2021. Isolation and characterization of Mesenchymal Stem Cell Line Derived from different regions of the placenta of the same donor. Cell Tiss. Biol. V. 15. P. 356.) <https://doi.org/10.31857/S0041377120090035>
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2019. Получение и характеристика линии мезенхимных стволовых клеток, выделенной из

- десны человека. Цитология. Т. 61. № 8. С. 658. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2019. The derivation and characterization of mesenchymal stem cell line, isolated from human gingival. Tsitologiya. V. 61. P. 658.)
<https://doi.org/10.1134/S0041377119080029>
- Кольцова А.М., Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2017. Динамика свойств двух линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из Вартонова студня пупочного канатика человека, при длительном культивировании. Цитология. Т. 59. № 9. С. 574. (Koltsova A.M., Krylova T.A., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2017. Dynamics properties of two lines of mesenchymal stem cells, derived from the Wharton's jelly of the human umbilical cord, during long-term cultivation. Tsitologiya. V. 59. P. 574.)
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Шатрова А.Н., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2022. Получение и характеристика разных популяций мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эмбриональных стволовых клеток человека линии SC7. Цитология. Т. 64. № 5. С. 411. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Shatrova A.N., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2022. The derivation and characterization of different populations of mesenchymal stem cells, isolated from embryonic stem cells line – SC7. Tsitologiya. V. 64. № 5. P. 411.)
<https://doi.org/10.31857/S0041377122050054>
- Крылова Т.А., Кольцова А.М., Зенин В.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2012. Сравнительные характеристики новых линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток, костного мозга и крайней плоти человека. Цитология. 54. № 1. С. 5. (Krylova T.A., Koltsova A.M., Zenin V.V., Musorina A.S., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2012. Comparative characteristics of new mesenchymal stem cell lines derived from human embryonic stem cells, bone marrow and foreskin. Tsitologiya. V. 54. P. 5)
- Луппа Х. 1980. Методы гистохимического выявления неорганических веществ. В кн.: Основы гистохимии. М.: Мир. С. 267. (Luppa H. 1980. Methods of histochemical detection of inorganic substances. In: Fundamentals of histochemistry. Moscow: Mir. P. 267.)
- Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2019. Характеристика неиммортизированной линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эпикардальной жировой ткани человека. Цитология. Т. 61. № 4. С. 272. (Musorina A.S., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. 2019. Characterization of a nonimmortalized mesenchymal stem cell line isolated from human epicardial adipose tissue. Cell Tiss. Biol. V. 13. P. 247.)
- Полянская Г.Г. 2000. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях (обзор). Успехи современной биологии. Т. 120. С. 529. (Poljanskaya G.G. 2000. The regularity of karyotypic variability in cell cultures during long-term cultivation under different conditions (review). Successes of the modern biol. V. 120. P. 529.)
- Полянская Г.Г. 2018. Сравнительный анализ характеристик линий мезенхимных стволовых клеток человека, полученных в коллекции культур клеток позвоночных (обзор). Клеточные культуры. № 34. С. 3. (Poljanskaya G.G. 2018. Comparative analysis of the lines of human mesenchymal stem cells derived in the collection of cell cultures of vertebrates (review). Collection "Cell cultures". V. 34. P. 3).
- Полянская Г.Г., Вахтин Ю.Б. 2003. Кариотипическая структура клеточных популяций in vitro как целостная система (обзор). Цитология. Т. 45. № 2. С. 115. (Poljanskaya G.G., Vakhtin Yu.B. 2003. The karyotypic structure of cell populations in vitro as integral system (review). Tsitologiya. V. 45. № 2. P. 115.)
- Седова Г.П. 2008. Количественные аспекты злокачественного роста. Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал. Т. 7. (Sedova G.P. 2008. Quantitative aspects of malignant body height. Mathematical morphology. Electronic Math. Medicobiol. J. V. 7.) URL: <http://sgma.alpha-design.ru/MMORPH/N-18-html/sedova/sedova.htm>
- Хейфлик Л. 1997. Смертность и бессмертие на клеточном уровне. Биохимия. Т. 62. № 11. С. 1380. (Hayflick L. 1997. Mortality and immortality at the cellular level. Biochemistry. V. 62. № 11. P. 1380).
- Aksu A., Rubin J., Dudas J., Marra K. 2008. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. Ann. Plast. Surg. V. 60. P. 306.
<https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e3180621ff0>
- Antonucci I., Stuppia L., Kaneko Y., Yu S., Tajiri N., Bae E.C., Chheda S.H., Weinbren N.L., Borlongan C.V. 2011. Amniotic fluid as rich source of mesenchymal stromal cells for transplantation therapy. Cell Transplant. V. 20. P. 789.
<https://doi.org/10.3727/096368910X539074>
- Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., Büscher D., Fibbe W., Foussat A., Kwa M., Lantz O., Mačulaitis R., Palomäki T., Schneider C.K., Sensebé L., Tachdjian G., Tarte K., Tosca L., Salmikangas P. 2013. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies-bridging scientific observations and regulatory viewpoints. Cytother. V. 15. P. 753.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.03.005>
- Benn P.A. 1976. Specific chromosome aberrations in senescent fibroblast cell lines derived from human embryos. Am. J. Hum. Genet. V. 28. P. 465.
- Bongso A., Fong C.Y. 2013. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cell Rev. V. 9. P. 226.
<https://doi.org/10.1007/s12015-012-9418-z>
- Chen Y., Wang X., Wu Z., Jia S., Wan M. 2023. Epigenetic regulation of dental-derived stem cells and their application in pulp and periodontal regeneration. Biochem., Biophys. Mol. Biol. V. 11: e14550.
<https://doi.org/10.7717/peerj14550>
- De Witte S.F.H., Lambert E.E., Merino A., Strini T., Douben H.J.C.W., O'Flynn L., Elliman S.J.,

- de Klein A.J.E.M.M., Newsome P.N., Baan C.C., Hoogduijn M.J. 2017. Aging of bone marrow- and umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells during expansion. *Cytotherapy*. V. 9. P. 798.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.02.074>
- Ding D.C., Chang Y.H., Shyu W.C., Lin S.Z. 2015. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant*. V. 24. P. 339.
<https://doi.org/10.3727/096368915X686841>
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Int. Soc. Cell. Ther. position statement*. *Cytother*. V. 8. P. 315.
<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Garcia J., Wright K., Roberts S., Kuiper J.H., Mangham C., Richardson J., Mennan C. 2016. Characterisation of synovial fluid and infrapatellar fat pad derived mesenchymal stromal cells: The influence of tissue source and inflammatory stimulus. *Sci Rep*. V. 6: 24295.
<https://doi.org/10.1038/srep24295>
- Jayasinghe M., Prathiraja O., Prashan B., Jena R., Silva M., Weerawarna P., Singhal M., Kayani A., Karnakoti S., Jain S. 2022. The role of mesenchymal stem cells in the treatment of type 1 diabetes. *Cureus*. V. 14: e27337.
<https://doi.org/10.7759/cureus.27337>
- Jin Q., Yuan K., Lin W., Niu C., Ma R., Huang Z. 2019. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and adipose tissue for bone regeneration potential. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol*. V. 47. P. 1577.
<https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1594861>
- Hatore A., Fujii Y., Kawase-Koga Y., Ogasawara T., Chikira J., Minami S., Yamakawa D., Chikazu D. 2023. VCAM-1 and GFPT-2: predictive markers of osteoblast differentiation in human dental pulp stem cells. *Bone*. V. 166: 116575.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2022.116575>
- Hezan K., Mo R., Wang C., Yue L., Zongjin L. 2022. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells and their secretomes in pneumonia. *Curr. Pharm. Biotechnol*. V. 23. P. 1153.
<https://doi.org/10.2174/1389201022666210907115126>
- Hoang D., Pham P., Bach T., Ngo A., Nguyen Q., Phan T., Nguyen G., Le P., Hoang V., Forsyth N., Heke M., Nguyen L. 2022. Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal Transduct. Target. Ther*. V. 7. P. 272.
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-01134-4>
- Huang H.I., Chen S.K., Ling Q.D., Chien C.C., Liu H.T., Chan S.H. 2010. Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. *Tiss. Eng. (A)*. V. 16. P. 1491.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0431>
- Kerkis I., Caplan A.I. 2012. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tiss. Eng. Part B Rev*. V. 18. P. 129.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2011.0327>
- Li J., Xu S.-Q., Zhao Y.-M., Yu S., Ge L.-H., Xu B.-H. 2018. Comparison of the biological characteristics of human mesenchymal stem cells derived from exfoliated deciduous teeth, bone marrow, gingival tissue, and umbilical cord. *Mol. Med. Rep*. V. 18. P. 4969.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9501>
- Liu A., Zhang X., He H., Zhou Li., Naito Y., Sugita S., Lee J.-W. 2020. Therapeutic potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived secretome and vesicles for lung injury and disease. *Expert Opin. Biol. Ther*. V. 20. P. 125.
<https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1689954>
- Lo Surdo J.L., Millis B.A., Bauer S.R. 2013. Automated microscopy as a quantitative method to measure differences in adipogenic differentiation in preparations of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. V. 15. P. 1527.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.04.010>
- Mamidi M.K., Pal R., Mori N.A., Arumugam G., Thirichelvam S.T., Noor P.J., Abdullah H.M., Gupta P.K., Das A.K., Zakaria Z., Bhonde R. 2011. Co-culture of mesenchymal-like stromal cells derived from human foreskin permits long term propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *J. Cell Biochem*. V. 112. P. 1353.
<https://doi.org/10.1002/jcb.23052>
- Matsumura T., Zerrudo Z., Hayflick L. 1979. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *J. Gerontol*. V. 34. P. 328.
<https://doi.org/10.1093/geronj/34.3.328>
- Mou C., Wang X., Li W., Li Z., Liu N., Xu Y. 2023. Efficacy of mesenchymal stromal cells intraspinal transplantation for patients with different degrees of spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *Cytotherapy*. V. 25. P. 530.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2023.01.012>
- McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M. 2016. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger. 140 p.
- Navarro L., Chen X., Viviescas L.T., Ardila-Roa A., Luna-Gonzalez M., Sossa C., Arango-Rodriguez M. 2022. Mesenchymal stem cells for critical limb ischemia: their function, mechanism, and therapeutic potential. *Stem Cell Res. Ther*. V. 13. P. 345.
<https://doi.org/10.1186/s13287-022-03043-3>
- Ozkinay C., Mitelman F. 1979. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas*. V. 90. P. 1.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1979.tb01287.x>
- Payne K., Didiano D., Chu C. 2010. Donor sex and age influence the chondrogenic potential of human femoral bone marrow stem cells. *Osteoarthritis Cartilage*. V. 18. P. 705.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2010.01.011>
- Pischiutta F., Caruso E., Cavaleiro H., Salgado A., Loane D., Zanier E. 2022. Mesenchymal stromal cell secretome for traumatic brain injury: Focus on immunomodulatory action. *Exp. Neurol*. V. 357: 114199.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114199>
- Poljanskaya G., Bobkov D., Koltsova A., Musorina A., Mikhailova N. 2022. Creation, working principles, development of applied and scientific activities of the Collection of Cell Cultures of Vertebrate. (review). *Biol. Commun*. V. 67. P. 312.
<https://doi.org/10.21638/spbu03.2022.406>
- Rahmani-Moghadam E., Zarrin V., Mahmoodzadeh A., Owrang M., Talaei-Khozani T. 2022. Comparison of the characteristics of Breast Milk derived stem cells with the stem cells derived

- from the other sources: a comparative review. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* V. 17. P. 71.
<https://doi.org/10.2174/1574888X16666210622125309>
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C.M.* 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* V. 98. P. 2615.
<https://doi.org/10.1182/blood.v98.9.2615>
- Riekstina U., Cakstina I., Parfejevs V., Hoogduijn M., Jankovskis G., Muiznieks I., Muceniece R., Ancans J.* 2009. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev.* V. 5. P. 378.
<https://doi.org/10.1007/s12015-009-9094-9>
- Scibetta A., Morris E., Liebowitz A., Gao X., Lu A., Philippon M., Huard J.* 2019. Characterization of the chondrogenic and osteogenic potential of male and female human muscle-derived stem cells: Implication for stem cell therapy. V. 37. P. 1339.
<https://doi.org/10.1002/jor.24231>
- Semenova E., Grudniak M.P., Machaj E.K., Bocian K., Chroscinska-Krawczyk M., Trochonowicz M., Stepaniec I.M., Murzyn M., Zagorska K.E., Boruckowski D., Kolanowski T.J., Oldak T., Rozwadowska N.* 2021. Mesenchymal stromal cells from different parts of umbilical cord: approach to comparison and characteristics. *Stem Cell Rev. Rep.* V. 17. P. 1780.
<https://doi.org/10.1007/s12015-021-10157-3>
- Sensebé L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P., Giordano R.* 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* V. 98. P. 93.
<https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01227.x>
- Sharma Y., Shobha K., Sundeep M., Pinelli V., Parveen S., Dhanushkodi A.* 2022. Neural basis of dental pulp stem cells and its potential application in Parkinson's disease. *CNS Neurol. Disord. Targets.* V. 21. P. 62.
<https://doi.org/10.2174/1871527320666210311122921>
- Shin S., Lee J., Kwon Y., Park K.-S., Jeong J.-H., Choi S.-J., Bang S., Chang J., Lee C.* 2021. Comparative proteomic analysis of the mesenchymal stem cells secretome from adipose, bone marrow, placenta and Wharton's jelly. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 845.
<https://doi.org/10.3390/ijms22020845>
- Sousa A., Coelho P., Leite F., Teixeira C., Rocha A., Santos I., Baylina P., Fernandes R., Soares R., Costa R., Gomes A.* 2023. Impact of umbilical cord mesenchymal stromal/stem cell secretome and cord blood serum in prostate cancer progression. *Hum. Cell.* V. 36. P. 1160.
<https://doi.org/10.1007/s13577-023-00880-z>
- Stanko P., Kaiserova K., Altanerova V., Altaner C.* 2014. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* V. 158. P. 373.
<https://doi.org/10.5507/bp.2013.078>
- Szepesi Á., Matula Z., Szigeti A., Várady G., Szalma J., Szabó G., Uher F., Sarkadi B., Németh K.* 2016. *In vitro* characterization of human mesenchymal stem cells isolated from different tissues with a potential to promote complex bone regeneration. *Stem Cells Int.* V. 2016: 3595941.
<https://doi.org/10.1155/2016/3595941>
- Tai C., Wang L., Xie Y., Gao T., Huang F., Wang B.* 2021. Analysis of key distinct biological characteristics of human placenta-derived mesenchymal stromal cells and individual heterogeneity attributing to donors. *Cell Tiss. Organs.* V. 210. P. 45.
<https://doi.org/10.1159/000513038>
- Tesiye M., Gol M., Fadardi M., Kani S., Costa A., Ghasemi-Kasman M., Biagini G.* 2022. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the treatment of epilepsy and their interaction with antiepileptic medications. *Cells.* V. 11. P. 4129.
<https://doi.org/10.3390/cells11244129>
- Topoluk N., Hawkins R., Tokish J., Mercuri J.* 2017. Amnionic mesenchymal stromal cells exhibit preferential osteogenic and chondrogenic differentiation and enhanced matrix production compared with adipose mesenchymal stromal cells. *Am. J. Sports Med.* V. 45. P. 2637.
<https://doi.org/10.1177/0363546517706138>
- Turano E., Scambi I., Virla F., Bonetti B., Mariotti R.* 2023. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells: towards novel therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24. P. 2917.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032917>
- Wu W., Zhou J., Xu C.-T., Zhang J., Jin Y.-J., Sun G.-L.* 2022. Derivation and growth characteristics of dental pulp stem cells from patients of different ages. *Mol. Med. Rep.* V. 12. P. 5127.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4106>
- Yi X., Liu F., Chen F., Wang Y., Gao Y.* 2022. Comparison of biological characteristics of placenta mesenchymal stem cells derived from fetus. *Chin. J. Biotechnol.* V. 38. P. 1183.
<https://doi.org/10.13345/j.cjb.210244>
- Yang K., Lu R., Lu J., Fan S., Zhang Q., Lou Z., Ma Y., Lu G., Pan R., Zhang J.* 2022. Phenotypic and functional characterizations of mesenchymal stem/stromal cells isolated from human cranial bone marrow. *Front. Neurosci.* V. 16: 909256.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.909256>
- Yigitbilek F., Conley S.M., Tang H., Saadiq I.M., Jordan K.L., Lerman L.O., Taner T.* 2021. Comparable in vitro function of human liver-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells: implications for cell-based therapy. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 9: 641792.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.641792>
- Zhang Z., Yang X., Cao X., Qin A., Zhao J.* 2022. Current applications of adipose-derived mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration: a review of cell experiments, animal models, and clinical trials. *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 10: 942128.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.942128>
- Zou D., Vigen M., Putman A., Cao C., Tarle S., Guinn T., Kaigler D.* 2022. Phenotypic, trophic, and regenerative properties of mesenchymal stem cells from different osseous tissues. *Cell Tiss. Res.* V. 388. P. 75.
<https://doi.org/10.1007/s00441-021-03563-z>

The Derivation and Comparative Characterization of Mesenchymal Stem Cell Lines, Isolated from Human Pulp of a Deciduous Tooth of Children of Different Sexes

A. S. Musorina^a *, V. I. Turilova^a, A. N. Shatrova^a, T. K. Yakovleva^a, and G. G. Poljanskaya^a **

^a*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

**e-mail: anam18@inbox.ru*

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

Two new non-immortalized fibroblast-like cell lines isolated from the pulp of Deciduous Tooth of Children of Different Sexes, named MSC-DP-1 and MSC-DP-2, were derived and characterized. In order to confirm the status of mesenchymal stem cells, a comparative analysis of some characteristics in these lines was carried out at early and late passages. In the process of long-term cultivation, significant interline differences were revealed in the nature of replicative senescence (RS) and in growth characteristics. The MSC-DP-1 line was characterized by a later entry into the active stage of RS and more active proliferation compared to the MSC-DP-2 line. Karyotypic analysis showed that both lines have a normal human diploid karyotype at early passages. At the late (18th passage), in the stage of active PS, the MSC-DP-2 line also has a normal karyotype. And the MSC-DP-1 line, which enters the active stage of RS much later (at passage 42), has an abnormal karyotype with a large number of clonal chromosomal rearrangements. Both lines showed a high proportion of cells carrying antigens characteristic of human MSCs: CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, and a low frequency of cells with CD34, CD45, and HLA-DR antigens. The cells of the derived lines at an early passage have the ability to differentiate in adipogenic, osteogenic and chondrogenic directions. But the MSC-DP-2 line shows weaker differentiation in the adipogenic direction, than the MSC-DP-1 line. In the process of RS, a significant weakening of adipogenic differentiation takes place in the MSC-DP-1 line, and it disappears in the MSC-DP-2 line. The activity of other differentiations does not change during RS. In general, the derived results confirm the status of MSCs for the derived lines and indicate interline differences in the RS process. However, the derived differences between these lines, as well as the comparison with the previously derived line MSC-DP do not indicate their gender nature. Apparently, they are associated with the genetic characteristics of different donors.

Keywords: human mesenchymal stem cells, replicative senescence, proliferative activity, cell surface markers, karyotype, differentiation

УДК 576.08:576.31

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ EA.hy926 МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ И СКАНИРУЮЩЕЙ ИОН-ПРОВОДЯЩЕЙ МИКРОСКОПИИ

© 2023 г. С. Н. Плескова^{1, 2, *}, Н. А. Безруков¹, Е. Н. Горшкова¹, С. З. Бобык¹, Е. В. Лазаренко^{1, 2}

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, научно-исследовательская лаборатория сканирующей зондовой микроскопии, Нижний Новгород, 603950 Россия

²Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева, кафедра “Нанотехнологии и биотехнологии”, Нижний Новгород, 603115 Россия

*E-mail: pleskova@mail.ru

Поступила в редакцию 18.04.2023 г.

После доработки 28.04.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

Разработана и апробирована двухсекционная аналитическая система для исследования культуры эндотелиальных клеток EA.hy926 в режиме реального времени с высоким разрешением. Показано, что релевантные результаты дает метод сканирующей ион-проводящей микроскопии, поскольку он обеспечивает отсутствие механических воздействий на клетки, и с его помощью возможно сканирование на мембранах, обеспечивающих окружение эндотелиальных клеток питательной средой. Метод дал возможность визуализировать не только изменения поверхности клеток в процессе длительного сканирования, но и детектировать внеклеточные (микрофиламенты) и внутриклеточные (ядрышко) структуры. Построение карт ригидности позволило определить, что значение жесткости мембран эндотелиоцитов находится в диапазоне от 357 до 796 Па. Через 240 мин от начала наблюдения начиналось формирование апоптозных тел эндотелиальными клетками, при этом ригидность самих клеток постепенно нарастала, а апоптозных тел — уменьшалась.

Ключевые слова: эндотелиоциты, апоптоз, ригидность мембраны, морфология клетки, микроструктуры, двухсекционная аналитическая камера, сканирующая ион-проводящая микроскопия, атомно-силовая микроскопия

DOI: 10.31857/S0041377123050073, **EDN:** GZFWWG

Культура эндотелиальных клеток часто используется для исследования транспортных функций и проникновения лекарственных веществ через гематоэнцефалический барьер (Roux, Couraud, 2005; Helms et al., 2016) и для моделирования процессов трансэндотелиальной миграции иммунокомпетентных клеток и бактерий. Еще одним важным практическим направлением использования эндотелиальных клеток является создание васкуляризированных композитных тканей (Kérourédan et al., 2019; Shah Mohammadi et al., 2021). Для оценки эффективности физиологических процессов и конструкторов необходимо развитие методов, позволяющих наблюдать за культурами клеток в динамике с высоким разрешением. Не менее важной задачей является оценка механических свойств эндотелиальных тканей, как в нативных структурах, так и в “строительных блоках”

применяемых в тканевой инженерии (Kosheleva et al., 2022). Высокоразрешающая микроскопия открывает новые возможности в изучении клеток и субклеточных структур.

В отличие от электронной микроскопии (сканирующей и просвечивающей), которая получает одномоментные изображения клеток (Watanabe et al., 2014), сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) позволяет исследовать динамические процессы в режиме реального времени. Основными преимуществами методов СЗМ являются следующие: 1) динамические наблюдения за клетками с высоким разрешением в нативной среде с возможностью модификации состава среды, внесением различных модуляторов и регистрацией немедленного отклика на эти изменения; 2) механические манипуляции на уровне отдельных клеток (например, доставка в клетку лекарственных веществ или, напротив, извлечение молекул); 3) определение вязко-упругих, зарядовых, фрикционных, гидрофобных свойств клеток с построением карт распределения этих свойств по по-

Принятые сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия; ПЭТГ — полиэтилентерефталатгликоль; СЗМ — сканирующая зондовая микроскопия; СИПМ — сканирующая ион-проводящая микроскопия; PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

верхности клеток; 4) оценка прочности адгезионных контактов между клетками; 5) изготовление сенсорных панелей для медицинской диагностики (Плескова, 2011).

В настоящее время, для исследования процессов трансэндотелиальной миграции применяются стандартные трансвеллы (Bai et al., 2017), представляющие собой двухкамерные системы, где в лунку культурального планшета помещается специальный вкладыш с мембраной. Однако из-за особенностей геометрии они не подходят для методов высокоразрешающей микроскопии. Поэтому цель настоящей работы заключалась в разработке двухкамерной системы, которая позволит вести длительные динамические наблюдения за культурой эндотелиальных клеток методами высокоразрешающей микроскопии и сравнение методов атомно-силовой микроскопии (АСМ) и сканирующей ион-проводящей микроскопии (СИПМ) для определения изменений морфологии и ригидности культуры эндотелиальных клеток.

В работе стояли следующие задачи: 1) смоделировать и изготовить двухкамерную систему, в которой эндотелиальная клеточная линия EA.hy926 выращивается на мембране, а сверху и снизу окружена питательной средой; 2) отработать оптимальные условия для длительного наблюдения за эндотелиальными клетками методами высокоразрешающей микроскопии (АСМ и СИПМ); 3) выявить изменения морфологии и ригидности эндотелиальных клеток в режиме реального времени при динамическом наблюдении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Клеточная культура эндотелиоцитов. Использовали перевиваемую клеточную линию EA.hy926 – гибрид аденокарциномы A549 легкого человека с первичной линией эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC). Клетки были получены в НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта (Санкт-Петербург). Пересев клеточных линий осуществляли 1 раз в течение 3–4 сут по общепринятой методике (Marin et al., 2001), дезинтеграцию монослоя вызывали с помощью раствора трипсина с ЭДТА (3 мин, 37°C). Клетки пассировали по достижении ими 90–100%-ного монослоя. Для создания монослоя на мембране клетки культивировали в среде DMEM-F12, содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ЕД/мл пенициллина, 8 мМ L-глутамина (Portable MiniNB 203M, N-Biotek, Южная Корея) в течение 72 ч при 37°C и 5% CO₂.

Создание аналитической камеры для наблюдения за культурой клеток EA.hy926 в режиме реального времени с высоким разрешением. Методом 3D-печати создали вкладыши, фиксирующие мембраны в полистироловой чашке Петри диаметром 35 мм (Corning,

США). Вкладыши изначально моделировали с использованием программного обеспечения AutoCAD (Autodesk, Inc., США), после чего изготавливали с помощью 3D-принтера QQ-S PRO с прямым экструдером (FLSun, Китай) из полиэтилентерефталатгликольного (ПЭТГ) пластика. Выбор пластика обусловлен пригодностью ПЭТГ-изделий к обработке химическими агентами, например, перекисью водорода (Grzelak et al., 2021). Готовые изделия отмывали в 5%-ной перекисью водорода (6 ч), ополаскивали дистиллированной водой, высушивали на воздухе и использовали в экспериментах неограниченное количество раз с повторной процедурой отмывки между экспериментами.

Мембраны для формирования монослоя. Учитывая геометрию приборов, использовали мембранные вкладыши с диаметром 24 мм для проведения АСМ-исследований или с диаметром 6.5 мм для сканирования методом СИПМ. Для выращивания монослоя и последующего сканирования тестировали необработанные мембраны из эфиров целлюлозы, ацетата целлюлозы, нитрата целлюлозы, полиамида с диаметром пор 0.2 мкм (Владисарт, Россия), мембраны из поликарбоната, полученные из трансвеллов с адгезионным покрытием и диаметром пор 0.4 мкм (Corning, США) и аналогичные мембраны, но с диаметром пор 3 мкм (SPL Lifesciences, Южная Корея). Культуру клеток EA.hy926 в начальной концентрации 4×10^5 кл./мл высаживали на мембраны и культивировали, как описано выше. Контроль роста проводили оптически (Olympus IX71, Япония).

Буферный раствор для длительного динамического наблюдения за культурой EA.hy926. Для длительного наблюдения за клетками методами высокоразрешающей микроскопии важен буферный раствор с оптимальным уровнем pH, значение которого длительно поддерживается на заданном уровне и который обеспечивает жизнеспособность клеток, достаточную для изучения изменений их морфологии и ригидности (Glasser et al., 1985). Были апробированы стерильный физиологический раствор (0.9% NaCl), фосфатно-солевой буфер (PBS), раствор Хенкса, содержащий 2 мМ L-глутамина или 2 мМ L-глутамина и 10 мМ HEPES, среда RPMI-1640 с 2 мМ L-глутамина и среда DMEM-F12 с 2 мМ L-глутамина.

Трехсуточную культуру EA.hy926 отмывали от DMEM-F12 и культивировали в одном из буферов. Каждый час определяли изменение уровня pH, после измерения которого снимали клетки с помощью раствора Версена (ПанЭко, Россия) и определяли жизнеспособность по окрашиванию йодистым пропидием (1 мкг/мл, Sigma, США) с помощью проточного цитофлуориметра CytoflexS (BeckmanCoulter, США).

Сканирование монослоя культуры EA.hy926 методом АСМ. Мембрану диаметром 24 мм с выращенным на ней монослоем эндотелиальных клеток отмывали экспериментальной средой от DMEM-F12 и

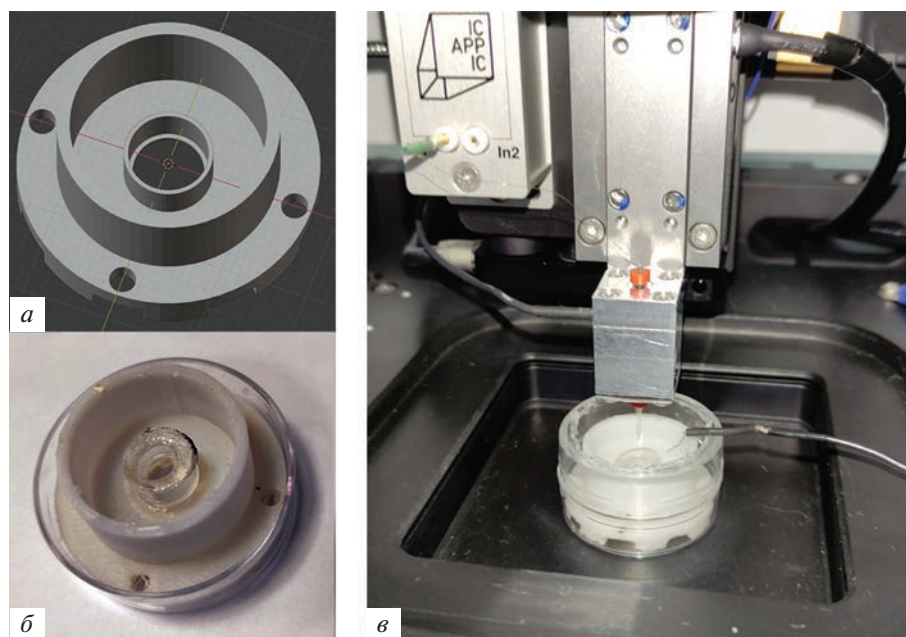


Рис. 1. Схема создания аналитической двухсекционной камеры для полного окружения средой культуры эндотелиальных клеток EA.hy926. *а* – первоначальный чертеж камеры в программе AutoCAD (Autodesk, Inc., США); *б* – двухсекционная аналитическая камера, изготовленная из ПЭТГ методом 3D-печати с вложенной мембраной; *в* – камера, встроенная в сканирующий ион-проводящий микроскоп.

помещали в аналитическую камеру, заполненную 2.5 мл экспериментальной среды. Поверхность мембраны сканировали с помощью атомно-силового микроскопа NTEGRA (НТ-МДТ, Россия) с использованием зондов MLCT-C (Bruker, США) в резонансном режиме. Полученные изображения обрабатывали в программе Gwyddion (GNU, Чехия).

Сканирование и измерение ригидности клеток методом СИПМ. Аналитическую камеру заполняли 2.5 мл экспериментальной среды, после чего в ней фиксировали отмытую экспериментальной средой мембрану с монослоем эндотелиоцитов.

Мембрану 6.5 мм с выращенным монослоем эндотелиальных клеток стерильно отмывали экспериментальной средой от DMEM-F12 и помещали в чашку Петри с ПЭТГ, таким образом культура клеток EA.hy926 оказывалась с обеих сторон окружена экспериментальной средой. Клетки сканировали с использованием сканирующего ион-проводящего микроскопа (ICAPPIC Ltd., Великобритания; ООО НАНОПРОФАЙЛИНГ, Россия). Сканирование проводили в “прыжковом режиме” со скоростью падения 100 нм/мс при потенциале смещения 200 мВ с использованием нанокapилляров в качестве зондов. Нанокapилляры с характерным внутренним радиусом кончика 25–50 нм получали на лазерном пуллере P-2000 (Sutter Instruments, США). Ригидность клеток определяли по напряжению, оказываемому нанокapилляром на клетку, в диапазоне уменьшения ионного тока от 0.5 до 2%, регистрируемого усилителем MultiClamp 700 В (Molecular Devices, Вели-

кобритания). Обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения ICAPPIC (ICAPPIC Ltd., Великобритания). Определяли модуль Юнга, основываясь на модели Герца (Pleskova et al., 2021), значения выражали в Па.

Статистическая обработка данных. Для обработки данных использовали программу Origin 8.0 (Origin Lab Corporation, США). Определяли границы нормального распределения количественных показателей выборок с использованием критерия Шапиро–Уилка. Поскольку распределения соответствовали критериям нормальности, определяли среднее и среднеквадратичное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Создание аналитической камеры для исследования методами СЗМ. Методом 3D-печати смоделировали и изготовили двухсекционные камеры, разделенные мембранами с выращенным на них монослоем культуры эндотелиальных клеток EA.hy926. При создании камер учитывали геометрию головок разных СЗМ. Этапы создания аналитической камеры отражены на рис. 1. В аналитическую камеру помещали поликарбонатную мембрану с выращенным в стерильных условиях монослоем эндотелиальных клеток культуры EA.hy926.

Оптимальные условия роста монослоя культуры EA.hy926 на мембранах. Выявлено, что на рост монослоя на мембране влияли свойства мембраны (материал, размер пор, покрытие поверхности), началь-

Таблица 1. Изменение уровня pH и жизнеспособности эндотелиальных клеток культуры EA.hy926 в процессе инкубации с разными буферными растворами

Раствор	Значение pH			Жизнеспособность, %	
	начальный уровень	через 1 ч	через 2 ч	через 1 ч	через 2 ч
Стерильный физиологический	7.40	6.79	6.67	82.6 ± 9.7	69.3 ± 23.5
PBS	7.65	7.15	7.12	89.7 ± 3.0	72.7 ± 9.3
Хенкса + 2 мМ L-глутамина	7.27	6.86	6.95	88.9 ± 6.0	81.3 ± 12.3
Хенкса + 2 мМ L-глутамина + 10 мМ HEPES	7.38	7.04	7.08	90.3 ± 4.0	85.9 ± 2.4
RPMI-1640 + 2 мМ L-глутамина	7.85	7.64	7.70	91.9 ± 2.0	77.2 ± 10.44
DMEM-F12 + 2 мМ L-глутамина	7.75	7.65	7.74	86.8 ± 10.4	80.7 ± 7.5

ная концентрация клеток и время культивирования. Апробировали варианты мембран, состоящие из ацетата целлюлозы, нитрата целлюлозы или полиамида с диаметром пор 0.2 мкм, а также мембраны из целлюлозы или поликарбоната с диаметром пор 0.4 и 3 мкм и диаметром мембраны 24 и 6.5 мм, с наличием и отсутствием адгезионного покрытия. Все варианты необработанных мембран характеризовались плохой адгезией эндотелиальных клеток и не обеспечивали формирование монослоя. Кроме того, все целлюлозные мембраны теряли натяжение по мере смачивания, что исключало возможность проведения экспериментов методами СЗМ. Поликарбонатные мембраны обеспечивали хорошую адгезию клеток, но стабильное формирование монослоя эндотелиоцитов отмечали только при начальной концентрации 2.5×10^5 кл./мл. Критичным для формирования монослоя эндотелиоцитов оказался также диаметр пор: большой диаметр пор (3 мкм) не позволял формировать монослой эндотелиоцитов, тогда как поры меньшего диаметра обеспечивали равномерное разрастание клеток. Было протестировано несколько начальных концентраций EA.hy926: 1.5×10^5 , 2×10^5 , 2.5×10^5 и 4×10^5 кл./мл. Время культивирования варьировало от 48 до 72 ч.

Оптимальными для длительного высокоразрешающего исследования оказались поликарбонатные мембраны с адгезионным покрытием и диаметром пор 0.4 мкм, поскольку они давали стабильно воспроизводимый рост монослоя эндотелиальных клеток. Оптимальное время культивирования составило 72 ч при начальной концентрации эндотелиальных клеток 2.5×10^5 .

Оптимальная среда для длительных наблюдений за культурой эндотелиальных клеток в двухсекционной аналитической камере. Для длительных динамических наблюдений за культурой EA.hy926 методами СЗМ были апробированы разные растворы: стерильный физиологический раствор (0.9% NaCl); PBS; раствор Хенкса, содержащий 2 мМ L-глутамин или 2 мМ L-глутамин и 10 мМ HEPES; среда RPMI-1640 с 2 мМ L-глутамин и среда DMEM-F12

с 2 мМ L-глутамин. Результаты замеров значений pH и определения жизнеспособности эндотелиальных клеток при использовании разных буферов суммированы в табл. 1. Начальная жизнеспособность эндотелиальных клеток находилась на уровне 98–99%.

Из полученных данных очевидно, что “бедные” среды, такие как стерильный физиологический раствор и PBS, не обеспечивают ни поддержания стабильного уровня pH, ни, как следствие, приемлемого уровня жизнеспособности эндотелиальных клеток. Во всех без исключения буферных растворах со временем наблюдали разную степень закисления. Самыми оптимальными для длительного наблюдения оказались раствор Хенкса, содержащий 2 мМ L-глутамин или 2 мМ L-глутамин и 10 мМ HEPES. Для дальнейших динамических наблюдений был выбран раствор Хенкса, содержащий 2 мМ L-глутамин и 10 мМ HEPES, поскольку поддерживаемый им уровень pH был ближе всего к физиологическим значениям в крови (7.35–7.45) (Горн и др., 1999), а также уровень жизнеспособности эндотелиальных клеток после длительной инкубации в нем был максимальным.

Морфология монослоя культуры EA.hy926 методами АСМ и СИПМ. Оба метода (АСМ и СИПМ) дают возможность наблюдения в режиме реального времени за морфологией эндотелиальных клеток в среде максимально нативной для клеток. Результаты исследования эндотелиальных клеток методом АСМ представлены на рис. 2. Очевидно, что исследование на мембранах методом АСМ практически невозможно, поскольку при сканировании в полуконтактном резонансном режиме из-за отсутствия жесткой фиксации индуцируются дополнительные колебания мембраны, что приводит к артефактам сканирования (рис. 2а, б). Попытки создать более жесткое натяжение мембраны с помощью теплового воздействия приводило к сплавлению пор и нарушению проницаемости, что исключало поступление питательной среды из нижнего отсека камеры. Кроме того, изменялось адгезионное покрытие, что подавляло формирование монослоя эндотелиоцитов.

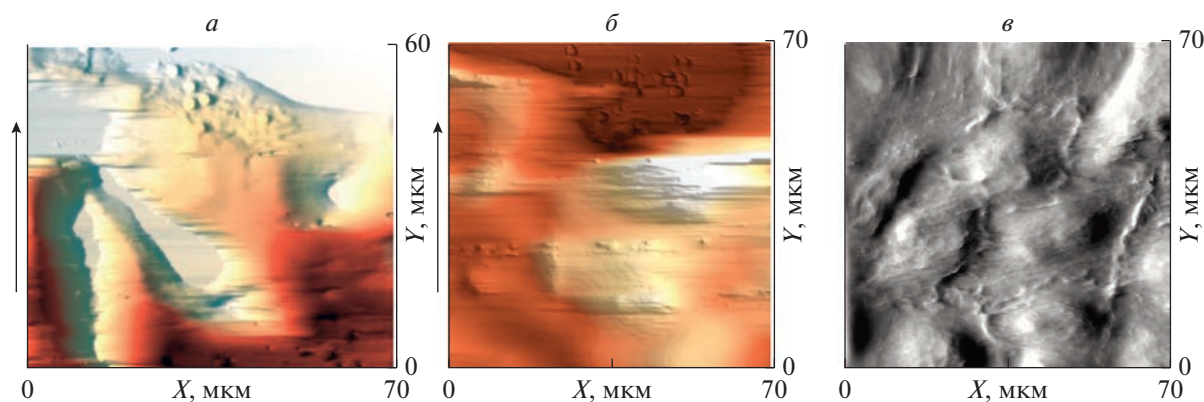


Рис. 2. Морфология эндотелиальных клеток EA.hy926 при сканировании методом АСМ. *а, б* — сканирование на мембране, *в* — сканирование на твердой подложке чашки Петри, не позволяющей вести длительные наблюдения и исследовать процесс трансэндотелиальной миграции.

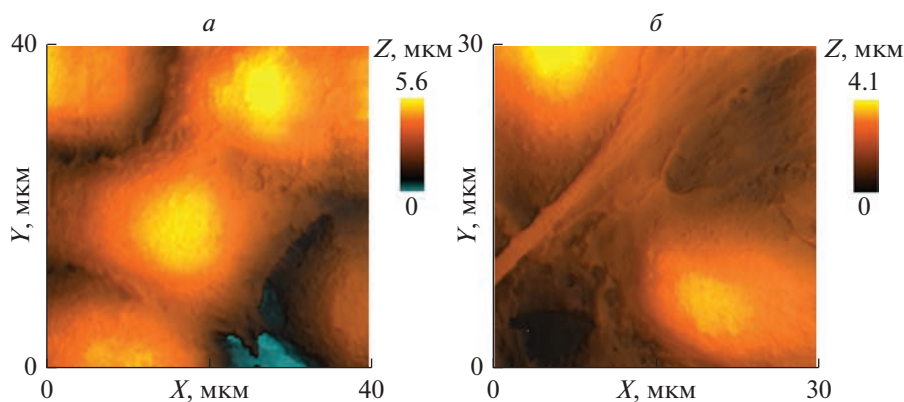


Рис. 3. Морфология эндотелиальных клеток EA.hy926 при сканировании методом СИПМ. *а* — сканирование на мембране в двухсекционной аналитической камере в окружении питательной среды, позволяющей вести длительные динамические наблюдения. *б* — сканирование на твердой подложке чашки Петри, не позволяющей вести длительные наблюдения и исследовать процесс трансэндотелиальной миграции. Справа показаны шкалы высот (мкм) в цвете.

Перепады высот в области сканирования приводили к срыву эндотелиоцитов с мембраны. Сканирование на жесткой подложке, обеспечивающей только одностороннее поступление среды (сверху), тогда как нижняя часть клетки прочно адгезировалась всей поверхностью к покрытию чашки Петри, приводило к получению четких сканов, позволяющих анализировать морфологию монослоя с высоким разрешением (рис. 2в). Однако и в этом случае возникали две проблемы: 1) поскольку питательная среда находится только сверху над эндотелиоцитами, это исключает возможность очень длительных исследований; 2) при выборе не оптимального режима сканирования происходит отрыв клеток от поверхности подложки.

Результаты исследования монослоя культуры EA.hy926 методом СИПМ представлены на рис. 3. Очевидно, что в обоих случаях и при сканировании эндотелиоцитов, выросших на адгезионных мембранах в двухсекционных аналитических камерах (рис. 3а), и

при сканировании клеток на жесткой подложке — поверхности чашки Петри (рис. 3б), хорошо прописываются все особенности морфологии эндотелиоцитов, включая микроструктуру поверхности. В дальнейшем предпочтение отдавали клеткам, выросшим на адгезионных мембранах, которые были закреплены в двухсекционных аналитических камерах, поскольку именно в этом случае они оказывались окруженными питательной средой с двух сторон, что позволяло проводить длительное динамическое наблюдение за изменением их морфологии и ригидности.

На рис. 4 показано, что в режиме измерения распределения ионных токов, позволяющем одновременно получать топографические сканы (исследовать морфологию клеток) и карту ригидности (распределение жесткости поверхностной мембраны клетки), можно дополнительно получать информацию не только о микроструктуре мембран нативных клеток, но и определять внеклеточные структуры на

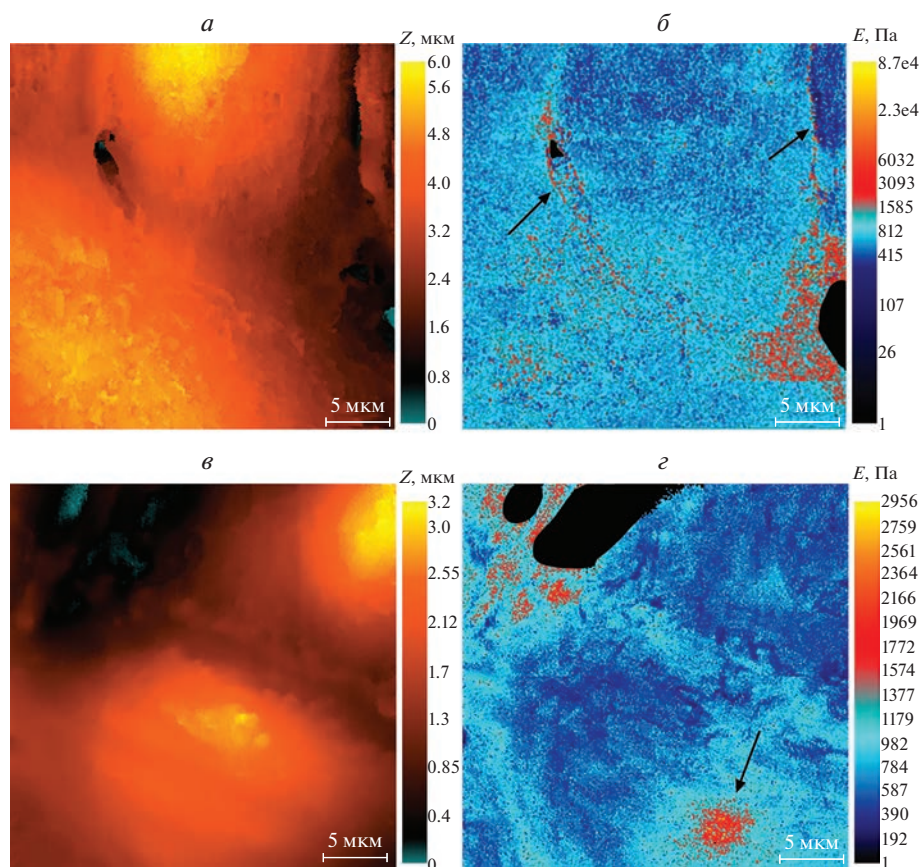


Рис. 4. Морфология и ригидность эндотелиоцитов. *а* — топографический скан, четко визуализируется микроструктура мембраны эндотелиоцита; *б, г* — карта ригидности (E — модуль Юнга, Па): хорошо видны поверхностные структуры микрофиламентов (стрелки, *а*) и ядрышко (стрелка, *г*); *в* — топографический скан, визуализируются только особенности морфологии эндотелиальных клеток.

них (микрофиламентозные образования) (рис. 4*а, б*) и даже внутриклеточные структуры (ядрышки) (рис. 4*в, г*). Благодаря построению карты ригидности удалось определить, что жесткость мембран эндотелиоцитов варьирует от 357 до 796 Па. Максимальная ригидность отмечается у филаментов клеток и ядрышек — соответственно 1536 и 1729 Па.

Разработанная система позволила вести длительные динамические наблюдения с высоким разрешением. Через 3 ч наблюдаются существенные изменения морфологии клеток: микроструктура мембран сглаживается, а над ядерной зоной клетки появляются выросты мембраны (рис. 5*а*). Через 4 ч наблюдаются признаки апоптоза: формируются апоптотные тела (рис. 5*б*), они формируются на границе межклеточных контактов. Для апоптотных тел выявлена интересная особенность: при их формировании ригидность клетки постепенно повышается, а ригидность апоптотных тел постепенно уменьшается (рис. 6). Исключение составляет изображение на рис. 5*г*, на котором отмечено сморщивание (shrinkage) апоптотного тела: здесь, напротив, ригидность эндотелиоцита падает, а апоптотных тел — повышает-

ется, что четко видно на рис. 6. Эта тенденция абсолютно одинакова для обоих апоптотных тел, отпочковывающихся от эндотелиальной клетки.

Формирование апоптотного тела на границе клеток особенно четко видно при построении трехмерной проекции клетки (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Создание двухкамерной аналитической системы для исследования клеток, когда они с обеих сторон окружены оптимальной для них (по составу и величине рН) средой, дает возможность длительных динамических наблюдений за эндотелиоцитами. В этой системе, помимо состава и значения рН среды, важно учитывать диаметр пор мембраны, ее адгезионные свойства, начальную концентрацию и время роста эндотелиальной культуры для формирования монослоя, имитирующего эндотелиальную выстилку интимы сосуда. Особенности системы обратной связи и механики АСМ не дают возможности исследовать клетки на мембранах, даже в малотравматичном резонансном режиме сканирования. СИПМ

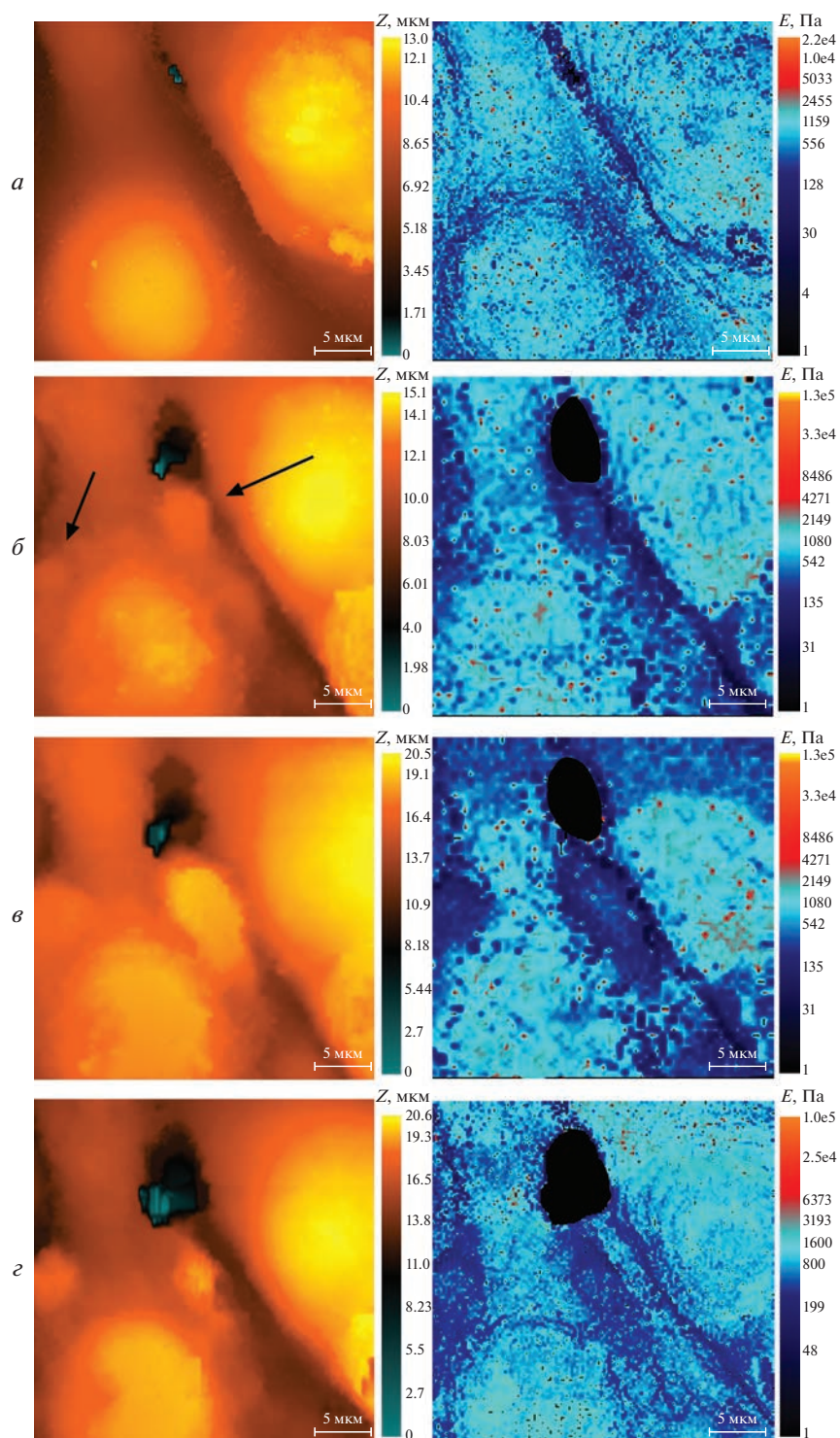


Рис. 5. Изменение морфологии эндотелиоцитов в процессе длительного наблюдения топография (ряд слева) и карта жесткости (ряд справа). По вертикали — высота (мкм, слева) и модуль Юнга (E , Па справа). *a* — “сглаживание” мембраны и формирование выростов в ядерной области через 180 мин наблюдения; *б* — начало формирования апоптозных тел (стрелки) через 246 мин; *в* — увеличение объема апоптозных тел через 255 мин; *г* — сморщивание (shrinkage) апоптозных тел через 258 мин наблюдения.

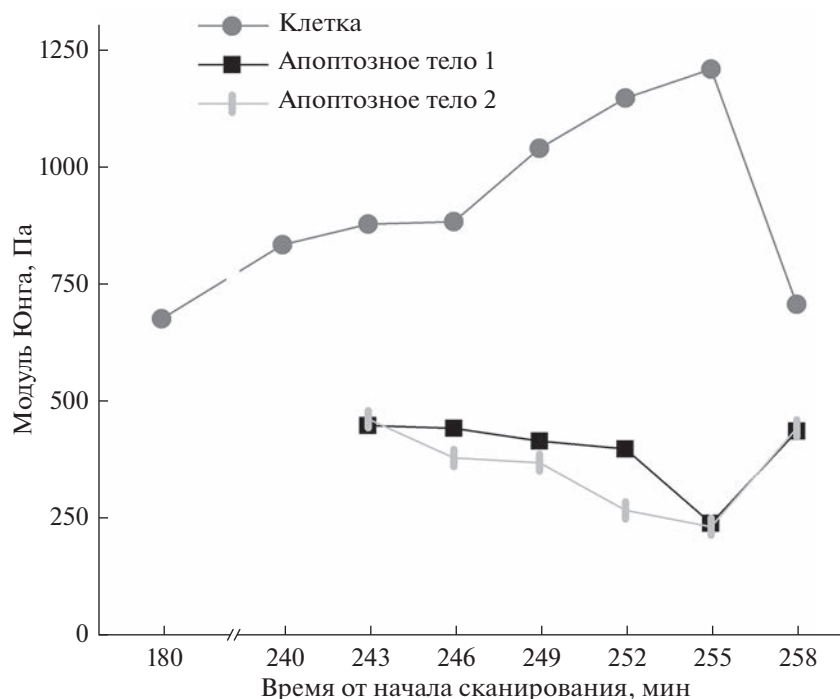


Рис. 6. Изменение модуля Юнга (Па) эндотелиоцита и апоптозных тел в процессе апоптоза при динамическом наблюдении в течение 258 мин.

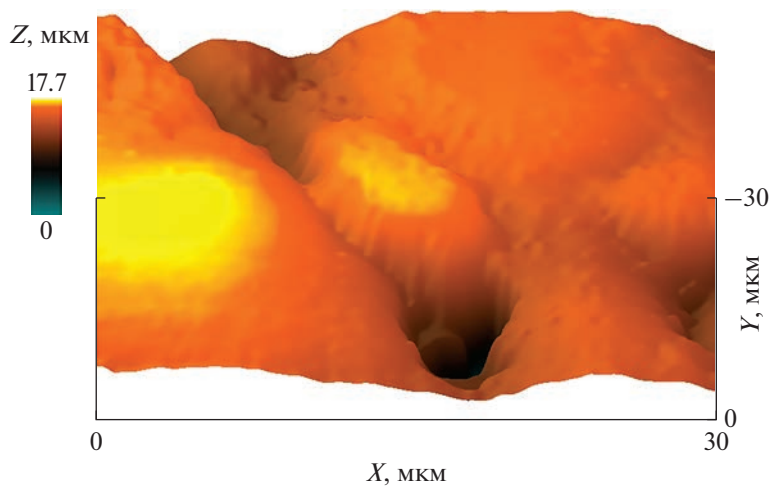


Рис. 7. Трехмерная проекция эндотелиоцитов. В середине четко визуализировано апоптозное тело.

позволяет анализировать не только морфологию и микроструктуру клеток и субклеточных структур, но и измерять ригидность эндотелиальных клеток.

Анализ клеток в течение 180–258 мин позволил наблюдать апоптоз эндотелиоцитов. В процессе апоптоза выявлено, что отпочковывающиеся апоптозные тела мягче, чем клетка, от которой они отделяются. Эти данные согласуются с исследованием, в котором авторы (Rodriguez-Quijada, Dahl, 2020) измеряли ригидность апоптозных тел, используя мик-

рофлюидную технологию. Но в этой работе значения ригидности апоптозных тел, извлеченных из сыворотки крови, составили 5.6 ± 0.5 Па (Rodriguez-Quijada, Dahl, 2020), тогда как минимальные значения ригидности, полученные нами в настоящей работе, относятся к моменту непосредственно перед сморщиванием апоптозных тел и составляют 235–242 Па. Существенная разница значений может быть объяснена как разными методами измерения ригидности, так и разными источниками апоптозных тел (клетками, от которых они отпочковались). Из на-

стоящей работы также очевидно, что ригидность апоптозных тел со временем может изменяться. Ранее при длительных наблюдениях нами был зарегистрирован феномен осцилляции ригидности нейтрофильных гранулоцитов перед отпочковыванием апоптозных тел (Pleskova, 2010), тогда как в настоящем исследовании на более коротком временном отрезке мы наблюдали феномен плавного нарастания ригидности эндотелиоцита перед отпочковыванием апоптозных тел и плавное снижение ригидности самих апоптозных тел, за исключением момента их сморщивания, когда эти тенденции резко менялись местами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность С.А. Селькову и Д.И. Соколову (НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург) за предоставление клеточной линии EA.hy926.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-74-00004).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не использовали животных или людей в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горн М.М., Хейтц У.И., Сверинген П.Л., Вебер К.С. 1999. Водно-электролитный и кислотно-основной баланс. СПб.—М.: Невский Диалект, БИНОМ. (Gorn M.M., Heitz W.I., Swearingen P.L., Weber K.S. 1999. Water-electrolyte and acid-base balance. SPb.—M.: Nevsky Dialect, BINOM) (Horne M.M., Heitz U.E., Swearingen P.L. 1991. Fluid, electrolyte, and acid-base balance: a case study approach. St. Louis: Mosby Inc.)
- Плескова С.Н. 2011. Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. Долгопрудный: Интеллект. (Pleskova S.N. 2011. Atomic-force microscopy in biology and medicine. Dolgoprudny: Intellect.)
- Bai M., Grieshaber-Bouyer R., Wang J., Schmider A.B., Wilson Z.S., Zeng L., Halyabar O., Godin M.D., Nguyen H.N., Levescot A., Cunin P., Lefort C.T., Soberman R.J., Nigrovic P.A. 2017. CD177 modulates human neutrophil migration through activation-mediated integrin and chemoreceptor regulation. *Blood*. V. 130. P. 2092.
- Glasser L., Fiederlein R.L., Huestis D.W. 1985. Liquid preservation of human neutrophils stored in synthetic media at 22 degrees C: controlled observations on storage variables. *Blood*. V. 66. P. 267.
- Grzelak K., Łaszczyk J., Polkowski J., Mastalski P., Kluczyński J., Łuszczek J., Torzewski J., Szachogłuchowicz I., Szymaniuk R. 2021. Additive manufacturing of plastics used for protection against COVID19 – the influence of chemical disinfection by alcohol on the properties of ABS and PETG polymers. *Materials (Basel)*. V. 14. P. 4823.
- Helms H.C., Abbott N.J., Burek M., Cecchelli R., Couraud P.O., Deli M.A., Förster C., Galla H.J., Romero I.A., Shusta E.V., Stebbins M.J., Vandenhaute E., Weksler B., Brodin B. 2016. *In vitro* models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* V. 36. P. 862.
- Kérourédan O., Bourget J.M., Rémy M., Crauste-Manciet S., Kalisky J., Catros S., Thébaud N.B., Devillard R. 2019. Micropatterning of endothelial cells to create a capillary-like network with defined architecture by laser-assisted bioprinting. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* V. 30. P. 28. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6230-1>
- Kosheleva N.V., Efremov Y.M., Koteneva P.I., Ilina I.V., Zurina I.M., Bikhmulina P.Y., Shpichka A.I., Timashev P.S. 2022. Building a tissue: mesenchymal and epithelial cell spheroids mechanical properties at micro- and nanoscale. *Acta Biomater.* V. 2022. S1742-7061(22)00621-3. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.09.051>
- Marin V., Kaplanski G., Grès S., Farnarier C., Bongrand P. 2001. Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J. Immunol. Methods*. V. 254. P. 183.
- Pleskova S.N. 2010. Behavior of the living neutrophil granulocytes under a lipopolysaccharide condition observed in real time by atomic force microscopy. In: *Handbook of granulocytes. Classification, toxic materials produced and pathology*. N.Y.: Nova Science Publishers. P. 289.
- Pleskova S.N., Bobyk S.Z., Kriukov R.N., Gorshkova E.N., Novikov D.V., Vasilchikov P.I., Bezrukov N.A., Novikov V.V. 2021. *S. aureus* and *E. coli* change the force and work of adhesion between P- and E-selectins of endothelial cells and ligands of neutrophil granulocytes. *Micron*. V. 150. 103139. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103139>
- Rodriguez-Quijada C., Dahl J.B. 2020. Non-contact microfluidic mechanical property measurements of single apoptotic bodies. *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* V. 1865. P. 129657. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129657>
- Roux F., Couraud P.O. 2005. Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions. *Cell. Mol. Neurobiol.* V. 25. P. 41.
- Shah Mohammadi M., Buchen J.T., Pasquina P.F., Niklason L.E., Alvarez L.M., Jariwala S.H. 2021. Critical considerations for regeneration of vascularized composite tissues. *Tissue Eng. B. Rev.* V. 27. P. 366.
- Watanabe S., Lehmann M., Hujber E., Fetter R.D., Richards J., Söhl-Kielczynski B., Felies A., Rosenmund C., Schmoranz J., Jorgensen E.M. 2014. Nanometer-resolution fluorescence electron microscopy (nano-EM) in cultured cells. *Methods Mol. Biol.* V. 1117. P. 503.

Study of EA.hy926 Endothelial Cells by Atomic Force and Scanning Ion-Conductance Microscopy

S. N. Pleskova^{a, b, *}, N. A. Bezrukov^a, E. N. Gorshkova^a, S. Z. Bobyk^a, and E. V. Lazarenko^{a, b}

^aLobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Scanning Probe Microscopy Laboratory, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

^bNizhny Novgorod State Technical University, Department of Nanotechnology and Biotechnology, Nizhny Novgorod, 603115 Russia

*e-mail: pleskova@mail.ru

A two-section analytical system was developed and tested to study the culture of EA.hy926 endothelial cells in real time with high resolution imaging. Scanning ion-conductance microscopy was shown as more relevant method because it didn't cause mechanical damage of cell, and made possible scanning on the membranes, when endothelial cells were surrounded by nutrient medium. The method allowed not only to analyze changes in the cells morphology, but also to identify extracellular (microfilaments) and intracellular (nucleolus) structures. The rigidity mapping showed that the rigidity of the endotheliocyte membrane varied from 357 to 796 Pa. After 240 min from the beginning of the observation, the formation of endothelial cells apoptotic bodies has begun, and the rigidity of the cell gradually increased, while rigidity of the apoptotic bodies decreased.

Keywords: endotheliocytes, apoptosis, membrane rigidity, cell morphology, microstructures, two-section analytical chamber, scanning ion-conductance microscopy, atomic force microscopy

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПОЛИКАТИОНА ПОЛИ-2-ДИМЕТИЛАМИНОЭТИЛМЕТАКРИЛАТА НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ РЕЗИДЕНТНЫХ И НЕРЕЗИДЕНТНЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2023 г. В. П. Иванова¹, *, Л. Л. Алексеенко², О. В. Назарова³, И. В. Миндукшев¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

³Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, 199004 Россия

*E-mail: valet@iephb.ru

Поступила в редакцию 21.06.2023 г.

После доработки 19.07.2023 г.

Принята к публикации 20.07.2023 г.

Катионные полимеры представляют собой положительно заряженные высокомолекулярные соединения, в состав которых входят N-содержащие функциональные группы, такие как первичные, вторичные и третичные аминогруппы, четвертичные аммонийные группы и др. В настоящей работе изучено действие синтетического поликатиона поли-2-диметиламиноэтилметакрилата (ПДМАЭМ) на биологическую активность фибробластов китайского хомячка и эритроцитов человека. На культуре фибробластов проведен анализ воздействия поликатиона на клеточную адгезию. В качестве субстрата использовали культуральный пластик, обработанный или необработанный поликатионом. Адсорбция поликатиона на полистироловой поверхности не приводила к изменению адгезивной способности фибробластов. Предварительная обработка фибробластов ПДМАЭМ в малых концентрациях (0.1 и 1 мкг/мл) не влияла на адгезионные свойства клеток, посеянных на необработанный пластик. При концентрациях 10 и 100 мкг/мл ПДМАЭМ ингибировал прикрепление фибробластов к этому субстрату. Установлена связь между подавлением клеточной адгезии под влиянием полимера и его токсическим действием на жизнеспособность фибробластов. Обработка эритроцитов человека поликатионом при концентрациях 10 и 100 мкг/мл приводила к повреждению клеток и выделению гемоглобина из эритроцитов. При малых дозах поликатион практически не оказывал влияния на процессы гемолиза эритроцитов. Показано, что ПДМАЭМ вызывал морфологические изменения эритроцитов и их агрегацию. Токсический эффект поликатиона в отношении эритроцитов человека в целом совпадал с таковым для фибробластов животных. Обсуждаются возможные клеточные мишени, на которые может воздействовать изученный поликатион.

Ключевые слова: синтетический поликатион, адгезия, цитотоксичность, гемолиз, агрегация, фибробласты, эритроциты

DOI: 10.31857/S0041377123050115, **EDN:** NWYVEA

Катионные полимеры — это высокомолекулярные соединения, положительный заряд которых обусловлен наличием N-содержащих функциональных групп (первичных, вторичных и третичных аминогрупп или четвертичных аммонийных групп) в структуре линейных поликатионов или дендритных/(гидрогелевых) сферических полимерных образований (Samal et al., 2012; Madaan et al., 2014).

В настоящее время поликатионы рассматриваются в качестве перспективных инструментов для формирования наноструктур для транспортировки раз-

личных белков, пептидов и лекарственных препаратов, в качестве невирусных векторных систем для переноса нуклеиновых кислот в клетки-мишени, а также для тканевого конструирования (Lv et al., 2006; Rihová et al., 2009; Samal et al., 2012).

Поликатион поли-2-диметиламиноэтилметакрилат (ПДМАЭМ) представляет собой линейный полимер с третичной аминогруппой в боковой цепи. Это водорастворимый полиэлектролит, обладающий биоактивностью. В частности, ПДМАЭМ проявляет антибактериальную активность в отношении широкого спектра бактерий, включая *Mycobacterium tuberculosis* (Rawlinson et al., 2010; Phillips et al., 2017; Stawski et al., 2022). ПДМАЭМ адгезирует к монослою клеток кишечника человека, секретирующих

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; ПДМАЭМ — поли-2-диметиламиноэтилметакрилат.

слизь. При этом поликатион усиливает барьерную функцию клеток кишечника, уменьшая проницаемость слизистой оболочки кишечника (Keely et al., 2005). Благодаря способности поликатиона формировать комплексы с противоположно заряженными соединениями, ПДМАЭМ может использоваться в качестве носителя при трансфекции и для доставки лекарственных препаратов в поврежденные и (или) инфицированные ткани человека (You et al., 2007; Keely et al., 2009; Layman et al., 2009; Tanasienko et al., 2015).

Стратегия тканевого конструирования заключается в создании на основе синтетических полимерных носителей матриц, обеспечивающих оптимальную адгезию клеточного материала (фибробластов, остеобластов, кератиноцитов, эпителиоцитов и др.) для структурирования или формирования зон регенеративного роста тканей в местах их повреждения (Lutolf, Hubbell, 2003; Bačáková et al., 2004; Ravichandran et al., 2012). В связи с этим важной задачей остается подбор полимерных соединений для получения матриц с инкорпорированными линкерными фрагментами известных белков внеклеточного матрикса (ВКМ) (например, коллагена или фибронектина), обладающих высокой адгезивной активностью и связывающихся с определенными участками интегринных рецепторов, определяющих в итоге степень клеточной адгезии к полимерной поверхности (Lutolf, Hubbell, 2003; VandeVondele et al., 2003; Santiago et al., 2006; Thompson et al., 2006; Tsai et al., 2009). Кроме того, поликатионы могут использоваться для создания полимерных средств доставки различных растворимых соединений (от регуляторных пептидов до ростовых факторов), регулирующих клеточную адгезию, воздействуя на процесс регенерации в целом (Gribova et al., 2012; Ravichandran et al., 2012).

Кроме воздействия на резидентные ядродержащие клетки поликатионные носители, попадая в кровоток, могут воздействовать на форменные элементы крови, включая безъядерные клеточные элементы – эритроциты человека, являющиеся доминирующей клеточной формой в крови (Щербак, 2005; Трошкина и др., 2007). Ввиду высокого положительного заряда поликатионы изменяют физиологические характеристики эритроцитов, что может приводить к их повреждению или трансформации их структурных элементов (Moreau et al., 2000).

Основная сложность, ограничивающая использование поликатионных носителей в медицинской практике, связана с их токсическими свойствами (Fischer et al., 2003; Lv et al., 2006; Madaan et al., 2014; Xie et al., 2022). Для снижения негативных последствий при использовании поликатионов разрабатываются способы минимизации токсического эффекта за счет маскировки периферического заряда у молекулы полимера посредством модификации поверхностных характеристик полимерного носителя (Samal et al., 2012; Xie et al., 2022).

В представленной работе исследовали влияние синтетического поликатиона ПДМАЭМ на функции фибробластов (резидентных клеток) и эритроцитов (нерезидентных клеток) млекопитающих. Основное внимание уделено анализу воздействия поликатиона, во-первых, на адгезивную активность фибробластов, которая определяет все последующие стадии развития и дифференцировки резидентных клеток в растворенной форме или в виде субстрата на твердой поверхности и, во-вторых, на морфофункциональные характеристики эритроцитов, развитие гемотоксического эффекта, включая лизис и агрегацию эритроцитов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. В работе использовали фибробласты легкого китайского хомячка линии CHL V-79 RJK (предоставленной Иельским университетом, США), а также эритроциты человека. Фибробласты культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 50 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Gibco, США), в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Клетки, достигшие монослоя, промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Sigma, США) и суспендировали в питательной среде без сыворотки. Действие поликатиона на фибробласты оценивали по изменению адгезии и выживаемости. Эритроциты выделяли из венозной крови здоровых доноров, стабилизированной добавлением 2 мМ EGTA. Суспензию эритроцитов получали после двукратной промывки цельной крови PBS (pH 7.4). Отмытые эритроциты (гематокрит 2.2%) ресуспендировали в том же буфере. Действие поликатиона на эритроциты оценивали по его влиянию на лизис эритроцитов, а также на их морфофункциональные характеристики.

Оценка адгезии клеток линии CHL V-79 RJK. Влияние ПДМАЭМ (с мол. массой 30000), синтезированного в Институте высокомолекулярных соединений РАН (Санкт-Петербург), на адгезию клеток оценивали по описанному ранее методу (Иванова, 2023). Клетки линии CHL V-79 RJK (10⁶ кл./мл) культивировали в питательной среде в 96-луночных планшетах (Corning, США), обработанных или необработанных полимером. Во втором случае клетки выдерживали в питательной среде без сыворотки с ПДМАЭМ в концентрации от 0.1 до 100 мкг/мл или без поликатиона (контроль) 30 мин при 37°C, затем в питательную среду добавляли сыворотку, переносили клеточную суспензию в планшет и выдерживали 1 ч в тех же условиях. Прикрепившиеся клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым. Связанный краситель экстрагировали этанолом и определяли его оптическую плотность на анализаторе “Униплан” (Пикон, Россия) при длине волны 570 нм. По величине оптической плотности судили об изменении количества прикрепленных клеток. Результаты выражали в % от контроля, принятого за 100%.

Планшеты предварительно (до посева клеток) обрабатывали поликатионом в концентрациях 10, 20 и 50 мкг/мл (в PBS) в течение 18 ч при 4°C. После двукратной отмывки PBS в лунки планшета вносили клеточную суспензию в полной питательной среде и выдерживали клетки 1 ч при 37°C. Количество прикрепившихся клеток оценивали, как описано выше.

Оценка цитотоксичности клеток линии CHL V-79 RJK. Цитотоксичность поликатиона оценивали по выживаемости клеток, которую определяли с помощью МТТ-теста (Niks, Otto, 1990) по количеству образовавшегося в процессе реакции продукта формазана. Клетки рассевали в 96-луночные планшеты по 2×10^4 клеток в лунку в полной питательной среде, через 1 сут ее удаляли и добавляли питательную среду без сыворотки с исследуемым полимером (в концентрации от 0.1 до 100 мкг/мл) или без него. Клетки выдерживали 1.5 ч при 37°C, после чего проводили замену питательной среды. В каждую лунку добавляли 0.5 мг/мл МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид; Sigma, США) в PBS и культивировали 2 ч 40 мин при 37°C в атмосфере 5% CO₂. О количестве жизнеспособных клеток судили по изменению величины оптической плотности экстрагированного из клеток формазана. Оптическую плотность измеряли на анализаторе Униплан (Пикон, Россия) при длине волны 570 нм.

Определение количества эритроцитов в крови. Венозную кровь здоровых доноров использовали для анализа влияния ПДМАЭМ на содержание эритроцитов. От здоровых доноров получали информированное согласие на работу с их кровью. Кровь стабилизировали добавлением антикоагулянта (2 мМ EGTA). В пробы цельной крови вносили исследуемый поликатион в концентрации от 0.1 до 100 мкг/мл и выдерживали в течение 30 мин при 35°C. После этого проводили подсчет эритроцитов на гематологическом анализаторе МЕК-6550 (Nihon Kohden, Япония). Контролем служили образцы цельной крови без добавления поликатиона.

Гемолиз эритроцитов. Гемолитическую активность поликатиона оценивали по модифицированному методу (Jacobson et al., 2005). Эритроциты человека выделяли из венозной крови здоровых доноров. Эритроциты дважды промывали PBS (pH 7.4) и ресуспендировали в том же буфере. Суспензию эритроцитов в PBS (гематокрит 2.2%) инкубировали с полимером (в различных концентрациях от 0.1 до 100 мкг/мл) или без него 30 мин при 37°C. Степень гемолиза оценивали по величине выделившегося гемоглобина. Количество выделенного гемоглобина оценивали по оптической плотности, которую измеряли при 540 нм, используя анализатор Clariostar Plus Reader (BMG Labtech, Германия). Полный лизис эритроцитов получали после добавления в суспензию эритроцитов 1%-ного раствора Тритона X-100. Результаты выражали в % от содержания гемоглобина в эритроцитах после их полного лизиса.

Морфология эритроцитов. Для изучения действия ПДМАЭМ на эритроциты использовали их суспензию (гематокрит 2.2%), разведенную PBS в 20 раз. Образцы суспензии эритроцитов переносили в 96-луночный планшет, куда вносили ПДМАЭМ в концентрации от 0.1 до 100 мкг/мл. Через 5 мин анализировали изменение клеточной формы эритроцитов с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS2-FL (Nikon, Япония), оснащенного фотокамерой Retiga R1 (Cairn, Великобритания). Использовали объективы с увеличением 20× и 40×.

Одновременно исследовали влияние поликатиона на изменение клеточной формы эритроцитов после внесения ПДМАЭМ в тех же концентрациях в суспензию эритроцитов (гематокрит 2.2%) и инкубирования в течение 30 мин при 37°C. Анализ изменения клеточной формы эритроцитов проводили с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS2-FL (Nikon, Япония), оснащенного фотокамерой Retiga R1 (Cairn, Великобритания). Использовали объективы с увеличением 20× и 40×.

Статистическая обработка результатов. Результаты представлены в виде средних значений и их ошибок. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента для сравнения контрольных и экспериментальных групп. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как правило, поверхностная модификация субстрата осуществляется посредством адсорбции белков ВКМ или их фрагментов на ригидной или полуригидной подложке для имитации существующего *in vivo* внеклеточного окружения.

В последнее время используются синтетические полимеры, в том числе поликатионы, в качестве биоактивных субстратов для изучения адгезивной активности клеток различного происхождения (Thompson et al., 2006; Иванова и др., 2010). Использование природных биodeградируемых полимеров (белков ВКМ, таких как коллаген, фибронектин) (Спичкина и др., 2008; Иванова и др., 2012) и синтетических катионных полимеров (таких как полилизин, полиэтиленмин) (Vancha et al., 2004) в качестве адсорбируемого материала на субстратной подложке ускоряет адгезионные процессы у клеток различных типов.

Поиск синтетических поликатионов (среди известных или новых соединений) с оптимальным сочетанием биосовместимости и биodeградации полимерных материалов, используемых в качестве покрытий для изменения (усиления или подавления) адгезионной активности клеток, остается важным направлением биотехнологии. Биосовместимость синтетических полимеров связана с клеточным поведением в процессе контакта клеток с этими материалами и, чаще всего она определяется клеточной адгезией к полимерным субстратам.

Таблица 1. Влияние адсорбированного на пластике поликатиона ПДМАЭМ на адгезию фибробластов линии CHL V-79 RJK

Концентрация поликатиона, мкг/мл	Количество прикрепившихся клеток, %
– (Контроль)	100
10	100.1 ± 3.6
20	102.1 ± 4.2
50	99.7 ± 12.9

Примечание. Интактные клетки сеяли на поликатион, адсорбированный на пластике. Через 1 ч культивирования в полной питательной среде при 37°C оценивали количество прикрепившихся клеток. Показаны средние значения и их ошибки из 4-х независимых экспериментов.

В настоящей работе исследовали влияние адсорбированного на полистироловой поверхности ПДМАЭМ на адгезию фибробластов линии CHL V-79 RJK. Данные, представленные в табл. 1, показывают, что адсорбция ПДМАЭМ на культуральном пластике во всех использованных концентрациях (10, 20 и 50 мкг/мл) не влияла на степень прикрепления клеток к субстрату и не отличалась от контрольных значений. Таким образом, ПДМАЭМ, адсорбированный на синтетической поверхности другого химического состава, не подавляет адгезионную активность фибробластов, а значит не вызывает токсического эффекта в данных условиях.

Нейтральный статус в отношении регуляции клеточной адгезии исследованного нами ПДМАЭМ в качестве поверхности прикрепления не совпадает с действием ряда других поликатионов на адгезивный ответ клеток. Так, установлено, что катионные полиэлектролиты способствуют прикреплению, распластыванию и пролиферации фибробластов, а также синтезу ВКМ (коллагенов I и III типов) этими клетками (Rosa et al., 2004). Кроме того, полистироловый субстрат, покрытый полиэтиленимином, обеспечивал быстрое прикрепление и распластывание клеток гепатомы человека (HepG2) (Soravia, Tоса-Неггера, 2009), эмбриональных клеток почки человека (HEK293) и клеток феохромоцитомы крысы (PC12) (Vancha et al., 2004), а также ускорял созревание нейрональных клеток после их прикрепления к поликатиону (Lelong et al., 1992). Адгезия фибробластов к полиаллиламину, адсорбированному на культуральном пластике, усиливалась или ингибировалась в зависимости от концентрации поликатиона (Иванова и др., 2010). Возможно, менее выраженный эффект ПДМАЭМ на клеточную адгезию фибробластов связан с тем, что этот поликатион содержит третичные аминогруппы, что обуславливает снижение его реакционной способности.

Положительно заряженные поверхности часто используются на практике, чтобы обеспечить прикрепление клеток к субстрату. Вместе с тем не все субстратные поверхности, несущие заряд, обеспечи-

вают оптимальную клеточную адгезию в ходе культивирования клеток. Определяющую роль в этом процессе играют плотность заряда и ориентация в пространстве аминогрупп у поликатионов. Можно предположить, что при адсорбции поликатиона ПДМАЭМ на искусственной поверхности (полистироле) формирующаяся пространственная ориентация функционально значимых аминогрупп ПДМАЭМ не препятствует взаимодействию клеток с субстратом.

Нельзя исключить также возможность адсорбции сывороточных белков, включая белки ВКМ, содержащихся в среде культивирования, на адсорбированный слой ПДМАЭМ. В этом случае фибробласты могут специфически взаимодействовать с адсорбированными белками ВКМ через интегриновые рецепторы (Humphries et al., 2006; Iwamoto, Calderwood, 2015). Установлено, что эндотелиальные клетки человека, адгезированные на многослойных пленках, терминирующим слоем которых являются поликатионы поли-D-лизин или полиаллиламин, экспрессируют интегрины, содержащие β_1 -субъединицу (Boura et al., 2005).

Как известно, линейные полиэлектролиты (поликатионы и полианионы) используются для получения многослойных пленок, способных регулировать клеточную адгезию, свойства которых определяются зарядом и эластическими свойствами поверхности субстрата (VandeVondele et al., 2003; Boura et al., 2005; Tsai et al., 2009). Представляется возможным использование исследованного поликатиона в качестве матрицы для обеспечения регулируемой адгезии клеток к полимерной поверхности или в качестве составляющей многослойных пленок для трансплантации клеток в места тканевого повреждения для оптимизации регенеративных процессов.

Далее мы исследовали влияние ПДМАЭМ в растворенном виде на функции фибробластов. При внесении этого синтетического поликатиона в клеточную суспензию выявлено его заметное действие на адгезивные свойства фибробластов линии CHL V-79 RJK. Данные, представленные на рис. 1, показывают, что ПДМАЭМ после предварительной обработки клеток не изменяет количество прикрепившихся клеток к культуральному пластику в концентрациях 0.1 и 1 мкг/мл. Дальнейшее увеличение концентрации ПДМАЭМ в среде культивирования приводит к резкому сокращению числа прикрепившихся клеток: в концентрации 10 мкг/мл – в 2.7 раза ($P < 0.001$) и 100 мкг/мл – в 8.1 раза ($P < 0.001$) по сравнению с клетками, не обработанными поликатионом.

Известно, что степень заряженности ПДМАЭМ в водных растворах зависит от величины pH. При нейтральных значениях pH молекула этого поликатиона содержит заряженные и незаряженные участки молекулы. Это создает предпосылки для дифференцированного взаимодействия его с липидными

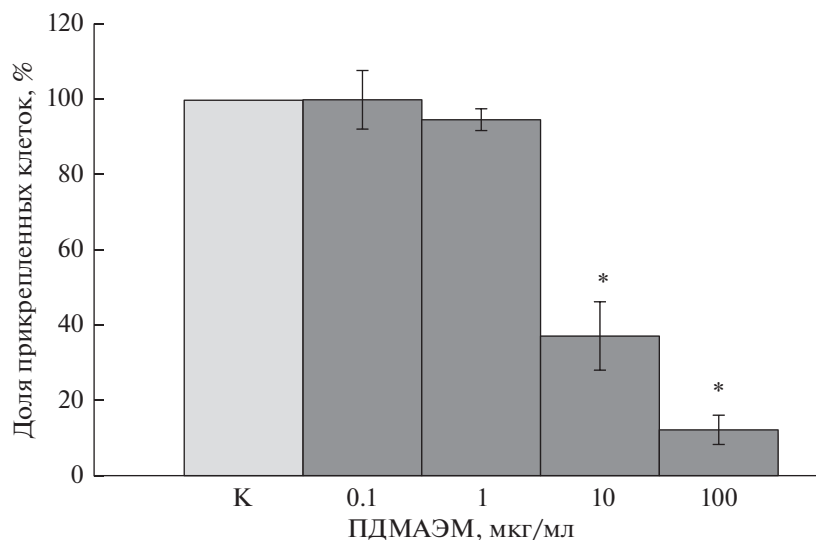


Рис. 1. Адгезия фибробластов линии CHL V-79 RJK, предварительно обработанных поликатионом ПДМАЭМ, к культуральному пластику. Клетки выдерживали с поликатионом или без него (Контроль, К) в течение 30 мин при 37°C в питательной среде без сыворотки, затем сеяли на пластик и оценивали количество прикрепившихся клеток через 1 ч культивирования в питательной среде с 10% сыворотки при 37°C. Показаны средние значения и их ошибки из 6 независимых измерений, (*) – отличия от контроля достоверны при $P < 0.001$.

компонентами клеточной мембраны. Незаряженные фрагменты поликатиона взаимодействуют с гидрофобными участками мембранных фосфолипидных молекул (Schwieger, Blume, 2009), а положительно заряженные фрагменты полимера взаимодействуют электростатически с отрицательно заряженными участками липидных молекул (Oku et al., 1986; Reuter et al., 2009). При этом поликатион может не только адсорбироваться на поверхности клеточной мембраны, но и инкорпорироваться во внутренний монослой липидного бислоя мембран (Flebus et al., 2015). В последнем случае ПДМАЭМ, возможно, может взаимодействовать с фосфатидилсерином, индуцируя формирование липидных доменов, обогащенных этим фосфолипидом, как это было показано для поликатиона поли-L-лизина (Franzin, Macdonald, 2001). Сегрегация фосфолипидов в мембране (Oku et al., 1986) обуславливает перераспределение плотности поверхностного заряда у клеток, а значит изменяет силу электростатического взаимодействия между поликатионом и клеточной поверхностью.

Токсичность любого препарата, в том числе полимерных соединений, обусловлена повреждением ими клеточной мембраны и выходом внутриклеточных компонентов во внеклеточное пространство. Для оценки влияния ПДМАЭМ на жизнеспособность резидентных клеток мы использовали МТТ-тест, т.к. он позволяет оценить внутриклеточное действие анализируемого препарата на активность митохондриальных дегидрогеназ.

При наименьших из использованных концентраций ПДМАЭМ (0.1 и 1 мкг/мл) жизнеспособность фибробластов практически не изменялась и не отлича-

лась от таковой клеток, не обработанных ПДМАЭМ. Увеличение дозы ПДМАЭМ в среде культивирования приводило к уменьшению числа жизнеспособных фибробластов в клеточной популяции. Но если ПДМАЭМ в дозе 10 мкг/мл приводит только к появлению тенденции к ингибированию метаболической активности клеток, то в дозе 100 мкг/мл он вызывал сильный токсический эффект, уменьшая количество жизнеспособных клеток более, чем в 9 раз ($P < 0.001$) (рис. 2). Аналогичные данные были получены другими исследователями. Так, линейный ПДМАЭМ не влиял на жизнеспособность эндотелиальных клеток и опухолевых клеток поджелудочной железы человека в дозе 10 мкг/мл, но вызывал сильный цитотоксический эффект в дозах 20 и 50 мкг/мл, уменьшая число жизнеспособных клеток соответственно до 40 и 10% (You et al., 2007) или 20% (Layman et al., 2009). Кроме того, при обработке клеток поликатионом поли-L-лизином или полиэтиленгликолем в дозе 55 мкг/мл жизнеспособность сохраняли около 10% гладкомышечных клеток (Putnam et al., 2001) или 2–5% фибробластов мыши (при 100 мкг/мл; Fischer et al., 2003).

Изменение метаболической активности митохондрий под действием поликатиона свидетельствует о проникновении полимера в клетку. Недавно подтверждено, что токсичность полимеров, оцениваемая по МТТ-тесту, обусловлена повреждением клеточных мембран (Monnery et al., 2017) и связанным с этим процессом входом молекул поликатиона во внутриклеточное пространство. Авторы полагают, что поликатион может поступать в клетки, минуя процесс эндоцитоза.

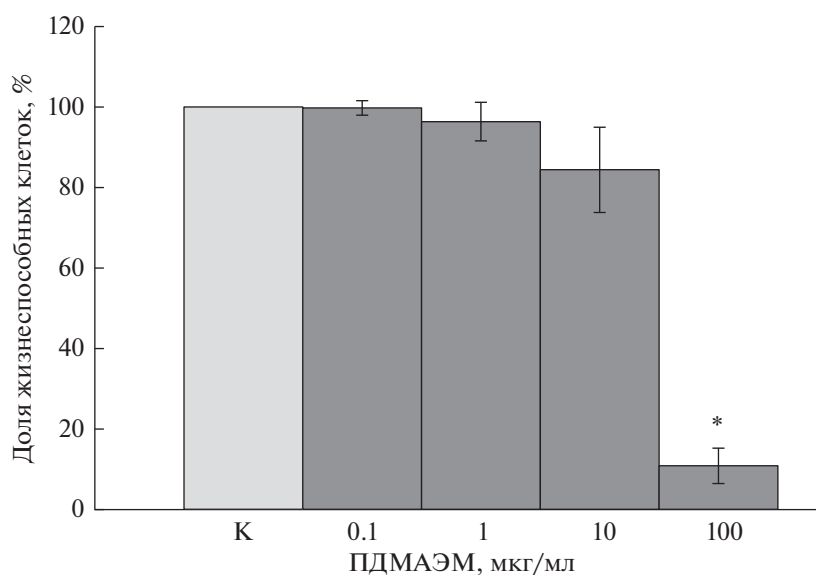


Рис. 2. Влияние поликатиона ПДМАЭМ на жизнеспособность фибробластов линии CHL V-79 RJK. Клетки культивировали в присутствии поликатиона или без него при 37°C в течение 1.5 ч. После удаления культуральной среды с полимером в лунки планшета вносили свежую питательную среду без сыворотки. Жизнеспособность клеток оценивали по активности митохондриальных дегидрогеназ с помощью МТТ-теста. Показаны средние значения и их ошибки из 4-х независимых измерений, (*) — отличия от контроля достоверны при $P < 0.001$.

Только для максимальной из использованных концентраций ПДМАЭМ (100 мкг/мл) установлена четкая взаимосвязь между ингибированием клеточной адгезии и снижением числа жизнеспособных клеток. Т.е. сокращение числа прикрепленных клеток к субстрату при 100 мкг/мл ПДМАЭМ напрямую связано с его токсическим действием. Ранее уже показано, что ПДМАЭМ обладает токсичностью (You et al., 2007). Кроме того, установлено, что токсичность ПДМАЭМ обусловлена гибелью клеток по некротическому механизму, т.е. обработка этим поликатионом приводила к гибели клеток через повреждение клеточных мембраны, что подтверждается данными об усилении выделения цитозольного фермента ЛДГ из эндотелиальных клеток человека под действием ПДМАЭМ в концентрации от 20 до 50 мкг/мл (Laupman et al., 2009). Поликатионы полиэтиленимин и поли-L-лизин также вызывали повреждение мембран фибробластов мыши, увеличивая выделение ЛДГ соответственно на 45 и 18% (Fischer et al., 2003).

В результате проведенных нами исследований установлено, что адсорбированный на полистироловой поверхности ПДМАЭМ поддерживает адгезию фибробластов линии CHL V-79 RJK на одном уровне с контрольными значениями вне зависимости от использованной дозы поликатиона для его адсорбции на пластиковой поверхности. Предварительная обработка фибробластов ПДМАЭМ по-разному влияла на адгезию клеток к необработанному пластику. Если при малых концентрациях ПДМАЭМ практически не влиял на адгезионные свойства клеток, то дальнейшее увеличение его дозы в культуральной

среде приводило к дозозависимому ингибированию клеточной адгезии к необработанному пластику, связанному с уменьшением числа жизнеспособных фибробластов в клеточной популяции.

Эритроциты привлекают внимание исследователей в качестве объекта изучения, т.к. они обладают уникальными биологическими и биофизическими свойствами. Эритроциты, относящиеся к нерезидентным клеткам, являются наиболее важными компонентами крови, основная функция которых состоит в поддержании дыхательной активности резидентных клеток (Щербак, 2005).

При внутривенном введении синтетических полимеров и их комплексов последние непосредственно взаимодействуют с циркулирующими компонентами крови. Повреждение эритроцитов различными фармакологическими препаратами и средствами доставки последних, в том числе поликатионных полимеров, может приводить к серьезным негативным эффектам, включая гемолиз, лейкоцитоз и др. (Боровская и др., 2010). Попадая в кровеносную систему, молекулы поликатионов в свободной или связанной форме могут взаимодействовать с клетками крови и белковыми компонентами плазмы крови (Moreau et al., 2002; Flebus et al., 2015). Поэтому в доклинических исследованиях необходимо проводить оценку токсичности полимеров, включая поликатионы, в отношении форменных элементов крови.

Гемолиз является простым и надежным способом оценки совместимости полимерных материалов с компонентами крови, индикатором цитотоксичности. В представленной работе проведен анализ влия-

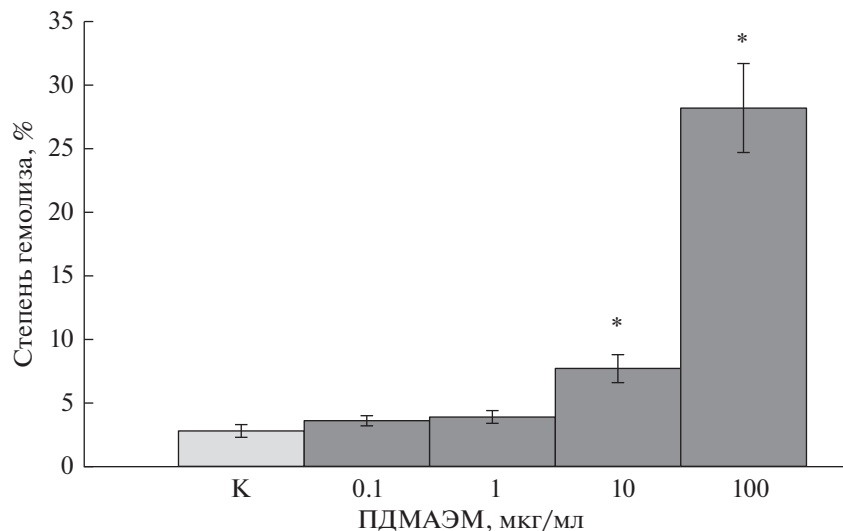


Рис. 3. Влияние поликатиона ПДМАЭМ на степень гемолиза эритроцитов человека. В суспензию эритроцитов (гематокрит 2.2%) вносили ПДМАЭМ в концентрации от 0.1 до 100 мкг/мл на 30 мин при 37°C. Контролем служили эритроциты, не обработанные ПДМАЭМ. Степень гемолиза оценивали по величине выделившегося гемоглобина в среду инкубации. Оптическую плотность измеряли при длине волны 540 нм. Результаты представлены в % от содержания гемоглобина в эритроцитах после их полного гемолиза (см. Материал и методика). Показаны средние значения и их ошибки из 8–9 независимых измерений, (*) — отличия от контроля достоверны при $P < 0.001$.

ния ПДМАЭМ на гемолиз эритроцитов человека. Показано, что ПДМАЭМ в зависимости от использованной дозы по-разному влиял на интенсивность гемолиза. Так, в дозах 0.1 и 1 мкг/мл ПДМАЭМ не влиял на гемолиз и полученные показатели фактически не отличались от контрольных значений. При добавлении ПДМАЭМ в суспензию эритроцитов в дозах 10 и 100 мкг/мл гемолитический эффект возрастал соответственно в 2.8 и 10 раз ($P < 0.001$) по сравнению с эритроцитами, не обработанными этим полимером (рис. 3).

Согласно данным из литературы (Moreau et al., 2002), ПДМАЭМ не оказывал значительного влияния на гемолиз эритроцитов человека. Возможно, это связано с тем, что эти авторы использовали для анализа активности полимера 40%-ную суспензию эритроцитов, в то время мы использовали суспензию эритроцитов 2.2%.

Поскольку гемолиз (выделение гемоглобина из эритроцитов во внешнюю среду) связан с нарушением целостности мембран эритроцитов, а эритроциты человека являются безъядерными клеточными формами, которые не содержат каких-либо органелл, можно с большой вероятностью утверждать, что основной мишенью токсического действия исследованного поликатиона является их мембрана.

Поэтому на следующем этапе мы исследовали влияние ПДМАЭМ на изменение формы эритроцитов (пойкилоцитоз) (Мороз и др., 2012). Обнаружено, что краткосрочная обработка эритроцитов полимером ПДМАЭМ в дозах 0.1 и 1 мкг/мл не влияла на морфологию эритроцитов, поскольку они сохраня-

ют дисковидную форму. Дальнейшее увеличение концентрации поликатиона (10 и 100 мкг/мл) в инкубационной среде приводило к резкому изменению клеточной формы эритроцитов (рис. 4) и часть из них приобретала сферическую форму. В этом случае мембрана эритроцитов становится более контрастной в поле зрения микроскопа. Другая часть популяции эритроцитов приобретала более вытянутую форму. Происходило уплощение эритроцитов с потерей дисковидной формы. Кроме того, отмечено слияние 2–3-х эритроцитов с измененной клеточной формой. Можно предположить, что при краткосрочном воздействии ПДМАЭМ на эритроциты адсорбция поликатиона на поверхности клетки вызывает структурные изменения, скорее всего, во внешнем листке липидного бислоя мембраны эритроцитов, трансформируя взаимодействие компонентов цитоскелета с интегральными трансмембранными комплексами. Это приводит к запуску пойкилоцитоза и морфологическим деформациям эритроцитов.

Данные, представленные на рис. 5, показывают, что инкубация эритроцитов с ПДМАЭМ в течение 30 мин при 37°C существенно влияет на активность полимера. При инкубировании эритроцитов с ПДМАЭМ в дозах 0.1 и 1 мкг/мл незначительная часть клеточной популяции изменяла форму на эхиноцитарную. По-видимому, трансформация в эхиноцитарную форму носит обратимый характер, поскольку не приводит к увеличению гемолиза при инкубировании эритроцитов при малых дозах ПДМАЭМ. В концентрациях 10 и 100 мкг/мл ПДМАЭМ вызывал агрегирование эритроцитов с образованием крупных конгломератов. Агрегирование эритроцитов связано

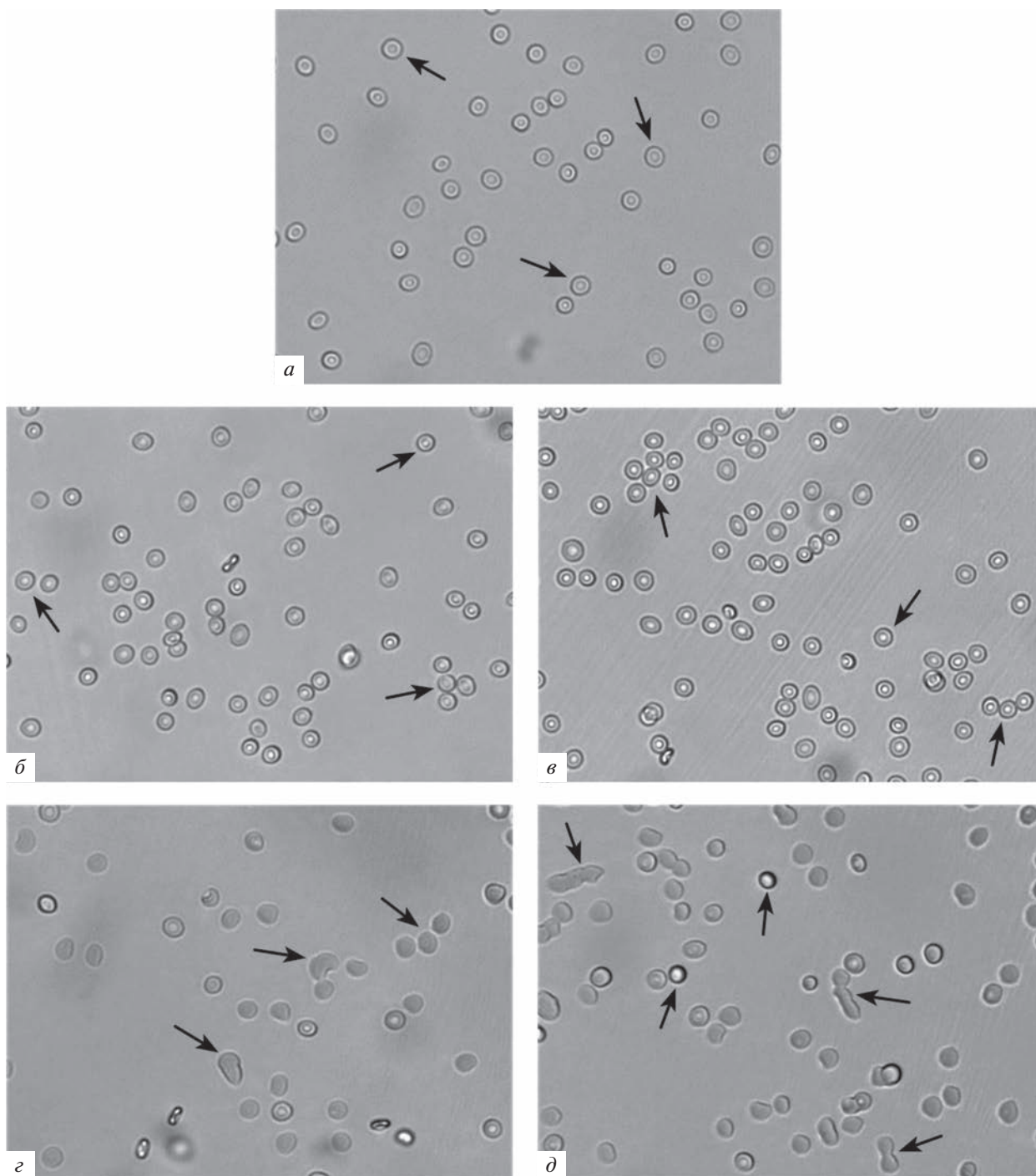


Рис. 4. Изменение формы эритроцитов человека при краткосрочном воздействии поликатиона ПДМАЭМ. *а* – Эритроциты, необработанные ПДМАЭМ (контроль); *б–д* – эритроциты, обработанные ПДМАЭМ в концентрации 0.1 (*б*), 1 (*в*), 10 (*г*) и 100 (*д*) мкг/мл. ПДМАЭМ добавляли в суспензию эритроцитов (гематокрит 2.2%), разведенную PBS в 20 раз. Через 5 мин оценивали форму эритроцитов с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS2-FL (Япония), объектив 40×. Стрелками указаны дискоциты (*а, б, в*), уплощение эритроцитов (*г*), сферизация эритроцитов (*д*) и слияние 2–3-х эритроцитов (*д*).

с полной или частичной потерей отрицательного заряда на их поверхности. В норме отрицательный заряд эритроцитов обеспечивает взаимное отталкивание эритроцитов, тем самым предотвращая их сближение и слипание в кровяном русле. Изменение

формы эритроцитов (потеря дисковидной формы) после обработки ПДМАЭМ приводит к увеличению контактной зоны у эритроцитов, что обуславливает ускорение процессов их агрегации. При этом прочность формирующихся агрегатов может возрастать.

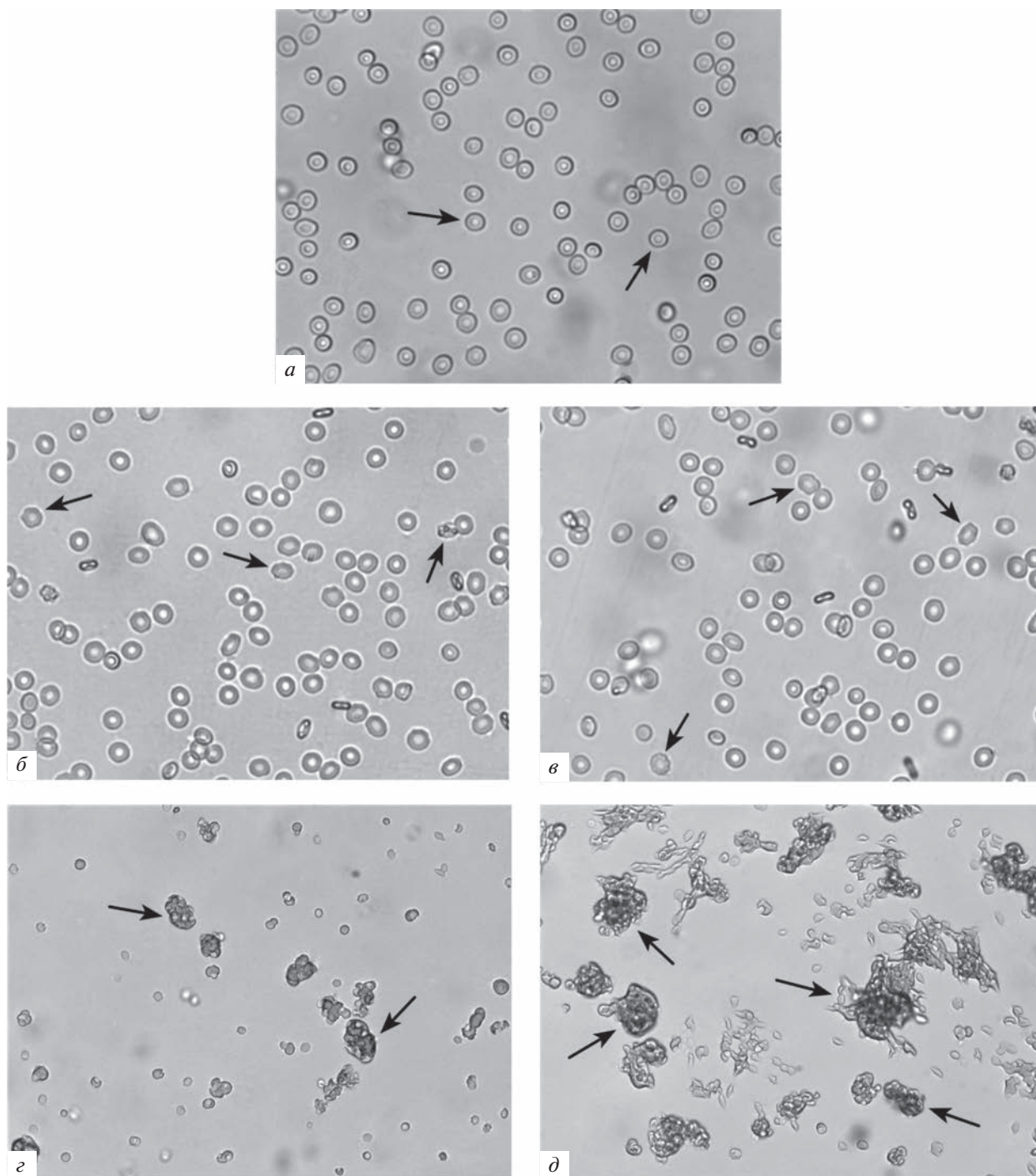


Рис. 5. Влияние поликатиона ПДМАЭМ на деформацию и агрегацию эритроцитов человека. *a* — Эритроциты, необработанные ПДМАЭМ (контроль); *б–д* — эритроциты, обработанные ПДМАЭМ в концентрации 0.1 (*б*), 1 (*в*), 10 (*з*) и 100 (*д*) мкг/мл. Поликатион добавляли в суспензию эритроцитов (гематокрит 2.2%) на 30 мин при 37°C. Форму эритроцитов оценивали после разбавления суспензии эритроцитов PBS в 20 раз, используя микроскоп Nikon Eclipse TS2-FL (Япония) и объектив 20× (*з, д*) или 40× (*а–в*). Стрелками указаны дискоциты (*а*); эхиноциты (*б, в*); агрегаты эритроцитов (*з, д*).

Ранее сообщалось, что обработка эритроцитов человека поли-L-лизинном, ПДМАЭМ и диэтиламиноэтил-декстраном вызывала гемагглютинацию (Moreau et al., 2002; Cerda-Cristerna et al., 2011). Авторы показали, что линейный ПДМАЭМ в концентрации

500 мкг/мл при внесении в образцы цельной крови человека вызывал образование значительных агрегатов эритроцитов в течение 15–120 мин, а при меньших дозах ПДМАЭМ не влиял на процессы агрегирования эритроцитов человека (Cerda-Cristerna et al., 2011).

Таблица 2. Влияние поликатиона ПДМАЭМ на количество эритроцитов в цельной крови человека

Концентрация поликатиона, мкг/мл	Количество эритроцитов ($\times 10^{12}/л$)
Контроль	4.64 ± 0.29
0.1	4.22 ± 0.21
1	4.32 ± 0.15
10	4.06 ± 0.10
100	3.95 ± 0.13

Примечание. Образцы цельной крови человека инкубировали с поликатионом или без него (контроль) 30 мин при 35°C. Количество эритроцитов определяли на гематологическом анализаторе МЕК-6550 (Япония). Показаны средние значения и их ошибки из 8 независимых экспериментов.

Необходимо отметить, что авторы использовали цитратную кровь, возможно, наличие цитрата Na в образцах крови снижало протонирование поликатиона, а значит и реакционную способность ПДМАЭМ в данных условиях.

Не менее важным при изучении влияния на гемосовместимость является анализ воздействия полимера на содержание эритроцитов в цельной крови. Данные, представленные в табл. 2, показывают, что при внесении в цельную кровь в дозе от 0.1 до 10 мкг/мл ПДМАЭМ не влиял на количественные показатели эритроцитов. Только в процессе инкубации образцов цельной крови с ПДМАЭМ в дозе 100 мкг/мл отмечена тенденция к уменьшению числа эритроцитов в крови по сравнению с контрольными значениями. Отсутствие влияния этого поликатиона на содержание эритроцитов в крови может быть связано с адсорбционной активностью сывороточного альбумина, на долю которого в составе белков плазмы приходится около 60% (Щербак, 2005). Альбумины, связываясь с циркулирующими в организме соединениями природного или искусственного происхождения, защищают клетки крови от повреждающего воздействия, как при физиологических, так и патологических состояниях. Поликатионы, связываясь с белками плазмы, формируют полиэлектролитные комплексы с низкой аффинностью для эритроцитов. Подобные взаимодействия могут снижать реакционную способность поликатионов в цельной крови. Известно, что плазма, добавленная в суспензию эритроцитов, частично предотвращала гемотоксический эффект поликатионов за счет электростатических взаимодействий с белками плазмы (Moreau et al., 2002). Низкая гемолитическая активность линейных поликатионов (ПДМАЭМ), обнаруженная и при инкубации цельной крови человека с полимерами, объясняется адсорбционной активностью белков плазмы,

снижающей концентрацию реактивных поликатионов в крови (Cerdá-Cristerna et al., 2011).

В представленной работе показано, что ПДМАЭМ сохраняет характеристики гемосовместимости при малых концентрациях. Увеличение концентрации поликатиона в среде инкубации приводит к дозозависимому гемолизу и агрегированию отмытых эритроцитов, но не влияет на количество эритроцитов в образцах цельной крови человека. Это означает, что ПДМАЭМ сохраняет свойство гемосовместимости при его добавлении в цельную кровь *in vitro*. Это дает основание полагать, что исследованный нами ПДМАЭМ может быть использован при определенных концентрациях в качестве полимерного носителя.

Необходимо подчеркнуть, что было выявлено сходство зависимости действия ПДМАЭМ на адгезивный ответ резидентных (фибробластов) клеток и на гемолитический ответ нерезидентных (эритроцитов) клеток от использованной дозы поликатиона. При относительно малых концентрациях ПДМАЭМ практически не оказывал действия на указанные физиологические реакции фибробластов и эритроцитов. Увеличение его концентрации до 10 и 100 мкг/мл в суспензии фибробластов и эритроцитов дозозависимо ингибировало клеточную адгезию или усиливало лизис эритроцитов (см. рис. 1 и 3). Возможно, выявленная корреляция между антиадгезивными свойствами в отношении фибробластов и гемолитической активностью в отношении эритроцитов ПДМАЭМ связана с однотипным воздействием поликатиона на фибробласты и эритроциты, скорее всего на физико-химическую структуру клеточных мембран.

Известно, что поликатионы взаимодействуют с отрицательно заряженными компонентами клеточных мембран и внутриклеточными структурами (Molotkovsky et al., 2021). В качестве мембранных компонентов, с которыми может связываться поликатион, могут выступать фосфолипиды, структурирующие липидный бислой клеточных мембран, а также гликолипиды, которые благодаря сиаловым кислотам вносят существенный вклад в суммарный отрицательный заряд клетки (Крепс, 1981). У эритроцитов отрицательный поверхностный заряд в большей степени обусловлен наличием олигосахаридных цепей, связанных с гликопротеинами, в первую очередь гликофоринами, наряду с фосфолипидами и гликолипидами (Боронихина и др., 2021).

Адсорбция молекул поликатиона на клеточной мембране вызывает многоуровневое воздействие. Во-первых, происходит частичная нейтрализация поверхностного заряда клетки под действием поликатиона, что не может не изменить физико-химические свойства клетки. Во-вторых, связывание молекул поликатиона с эктодоменами сложных белковых комплексов (рецепторов, ионных каналов и др.) приводит к прямому воздействию полимера на структуру белков/комплексов, изменяя в первую очередь конфор-

мационные характеристики последних (Gao et al., 2019). Это означает, что молекулы поликатиона, изменяя характеристики белковых структур, включая локальный заряд молекулы белка, влияют и на проведение сигнала из и в клетку, тем самым оказывая опосредованное воздействие на активность клеточной/эритроцитарной популяции в целом.

В настоящее время нет единого мнения о механизме воздействия поликатионов на мембрану ядерных и безъядерных клеток (Molotkovsky et al., 2021). Предполагается, что адсорбированный на клеточной мембране поликатион, электростатически взаимодействуя с фосфатными группами фосфолипидов, вызывает трансформацию липидного бислоя, которая при критических воздействиях может приводить к образованию пор (дыр) в липидном бислое мембраны (Oku et al., 1986; Reuter et al., 2009). Перфорация клеточной мембраны приводит к неконтролируемому выходу/входу внутриклеточных/внеклеточных соединений в тканевую жидкость или кровь/клетку. Кроме того, влияние адсорбированного на клеточной мембране поликатиона может ограничиваться локальными изменениями в структуре клеточной мембраны. Например, положительно заряженные поликатионы могут вызывать ограниченную в пространстве сегрегацию липидных молекул, чаще одноименно заряженных (Oku et al., 1986; Franzin, Macdonald, 2001), что приводит к мозаичному перераспределению плотности поверхностного заряда мембраны. Одновременно может происходить локальное изменение текучести клеточной мембраны (в сторону увеличения степени жидкостности или ригидности отдельных локусов мембраны), тем самым создаются условия для регулирования процессов деформации клеточных мембран, приводящих к нарушению пластических функций плазматической мембраны у резидентных и нерезидентных клеток.

На основании полученных данных можно заключить, что ПДМАЭМ может быть использован в медицинской практике в фармакологических концентрациях 0.1 и 1 мкг/мл в качестве средств доставки лекарственных препаратов (в частности противоопухолевых или противовоспалительных), а также в качестве одного из компонентов многослойных пленок для трансплантации клеток в места повреждения тканей, осуществляя тем самым регулирование процессов клеточной адгезии и восстановление целостности ткани. При малых концентрациях ПДМАЭМ сохраняет характеристики цито- и гемосовместимости. Увеличение фармакологической дозы ПДМАЭМ во внеклеточной жидкости или в плазме крови может приводить к негативным последствиям, трансформируя физиологические функции резидентных и нерезидентных клеток млекопитающих. При этом при подборе полимерных носителей необходимо учитывать не только используемую дозу ПДМАЭМ, но и величину положительного заряда полимера, которая определяет степень нейтрализации поверхностного

заряда клеток. Модификация структуры ПДМАЭМ посредством введения дополнительных заместителей с гидрофобными/гидрофильными свойствами или с разной степенью заряженности, а также использование сополимеров ДМАЭМ с различными сомономерами позволит регулировать реакционную способность поликатиона для обеспечения оптимального уровня биосовместимости полимеров с различными типами резидентных и нерезидентных клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН № 075-00967-23-00.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили в соответствии с рекомендациями Комитета по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 1-04 от 7 апреля 2022 года). От здоровых доноров получали информированное согласие на работу с их кровью.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

В.П.И.: оригинальная идея и схема экспериментов, эксперименты, анализ и интерпретация полученных данных, написание рукописи. Л.Л.А.: культивирование фибробластов, интерпретация результатов по выживаемости фибробластов. О.В.Н.: химический синтез поликатиона ПДМАЭМ, интерпретация результатов по эритроцитам. И.В.М.: обсуждение результатов. Все авторы прочитали окончательную версию рукописи и согласились с ней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Боровская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Корякина Л.Б., Курильская Т.Е., Пивоваров Ю.И. 2010. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. № 3. С. 334. (Borovskaya M.K., Kuznetsova E.E., Gorokhova V.G., Koriakina L.B., Kuril'skaya T.E., Pivovarov Ju.I. 2010. Structural and functional characteristics of membrane's erythrocyte and its change at pathologies of various genesis. Byulleten' Vostochno-Sibirskogo Nauchnogo Tsentra Sibirskogo Otdeleniya Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk. № 3. P. 334.)
- Боронихина Т.В., Ломановская Т.А., Яцковский А.Н. 2021. Плазмолемма эритроцитов и ее изменения в течение жизни клеток. Журн. анатомии и гистопатологии. Т. 10. № 2. С. 62. (Boronikhina T.V., Lamanovskaya T.A., Yatskovskii A.N. 2021. Erythrocyte plasmalemma and its

- changes during the cell lifespan. *Zhurnal Anatomii i Gistopatologii*. V. 10. № 2. P. 62.)
- Иванова В.П. 2023. О вариативности клеточного адгезивного ответа под воздействием родственных коротких пептидов. *Цитология*. Т. 65. № 1. С. 92. (Ivanova V.P. 2023. On the variability of cellular adhesive response under the influence of related short peptides. *Cell Tissue Biol. (Tsitologiya)*. V. 17. № 3. P. 265.)
- Иванова В.П., Гринчук Т.М., Алексеенко Л.Л., Арцыбашева И.В., Гаврилова И.И. 2010. Влияние синтетического поликатиона полиаллиламина на адгезию и жизнеспособность фибробластов китайского хомячка CHL V-79 RJK с разной степенью устойчивости к нагреву. *Цитология*. Т. 52. № 9. С. 729. (Ivanova V.P., Grinchuk T.M., Alekseenko L.L., Artsybasheva I.V., Gavrilova I.I. 2010. Effect of synthetic polycation polyallylamine on adhesion and viability of CHL V-79 RJK Chinese hamster fibroblasts with various heat resistance. *Cell Tiss. Biol.* V. 4. P. 520.)
- Иванова В.П., Ковалева З.В., Анохина В.В., Кривченко А.И. 2012. Влияние трипептидного фрагмента коллагена (GER) на адгезию и распластывание фибробластов зависит от свойств адгезивной поверхности. *Цитология*. Т. 54. № 11. С. 823. (Ivanova V.P., Kovaleva Z.V., Anokhina V.V., Krivchenko A.I. 2013. The effect of a collagen tripeptide fragment (GER) on fibroblast adhesion and spreading depends on properties of an adhesive surface. *Cell Tiss. Biol.* V. 7. P. 21.)
- Крепс Е.М. 1981. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. Л.: Наука. 339 с. (Kreps E.M. 1981. Lipidy kletochnykh membran. Evolyutsiya lipidov mozga. Adaptatsionnaya funktsiya lipidov (Cell membrane lipids. Evolution of brain lipids. Adaptive functions of lipids). Leningrad: Nauka. 339 pp.)
- Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В., Кузовлев А.Н., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Черныш А.М. 2012. Строение и функции эритроцита в норме и при критических состояниях. *Общая реаниматология*. Т. 8. № 1. С. 52. (Moroz V.V., Golubev A.M., Afanasyev A.V., Kuzovlev A.N., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Chernysh A.M. 2012. The structure and function of a red blood cell in health and critical conditions. *Obschaya Reanimatologiya*. V. 8. № 1. P. 52.)
- Спичкина О.Г., Пинаев Г.П., Петров Ю.П. 2008. Анализ гетерогенности кератиноцитов человека, взаимодействующих с иммобилизованными фибронектином, коллагеном I и IV типов. *Цитология*. Т. 50. № 1. С. 210. (Spichkina O.G., Pinaev G.P., Petrov Y.P. 2008. Analysis of heterogeneity of human keratinocytes interacting with immobilized fibronectin and collagens of types I and IV. *Cell Tiss. Biol.* V. 2. P. 123.)
- Трошкина Н.А., Циркин В.И., Дворянский С.А. 2007. Эритроцит: строение и функции его мембраны. *Вятский мед. вестник*. № 2-3. С. 32. (Troshkina N.A., Tsirkin V.I., Dvoryansky S.A. 2007. Erythrocyte: structure and functions of its membrane. *Vyatskii Meditsinskii Vestnik*. V. 18. № 2-3. P. 32.)
- Щербак И.Г. 2005. Биологическая химия. СПб: Изд-во СПбГМУ. 480 с. (Scherbak I.G. 2005. Biological chemistry. St. Petersburg: SPbSMU. 480 p.)
- Bačáková L., Filová E., Rypáček F., Švorčík V., Starý V. 2004. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol. Rev.* V. 53. P. 35.
- Boura C., Muller S., Vautier D., Dumas D., Schaal P., Voegel J.C., Stoltz J.F., Menu P. 2005. Endothelial cell-interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials*. V. 26. P. 4568.
- Cerda-Cristerna B.I., Flores H., Pozos-Guillén A., Pérez E., Sevrin C., Grandfils C. 2011. Hemocompatibility assessment of poly(2-dimethylamino ethylmethacrylate) (PDMAEMA)-based polymers. *J. Control. Release*. V. 153. P. 269.
- Fischer D., Li Y., Ahlemeyer B., Kriegelstein J., Kissel T. 2003. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*. V. 24. P. 1121.
- Flebus L., Lombart F., Sevrin C., Defraigne J.O., Peters P., Parhamifar L., Molin D.G.M., Grandfils C. 2015. Low molecular weight (2-dimethylamino ethylmethacrylate) polymers with controlled positioned fluorescent labeling: Synthesis, characterization and *in vitro* interaction with human endothelial cells. *Int. J. Pharmaceut.* V. 478. P. 278.
- Franzin C.M., Macdonald P.M. 2001. Polylysine-induced ²H NMR-observable domains in phosphatidylserine/phosphatidylcholine lipid bilayers. *Biophys. J.* V. 81. P. 3346.
- Gao S., Holkar A., Srivastava S. 2019. Protein-polyelectrolyte complexes and micellar assemblies. *Polymers*. V. 11. 1097. <https://doi.org/10.3390/polym11071097>
- Gribova V., Auzely-Velty R., Picart C. 2012. Polyelectrolyte multilayer assemblies on materials surfaces: From cell adhesion to tissue engineering. *Chem. Mater.* V. 24. P. 854.
- Humphries I.D., Byron A., Humphries M.J. 2006. Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* V. 119. P. 3901.
- Iwamoto D.V., Calderwood D.A. 2015. Regulation of integrin-mediated adhesion. *Cur. Opin. Cell Biol.* V. 36. P. 41.
- Jacobson F., Baraniskina A., Mertens J., Mittler D., Mohammadi-Tabrisi A., Schubert S., Soltan M., Lehnhardt M., Behnke B., Gattermann S., Steinau H.U., Steinstraesser L. 2005. Activity of histone H1.2 in infected burn wounds. *J. Antimicrob. Chemother.* V. 55. P. 735.
- Keely S., Rullay A., Wilson C., Carmichael A., Carrington S., Corfield A., Haddleton D.M., Brayden D.J. 2005. *In vitro* and *ex vivo* intestinal tissue models to measure mucoadhesion of poly(methacrylate) and N-trimethylated chitosan polymers. *Pharmac. Res.* V. 22. P. 38.
- Keely S., Ryan S., Haddleton D.M., Limer A., Murphy E.P., Colgan S.P., Brayden D.J. 2009. Dexamethasone-poly(dimethylamino)ethyl methacrylate (pDMAEMA) conjugates reduce inflammatory biomaterials in human intestinal epithelial monolayers. *J. Control. Release*. V. 135. P. 35.
- Layman J.M., Ramirez S.M., Green M.D., Long T.E. 2009. Influence of polycation molecular weight on poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)-mediated DNA delivery *in vitro*. *Biomacromol.* V. 10. P. 1244.

- Lelong I.H., Petegnief V., Rebel G.* 1992. Neuronal cells mature faster on polyethyleneimine coated plates than on polylysine coated plates. *J. Neurosci. Res.* V. 32. P. 562.
- Lutolf M.P., Hubbell J.A.* 2003. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis and tissue engineering. *Nature Biotechnol.* V. 23. P. 47.
- Ly H., Zhang S., Wang B., Cui S., Yan J.* 2006. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control. Release.* V. 114. P. 100.
- Madaan K., Kumar S., Poonia N., Lather V., Pandita D.* 2014. Dendrimers in drug delivery and targeting: drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *J. Pharmacy Bioall. Sci.* V. 6. P. 139.
- Molotkovsky R.J., Galimzyanov T.R., Ermakov Y.A.* 2021. Heterogeneity in lateral distribution of polycations at the surface of lipid membranes: from the experimental data to the theoretical model. *Materials.* V. 14. 6623.
<https://doi.org/10.3390/ma14216623>
- Monnery B.D., Wright M., Cavill R., Hoogenboom R., Shaunak S., Steinke J.H.G., Thanou M.* 2017. Cytotoxicity of polycations: relationship of molecular weight and the hydrolytic theory of the mechanism of toxicity. *Int. J. Pharm.* V. 521. P. 249.
- Moreau E., Domurado M., Chapon P., Vert M., Domurado D.* 2002. Biocompatibility of polycations: *in vitro* agglutination and lysis of red blood cells and *in vivo* toxicity. *J. Drug Target.* V. 10. P. 161.
- Moreau E., Ferrari I., Drochon A., Chapon P., Vert M., Domurado D.* 2000. Interactions between red blood cells and a lethal, partly quarternized tertiary polyamine. *J. Control. Release.* V. 64. P. 115.
- Niks M., Otto M.* 1990. Towards an optimized MTT assay. *J. Immunol. Meth.* V. 130. P. 149.
- Oku N., Yamaguchi Na, Yamaguchi No, Shibamoto S., Tto F., Nango M.* 1986. The fusogenic effect of synthetic polymers on negatively charged lipid bilayers. *J. Biochem.* V. 100. P. 935.
- Phillips D.J., Harrison J., Richards S.J., Mitchell D.E., Tichauer E., Hubbard A.T.M., Guy C., Portman I.H., Fullam E.* 2017. Evaluation of the antimicrobial activity of cationic polymers against Mycobacteria: toward antitubercular macromolecules. *Biomacromol.* V. 18. P. 1592.
- Putnam D., Gentry C.A., Pack D.W., Langer R.* 2001. Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 98. P. 1200.
- Ravichandran R., Sundarajan S., Venugopal J.R., Mukherjee S., Ramakrishna S.* 2012. Advances in polymeric systems for tissue engineering and biochemical applications. *Macromol. Biosci.* V. 12. P. 286.
- Rawlinson L.A., Ryan S.M., Mantovani G., Syrett J.A., Haddleton D.M., Brayden D.J.* 2010. Antibacterial effects of poly(2-dimethylamino ethyl) methacrylate against selected gram-positive and gram-negative bacteria. *Biomacromol.* V. 11. P. 443.
- Reuter M., Schwieger C., Meister A., Karlsson G., Blume A.* 2009. Poly-L-lysines and poly-L-arginines induce leakage of negatively charged phospholipid vesicles and translocate through the lipid bilayer upon electrostatic binding to the membrane. *Biophys. Chem.* V. 144. P. 27.
- Rihová B., Kovár L., Kovár M., Hovorka O.* 2009. Cytotoxicity and immunostimulation: double attack on cancer cells with polymeric therapeutics. *Trends Biotechnol.* V. 27. P. 11.
- Rosa M.D., Carteni M., Petillo O., Calarco A., Margarucci S., Rosso F., Rosa A.D., Farina E., Grippo P., Peluso G.* 2004. Cationic polyelectrolyte hydrogel fosters fibroblast spreading, proliferation and extracellular matrix production: Implication for tissue engineering. *J. Cell Physiol.* V. 198. P. 133.
- Samal S.K., Dash M., Vlierberghe van S., Kaplan D.L., Chellini E., Blitterswijk van C., Moroni L., Dubruel P.* 2012. Cationic polymers and their therapeutic potential. *Chem. Soc. Rev.* V. 41. P. 7147.
- Santiago L.Y., Nowak R.W., Rubin J.P., Marra K.G.* 2006. Peptide-surface modification of poly(caprolactone) with laminin-derived sequences for adipose-derived stem cell application. *J. Biomaterials.* V. 27. P. 2962.
- Schwieger C., Blume A.* 2009. Interaction of poly-L-arginine with negatively charged DPPG membranes: calorimetric and monolayer studies. *Biomacromol.* V. 10. P. 2152.
- Soravia V., Toca-Herrera J.L.* 2009. Substrate influence on cell shape and cell mechanics: Hep G2 cells spread on positively charged surfaces. *Microsc. Res. Tech.* V. 72. P. 957.
- Stawski D., Rolińska K., Zielińska D., Sahariah P., Hjalmsdóttir M.A., Másson M.* 2022. Antibacterial properties of poly(NN-dimethylaminoethyl methacrylate) obtained at different initiator concentrations in solution polymerization. *R. Soc. Open Sci.* V. 9. 211367.
<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c5764223>
- Tanasienko I.V., Yemets A.I., Finiuk N.S., Stoiko R.P., Blume Y.B.* 2015. DMAEM-based cationic polymers as novel carriers for DNA delivery into cells. *Cell Biol. Int.* V. 39. P. 243.
- Thompson M.T., Berg M.C., Tobias I.S., Lichter J.A., Rubner M.F., Vliet van K.J.* 2006. Biochemical functionalization of polymeric cell substrata can alter mechanical compliance. *Biomacromol.* V. 7. P. 1990.
- Tsai W.B., Chen R.P.Y., Wei K.L., Chen Y.R., Liao T.Y., Liu H.L., Lai J.Y.* 2009. Polyelectrolyte multilayer films functionalized with peptides for promoting osteoblast functions. *Acta Biomaterialia.* V. 5. P. 3467.
- Vancha A.R., Govindaraju S., Parsa K.V.L., Jasti M., Gonzalez-Garcia M., Ballester R.P.* 2004. Use of polyethyleneimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer. *BMC Biotechnology.* V. 4. 23.
<https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-23>
- VanderVondele S., Vörös J., Hubbell J.A.* 2003. RGD-grafted poly-L-lysine-graft-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion. *Biotechnol. Bioeng.* V. 82. P. 784.
- Xie B., Du K., Huang F., Lin Z., Wu L.* 2022. Cationic nanomaterials for autoimmune diseases therapy. *Front. Pharmacol.* V. 12. 762362.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.762362>
- You Y.Z., Manickam D.S., Zhou Q.H., Oupicky D.* 2007. Reducible poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate): synthesis, cytotoxicity, and gene delivery activity. *J. Control. Release.* V. 122. P. 217.

The Effect of Synthetic Polycation Poly-2-Dimethylaminoethylmethacrylate on Biological Activity of Mammalian Resident and Nonresident Cells

V. P. Ivanova^{a, *}, L. L. Alekseenko^b, O. V. Nazarova^c, and I. V. Mindukshev^a

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia*

^b *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

^c *Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199004 Russia*

*E-mail: valet@iephb.ru

Cationic polymers are the positively charged macromolecules that have in their structure N-containing functional groups such as primary, secondary and tertiary amine groups; quaternary ammonium groups and others. The effect of synthetic polycation poly-2-dimethylaminoethylmethacrylate (PDMAEM) on biological activity of animal fibroblasts (CHL V-79 RJK) and human red blood cells (RBCs) was studied. The influence of PDMAEM on cell adhesion using fibroblast culture was analyzed. Cultural plastic treated or untreated by polycation was used as substrate. The polycation adsorption on polystyrene surface did not change the adhesive capacity of fibroblasts. Pretreatment of fibroblasts with PDMAEM did not influence at low concentrations (0.1 and 1 µg/mL) the adhesive properties of cells plated on the untreated plastic surface. At high concentrations (10 and 100 µg/mL) PDMAEM inhibited the attachment of fibroblasts to this substrate. Relationship between the inhibition of cell adhesion under PDMAEM action and the toxic effect on fibroblast viability has been found. The PDMAEM treatment of human RBCs at high doses led to the damage of cells and release of hemoglobin to incubation medium. At low doses PDMAEM practically did not influence the hemolysis of RBCs. It was shown that PDMAEM induced the change of the shape and aggregation of RBCs. The toxic effect of PDMAEM on human RBCs coincided as a whole with such effect for animal fibroblasts. Possible cell targets upon the PDMAEM effect are discussed.

Keywords: synthetic polycation, adhesion, cytotoxicity, hemolysis, aggregation, fibroblasts, red blood cells

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КЛЕТОК МИОКАРДА ПРИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА И ИШЕМИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

© 2023 г. А. И. Стельмашенко^{1, 2}, С. Л. Андреев³, Л. С. Литвинова^{2, 4, *}, В. В. Малащенко⁴, Н. М. Тодосенко⁴, Н. Д. Газатова⁴, И. А. Хлусов^{1, 2}, В. М. Шипулин³

¹Кафедра морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета, Томск, 634050 Россия

²Лаборатория клеточных и микрофлюидных технологий Сибирского государственного медицинского университета, Томск, 634050 Россия

³Научно-исследовательский институт кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, 634012 Россия

⁴Центр иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. И. Канта, Калининград, 236041 Россия

*E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.04.2023 г.

После доработки 26.04.2023 г.

Принята к публикации 29.04.2023 г.

В настоящей работе проведен сравнительный анализ цитокинового профиля миокарда у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) и у пациентов с ишемической кардиомиопатией (ИКМП) на фоне ИБС. Методом проточной флюориметрии с использованием мультиплексной тест-системы проведено определение концентраций 41 цитокина, секретируемых 24-часовой тканевой культурой миокарда, интраоперационно забранного из ушка правого предсердия (ПП, контроль) и перинфарктной зоны (ПЗ) левого желудочка (ЛЖ). Цель работы — изучить *in vitro* цитокиновый профиль клеток миокарда для поиска возможных предикторов неблагоприятных исходов хирургического лечения пациентов с ИБС и ИКМП. У пациентов с ИКМП на фоне ИБС секреция миокардом провоспалительных молекул GM-CSF и IFN- γ значительно выросла (до 78–80 пг/г, $p < 0.05$) по сравнению с нулевыми значениями при ИБС. В то же время наблюдали 3-кратное снижение концентрации лиганда Fractalkine 3 (Flt-3L — лиганда fms-подобной тирозинкиназы 3). Падение секреции Flt-3L отмечено именно в ПЗ-ЛЖ в сравнении с УПП. Кроме того, в сравнении с ушком ПП, в тканевой культуре миокарда ПЗ-ЛЖ резко снижались концентрации фактора роста фибробластов-2 (FGF-2), тромбоцитарного фактора роста AB/BB (PDGF-AB/BB), интерлейкинов IL-15 и IL-4, а также фактора, экспрессируемого и секретируемого нормальными Т-клетками при активации (RANTES/CCL5). Обнаруженные изменения анализируются с помощью корреляционного и регрессионного анализа; предлагаются возможные предикторы риска хирургического лечения пациентов двух групп. Предлагается рассмотреть провоспалительные цитокины (IL-5, IL-6) и хемокины (Flt-3L, IL-8), а также факторы ангиогенеза (VEGF) и ангиостаза (IP-10) в качестве потенциальных маркеров неблагоприятного исхода хирургического лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Ключевые слова: цитокиновый профиль культуры миокарда, ишемическая кардиомиопатия, ишемическая болезнь сердца, корреляционный анализ, регрессионный анализ, ремоделирование левого желудочка

DOI: 10.31857/S0041377123050097, **EDN:** POBBZE

Миокард — это многокомпонентная ткань, состоящая из кардиомиоцитов (функциональных клеток) и внеклеточного матрикса, формирующего каркас сердца и включающего в себя различные клеточные популяции (фибробласты, адипоциты, резидентные макрофаги, эндотелиальные клетки и т.д.). При воспалении и регенерации фибробласты активируются мигрирующими из крови лейкоцитами, что усиливает секрецию ангиогенных и профиброгенных факторов, а также способность дифференцироваться в миофибробласты, адипоцитоподобные клетки, хондроциты и остеобласты (Choi et al., 2010). Такая

сложная многоклеточная система организации требует регуляторного и координирующего надзора за взаимоотношениями между клеточными популяциями, который обеспечивается, в том числе, различными цитокинами и факторами роста.

Нарушение баланса про- и противовоспалительных цитокинов является маркером неблагоприятного прогноза воспалительного процесса, способствует повреждению кардиомиоцитов и, как следствие, приводит к патологическому ремоделированию миокарда (Москалёв и др., 2017; Timonen et al., 2008; Хамитова и др., 2017). При этом воспаление миокар-

да приобретает хроническое течение, что, в итоге, становится причиной потери сократительной способности и дилатации камер сердца, преобладания продуктивного воспаления вследствие избыточной продукции профиброгенных цитокинов (Prabhu et al., 2016; Berezin et al., 2020; Kologrivova, 2021).

Известно, что концентрации IL-1, хемоаттрактантного белка моноцитов (MCP-1) и фактора некроза опухоли альфа (TNF α) в крови повышены при инфаркте миокарда и сердечной недостаточности. Это приводит к увеличению размеров и гибели кардиомиоцитов за счет активации каскадных реакций, таких как NF- κ B, JAK/STAT и PI3-киназа (Murakami et al., 2015). Считается, что цитокины определяют реализацию воспаления, его длительность и исход; в частности, активными участниками воспаления являются провоспалительные TNF α , хемокины IL-8 и MCP-1, а также противовоспалительный IL-10. Эти молекулы, наряду с другими, играют роль медиаторов каскада иммунного реагирования как единого целого и определяют координацию интегральных (иммунной, эндокринной, гемопоэтической и фагоцитарной) систем организма (Симбирцев, 2018; Юрова и др., 2020). Они же являются главными биомаркерами течения воспаления (Bartekova et al., 2018).

В настоящее время существует достаточно исследований, описывающих цитокиновый профиль крови у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (см., например: Urazova et al., 2019; Van der Heijden et al., 2019; Henein et al., 2022). Ряд цитокинов, включая TNF- α , TGF- β и некоторые интерлейкины (IL-1, IL-4, IL-6, IL-8 и IL-18), участвуют в развитии различных воспалительных сердечных патологий, а именно ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности и кардиомиопатии. Другие цитокины, такие как IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 и IL-10, участвуют в восстановлении тканей после ишемии и, таким образом, считается, что они оказывают благотворное влияние на сердечную функцию (Bartekova et al., 2018). Так, выявлено статистически значимое снижение в крови провоспа-

лительного хемокина IL-8 при дилатационной кардиомиопатии и ишемической кардиомиопатии (ИКМП) на фоне повышения концентрации провоспалительного цитокина TNF α , хемокина MCP-1 и противовоспалительного хемокина IL-10. Цитокины обнаружены в атеросклеротических бляшках и на внутренней поверхности сосудов, что может играть определенную патогенетическую роль в формировании ИКМП (Хамитова и др., 2017).

В то же время интерес представляет сам миокард, как синтетически активная ткань, клетки которой способны локально продуцировать биологически активные вещества, участвующие в фиброгенезе (Maass et al., 2005; Cojan-Minzat et al., 2021). Частые осложнения хирургического лечения пациентов с ИКМП в виде постинфарктного ремоделирования левого желудочка (ЛЖ) (Гриценко и др., 2020) обуславливают необходимость поиска качественных и количественных предикторов неблагоприятного развития репаративного процесса.

Цель настоящей работы заключалась в изучении *in vitro* цитокинового профиля тканевой культуры миокарда для поиска возможных предикторов неблагоприятных исходов хирургического лечения пациентов с ишемической болезнью сердца и ишемической кардиомиопатией.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал. Исследование проведено на материале интраоперационных биопсий из ушка правого предсердия (ПП) и перинфарктной зоны (ПЗ) миокарда, полученных от 14 пациентов с диагнозом ИКМП и ишемическая болезнь сердца (ИБС). Пациентам с ИКМП и ИБС проводилась вентрикулопластика по методике, предложенной Дором (Dor, 1997) в модификации по Мениканти (Menicanti, 2002) в сочетании с аортокоронарным шунтированием и пластикой митрального клапана при наличии соответствующих показаний.

В группу пациентов с ИБС и ИКМП вошли 9 человек (8 мужчин и 1 женщина), средний возраст пациентов составлял 64.8 ± 2.6 лет (минимальный и максимальный — 61 и 69 лет соответственно). В группу пациентов с ИБС без ИКМП вошли 5 пациентов мужского пола, средний возраст составил 52.0 ± 7.2 года (минимальный и максимальный 45 и 61 год соответственно). Критериями включения больных в основную группу исследования являлись критерии для постановки диагноза ишемическая кардиомиопатия, предложенные в 2002 г. (Felker et al., 2002), а именно: наличие участков акинеза и дискинеза ЛЖ, конечно-систолический индекс (КСИ) ЛЖ > 60 мл/м², фракция выброса ЛЖ $\leq 40\%$, длительность ИБС > 1 года и стеноз ствола левой коронарной артерии $> 75\%$ или проксимальный стеноз передней нисходящей артерии, или стенозы, превышающие 75%, не менее чем в двух коронарных артериях.

Принятые сокращения: ИБС — ишемическая болезнь сердца; ИКМП — ишемическая кардиомиопатия; ИФ — иммуноферментный; КСИ — конечно-систолический индекс; ЛЖ — левый желудочек; ПЗ — перинфарктная зона; ПП — правое предсердие; CXCL/CCL — мотив С-Х-С хемокин/С-С мотив лиганд; EGF — эпидермальный фактор роста; FGF-2 — основной фактор роста фибробластов; Flt-3L — фракталкин-3 лиганд; Fractalkine — фракталкин; G-CSF — колониестимулирующий фактор гранулоцитов; GM-CSF — колониестимулирующий фактор гранулоцитов и моноцитов; GRO — онкоген, связанный с ростом опухоли; IFN — интерферон; IL — интерлейкин; IP-10 — гамма-интерферон индуцируемого белка 10; MCP — моноцитарный хемотаксический протеин; MDC — макрофагальный хемокин; MIP — макрофагальный белок воспаления; PDGF — тромбоцитарный фактор роста; RANTES/CCL5 — фактор, экспрессируемый и секретируемый нормальными Т-клетками при активации; sCD40L — трансмембранный гликопротеин типа I; TGF- α — трансформирующий фактор роста альфа; TNF — фактор некроза опухоли; VEGF — фактор роста эндотелия сосудов.

Все пациенты проходили лечение в отделении сердечно-сосудистой хирургии Научно-исследовательского института кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (НИИ кардиологии Томского НИМЦ) в период 2011–2022 гг. Все пациенты получили полную информацию об исследовании и дали осознанное письменное информированное согласие на добровольное участие в нем. Работа проведена с информированного согласия пациентов на основе разрешения локального этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 7981 от 16.12.2019 г.).

Морфометрическое исследование. Для гистологического исследования интраоперационные образцы миокарда фиксировали в 10%-ном забуференном формальдегиде, далее осуществляли стандартную проводку образцов с последующей заливкой в парафин и подготовкой серийных срезов (толщиной 3–5 мкм). Окрашивали гематоксилин-эозином (БиоВитрум, Россия) по стандартной методике.

Визуализацию изображения осуществляли в проходящем свете на микроскопе Axioskop 40 фирмы Carl Zeiss (Германия). Микрофотографии гистологических препаратов получали с помощью фотокамеры Canon G 10 (Япония) с разрешением 14 мегапикселей. Морфометрический анализ производили с помощью программы обработки графических изображений ImageJ v1.43 software (Национальный институт здоровья, Бетезда, США) в 10 случайных полях зрения, что соответствовало 1 мм² ткани. Для оценки таких морфологических изменений миокарда, как удельный объем внутриклеточного отека кардиомиоцитов, интерстициального отека, капилляров, паренхимы, стромы и ядер кардиомиоцитов, а также количественной оценки степени выраженности воспаления в сердце применяли метод точечного счета в 10 случайных полях, исключая перекрытие полей зрения.

Культивирование. Другие интраоперационные биопсии из УПП и перинфарктной зоны миокарда (объем извлеченной ткани ~1 мм³), полученные от 15 пациентов с диагнозом ИКМП и ИБС, помещали в пробирки со средой DMEM/F12, содержащей гентамицин и культивировали 24 ч при 37°C. Затем супернатанты (надосадочные жидкости) из тканевых культур центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об./мин, помещали в эппендорфы и хранили не более 1 мес. при температуре –80°C для последующего мультиплексного анализа. Вследствие некоторого разброса объема биопсийных образцов определяли их массу (табл. 1) на аналитических весах GR-202 (A&D Company, Токио, Япония) для перерасчета уровней цитокинов в культуре на 1 г ткани миокарда.

Мультиплексный ИФ-анализ по типу проточной флуориметрии. Количественное определение хемокинов, факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов проводили методом флуоресцентной проточной флуориметрии на автоматизированном

Таблица 1. Массы образцов биопсийного миокарда от пациентов разных групп

Пациент (n = 9)	Масса биоптата, полученного из ушка ПП (контроль), г (n ₁ = 7)	Масса биоптата, полученного из ПЗ-ЛЖ, г (n ₁ = 9)
Пациенты с ИКМП		
1	0.19 ± 0.01	0.16 ± 0.01
2	0.19 ± 0.03	0.03 ± 0.01
3	0.06 ± 0.03	0.11 ± 0.02
4	0.05 ± 0.01	0.01 ± 0.01
5	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.01
6	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00
7	—	0.34 ± 0.01
8	—	0.03 ± 0.01
9	0.06 ± 0.01	0.21 ± 0.01
Пациенты с ИБС (n = 5; n ₁ = 5)		
1	0.10 ± 0.03	0.18 ± 0.02
2	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01
3	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.02
4	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02
5	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01

Примечание. Даны средние значения и их стандартные отклонения; n — число пациентов; n₁ — число образцов миокарда.

анализаторе Bio-Plex Protein Assay System (Bio-Rad, США) с использованием коммерческой тест-системы MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Panel I, 41 plex kit (Merck Millipore, США). Для определения цитокинового профиля миокарда была выбрана следующая панель цитокинов: интерлейкины IL-1α, IL-1β, IL-1Ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A; фактор некроза опухоли альфа (TNFα); фактор некроза опухоли бета (TNFβ); альфа-интерферон (IFN-α2); гамма-интерферон (IFNγ); эотаксин (CCL11); колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF); колониестимулирующий фактор гранулоцитов и моноцитов (GM-CSF); трансформирующий фактор роста альфа (TGF-α); тромбоцитарный фактор роста (PDGF-AA и PDGF-AB/BB); индуцируемый гамма-интерфероном протеин 10 (IP-10; мотив C-X-C хемокин 10 (C-X-C motif chemokine 10, CXCL10); моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1; chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)); моноцитарный хемотаксический протеин-3 (MCP-3); макрофагальный белок воспаления 1α (MIP-1α; CCL3); макрофагальный белок воспаления 1β (MIP-1β; CCL4); фактор, экспрессируемый и секретируемый нормальными Т-клетками при активации (RANTES/CCL5); основной фактор роста фибробластов (FGF-2); фактор роста эндотелия сосудов (VEGF); эпидермальный фактор роста (EGF); онко-

ген, связанный с ростом опухоли (GRO); фракталкин (Fractalkine; Flt-3 лиганд; лиганд fms-подобной тирозинкиназы 3); трансмембранный гликопротеин типа I (sCD40L) и макрофагальный хемокин MDC (CCL22).

Концентрацию определяли по стандартной кривой для каждого набора (определяемый динамический диапазон 2–10000 пг/мл) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя (Merck Millipore, США). При статистической обработке значения уровня цитокинов, выходящие за нижнюю границу чувствительности метода (<2 пг/мл), принимали за 1 пг/мл.

Статистическая обработка результатов. Обработку выполняли с использованием пакета программ MS Excel и STATISTICA 10.0 for Windows (StatSoft Inc., США). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. При распределении, отличающемся от нормального, для выявления отличий между группами использовали непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни для независимых выборок и описывали с указанием медианы (Me) и межквартильного размаха (Q1–Q3). Корреляционный анализ проводили с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при критическом уровне значимости $p < 0.05$. Зависимость между количественными признаками определяли с помощью линейного многофакторного регрессионного анализа. Для построения регрессионной модели использовалось 16 наблюдений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Секреция цитокинов, хемокинов и факторов роста у пациентов с ИБС и ИКМП. Согласно классификации цитокинов по концентрации (van den Broek et al., 2014), среди 41 цитокина, хемокина и фактора роста, секретируемых *in vitro* тканевой культурой миокарда у пациентов с ИКМП или ИБС, было выделено 4 группы биологически активных молекул. Группу цитокинов с наибольшей концентрацией (от 1000 до 10000 пг/мл) составили IL-8, MCP-1, IL-6 и GRO. Концентрация IL-8 вне зависимости от зоны миокарда (УПП или ПЗ-ЛЖ) и диагноза (ИКМП или ИБС) приближалась к максимальным значениям чувствительности мультиплексного ИФ-анализа (до 10000 пг/мл).

У пациентов с ИБС в группу цитокинов со средней концентрацией (от 100 до 1000 пг/мл) вошли: FGF-2, RANTES/CCL5, G-CSF и IP-10. Остальные цитокины и факторы роста, секретируемые клетками сердца пациентов с ИБС, были представлены в низкой (от 10 до 100 пг/мл) и следовой концентрациях (от 0 до 10 пг/мл).

У пациентов с ИКМП группу цитокинов с высокой концентрацией (от 1000 пг/мл) дополнил IL-7 (среднее значение его концентрации составило

1873.9 пг/мл). В группу цитокинов со средней концентрацией (от 100 до 1000 пг/мл) вошли IP-10, IL-5, IFN- γ , RANTES/CCL5 и FGF-2. Остальные цитокины и факторы роста, секретируемые клетками сердца пациентов с ИКМП, были представлены в низкой (от 10 до 100 пг/мл) и следовой концентрациях (от 0 до 10 пг/мл).

После биопсии участки миокарда несколько различались по массе (табл. 1), поэтому в дальнейшем концентрации цитокинов выражали в пикограммах на 1 грамм миокарда в 1 мл культуральной среды.

Сравнение пациентов с ИКМП и ИБС по секреции клетками сердца цитокинов и факторов роста. По результатам сравнения концентраций цитокинов, хемокинов и факторов роста у двух групп пациентов показано, что у пациентов с ИКМП секреция Flt-3L статистически значимо в 3 раза ниже, чем уровень этого лиганда в культуре миокарда пациентов с ИБС (табл. 2). С другой стороны, секреция GM-CSF и IFN- γ значительно выше (до 78–80 пг/г, $p < 0.05$) у пациентов в группе ИКМП, чем в группе ИБС с нулевыми значениями этих показателей.

При сопоставлении содержания цитокинов, хемокинов и факторов роста в культуральной среде в зависимости от зоны интереса в ПЗ-ЛЖ у пациентов с ИКМП или ИБС отмечено статистически значимое снижение (в сравнении с ушком ПП) секреции 6 аналитов: FGF-2 (до 26%, $p = 0.001$), Flt-3L (до 19%, $p = 0.003$), PDGF-AB/BB (до 30%, $p = 0.012$), IL-15 (до 0, $p = 0.007$), IL-4 (до 0, $p = 0.027$) и RANTES/CCL5 (до 15%, $p = 0.027$) (табл. 2).

При сравнении морфометрических показателей установлено, что у пациентов обеих групп наблюдения (ИБС и ИКМП) в ПЗ-ЛЖ частота встречаемости интерстициального отека и, особенно, удельного объема капилляров оказались резко сниженными соответственно в 15 ($p = 0.003$) и 61 ($p = 0.049$) раз по сравнению с соответствующими показателями в ушке ПП (рис. 1). Морфология миокарда ПЗ-ЛЖ характеризовалась наличием фиброзной ткани, а также кардиомиоцитов с признаками атрофии и компенсаторной гипертрофии (рис. 2).

Определение взаимосвязей между концентрацией цитокинов, хемокинов и факторов роста и морфометрическими показателями миокарда у пациентов с ИКМП. Корреляционный анализ выявил положительные и отрицательные взаимосвязи между концентрацией цитокинов и такими морфометрическими показателями, как удельный объем интерстициального отека и удельный объем стромы миокарда, а также диаметр кардиомиоцитов и наличие воспалительного инфильтрата в сердце у пациентов с ИКМП (рис. 3а). Множественный регрессионный анализ показал обратно пропорциональную взаимосвязь между концентрацией IL-8 в миокарде и диаметром кардиомиоцитов у пациентов с ИКМП, а также прямо пропорциональную взаимосвязь между

Таблица 2. Концентрации цитокинов, хемокинов и факторов роста при 24-часовом культивировании образцов миокарда ушка ПП и ПЗ-ЛЖ от пациентов с ИКМП и ИБС

Цитокины, хемокины и факторы роста	Концентрация, пг на 1 г миокарда в 1 мл среды			
	ИБС (контроль; $n = 5, n_1 = 14$)	ИКМП на фоне ИБС ($n = 9, n_1 = 27$)	ПЗ-ЛЖ ($n = 14, n_1 = 41$)	Ушко ПП (контроль; $n = 12, n_1 = 35$)
EGF	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)
FGF-2	6861.2 (3591.3–10060.8)	3512.3 (589.4–10010.6)	2669.1* (189.4–3674.6) $p = 0.001$	10123.3 (6346.1–13952.3)
Eotaxin	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–179.7)	0.0 (0.0–0.0)
TGF- α	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)
G-CSF	1514.8 (949.7–5467.0)	2327.5 (541.7–6981.2)	1437.3 (625.8–3468.5)	3603.6 (968.2–10709.9)
Flt-3L	812.8 (271.3–1296.0)	273.9* (67.5–733.9) $p = 0.042$	178.3* (82.8–312.2) $p = 0.003$	957.5 643.8–1192.0)
GM-CSF	0.0 (0.0–64.4)	80.0* (29.0–21.4) $p = 0.026$	47.4 (0.0–116.2)	67.9 (11.2–9.4)
Flt-3	853.5 (0.0–1401.2)	1149.6 (148.01–823.0)	788.1 (0.0–1689.6)	1196.1 (527.2–681.8)
IFN α 2	269.1 (0.0–503.1)	182.9 (0.0–592.7)	87.5 (0.0–01.8)	411.0 (105.3–592.7)
IFN- γ	0.0 (0.0–45.6)	77.6* (25.3–130.9) $p = 0.012$	25.3 (0.0–90.1)	71.0 (17.6–84.1)
GRO	25225.2 (13777.8–33093.3)	20446.4 (1590.4–47288.6)	24317.9 (2774.9–1566.6)	21353.7 (8173.5–64494.3)
IL-10	0.7 (0.3–1.6)	0.6 (0.2–1.4)	0.8 (0.2–1.8)	0.6 (0.3–1.2)
MCP-3	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)
IL-12p40	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)
MDC	533.5 (400.51–656.9)	375.4 (132.4–544.9)	414.0 (117.7–556.8)	450.7 (345.1–733.3)
IL-12p70	16.2 (0.0–73.1)	39.3 (0.0–39.2)	38.3 (0.0–133.8)	17.3(0.0–95.5)
PDGF-AA	85.21 (0.0–139.8)	50.6 (0–115.5)	85.9 (0.0–139.8)	55.7 (0.0–97.3)
IL-13	79.2 (31.5–96.4)	115.5 (34.3–174.8)	94.7 (26.2–190.0)	82.9 (36.5–115.5)
PDGF-AB/BB	81104 (60.7–184.8)	111.6 (18.5–245.9)	60.2* (0.0–108.8) $p = 0.012$	199.8 (83.3–264.2)
IL-15	50.9 (0.0–67.4) $p1 < 0.05$	0.0* (0.0–17.8) $p1 < 0.05$	0.0* (0.0–0.0) $p = 0.007$	50.9 (9.7–76.4)
sCD40L	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)
IL-17A	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)
IL-1RA	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)
IL-1a	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)
IL-9	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)
IL-1b	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)
IL-2	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)
IL-3	8.4 (4.2–11.0)	11.4 (3.5–20.1)	9.3 (3.6–13.0)	10.4 (6.5–16.1)
IL-4	0.0 (0.0–192.2)	9.1 (0.0–278.5)	0.0* (0.0–5.2) $p = 0.027$	140.2 (0.0–472.4)
IL-5	11.9 (8.5–13.8)	18.2 (7.9–55.5)	15.8 (7.6–33.0)	14.2 (8.8–19.0)
IL-6	33452.9 (18382.3–57609.3)	40437.1 (2710.2–90352.0)	38160.3 (7907.5–95466.0)	32088.2 (9115.8–81466.6)
IL-7	299.2 (221.5–522.8)	770.6 (226.2–1143.6)	647.2 (295.8–1036.3)	430.4 (213.4–765.7)
IL-8	93824.7 (40033.1–153981.1)	133125.7 (1752.2–199863.3)	80796.6 (11182.9–199987.0)	135778.7 (11421.5–199795.7)
IP-10	1498.7 (815.6–2187.6)	2181.5 (1299.1–3857.4)	1511.6 (912.8–4123.0)	2182.3 (1397.2–3047.1)
MCP-1	46714.4 (27893.8–75625.4)	47304.1 (3124.7–115210.9)	47696.1 (17826.2–118332.6)	46714.4 (15794.5–98294.0)
MIP-1a	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–323.8)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–402.5)
MIP-1b	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–146.4)	0.0 (0.0–0.0)	0.0 (0.0–0.0)
RANTES	1668.9 (443.9–3258.7)	1828.6 (263.8–3523.1)	501.4* (231.8–2120.0) $p = 0.037$	3258.7 (1565.6–5549.0)
TNF α	42.6 (28.5–86.8)	50.7 (23.7–82.7)	39.3 (23.9–86.8)	53.2 (24.8–82.7)
TNF β	8.8 (4.3–13.9)	14.9 (5.4–29.6)	12.4 (5.6–29.0)	10.8 (4.8–19.3)
VEGF	0.0 (0.0–3864.9)	120.8 (0.0–2052.8)	120.7 (0.0–2775.6)	0.0 (0.0–2015.9)

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (Q1–Q3); (*) – различия между группами сравнения ИБС/ИКМП и ушко ПП/ПЗ-ЛЖ достоверны при $p < 0.05$ и выделены жирным шрифтом. Данные по зонам интереса (ушко ПП и ПЗ-ЛЖ) включают значения обеих групп пациентов (ИБС и ИКМП); n – число пациентов; n_1 – число определений концентраций.

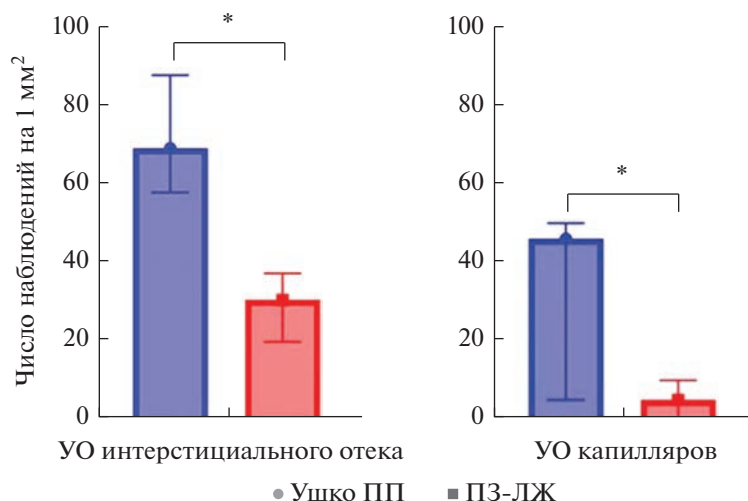


Рис. 1. Сравнительные морфометрические показатели миокарда в ушке правого предсердия (ПП; темный столбец) и перинфарктной зоне левого желудочка (ПЗ-ЛЖ; светлый столбец) в обеих группах наблюдения (ИБС и ИКМП). УО — удельный объем. Показаны медианы и квартильные размахи; (*) — различия достоверны при уровне значимости $p < 0.05$. По горизонтали показано наличие морфометрического показателя для ушка ПП и ПЗ-ЛЖ.

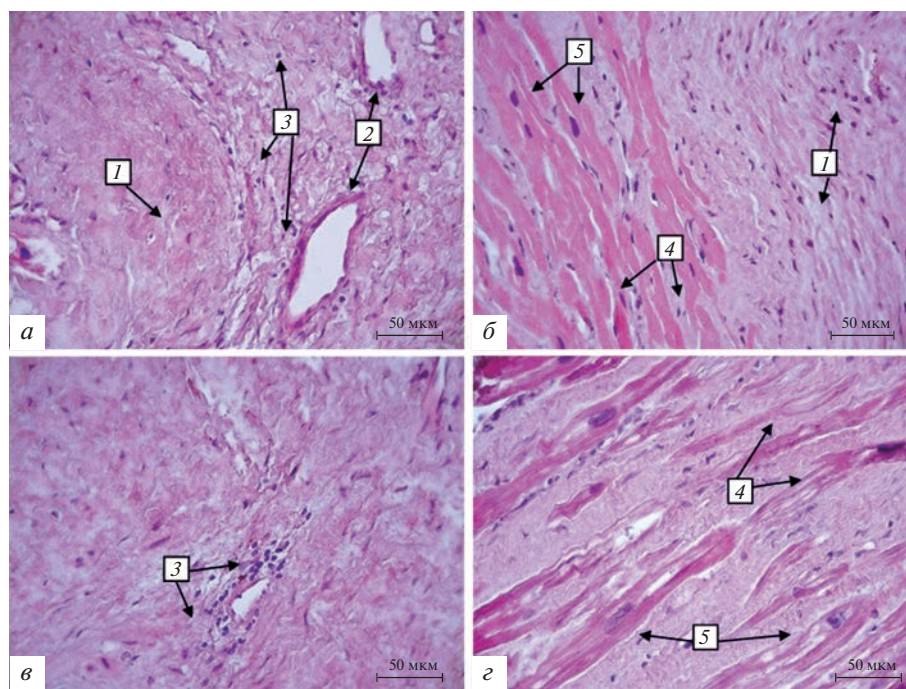


Рис. 2. Миокард перинфарктной зоны левого желудочка при ИБС сердца (а, в, г) и ИКМП (б). Показаны фиброз (1), кровеносные сосуды (2), слабо выраженный воспалительный инфильтрат (3), атрофия (4) и компенсаторная гипертрофия кардиомиоцитов (5). Окраска гематоксилин-эозином. Увел. об.: $\times 40$.

концентрацией IL-6 в миокарде и удельным объемом стромы миокарда пациентов с ИКМП (табл. 3).

Определение взаимосвязей между концентрацией цитокинов, хемокинов и факторов роста и морфометрическими показателями миокарда у пациентов с ИБС. В ходе корреляционного анализа данных пациентов с ИБС наибольшее количество корреляционных

взаимосвязей было выявлено между цитокинами и такими морфометрическими показателями, как удельный объем паренхимы миокарда, удельный объем стромы миокарда, удельный объем интерстициального отека и удельный объем капилляров (рис. 3б). Множественный регрессионный анализ показал прямо пропорциональную взаимосвязь между кон-

Таблица 3. Стандартизированные β -коэффициенты в полученной модели множественной регрессионной связи морфометрических, гемодинамических и биохимических показателей с концентрациями цитокинов в тканевой культуре миокарда, полученного от пациентов с ИКМП

Цитокин (хемокин)	β -Коэффициент (К)	Стандартная ошибка К	p	R^2
Пациенты с ИКМП ($n = 16$)				
Диаметр кардиомиоцитов, мкм				
IL-8	-0.708334	0.182277	0.001285	0.502
УО стромы миокарда				
IL-6	0.660712	0.200617	0.005332	0.436
КСИ после операции				
IL-5	0.795798	0.161843	0.000227	0.633
Фракция выброса ЛЖ до операции				
IL-8	-0.680400	0.195860	0.003723	0.463
Концентрация мочевины в крови до операции, мМ				
MDC (CCL22)	0.687331	0.209683	0.006606	0.472
Концентрация креатинина в крови до операции, мкМ				
MDC (CCL22)	0.677116	0.235695	0.030610	0.472
Концентрация тромбоцитов до операции, $10^9/\text{л}$				
IP-10	-0.678342	0.258031	0.048969	0.578
Пациенты с ИБС ($n = 10$)				
Воспалительный инфильтрат в миокарде, шт/мм ²				
IL-5	0.868237	0.175416	0.001121	0.753
Удельный объем капилляров в миокарде, число наблюдений на 1 мм ²				
VEGF	0.657714	0.266320	0.038732	0.432

Примечание. Морфометрические показатели учитывали в обеих зонах миокарда: ушке ПП и ПЗ-ЛЖ. n – число пациентов; (*) – уровень достоверности p ; R^2 – коэффициент детерминации.

Определение взаимосвязей между концентрацией цитокинов, хемокинов и факторов роста и биохимическими показателями крови у пациентов с ИКМП. Для пациентов с ИКМП в ходе корреляционного анализа наибольшее количество корреляционных взаимосвязей было выявлено с такими биохимическими показателями, как международное нормализованное отношение (МНО), концентрация мочевины и креатинина, измеренными до операции, и между концентрацией фибриногена и количеством тромбоцитов, измеренных в течение двух недель после операции (рис. 5). Множественный регрессионный анализ (табл. 3) показал прямо пропорциональную взаимосвязь между концентрацией MDC (CCL2) в миокарде и концентрациями мочевины и креатинина, измеренными до оперативного вмешательства у пациентов с ИКМП ($r = 0.687$ и $r = 0.677$ соответственно), а также обратную связь между концентрацией IP-10 и содержанием тромбоцитов крови, измеренных в течение 1 нед. после операции пациентов с ИКМП ($r = -0.678$).

Множественный регрессионный анализ позволил получить стандартизованные коэффициенты линейной регрессии морфометрических, гемодинамических, биохимических показателей и секретиру-

емых миокардом цитокинов для группы пациентов с ИКМП (табл. 3).

Определение взаимосвязей между концентрацией цитокинов, хемокинов и факторов роста и биохимическими показателями крови у пациентов с ИБС. У этих пациентов достоверные корреляционные связи были определены между концентрацией цитокинов в миокарде (MDC (CCL2), IL-12p70, IL-8) и содержанием тромбоцитов, лейкоцитов и концентрациями общего белка, мочевины и глюкозы, измеренными и до оперативного лечения пациентов с ИБС, и в течение 2-х нед. после операции. Однако в ходе множественного регрессионного анализа достоверных различий между этими показателями обнаружено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Локальное нарушение баланса цитокинов, по мнению многих исследователей, стимулирует повреждающее воздействие цитокинов на ткани сердца и является маркером неблагоприятного прогноза течения заболевания (Timonen et al., 2008; Хамитова и др., 2017; Симбирцев, 2018). В проведенном нами исследовании была выявлена группа провоспалительных

тельных цитокинов (GRO, IL-6, MCP-1 и IL-8), концентрация которых в миокарде приближалась к максимальным значениям чувствительности мультиплексного ИФ-анализа у пациентов с ИКМП на фоне ИБС и пациентов с ИБС без ИКМП (до 10000 пг/мл). Высокие концентрации перечисленных цитокинов можно рассматривать, на наш взгляд, как ключевые факторы хронического воспаления и, как следствие, риска патологического ремоделирования сердца для пациентов обеих групп.

В литературе представлены доказательства того, что повышенная концентрация в крови провоспалительных молекул (таких как $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, галлектин 3) при сердечной недостаточности подтверждает ключевую роль воспаления в ее прогрессировании (Москалёв и др., 2017). IL-6, наряду с IL-8, играет двоякую роль при повреждении миокарда. В острую фазу они обеспечивают защитную роль за счет снижения сократительной способности кардиомиоцитов и индукции антиапоптотической программы. В свою очередь высокие (>1000 пг/мл) концентрации IL-6 и IL-8 при длительном воздействии являются патогенными, что в конечном итоге приводит к хроническому воспалению и ремоделированию сердца (Hirota et al., 1995; Fontes et al., 2015; Ridker et al., 2017). MCP-1/CCL2 является одним из ключевых хемокинов, регулирующих миграцию и инфильтрацию моноцитов (макрофагов) в ткани. Миграция моноцитов из кровотока через эндотелий сосудов необходима для рутинного иммунологического надзора и возникает в ответ на воспалительный процесс, пополняя пул тканевых макрофагов — основных участников воспалительного процесса в миокарде (Deshmane et al., 2009).

Ущерб, нанесенный сердечной мышце при инфаркте миокарда, является результатом двух процессов: острой ишемии и последующей реперфузии (Ibanez et al., 2015). Согласно экспериментальным данным, при инфаркте миокарда именно реперфузионным повреждением спровоцировано около 50% окончательного размера зоны повреждения (Yang et al., 2007). Выявленная нами повышенная концентрация хемокина Flt-3L в культуре миокарда у пациентов с ИБС без ИКМП может указывать на риск острого поражения большого объема ткани сердца вследствие микроциркуляторной обструкции сосудов и реперфузионного повреждения миокарда. Действительно, некоторые авторы (Spray et al., 2021, Damás et al., 2005, Voag et al., 2015) считают, что рецептор CX3CR1 к Flt-3L играет ключевую роль в развитии ишемии и реперфузионного повреждения миокарда. Спустя 90 мин после проведения реперфузии происходит связывание рецептора CX3CR1 с Flt-3L на эндотелии сосудов микроциркуляторного русла и эмиграция Т-лимфоцитов из кровотока в миокард, где иммунные клетки не только выступают в качестве активаторов воспаления, но и запускают апоптоз кардиомиоцитов при помощи провоспалительных цитокинов (Корнева, Доросевич, 2016; Spray et al., 2021).



Рис. 5. Интегральная карта регрессионных взаимосвязей между концентрацией цитокинов в тканевой культуре миокарда и биохимическими показателями крови пациентов с ИКМП в соответствии с табл. 3. Квадратные скобки означают концентрацию, индексы 1 и 2 — значения измерены до и через 2 нед. после оперативного вмешательства соответственно.

Трехкратное падение уровня Flt-3L в миокарде пациентов с ИКМП (табл. 2) может предполагать качественное изменение репаративных и патологических процессов в сравнении с группой ИБС. При поиске таких качественных взаимосвязей (рис. 3) между концентрацией цитокинов и клинко-морфометрическими показателями миокарда у пациентов с ИКМП на фоне ИБС выявлена обратная связь между концентрацией IL-8 и диаметром кардиомиоцитов, а также прямая связь между концентрацией IL-6 и УО стромы миокарда (рис. 4). Как уже было описано выше (Хамитова и др., 2017), длительное нарастание концентраций IL-6 и IL-8 приводит к утончению миофибрилл, конденсации и утрате ядра кардиомиоцитами вследствие апоптоза, и, как следствие, к уменьшению диаметра клеток. Провоспалительный фон стимулирует дифференцировку миофибробластов, которые активно продуцируют матрикс сердца, все больше замещая функциональную ткань сердца на соединительную (Timonen et al., 2008; Jiang, Rinkevich, 2018). Установленная прямая корреляция высокого уровня IL-6 с УО стромы в миокарде ($r = 0.66$; рис. 4) соответствует данным из литературы. В свою очередь обнаруженная обратная связь ($r = -0.68$) между концентрацией IL-8 и фракцией выброса ЛЖ, рассчитанной до операции (рис. 4), как одного из самых важных гемодинамических показателей сердца для постановки диагноза и показаний для проведения операции, также предполагает развитие фиброза миокарда. Еще одним важным гемодинамическим показателем сердца принято считать КСИ-ЛЖ, измеренный спустя более 6 мес после операции. Этот показатель необходим для прогнозирования исхода хирургического лечения (обратное или прогрессирующее ремоделирование ЛЖ со-

ответственно — благоприятный или неблагоприятный исход хирургического лечения).

В рамках пилотного исследования нам не удалось выявить изменения цитокинов при разных исходах хирургического лечения. Тем не менее, при ИБС IL-5 способствует с высокой степенью детерминации $R^2 = 0.85$ (R^2 — коэффициент детерминации) накоплению воспалительного клеточного инфильтрата в миокарде ($r = 0.92$; рис. 4). В свою очередь, при ИКМП прямая связь ($r = 0.795$; рис. 4) концентрации IL-5 с КСИ-ЛЖ, измеренным после операции, позволяет предположить участие в патологическом процессе клеток гуморального иммунитета, поскольку IL-5 стимулирует пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов (Boren, Gershwin, 2004).

При поиске взаимосвязей между концентрацией цитокинов и клинико-морфометрическими показателями миокарда у пациентов с ИБС без ИКМП было показано, что лишь концентрация VEGF значимо влияет на плотность капилляров в миокарде ($r = 0.657$; рис. 4). Это неудивительно, так как VEGF является одним из основных сигнальных белков, вырабатываемых клетками для стимулирования васкулогенеза и ангиогенеза (Шевченко и др., 2020). Морфофункциональное состояние ушка ПП дает основание для суждения о состоянии миокарда в целом (Кожевников, 2009). Поэтому резкое падение удельного объема капилляров в ПЗ-ЛЖ в сравнении с ушком ПП (рис. 1) отражает неблагоприятную тенденцию острой ишемии при ИБС с переходом в мало васкуляризованную соединительную ткань у пациентов с ИКМП. Действительно, в первое время после инфаркта миокарда перинфарктная зона морфологически характеризуется увеличенным объемом капилляров. Так, известно, что первые очаги ангиогенеза появляются в перинфарктной зоне на 3 сут после инфаркта; однако в процессе формирования рубца количество капилляров в ПЗ-ЛЖ снижается (Корнева, Доросевич, 2016; Шперлинг и др., 1989).

В этом плане падение секреции FGF-2 и PDGF-AB/BB в ПЗ-ЛЖ, в сравнении с ушком ПП, может быть молекулярным механизмом сниженной васкуляризации миокарда. FGF-2, помимо митогенной активности по отношению к фибробластам, модифицирует миграцию эндотелиальных клеток и выступает как ангиогенный фактор (Shvangiradze et al., 2016). PDGF-AB/BB также является одним из ключевых факторов ангиогенеза (Narasimhalu et al., 2015).

По результатам корреляционного (рис. 3) и регрессионного (табл. 3) анализа между концентрацией цитокинов/хемокинов, секретлируемых культурой миокарда, и биохимическими показателями крови, значимые связи были выявлены только в группе пациентов с ИКМП (рис. 5). Между концентрацией MDC в миокарде и концентрацией креатинина и мочевины в крови были установлены прямые связи ($r = 0.677$ и $r = 0.68$ соответственно) (рис. 5). MDC/CCL22 — хемокин, вырабатываемый макро-

фагами, играет важную роль в рекрутировании клеток Т-хелперов 2 типа в очаг воспаления, а также в регуляции иммунных реакций, связанных с Т-хелперами 2 типа. Помимо участия в хемотаксисе лейкоцитов, хемокин может усиливать функцию тромбоцитов, поскольку тромбоциты экспрессируют рецептор CCR4, с которым связывается MDC (Goudswaard, 2019). Прямое объяснение взаимосвязи этих показателей дать трудно, однако это может помочь заново взглянуть на доступные для исследования на дооперационном этапе биохимические показатели крови в качестве возможных предикторов послеоперационных осложнений.

Для концентрации IP-10 в миокарде и количества тромбоцитов в крови нами была показана обратная связь ($r = -0.680$) (рис. 5). IP-10 можно рассматривать как потенциальный эндогенный ингибитор ангиогенеза, обладающий ангиостатическим влиянием (Hueso et al., 2018). Поэтому секреция данного цитокина в перинфарктной зоне может быть молекулярным механизмом снижения удельного объема капилляров, выявленного на срезах миокарда (рис. 1).

С другой стороны, IP-10 является одним из цитокинов/хемокинов, ассоциированных с тромбозом (Robba et al., 2020). В нашем исследовании IP-10 входил в группу цитокинов, продуцируемых культурой миокарда *in vitro* в средней концентрации (от 100 до 1000 пг/мл). Отрицательная регрессия растущей концентрации IP-10 в миокарде с числом тромбоцитов в крови после операции вентрикулопластики не согласуется с данными из литературы, но является интересным фактом, требующим дальнейшего изучения в плане благоприятного прогностического фактора снижения риска послеоперационного тромбоза.

В целом рис. 4 и 5 показывают число регрессионных связей изученных показателей у пациентов с ИКМП, двукратно (6 против 3) превышающее таковое у больных ИБС. Согласно работе Гольдберга и соавторов (1996), увеличение взаимосвязей параметров в биологической системе отражает снижение ее пластичности и уменьшение вариантов исходов (реституция, субституция, гибель) при воздействии повторных или постоянных раздражителей. Таким образом, *in vitro* оценка цитокинового профиля миокарда пациентов с ИКМП и ИБС свидетельствует о протекании воспалительных процессов в сердечной ткани разного характера, сначала острого, впоследствии хронического, частым неблагоприятным исходом которых является патологическое ремоделирование миокарда. Данные результаты согласуются с полученными ранее данными морфологического и иммуногистохимического исследования (Стедьмашенко и др., 2019, 2020).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение *in vitro* цитокинового профиля тканевой культуры миокарда и связи гуморальных факто-

ров с клинико-морфометрическими показателями сердца и биохимией крови позволило предположить таргетные молекулярные механизмы и обозначить потенциальные предикторы исходов хирургического лечения пациентов с ИБС и ИКМП. У пациентов с ИКМП на фоне ИБС секреция миокардом провоспалительных молекул GM-CSF и IFN- γ значительно растет в отличие от нулевых значений в группе ИБС. В то же время отмечено 3-кратное снижение концентрации Flt-3L в ПЗ-ЛЖ в сравнении с ушком ПП. Кроме того, в сравнении с ушком ПП, в тканевой культуре миокарда ПЗ-ЛЖ резко снижались концентрации фактора роста фибробластов-2 (FGF-2), тромбоцитарного фактора PDGF-AB/BB, интерлейкинов IL-15 и IL-4, а также фактора RANTES/CCL5, экспрессируемого и секретируемого нормальными Т-клетками при активации. Молекулярные изменения в миокарде больных с ИКМП, вариации концентраций провоспалительных цитокинов (IL-5, IL-6) и хемокинов (Flt-3L, IL-8), факторов ангиогенеза и ангиостаза (VEGF, IP-10) могут служить молекулярными механизмами вялотекущего течения воспалительного процесса, патологической реструктуризации матрикса сердца, а также факторами значительного риска повторного ремоделирования миокарда ЛЖ, то есть неблагоприятного исхода хирургического лечения. При этом с самой высокой степенью детерминации ($R^2 = 0.85$) накопление инфильтрата в ткани миокарда, обусловленное IL-5 и свидетельствующее об активном течении воспаления у больных ИБС, может быть потенциальным предиктором сниженного риска развития ИКМП и повторного (патологического) ремоделирования миокарда ЛЖ после хирургического лечения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Сибирскому государственному медицинскому университету за частичную поддержку в рамках Программы стратегического академического лидерства “Приоритет-2030”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-315-90051: Молекулярные, клеточные и тканевые маркеры неблагоприятных исходов хирургического лечения пациентов с ишемической кардиомиопатией).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа проведена с информированного согласия пациентов на основе разрешения локального этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ (протокол № 7981 от 16.12.2019 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.И. Стельмашенко: постановка цели и задач, планирование экспериментов, анализ результатов, написание статьи; И.А. Хлусов: постановка цели и задач, планирование экспериментов, написание статьи; С.Л. Андреев, В.М. Шипулин: предоставление клинического материала; А.И. Стельмашенко, Л.С. Литвинова, В.В. Малащенко, Н.Д. Тодосенко, Н.М. Газатова: постановка экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Удут В.В., Наумов С.А., Хлусов И.А. 1996. Закономерности структурной организации систем жизнеобеспечения в норме и при развитии патологического процесса. Томск. 283 с. (Gol'dberg E.D., Dygay A.M., Udu V.V., Naumov S.A., Kh-lusov I.A. 1996. Regularities of structural organization of life support systems in norm and in development of pathological process. Tomsk. 283 p.)
- Гриценко О.В., Чумакова Г.А., Шевляков И.В., Веселовская Н.Г. 2020. Внеклеточный матрикс сердца и его изменения при фиброзе миокарда. Кардиология. Т. 60. № 6. С. 107. (Gritsenko O.V., Chumakova G.A., Shevlyakov I.V., Veselovskaya N.G. 2020. Extracellular matrix of the heart and its changes in myocardial fibrosis. Kardiologiya. V. 60. № 6. P. 107.)
<https://doi.org/10.18087/cardio.2020.6.n773>
- Кожевников М.Л. 2009. Морфологические признаки вероятности послеоперационного ремоделирования левого желудочка у больных с приобретенными пороками сердца. Автореф. канд. дис. Томск. 23 с. (Kozhevnikov M.L. 2009. Morphological signs of the likelihood of postoperative left ventricular remodeling in patients with acquired heart defects. PhD Thesis. Tomsk. 23 p.)
- Корнева Ю.С., Доросевич А.Е. 2016. Динамика морфологических изменений в пограничной зоне при организации инфаркта миокарда. Медицинский вестник Северного Кавказа. Т. 11. № 3. С. 417. (Korneva Yu.S., Dorosovich A.E. 2016. Dynamic of morphological changes in border zone during myocardial infarction organization. Med. News of North Caucasus. V. 11. № 3. P. 417.)
<https://doi.org/10.14300/mnnc.2016.11092>
- Москалёв А.В., Рудой А.С., Апчел В.Я. 2017. Хемокины, их рецепторы и особенности развития иммунного ответа. Вестник Российской военно-медицинской академии. Т. 2. С. 182. (Moskalev A.V., Rudoy A.S., Apchel V.Ya. 2017. Chemokines, their receptors and features of development of the immune answer. Bull. Russ. Military Med. Acad. V. 2. P. 182.)
- Симбирцев А.С. 2018. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб: Фолиант. 512 с. (Simbircev A.S. 2018. Cytokines in pathogenesis and treatment of human diseases. SPb: Foliant. 512 p.)
- Стельмашенко А.И., Беляева С.А. 2019. Морфологические и молекулярные предикторы повторного ремоделирования левого желудочка при ишемической кардиомиопатии. Морфологический альманах имени В.Г. Ковеш-

- никова. Т. 17. № 4. С. 71. (Stelmashenko A.I., Belyaeva S.A. 2019. Morphological and molecular predictors of left ventricular remodeling in ischemic cardiomyopathy. V.G. Koveshnikov Morphological Almanac. V. 17. № 4. P. 71.)
- Сте́льмаше́нко А.И., Бе́льева С.А., Ра́кина М.А., Андре́ев С.Л. 2020. Роль макрофагов в ремоделировании левого желудочка у пациентов с ишемической кардиомиопатией. Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. Т. 18. № 4. С. 61. (Stelmashenko A.I., Belyaeva S.A., Rakina M.A., Andreev S.L. 2020. The role of macrophages in left ventricular remodeling in patients with ischemic cardiomyopathy. Koveshnikov Morphological Almanac. V. 18. № 4. P. 61.)
- Ха́митова К.А., Че́пурная А.Н., Ни́куличева В.И., Са́фуанова Г.Ш. 2017. Содержание цитокиновых маркеров воспаления у больных при хронической сердечной недостаточности, обусловленной некоторыми кардиомиопатиями. Acta Biomed. Sci. T. 2. № 3. С. 48. (Khamitova K.A., Chepurayeva A.N., Nikulichyeva V.I., Safuanova G.Sh. 2017. Content of cytokine inflammatory markers in patients with chronic heart failure caused by cardiomyopathy. Acta Biomed. Sci. V. 2. № 3. P. 48.)
- Ше́вченко А.В., Про́кофьев В.Ф., Ко́ненко В.И., Ха́паев Р.С., Ни́маев В.В. 2020. Полиморфизм генов фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и матриксных металлопротеиназ (MMP) при первичной лимфедеме конечностей. Медицинская иммунология. Т. 22. № 3. С. 497. (Shevchenko A.V., Prokofyev V.F., Konenkov V.I., Khapaev R.S., Nimaev V.V. 2020. Polymorphism of vascular endothelial growth factor gene (VEGF) and matrix metalloproteinase (MMP) genes in primary limb lymphedema. Med. Immunol. V. 22. № 3. P. 497.)
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-POV-1913>
- Шпе́рлинг И.Д., Араке́лян Л.А. 1989. Число и размеры желудочковых кардиомиоцитов человека и количество ядер в них. Цитология. Т. 31. № 4. С. 426. (Sperling I.D., Arakelyan L.A. 1989. Number and size of human ventricular cardiomyocytes and number of nuclei in them. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 31. № 4. P. 426.)
- Ю́рова К.А., Ха́зиахматова О.Г., Ма́лащенко В.В., Но́ркин И.К., Ива́нов П.А., Хлу́сов И.А., Шу́нькин Е.О., То́досенко Н.М., Ме́лащенко Е.С., Ли́твинова Л.С. 2020. Клеточно-молекулярные аспекты воспаления, ангиогенеза и остеогенеза. Краткий обзор. Цитология. Т. 62. № 5. С. 305. (Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Todosenko N.M., Norokin I.K., Ivanov P.A., Khlusov I.A., Melashchenko E.S., Litvinova L.S. 2020. Cellular-molecular aspects of inflammation, angiogenesis and osteogenesis. A short review. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 62. № 5. P. 305.)
- Ба́ртекова М., Ра́досиньска Ж., Же́лемский М., Дха́лла Н.С. 2018. Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease. Heart Fail Rev. V. 5. P. 733.
<https://doi.org/10.1007/s10741-018-9716-x>
- Бе́резин А.Е., Бе́резин А.А. 2020. Adverse cardiac remodelling after acute myocardial infarction: old and new biomarkers. Disease Markers. V. 2020. P. 21
<https://doi.org/10.1155/2020/1215802>
- Бо́аг С.Е., Да́с Р., Шме́лева Е.В., Ба́гналл А., Э́гред М., Хо́уард Н., Спиридопу́лос И. 2015. T lymphocytes and fractalkine contribute to myocardial ischemia/reperfusion injury in patients. J. Clin. Invest. V. 125. P. 3063.
<https://doi.org/10.1172/JCI80055>
- Бо́рен Е., Ге́ршвин М.Е. 2004. Inflamm-aging: autoimmunity, and the immune-risk phenotype. Autoimmunity rev. V. 3. P. 401.
- Чо́й В., Во́лбер Р., Ге́рват В., Ма́нн Т., Ба́тцер Ж., Сму́да С., Ли́у Х., Ко́лбе Л., Хе́аринг В.Д. 2010. The fibroblast-derived paracrine factor neuregulin-1 has a novel role in regulating the constitutive color and melanocyte function in human skin. J. of Cell Science. V. 123. P. 3102.
<https://doi.org/10.1242/jcs.064774>
- Ко́жан-Ми́нзат Б.О., Зли́бут А., Аго́стон-Ко́лдеа Л. 2021. Non-ischemic dilated cardiomyopathy and cardiac fibrosis. Heart Fail. Rev. V. 26. P. 1081.
<https://doi.org/10.1007/s10741-020-09940-0>
- Дама́с Ж.К., Боу́ллиер А., Ва́эре Т., Сми́т С., Са́ндберг В.Д., Грин С., Же́хенбергер О. 2005. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, is elevated in coronary artery disease and is reduced during statin therapy. Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biol. V. 25. P. 2567.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000190672.36490.7b>
- Дешма́не С.Л., Кре́млев С., Ами́ни С., Са́вая Б.Е. 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. J. Interferon Cytokine Res. V. 29. P. 313.
<https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- До́р В. 1997. Left ventricular aneurysms: The endoventricular circular patch plasty. Seminars in thoracic and cardiovascular surgery. V. 9. P. 123.
- Фелке́р Г.М., Шо́у Л.К., О'Ко́ннор С.М. 2002. A standardized definition of ischemic cardiomyopathy for use in clinical research. J. Am. Coll. Cardiol. V. 39. P. 210.
[https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01738-7](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01738-7)
- Фонте́с Ж.А., Ро́се Н.Р., Чі́хакová Д. 2015. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. Cytokine. V. 74. P. 62.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.12.024>
- Го́удсва́рд Л.Д. 2019. Do the chemokines MDC and TARC contribute to obesity-related platelet hyperactivity and cardiovascular disease? Abstracts of the 1st Platelet Society Meeting. Bristol. P. 133. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09537104.2019.1693140>
- Хе́нейн М.У., Ва́нчери С., Ло́нго Г., Ва́нчери Ф. 2022. The role of inflammation in cardiovascular disease. Int. J. Mol. Sci. V. 23. P. 12906.
<https://doi.org/10.3390/ijms232112906>
- Хиро́та Х., Йо́шида К., Ки́шимото Т., Та́га Т. 1995. Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 92. P. 4862.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.486>
- Хуэ́со Л., Орте́га Р., Се́ллес Ф., Уу-Хио́нг Н.У., Орте́га Ж., Ци́вера М., Аска́со Ж.Ф., Са́нз М.Д., Ре́ал Ж.Т., Пи́кверас Л. 2018. Upregulation of angiostatic chemokines IP-10/CXCL10 and I-TAC/CXCL11 in human obesity and their implication for adipose tissue angiogenesis. Int. J. Obes. (Lond.). V. 42. P. 1406.
<https://doi.org/10.1038/s41366-018-0102-5>
- Иба́ñez В., Хе́усх Г., Ови́зе М., Ва́н де Ве́рф Ф. 2015. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. J. Am. College Cardiol. V. 65. P. 1454.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.02.032>

- Jiang D., Rinkevich Y. 2018. Defining skin fibroblastic cell types beyond CD90. *Frontiers Cell Devel. Biol.* V. 6. P. 133. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00133>
- Kologrivova I., Shtatolkina M., Suslova T., Ryabov V. 2021. Cells of the immune system in cardiac remodeling: Main players in resolution of inflammation and repair after myocardial infarction. *Front. Immunol.* V. 12. P. 664457. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.664457>
- Maass D.L., White J., Horton J.W. 2005. Nitric oxide donors alter cardiomyocyte cytokine secretion and cardiac function. *Crit. Care Med.* V. 33. P. 2794.
- Menicanti L. 2002. The Dor procedure: What has changed after fifteen years of clinical practice? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* V. 124. P. 886. <https://doi.org/10.1067/mtc.2002.129140>
- Murakami T., Iwagaki H., Saito S. 2015. Equivalence of the acute cytokine surge and myocardial injury after coronary artery bypass grafting with and without a novel extracorporeal circulation system. *J. Int. Med. Res.* V. 33. P. 133. <https://doi.org/10.1177/147323000503300201>
- Narasimhalu K., Ma L., De Silva D.A., Wong M.C., Chang H.M., Chen C. 2015. Elevated platelet-derived growth factor AB/BB is associated with a lower risk of recurrent vascular events in stroke patients. *Int. J. Stroke.* V. 10. P. 85. <https://doi.org/10.1111/ijis.1235>
- Prabhu S.D., Frangogiannis N.G. 2016. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: From inflammation to fibrosis. *Circ. Res.* V. 119. P. 91. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>
- Ridker P.M., Everett B.M., Thuren T., MacFadyen J.G., Chang W.H., Ballantyne C., Fonseca F., Nicolau J., Koenig W., Anker S., Kastelein J.P., Cornel Jan H., Pais P., Pella D., Genest J. et al. 2017. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. V. 377. P. 1119. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707914>
- Robba C., Battaglini D., Pelosi P., Rocco P.R.M. 2020. Multiple organ dysfunction in SARS-CoV-2: MODS-CoV-2. *Expert Rev. Respir. Med.* V. 14. P. 865. <https://doi.org/10.1080/17476348.2020.1778470>
- Shvangiradze T.A., Bondarenko I.Z., Troshina E.A., Shestakova M.V., Ilyin A.V., Nikankina L.V., Karpukhin A.V., Muzafarova T.A., Kipkeeva F.M., Grishina K.A., Kuzevanova A.Y. 2016. Profile of micrnas associated with coronary heart disease in patients with type 2 diabetes. *Obesity Metabolism.* V. 13. P. 34. <https://doi.org/10.14341/omet2016434-38>
- Spray L., Park C., Cormack S., Mohammed A., Panahi P., Boag S., Bennaceur K., Sopova K., Richardson G., Stangl V., Rech L., Rainer P., Ramos G., Hofmann U., Stellos K. et al. 2021. The fractalkine receptor CX3CR1 links lymphocyte kinetics in CMV-seropositive patients and acute myocardial infarction with adverse left ventricular remodeling. *Front. Immunol.* V. 12. P. 605857. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0035-z>
- Timonen P., Magga J., Risteli J., Punnonen K., Vanninen E., Turpeinen A., Tuomainen P., Kuusisto J., Vuolteenaho O., Peuhkurinen K. 2008. Cytokines, interstitial collagen and ventricular remodelling in dilated cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* V. 124. P. 293. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.02.004>
- Urazova O., Chumakova S., Vins M., Maynagasheva E., Shipulin V., Pryahin A., Poletika V., Kononova T., Kolobovnikova Y., Novitskiy V. 2019. Characteristics of humoral regulation of differentiation of bone marrow monocyte subpopulations in patients with ischemic cardiomyopathy. *Int. J. Biomed.* V. 9. P. 91. [https://doi.org/10.21103/Article9\(2\)_OA1](https://doi.org/10.21103/Article9(2)_OA1)
- Van den Broek L.J., Kroeze K.L., Waaijman T., Breetveld M., Sampat-Sardjoepersad S.C., Niessen F.B., Gibbs S. 2014. Differential response of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, dermal fibroblasts, and keratinocytes to burn wound exudates: potential role of skin-specific chemokine CCL27. *Tiss. Eng. Part 1.* V. 20. P. 197. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0123>
- Van der Heijden T., Bot I., Kuiper J. 2019. The IL-12 cytokine family in cardiovascular diseases. *Cytokine.* V. 122. P. 154. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.10.010>
- Yang X.C., Liu Y., Wang L.F., Cui L., Wang T., Ge Y.G., Zhao Z.Q. 2007. Reduction in myocardial infarct size by post-conditioning in patients after percutaneous coronary intervention. *J. Invasive Cardiol.* V. 19. P. 424.

Cytokine Profile of Myocardial Cells in Coronary Heart Disease and Ischemic Cardiomyopathy

A. I. Stelmashenko^{a, b}, S. L. Andreev^c, L. S. Litvinova^{b, d, *}, V. V. Malashchenko^d, N. M. Todosenko^d, N. D. Gazatova^d, I. A. Khlusov^{a, b}, and V. M. Shipulin^c

^aMorphology and General Pathology Department, Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

^bLaboratory of Cellular and Microfluidic Technologies, Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

^cCardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634012 Russia

^dCenter of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041 Russia

*e-mail: larisalitvinova@yandex.ru

In the present work, we carried out a comparative analysis of myocardial cytokine profile in patients with coronary heart disease (CHD) and in patients with ischemic cardiomyopathy (ICMP) associated with CHD. The concentrations of 41 cytokines secreted by 24-hour myocardial tissue culture intraoperatively sampled from the right atrial auricle (RAA, control) and peri-infarct left ventricular zone (PZ-LV) were determined by flow fluorimetry using a multiplex test system. The aim was to study in vitro cytokine profile of myocardial cells to search for possible predictors of adverse outcomes of surgical treatment of patients with CHD and ICMP. Myocardial secretion of proinflam-

matory molecules GM-CSF and IFN- γ increased significantly (up to 78-80 pg/g, $p < 0.05$) in patients with ICMP associated with CHD in contrast to zero values in CHD. At the same time, there was a three-fold decrease in the concentration of fractalkin 3 ligand (Flt-3L; FMS-like tyrosine kinase 3 ligand). A decrease in Flt-3L secretion was observed in the PZ-LV in comparison with the RAA. In addition, compared with RAA, concentrations of fibroblast growth factor-2 (FGF-2), platelet-derived growth factor-AB/BB (PDGFAB/BB), interleukins IL-15 and IL-4, and a regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES; CCL5) were strongly reduced in PZ-LV myocardial tissue culture. Differences in the course of CHD and ICMP are discussed, and possible predictors of surgical treatment risk in patients of the two groups are suggested using correlation and regression analyses. Proinflammatory cytokines (IL-5, IL-6) and chemokines (Flt-3L, IL-8), as well as angiogenesis factors (VEGF) and angiostasis (IP-10), are proposed to be considered as potential markers of adverse outcome of surgical treatment of cardiovascular disease.

Keywords: myocardial culture cytokine profile, ischemic cardiomyopathy, coronary heart disease, correlation and regression analysis, left ventricular remodeling

УДК 57.04;57.053:616-002-008.953-092

ВЛИЯНИЕ ГЛИКОДЕЛИНА НА УРОВЕНЬ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ И БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ У КРЫС WISTAR ПРИ ВВЕДЕНИИ АЛЛОГЕННЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

© 2023 г. С. А. Заморина^{1,2, *}, М. С. Бочкова^{1,2}, В. П. Тимганова¹, С. В. Ужвиюк¹, К. Ю. Шардина¹, В. В. Власова¹, М. Б. Раев^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН — филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН, Пермь, 614081 Россия

²Биологический факультет Пермского государственного национального исследовательского университета, Пермь, 614068 Россия

*E-mail: zamorina.sa@gmail.com

Поступила в редакцию 25.05.2023 г.

После доработки 19.06.2023 г.

Принята к публикации 24.06.2023 г.

Амниотический вариант гликоделина (GdA) обладает выраженными иммуномодулирующими свойствами, участвуя в формировании иммунной толерантности в период беременности. Исследовали влияние GdA на количество Т-регуляторных лимфоцитов (Treg), и уровень белков острой фазы воспаления (α -2-макроглобулина (α -2М), орозомикоид, С-реактивного белка (СРБ)) при введении аллогенных клеток красного костного мозга (КМ) крысам Wistar в динамическом эксперименте *in vivo*. Установлено, что введение GdA на фоне введения аллогенных КМ вызывало повышение доли периферических Treg среди CD4⁺-лимфоцитов в финале эксперимента (на 21-е сут) в сравнении с группой, которой вводили КМ. Показано, что GdA снижал уровень СРБ и α -2М, но повышал концентрацию орозомикоид в сыворотке экспериментальных животных в начале эксперимента (3-и сут), однако к концу эксперимента (21-е сут) у всех групп экспериментальных животных наблюдали нормализацию содержания белков острой фазы воспаления до уровня интактных животных. Таким образом, гликоделин способен реализовать иммуносупрессорный эффект в отношении аллогенных клеток через повышение уровня Treg и орозомикоид, а также снижение концентрации СРБ и α -2М.

Ключевые слова: костный мозг, крысы, гликоделин, регуляторные Т-лимфоциты, белки острой фазы воспаления

DOI: 10.31857/S0041377123050103, EDN: DGDGMF

Гликоделин (PP14, PAEP, альфа-2-макроглобулин) является фетоплацентарным белком, который был впервые выделен и идентифицирован в 1976 (Татаринов и др., 1976). Амниотический вариант гликоделина (GdA) обладает выраженными иммуномодулирующими свойствами (Alok, Karande, 2009; Dixit et al., 2018) что дает основания исследовать не только его роль в формировании иммунной толерантности в период беременности, но и его иммунофармакологический потенциал. Т-регуляторные клетки (Treg) играют ключевую роль в ограничении иммунного ответа (Sakaguchi et al., 2008). Ранее в экспериментах *in vitro* мы показали, что GdA практически не влияет на дифференцировку этих клеток, полученных от человека (Шардина и др., 2022).

Индукция Treg и их адаптивный перенос являются эффективными способами снижения вероятности отторжения трансплантата (Romano et al., 2017; Martin-Moreno et al., 2018). Между тем, несомненные перспективы GdA как препарата в трансплантологии (Dixit et al., 2018), или иммунотерапии (Ochanina et al., 2008) делают задачу по глубокому изучению его роли в формировании иммунной толерантности крайне важной.

Изменения в иммунной системе реципиента на введение аллогенных клеток костного мозга (КМ) происходят в первые три недели после трансплантации, а уровень Treg в данном случае является одним из ключевых показателей развития иммунного ответа (Sakaguchi et al., 2008). В процессе развития иммунного ответа также изменяется уровень белков острой фазы воспаления. Известно, что α -2-макроглобулин (α -2М) и α -1 кислый гликопротеин (орозомикоид) являются положительными белками

Принятые сокращения: КМ — костный мозг; РХПТ — реакция хозяин против трансплантата; α -2М — α -2-макроглобулин; GdA — амниотический гликоделин; Treg — Т-регуляторные лимфоциты; СРБ — С-реактивный белок.

острой фазы у крыс, тогда как С-реактивный белок (СРБ) у данного вида не столь показателен (Schreiber et al., 1989).

Таким образом, цель исследования заключается в изучении влияния рекомбинантного GdA на уровень Treg и белков острой фазы воспаления в процессе формирования иммунного ответа на введение КМ в динамическом эксперименте на крысах Wistar.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные и схема экспериментов. Эксперименты проводили на самцах белых крыс линии Wistar ($n = 12$) в возрасте от 2–3 мес. массой около 250 г. Животных содержали в виварии Пермского государственного национального исследовательского университета в условиях, соответствующих ГОСТ 33216-2014 (“Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами”). Эксперименты проводили с соблюдением биоэтических норм в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (86/609/ЕЕС; 1986). Выведение животных из эксперимента осуществляли на 3-и и 21-е сут; в этот момент собирали периферическую кровь, из которой выделяли мононуклеарные клетки в градиенте плотности 1.077 г/см^3 (Диаколл, Диаэм, Россия). Выделенные клетки замораживали до -80°C в среде, содержащей 90% инактивированной теплом эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; Corning, США) и 10% диметилсульфоксида (Thermo Fisher, США), затем переносили в жидкий азот для длительного хранения (-196°C).

В работе использовали оригинальную модель реакции “хозяин против трансплантата” (РХПТ), разработанную по аналогии с моделью реакции “трансплантат против хозяина” (Hardt Claësson, 1971). Животных делили на 3 группы: группа 1 ($n = 4$) – интактные животные; группа 2 ($n = 4$) – контрольная, животным которой вводили 10^7 клеток КМ, обработанных камптотецином (50 мкг/мл, Tocris Bioscience, Великобритания), внутрибрюшинно в 100 мкл физиологического раствора; группа 3 ($n = 4$) – животные, которым после введения аллогенного КМ, обработанного камптотецином, делали инъекции рекомбинантного GdA, полученного из *Escherichia coli* (MBS718444; MyBioSource, Германия). GdA (14 мг в 100 мкл физиологического раствора) вводили внутримышечно (достигаемая концентрация в крови крыс составляла $\approx 0.75 \text{ мкг/мл}$) на 1, 5, 9 и 12 сут эксперимента, как было описано нами ранее (Бочкова и др., 2022). Трансплантацию суспензии аллогенных клеток КМ осуществляли без предварительного кондиционирования животного-реципиента.

Оценка уровня лимфоцитов Treg. Перед проведением эксперимента клетки размораживали при 37°C и отмывали в 10 мл полной питательной среды RPMI-1640, содержащей 10% ЭТС (Corning, США), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma,

США). Размороженные мононуклеарные клетки окрашивали флуоресцентно меченными (фикоэритрином (PE) или FITC) антителами, специфичными к поверхностным молекулам CD4 и CD25, после чего клетки фиксировали, пермеабелизовали и окрашивали антителами к внутриядерному транскрипционному фактору FOXP3. Использовали набор “FlowX Rat Regulatory T Cell Kit” (R&D Systems, США), включающий анти-CD25-PE, анти CD4-FITC и анти-FOXP3-AlexaFluor 647 антитела. Фенотип Treg определяли как $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+$ (рис. 1). Анализ проводили на проточном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Данные представлены в виде абсолютного и относительного количества Treg в пуле CD4^+ -Т-лимфоцитов.

Оценка уровня белков общей фазы воспаления. Для определения уровня СРБ, α -2М и орозомукоида крыс использовали иммуноферментные коммерческие наборы производства Cloud-Clone Corp. (Китай). Считывание результатов проводили на спектрофотометре MultiskanSky (Thermo Scientific, Inc., США) Обработку полученных данных осуществляли в программе Curve Expert 13.

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8, используя двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) и post-hoc тест Тьюки для множественных сравнений. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки Treg обеспечивают периферическую толерантность путем контроля силы и продолжительности иммунного ответа через регуляцию функции Т-эффекторов, участвуя в процессе трансплантации аллогенных клеток. В результате эксперимента было установлено, что на 3-и сут после трансплантации крысам КМ абсолютное и относительное количество Treg в пуле CD4^+ -Т-лимфоцитов существенно снижается в сравнении с показателями интактных крыс (группа 1). В тоже время введение GdA крысам с трансплантированным КМ не оказывало существенного влияния на абсолютное и относительное содержание Treg на 3-и сут эксперимента (рис. 2а, 3а). По-видимому, именно процедура введения КМ приводила к снижению Treg, что согласуется с данными из литературы (Корсунский и др., 2008).

Установлено, что вместе с долей Treg при введении аллогенного КМ сокращается также относительное число клеток $\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+\text{CD4}^+$ (рис. 2б). Роль этих клеток в регуляции иммунного ответа до сих пор не установлена. Предполагается, что клетки $\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+$ происходят от конвенциональных Treg в присутствии высоких концентраций фактора роста TGF- β , либо относятся к Treg, недавно покинувшим тимус (Zohouri et al., 2021). Установлено, что абсолютное и относительное содержание клеток $\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+\text{CD4}^+$ на 3-и сут эксперимента сокра-

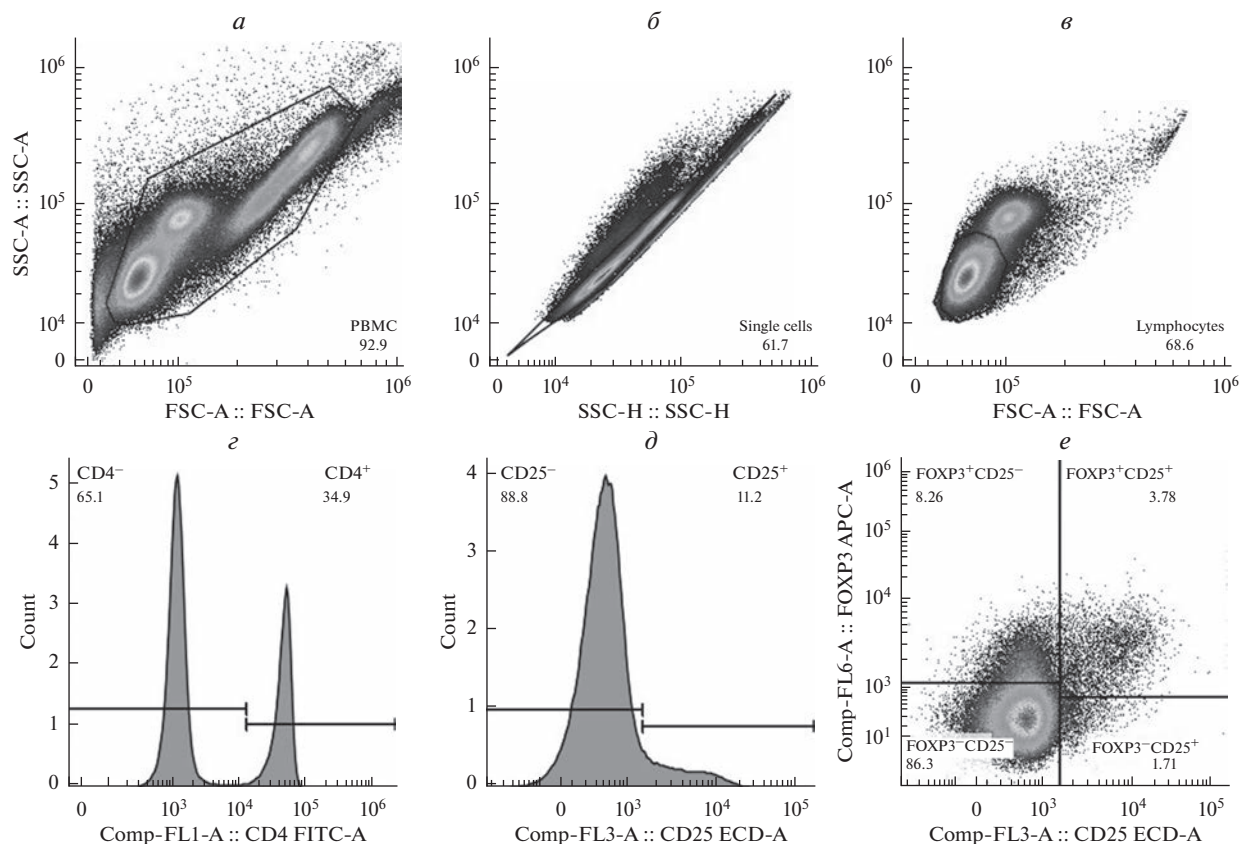


Рис. 1. Гистограммы гейтирования мононуклеарных клеток периферической крови для определения регуляторных $CD4^+$ -Т-лимфоцитов. *a* – Гейтирование мононуклеаров периферической крови (PBMC); *б* – выделение одиночных клеток; *в* – гейтирование лимфоцитов по параметрам светорассеяния; *г* – определение $CD4^+$ лимфоцитов; *д* – выделение $CD25^+CD4^+$ -клеток; *е* – определение регуляторных $CD4^+$ -Т-лимфоцитов ($FOXP3^+CD25^+$). По горизонтали: *a*, *в* – интенсивность прямого светорассеяния (FSC-A), *б* – интенсивность бокового светорассеяния (SSC-H); *г* – интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных FITC-мечеными анти- $CD4$ -антителами; *д*, *е* – интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных PE-мечеными анти- $CD25$ антителами; по вертикали: *a*, *б*, *в* – интенсивность бокового светорассеяния (SSC-A), *г*, *д* – число событий (count), *е* – интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных анти- $FOXP3$ -антителами, мечеными AlexaFluor 647.

щалось независимо от введения животным GdA (рис. 2б, 3б). Таким образом, на 3 сут эксперимента мы наблюдали снижение уровня Treg и клеток $CD25^-FOXP3^+CD4^+$ у крыс с трансплантированным КМ, при этом GdA не оказывал значимого влияния на уровень Treg и клеток $CD25^-FOXP3^+CD4^+$.

Установлено, что на 21 сут после введения аллогенного КМ абсолютное и относительное содержание Treg среди $CD4^+$ -Т-клеток крови крыс из группы 2 (контрольной с введенным КМ) было ниже, чем в группе intactных животных (рис. 2в, 3в).

Однако было показано, что GdA повышает долю Treg на 21-е сут эксперимента (группа 2), приближая уровень этих клеток к таковому у intactных животных (рис. 2в). В то же время действия GdA на уровень абсолютных показателей обнаружено не было, но очевидна явная тенденция к повышению абсолютного количества Treg (рис. 3в).

Относительное содержание клеток $CD25^-FOXP3^+CD4^+$ на 21-е сут эксперимента было

на одном уровне и не различалось в группах 2 и 3 (контрольной и опытной соответственно) (рис. 2г). Однако было показано, что введение аллогенного КМ приводило к снижению количества этих клеток в абсолютном выражении (рис. 3г), а GdA приводил этот показатель к уровню intactных животных.

Таким образом, на 3 сут эксперимента мы наблюдали снижение уровня Treg и $CD25^-FOXP3^+CD4^+$ -клеток у крыс с трансплантированным КМ, при этом GdA не оказывал значимого влияния на уровень Treg и клеток $CD25^-FOXP3^+CD4^+$. Однако на 21 сут эксперимента GdA увеличивал процент Treg у крыс с трансплантированным КМ. В то же время не выявлено действия GdA на процентное содержание $CD25^-FOXP3^+CD4^+$ -клеток на 21-е сут эксперимента, однако в абсолютном выражении результатов GdA демонстрировал видимую тенденцию к повышению числа этих клеток.

Ранее при изучении влияния GdA на дифференцировку Treg в экспериментальной модели на клет-

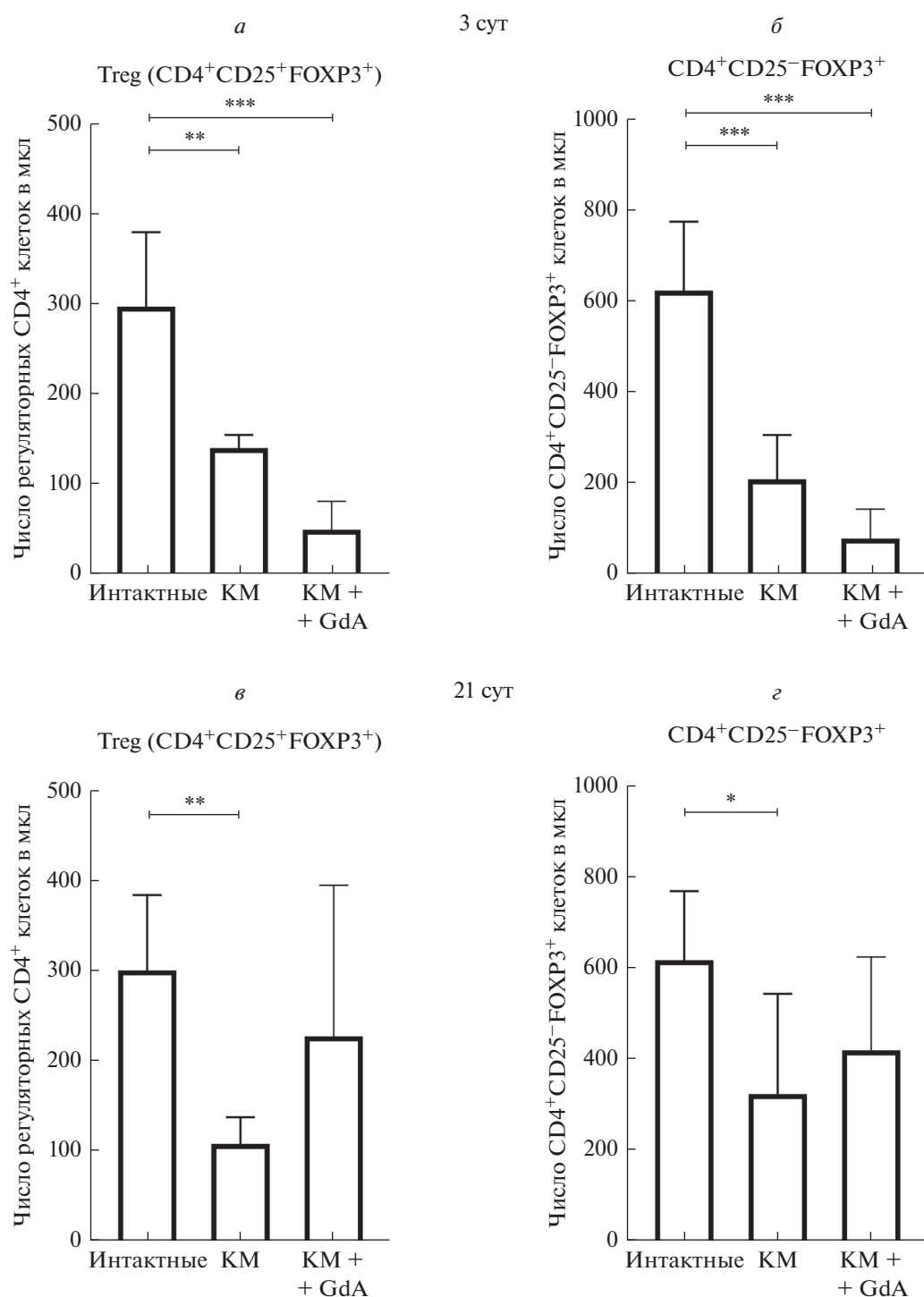


Рис. 2. Абсолютное число лимфоцитов Treg и CD25⁻FOXP3⁺CD4⁺ в периферической крови крыс на 3-и и 21-е сут после трансплантации KM и введения на ее фоне GdA. Здесь и на рис. 3 представлены средние значения и их стандартные ошибки; $n = 4$. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$ (two-way ANOVA).

ках человека было установлено, что данный белок практически не оказывал влияния на дифференцировку Treg (CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low}) (Шардина и др., 2022). Однако в ситуации *in vivo* GdA продемонстрировал стимулирующее действие на уровень Treg,

способствуя таким образом подавлению иммунного ответа на аллогенные клетки KM.

Установлено, что уровень СРБ в сыворотке крови в группе контрольных животных на фоне введения клеток KM не изменялся на протяжении всего экс-

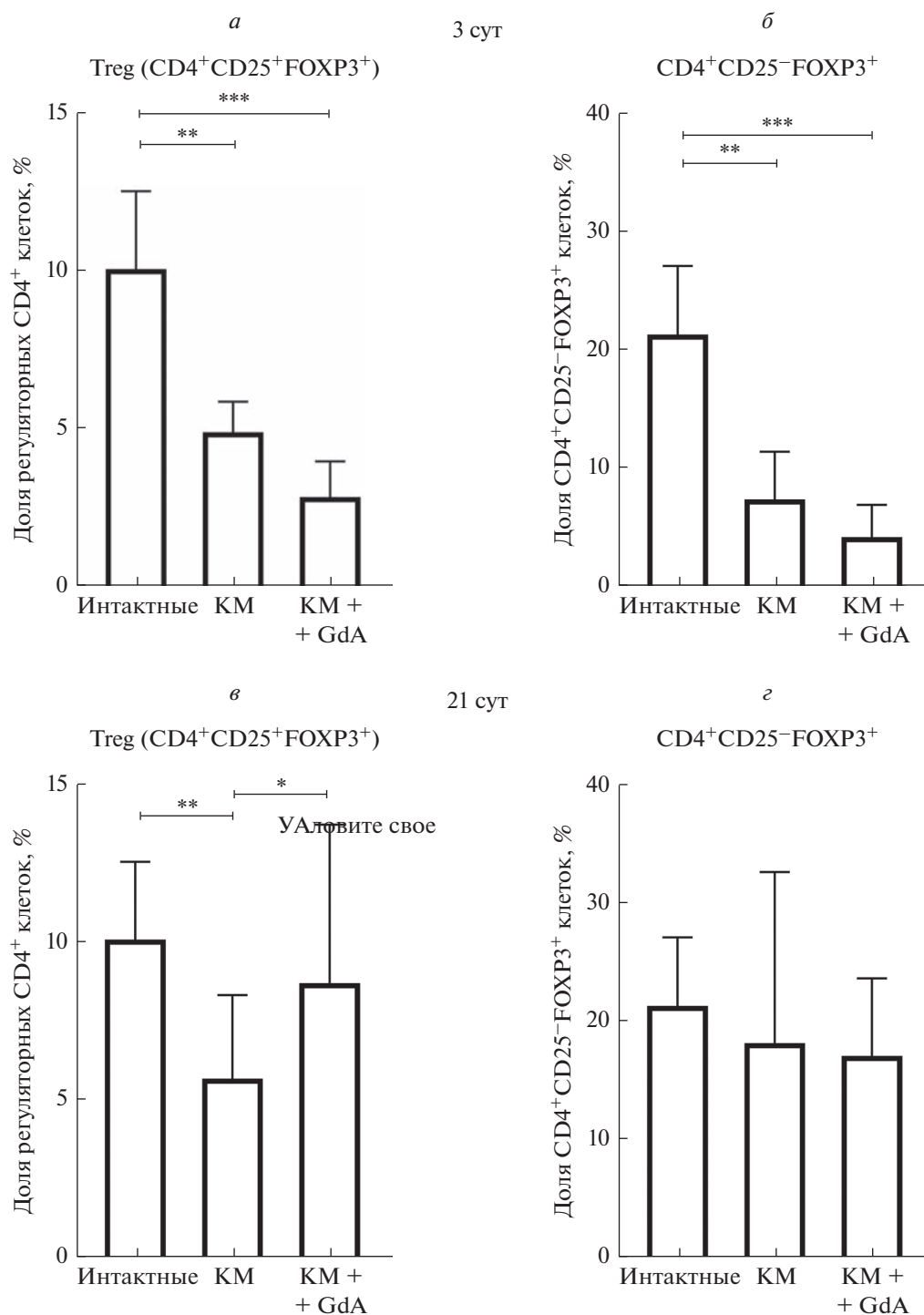


Рис. 3. Относительный уровень (доля в %) лимфоцитов Treg и CD25⁻FOXP3⁺CD4⁺ в периферической крови крыс на 3-и и 21-е сут после трансплантации клеток KM и введения на ее фоне GdA.

перимента. (табл. 1). В то же время введение GdA на фоне KM (группа 3) приводило к снижению уровня СРБ в сыворотке на 3-и сут эксперимента по сравнению с интактными животными, а к 21-м сут эксперимента наблюдали нормализацию концентрации этого белка. Таким образом, GdA способствует уменьшению

уровня СРБ, проявляя противовоспалительное действие на фоне введения аллогенного KM.

Показано, что уровень α -2М контрольных животных в группе 2 после введения аллогенного KM был повышен на 3-и сут от начала эксперимента в сравнении с группой интактных крыс (табл. 1). Со-

Таблица 1. Влияние GdA на белки острой фазы воспаления у крыс при аллогенной трансплантации в эксперименте *in vivo*

№ п. п.	Воздействие	Белки острой фазы воспаления		
		СРБ	α2-М	орозомукоид
На 3-и сут				
1	Интактные крысы, $n = 4$	5.083 (4.143–5.875)	23.18 (21.48–25.43)	90.84 (88.36–93.71)
2	Введение КМ (контроль), $n = 4$	4.395 (4.074–4.996)	33.86 (21.71–37.58) $P < 0.005$ (2–1)	107.7 (85.71–120.2) $P < 0.01$ (2–1)
3	КМ + GdA, $n = 4$	3.563 (3.402–4.202) $P < 0.01$ (3–1)	27.55 (20.12–27.78) $P < 0.05$ (3–2)	116.3 (88.35–119.0) $P < 0.05$ (3–1)
На 21-е сут				
4	Интактные крысы, $n = 4$	5.083 (4.143–5.875)	21.87 (20.13–25.85)	87.26 (85.78–92.53)
5	Введение КМ (контроль), $n = 4$	4.424 (4.384–4.560)	28.96 (25.72–30.90)	80.68 (62.08–106.4)
6	КМ + GdA, $n = 4$	4.447 (4.278–5.253)	25.41 (21.72–25.67)	85.79 (61.24–103.8)

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q1–Q3). Указаны только значения $p < 0.05$ (рядом в скобках группы сравнения; two-way ANOVA); КМ – костный мозг.

гласно динамике эксперимента, у этой группы животных к 21-м сут наблюдали нормализацию уровня этого белка. В то же время введение GdA на фоне введения КМ в группе 3 вызывало снижение уровня α -2М на 3-и сут по сравнению с контрольной группой 2 и нормализацию его значений к 21-м сут. Таким образом, GdA способен понижать уровень α -2М, оказывая противовоспалительный эффект.

Концентрация орозомукоида в контрольной группе животных после введения аллогенного КМ была повышена на 3-и сут эксперимента, а к 21-м сут наблюдали нормализацию его уровня в сыворотке (табл. 1). Введение GdA на фоне аллотрансплантации КМ приводило к повышению уровня орозомукоида на 3-и сут по сравнению с группой интактных крыс и дальнейшей нормализацией его концентрации в сыворотке к 21-м сут эксперимента. Таким образом, аллотрансплантация КМ и введение GdA вызывало повышение уровня орозомукоида в эксперименте, но к концу эксперимента (21 сут) наблюдали нормализацию его значений в сыворотке экспериментальных животных. Орозомукоид является белком, подавляющим иммунную реактивность на уровне врожденного иммунитета (Schreiber et al., 1989), что в целом может приводить к ослаблению иммунного ответа на введение аллогенных клеток.

Резюмируя полученные данные, очевидно, что введение аллогенного КМ вызывало увеличение концентрации α -2М и орозомукоида в сыворотке крови, что подтверждает их диагностическую значимость в процессе иммунного ответа. GdA снижал концентрацию СРБ и α -2М в сыворотке экспери-

ментальных животных с начала эксперимента, однако уровень орозомукоида, наоборот, был повышен в начале эксперимента. К концу эксперимента (21 сут) у всех групп экспериментальных животных наблюдали нормализацию значений СРБ, α -2М и орозомукоида в сыворотке крови.

Поскольку в организме в ответ на воспаление молниеносно повышается уровень некоторых цитокинов (интерлейкинов IL-1, IL-6 и TNF- α), которые, в свою очередь, дают сигнал клеткам печени на синтез белков острой фазы воспаления, ранее нами был исследован и цитокиновый профиль у крыс в аналогичных экспериментальных группах (Бочкова и др., 2022). Аллотрансплантация КМ вызывала системную воспалительную реакцию, что подтверждалось повышением уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке крови (IL-1 α , IL-1 β , IL-18) на 21-е сут; введение GdA, напротив, нивелировало общую воспалительную реакцию на аллотрансплантацию КМ у крыс и приводило к статистически значимому снижению уровня IL-17A по сравнению с контролем (Бочкова и др., 2022). Обсуждая настоящие эксперименты, мы можем предположить, что повышение уровня провоспалительных цитокинов способствовало увеличению концентрации α -2М и орозомукоида в сыворотке крови животных на фоне введения суспензии КМ.

В 2018 г. было проведено исследование иммуносупрессивной активности рекомбинантного GdA для предотвращения реакции отторжения трансплантата (Dixit et al., 2018). Используя экспериментальную модель *in vitro*, основанную на совместном культи-

вировании моноклеарных клеток с таргетными клетками линии НерG2е, авторы продемонстрировали, что гликоделин подавляет генерацию цитотоксических лимфоцитов и их функциональную активность. Аналогичные результаты были получены *in vivo* на экспериментальной модели на мышах *nude*, которые стали реципиентами клеток НерG2е и индуцированных CD8⁺-клеток человека, прединкубированных с GdA. Было показано, что и в ситуации *in vivo*, GdA ингибировал активность цитотоксических лимфоцитов (Dixit et al., 2018). Применение иммунодепрессантов для лечения отторжения аллотрансплантата связано с серьезными побочными эффектами. GdA, естественный иммуномодулятор человека, был бы идеальным альтернативным кандидатом. Было сделано и аналогичное предположение о возможном применении GdA в случае трансплантации легкого (Schneider et al., 2015, 2016).

Таким образом, рекомбинантный GdA является с точки зрения биофармацевтики перспективным иммуносупрессивным белком, способным избирательно снижать развитие иммунного ответа на аллоантигены.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовано оборудование ЦКП “Исследования материалов и вещества” Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-29-04055 мк) и в рамках государственного задания ИЭГМ УрО РАН (номер госрегистрации темы: 121112500044-9).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание крыс и манипуляции с ними проведены в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”, с соблюдением требований Совета Европейского сообщества об использовании лабораторных животных (86/609/ЕЕС).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бочкова М.С., Тимганова В.П., Шардина К.Ю., Ужвйук С.В., Логинова Н.П., Тройнич Я.Н., Заморина С.А. 2022. Влияние гликоделина на цитокиновый профиль крыс при аллогенной трансплантации клеток костного мозга. Бюллетень экспер. биол. мед. Т. 173. № 5. С. 606. (Boschkova M.S., Timganova V.P., Shardina K.Yu., Uzhviyuk S.V., Loginova N.P., Troinich Ya.N., Zamorina S.A. 2022. Effect

of Glycodelin on the Cytokine Profile of Rats during Allo-genic Bone Marrow Cell Transplantation. Bull. Exp. Biol. Med. V. 173. P. 636.)

<https://doi.org/10.1007/s10517-022-05603-2>

Корсунский И.А., Румянцев А.Г., Быковская С.Н. 2008. Роль регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺ и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в подавлении реакции трансплантат против хозяина. Онкогематология. Т. 3. С. 45. (Korsunsky I.A., Rumyantsev A.G., Bykovskaya S.N. 2008. Role of the regulatory T cells CD4⁺CD25⁺ and mesenchymal marrow stem cells in suppressing a graft versus host reaction. Oncohematology. V. 3. P. 45.)

<https://doi.org/10.17650/1818-8346-2008-0-3-45-51>

Татаринов Ю.С., Кривоносов С.К., Петрунин Д.Д., Шевченко О.П. 1976. Сравнительный иммунохимический анализ специфических βt-глобулинов “зоны беременности” человека и млекопитающих животных. Бюлл. эксп. биол. и мед., Т. 10. С. 1223. (Tatarinov Yu.S., Krivonosov S.K., Petrunin D.D., Shevchenko O.P. 1976. Comparative immunochemical analysis of specific beta globulins of the “pregnancy zone” of the humans and other mammals. Bull. Exper. Biol. Med. V. 82. № 10. P. 1223.)

<https://doi.org/10.1007/BF00799800>

Шардина К.Ю., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Храмов П.В., Раев М.Б., Заморина С.А. 2022. Роль рекомбинантного гликоделина в дифференцировке регуляторных Т-лимфоцитов. Доклады российской академии наук. Науки о жизни. Т. 506. № 1. С. 417. (Shardina K.Y., Timganova V.P., Boschkova M.S., Khramtsov P.V., Rayev M.B., Zamorina S.A. 2022. The Role of Recombinant Glycodelin in the Differentiation of Regulatory T-Lymphocytes. Dokl. Biol. Sci. V. 506. P. 137.)

<https://doi.org/10.1134/S0012496622050131>

Alok A., Karande A.A. 2009. The role of glycodelin as an immune-modulating agent at the feto-maternal interface. J. Reprod. Immunol. V. 83. P. 124.

<https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.06.261>

Dixit A., Balakrishnan B., Karande A.A. 2018. Immunomodulatory activity of glycodelin: implications in allograft rejection. Clin. Exp. Immunol. V. 192. P. 213.

<https://doi.org/10.1111/cei.13096>

Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. Cell. V. 133. P. 775.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009>

Martin-Moreno P.L., Tripathi S., Chandraker A. 2018. Regulatory T Cells and Kidney Transplantation. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. V. 13. P. 1760.

<https://doi.org/10.2215/CJN.01750218>

Romano M., Tung S.L., Smyth L.A., Lombardi G. 2017. Treg therapy in transplantation: a general overview. Transplant Int. V. 30. P. 745.

<https://doi.org/10.1111/tri.12909>

Ochanuna Z., Geiger-Maor A., Dembinsky-Vaknin A., Karussis D., Tykocinski M.L., Rachmilewitz J. 2010. Inhibition of effector function but not T cell activation and increase in FoxP3 expression in T cells differentiated in the presence of PP14. PLoS One. V. 5. P. e12868.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012868>

Schreiber G., Tsykin A., Aldred A.R., Thomas T., Fung W.P., Dickson P.W., Cole T., Birch H., De Jong F.A., Milland J. 1989. The acute phase response in the rodent. Ann. N. Y.

- Acad. Sci. V. 557. P. 61.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1989.tb24000.x>
- Hardt F., Claesson M.H. 1971. Graft-versus-host reactions mediated by spleen cells from amyloidotic and nonamyloidotic mice. *Transplantation*. V. 12. P. 36.
<https://doi.org/10.1097/00007890-197107000-00005>
- Zohouri M., Mehdipour F., Razmkhah M., Faghih Z., Ghaderi A. 2021. CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ T cells: a distinct subset or a heterogeneous population? *Int. Rev. Immunol.* V. 40. P. 307.
<https://doi.org/10.1080/08830185.2020.1797005>
- Zhou Y., Yang X., Zhang H., Jiang J. 2015. The roles of T helper type 17/regulatory T cells in acute rejection after liver transplantation in rats. *Transplantation*. V. 99. P. 1126.
<https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000666>
- Schneider M.A., Granzow M., Warth A., Schnabel P.A., Thomas M., Herth F.J.F., Dienemann H., Muley T., Meister M. 2015. Glycodelin A new Biomarker with Immunomodulatory Functions in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* V. 21. P. 3529.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2464>
- Schneider M.A., Muley T., Kahn N.C. Warth A., Thomas M., Herth F.J.F., Dienemann H., Meister M. 2016. Glycodelin is a potential novel follow-up biomarker for malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget*. V. 7. P. 71285.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.12474>

Effect of Glycodelin on the Level of T-Regulatory Lymphocytes and Acute Phase Proteins in Wistar Rats after Introduction of Allogeneous Bone Marrow Cells

S. A. Zamorina^{a, b, *}, M. S. Bochkova^{a, b}, V. P. Timganova^a, S. V. Uzhviyuk^a, K. Yu. Shardina^a, V. V. Vlasova^a, and M. B. Rayev^{a, b}

^a*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences ("IEGM UB RAS") – a branch of the Federal State Budgetary Institution of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russian Federation*

^b*Perm State University, Biology Faculty, Perm, 614068 Russian Federation*

*e-mail: zamorina.sa@gmail.com

Amniotic variant of glycodelin (GdA) has pronounced immunomodulatory properties, participating in the formation of immune tolerance during pregnancy. We investigated the effect of glycodelin on the level of T regulatory lymphocytes (Treg) and the level of acute phase proteins (α -2-macroglobulin (α -2M), orosomucoid, C-reactive protein (CRP)) upon administration of allogeneic red bone marrow (BM) cells to Wistar rats in a dynamic experiment *in vivo*. It was found that the introduction of GdA in animal with allogeneic BM led to an increase in the proportion of peripheral Treg among CD4⁺ lymphocytes at the end of the experiment (on the 21st day) in comparison with the group that was injected with BM. It was shown that glycodelin reduced the level of CRP and α -2M, but increased the level of orosomucoid in the serum of experimental animals at the beginning of the experiment (day 3), however, by the end of the experiment (day 21), normalization of protein values was observed in all groups of experimental animals acute phase to the level of intact animals. Thus, glycodelin is able to realize an immunosuppressive effect on allogeneic cells through an increase in the level of Treg and orosomucoid, as well as a decrease in the concentration of CRP and α -2M.

Keywords: bone marrow, transplantation, rats, glycodelin, regulatory T lymphocytes, acute inflammation phase proteins

УДК 577.112.854:616.124.2-091.8:618.39-092.9:599.323.4

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ 2 И 9 В ЛЕВОМ ЖЕЛУДОЧКЕ СЕРДЦА ПРЕЖДЕВРЕМЕННО РОЖДЕННЫХ КРЫС В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ ОНТОГЕНЕЗА

© 2023 г. В. В. Иванова¹ *, О. Н. Серебрякова¹, А. В. Ерохина¹, А. Д. Никонова¹, И. В. Мильто^{1, 2}

¹Кафедра морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России, Томск, 634050 Россия

²Лаборатория функциональной морфологии Северского биофизического научного центра Федерального медико-биологического агентства, Северск, 636013 Россия

*E-mail: ivvera92@rambler.ru

Поступила в редакцию 15.04.2023 г.

После доработки 16.05.2023 г.

Принята к публикации 26.05.2023 г.

Проведено иммуногистохимическое выявление матриксных металлопротеиназ (ММР) 2 и 9 в миокарде левого желудочка сердца преждевременно рожденных (21 и 21.5 сут беременности) и доношенных (22 сут беременности) крыс на 42, 56 и 180 сут постнатального периода онтогенеза. Интенсивность иммунопозитивного окрашивания оценивали полуколичественно. Преждевременное рождение приводит к повышению интенсивности иммунопозитивной реакции на ММР-2 и ММР-9 в стенке левого желудочка сердца крыс. Повышение интенсивности позитивной реакции на ММР-2 в левом желудочке сердца крыс наблюдается тем раньше, чем больше степень недоношенности. Интенсивность позитивной реакции на ММР-9 в левом желудочке сердца самцов крыс растет с увеличением степени недоношенности. Повышение интенсивности позитивной реакции на ММР-2 и ММР-9 в стенке левого желудочка самок крыс вследствие преждевременного рождения определяется исключительно у животных, рожденных на 21-е сут беременности, то есть при большей степени недоношенности.

Ключевые слова: преждевременное рождение, крысы, левый желудочек, сердце, матриксные металлопротеиназы

DOI: 10.31857/S0041377123050048, **EDN:** ALKLGU

Преждевременное рождение приводит к ремоделированию миокарда в постнатальном периоде онтогенеза, что служит предпосылкой для раннего развития заболеваний сердечно-сосудистой системы у недоношенных детей (Burchert, Lewandowski, 2019). Одной из основных причин ремоделирования миокарда является нарушение баланса между синтезом и деградацией межклеточного вещества. Известно, что матриксные металлопротеиназы (ММР – matrix metalloproteinase) не только разрушают белки межклеточного вещества, но и модулируют синтез коллагеновых волокон в строме миокарда (Li et al., 2000). В избыточном накоплении коллагеновых волокон в миокарде при старении, а также при заболеваниях сердечно-сосудистой системы ключевую роль играют ММР-2 и ММР-9 (Matsusaka et al., 2006; Meschiari et al., 2017; Попов и др., 2023). Выявление ММР-2 и ММР-9 в миокарде преждевременно рожденных людей затруднено, так как требует проведения биопсии. Определение концентрации ММР-2 и

ММР-9 в плазме крови просто в исполнении, но не дает детального представления об их тканевом источнике.

Таким образом, выявление ММР-2 и ММР-9 в миокарде преждевременно рожденных животных в эксперименте является актуальной задачей. Знание конкретных механизмов ремоделирования стромы миокарда вследствие преждевременного рождения необходимо для определения эффективных мер профилактики или терапии заболеваний сердца у преждевременно рожденных людей (Gonçalves et al., 2022; Villano et al., 2022).

Целью настоящего исследования является иммуногистохимическое выявление ММР 2 и ММР 9 в миокарде левого желудочка сердца преждевременно рожденных (21 и 21.5 сут беременности) и доношенных (22 сут беременности) крыс на 42, 56 и 180 сут постнатального периода онтогенеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Дизайн исследования. Эксперимент проведен на крысах Вистар обоего пола, которые составили группы: контрольная группа ($n = 24$, доношенные животные, продолжительность беременности 22 сут), группа 1 ($n = 30$, преждевременно рожденные крысы, продолжительность беременности 21.5 сут), группа 2 ($n = 30$, преждевременно рожденные крысы, продолжительность беременности 21 сут). Доношенное и преждевременно рожденное потомство получено от интактных самцов и самок крыс Вистар в возрасте 2 мес. и весом 180–200 г. Самок крыс содержали в индивидуальных клетках, ежедневно на основе цитологического анализа влагалищного содержимого определяли стадию эстрального цикла. В стадию проэструса к самке на ночь подсаживали самца. Утром следующего дня самца отсаживали, для верификации коитуса проводили цитологический анализ влагалищного содержимого крыс. В случае обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке крыс, считали этот день первым днем беременности.

Полная продолжительность беременности крыс Вистар составляет 22 сут (Saito et al., 2010; Shynlova et al., 2010). В результате естественных родов в срок были получены доношенные животные (контрольная группа). Для получения преждевременно рожденного потомства беременным крысам однократно подкожно вводили мифепристон (1 мл, 10 мг на 1 кг массы тела; Sigma-Aldrich, США) (Dudley et al., 1996). Введение мифепристона крысам на 20.5 сут беременности приводило к появлению потомства на 21.5 сут беременности (группа 1). Введение мифепристона крысам на 20 сут беременности приводило к появлению потомства на 21 сут беременности (группа 2).

Преждевременно рожденных и доношенных крыс содержали в стандартных условиях вивария и выводили из эксперимента на 42, 56 и 180 сут постнатального периода онтогенеза асфиксией углекислым газом. Сердце крыс фиксировали в забуференном формалине pH 7.0 (Биовитрум, Россия) не более 24 ч. Затем образцы промывали, обезвоживали и заливали в парафиновую смесь HistoMix (Биовитрум, Россия). Срезы толщиной 5 мкм получали на автоматическом микротоме HM335S (Thermo Fisher Scientific, Китай).

Иммуногистохимическое исследование. После депарафинизации и регидратации срезы подвергали высокотемпературной демаскировке антигенов в цитратном буфере pH 6.0 (Abcam, Великобритания). В качестве первичных антител использовали моноклональные мышиные антитела NCL-MMP-2-507 (Novocastra, Великобритания) и NCL-MMP-9-439 (Novocastra, Великобритания) в разведении 1 : 500. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали набор Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit – Micro-polymer (Ab-

cam, Великобритания). Ядра клеток докрашивали гематоксилином Джилла (Биовитрум, Россия).

Морфометрия и статистическая обработка данных. Развитие иммунного окрашивания анализировали в стенке левого желудочка сердца на поперечных срезах на уровне сосочковых мышц. Интенсивность иммуногистохимической реакции оценивали полуколичественно: 0 – отсутствие иммуногистохимической реакции, 1 – иммуногистохимическая реакция низкой интенсивности (иммунопозитивные структуры занимают менее 20% площади среза), 2 – умеренная интенсивность (иммунопозитивные структуры занимают 20–70% площади среза), 3 – высокая интенсивность (иммунопозитивные структуры занимают более 70% площади среза). Интенсивность иммунного окрашивания определяли визуально, не менее чем в 10 полях зрения каждого среза. Полуколичественные данные анализировали с использованием критериев Шапиро–Уилка и Манна–Уитни (Цорин, 2020), применяя SPSS 16.0 (IBM, США). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха: Me (Q_1 ; Q_3). Различия между показателями считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение преждевременно рожденного потомства. Введение беременным самкам антипрогестинов является физиологической, безопасной (нетоксичной) для потомства и надежной моделью индукции преждевременных родов у крыс (Cadepond et al., 1997; Кузьминых, Петросян, 2009). Во всех случаях через 20–24 ч после инъекции беременным крысам мифепристона наблюдали начало родов. В группе 2 наблюдали гибель отдельных особей в потомстве в течение 1–2-х сут постнатального периода онтогенеза, которая объясняется выраженной степенью недоношенности и трудностью постнатальной адаптации рожденных на 21-е сут пренатального периода онтогенеза крыс.

Локализация MMP-2 и MMP-9 при иммунном окрашивании в стенке левого желудочка сердца крыс. В стенке левого желудочка сердца самцов и самок крыс контрольной группы, групп 1 и 2 с 42 по 180 сут постнатального периода онтогенеза позитивно окрашенные на MMP-2 и MMP-9 структуры локализуются диффузно, однако количество окрашенных структур визуально больше в субэндокардиальных участках миокарда и сосочковых мышцах. В исследуемые сроки позитивное окрашивание на MMP-2 и MMP-9 в стенке левого желудочка крыс контрольной группы, групп 1 и 2 определяется в цитоплазме эндотелиоцитов эндокарда и кровеносных сосудов миокарда, фибробластов миокарда, мезотелиоцитов эпикарда, тучных клеток и макрофагов миокарда, а также в межклеточном веществе периваскулярной и интерстициальной стромы миокарда (рис. 1). Кроме того, в левом желудочке крыс групп 1

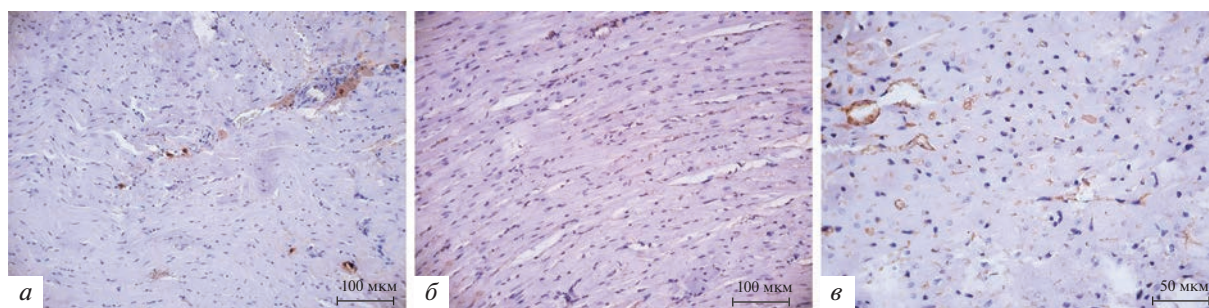


Рис. 1. Срез стенки левого желудочка сердца самцов крыс на 180 сут постнатального периода онтогенеза в контрольной группе (а, 22 сут беременности), группе 1 (б, срок беременности 21.5 сут) и в группе 2 (в, срок беременности 21 сут). Иммуногистохимическая реакция на ММР-2, докраска гематоксилином Джилла. а – Иммунопозитивны межклеточное вещество и интерстициальные клетки периваскулярной стромы миокарда, интенсивность иммунопозитивной реакции – 1 балл. б, в – Иммунопозитивны эндотелиоциты кровеносных сосудов и межклеточное вещество интерстициальной стромы миокарда, интенсивность реакции – 2 балла.

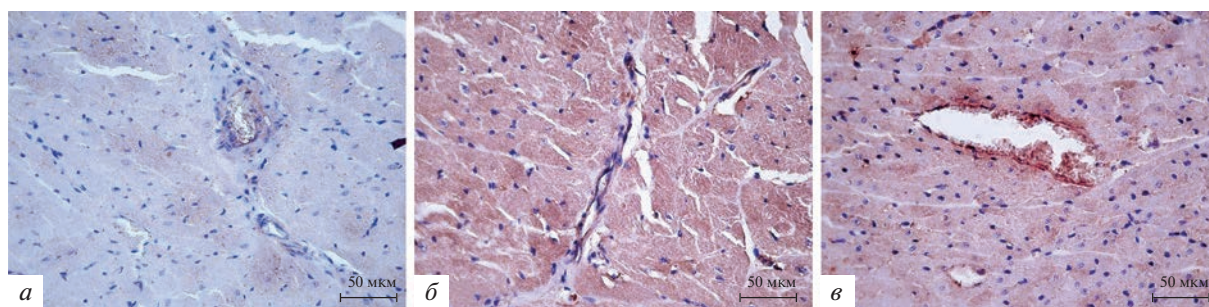


Рис. 2. Срез стенки левого желудочка сердца самцов крыс на 180 сут постнатального периода онтогенеза в контрольной группе (а, 22 сут беременности), группе 1 (б, срок беременности 21.5 сут) и в группе 2 (в, срок беременности 21 сут). Иммуногистохимическая реакция на ММР-9, докраска гематоксилином Джилла. а – Иммунопозитивно межклеточное вещество периваскулярной стромы миокарда, интенсивность реакции – 1 балл. б, в – Иммунопозитивны эндотелиоциты кровеносных сосудов и кардиомиоциты, интенсивность реакции – 3 балла.

и 2 на 42, 56 и 180 сут постнатального периода онтогенеза наблюдается позитивное окрашивание на ММР-9 цитоплазмы кардиомиоцитов (рис. 2). Наблюдаемое распределение окрашивания на ММР-2 и ММР-9 в миокарде согласуется с данными из литературы (Bellafiore et al., 2003).

Интенсивность иммунного окрашивания на ММР-2 в стенке левого желудочка крыс. Интенсивность позитивной реакции на ММР-2 в стенке левого желудочка преждевременно рожденных и доношенных крыс представлена в табл. 1. Интенсивность окрашивания на ММР-2 в левом желудочке сердца самок крыс контрольной группы превышает таковую у самцов крыс контрольной группы на 180 сут постнатального периода онтогенеза. У крыс групп 1 и 2 не обнаружено связанных с полом отличий интенсивности реакции ММР-2 левого желудочка с 42 по 180 сут постнатального периода онтогенеза. У самцов крыс группы 1 интенсивность позитивной реакции ММР-2 в стенке левого желудочка выше, чем у самцов крыс контрольной группы и группы 2 на 42 и 180 сут постнатального периода онтогенеза. У самцов и самок крыс группы 2 интенсивность реакции ММР-2 в стенке

левого желудочка сердца выше, чем у самцов и самок крыс контрольной группы и группы 1 на 56 сут постнатального периода онтогенеза (табл. 1).

Интенсивность иммунного окрашивания на ММР-9 в стенке левого желудочка крыс. Интенсивность позитивной реакции ММР-9 в стенке левого желудочка преждевременно рожденных и доношенных крыс представлена в табл. 1. В контрольной группе не выявлено связанных с полом отличий интенсивности реакции ММР-9 в левом желудочке крыс. У самцов крыс группы 1 интенсивность окрашивания на ММР-9 в левом желудочке сердца выше, чем у самок крыс группы 1 на 180 сут постнатального периода онтогенеза. В группе 2 интенсивность окрашивания на ММР-9 в левом желудочке самцов превышает аналогичный показатель самок на 42 сут постнатального периода онтогенеза. Интенсивность окрашивания на ММР-9 в левом желудочке сердца самцов крыс группы 1 выше, чем у самцов крыс контрольной группы на 42 и 180 сут постнатального периода онтогенеза. Напротив, исследуемый показатель самок крыс группы 1 не отличается от таковых самок крыс контрольной группы на всем протяжении экспери-

Таблица 1. Динамика показателей интенсивности иммуногистохимической реакции в левом желудочке сердца крыс контрольной группы (22 сут беременности) и преждевременно рожденных на 21.5 сут (группа 1) и на 21 сут (группа 2) беременности

Группа	Постнатальный период онтогенеза, сут					
	42		56		180	
	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
Интенсивность ММР-2-позитивной реакции в стенке левого желудочка сердца преждевременно рожденных и доношенных крыс, баллы, Ме (Q ₁ ; Q ₃)						
Контрольная	1.0 (0; 1.0)	1.0 (0; 1.0)	1.0 (0.8; 1.3)	1.0 (1.0; 1.3)	1.0 (1.0; 1.3)	2.0 (1.0; 3.0) ^{а, б}
1	1.0 (1.0; 2.0) ^в	1.0 (1.0; 1.3)	1.0 (1.0; 1.0)	1.0 (1.0; 1.0)	2.0 (2.0; 3.0) ^{б, в}	2.5 (1.0; 3.0) ^б
2	1.0 (0; 1.0) ^г	1.0 (0; 1.0)	2.0 (1.0; 2.3) ^{б, в, г}	2.0 (1.8; 3.0) ^{б, в, г}	1.0 (1.0; 2.0) ^г	1.5 (1.0; 2.3)
Интенсивность ММР-9-позитивной реакции в стенке левого желудочка сердца преждевременно рожденных и доношенных крыс, баллы, Ме (Q ₁ ; Q ₃)						
Контрольная	0.5 (0; 1.0)	1.0 (0; 1.0)	0 (0; 1.0)	1.0 (1.0; 1.0)	1.0 (1.0; 1.0)	1.0 (1.0; 2.0)
1	1.0 (1.0; 1.3) ^в	1.0 (1.0; 1.0)	1.0 (0; 1.0)	1.0 (1.0; 2.0)	2.0 (1.8; 3.0) ^{б, в}	1.0 (1.0; 2.0) ^а
2	2.0 (2.0; 3.0) ^{в, г}	1.5 (1.0; 2.0) ^{а, в}	2.0 (1.0; 2.3) ^{в, г}	1.0 (1.0; 2.0)	2.0 (1.0; 2.3) ^в	2.0 (1.0; 2.0)

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Ме), нижнего (Q₁) и верхнего (Q₃) квартилей. Различия достоверны при $p \leq 0.05$ при сравнении с соответствующим показателем: (^а) — у самцов крыс, (^б) — на предыдущем сроке, (^в) — в контрольной группе, (^г) — в группе 1.

мента. Интенсивность окрашивания на ММР-9 в левом желудочке самцов крыс группы 2 выше, чем соответствующий показатель самцов крыс контрольной группы в период с 42 по 180 сут, а также выше соответствующего показателя самцов крыс группы 1 на 42 и 56 сут постнатального периода онтогенеза. Интенсивность окрашивания на ММР-9 в левом желудочке сердца самок крыс группы 2 выше, чем в контрольной группе на 42 сут постнатального периода онтогенеза (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Межклеточное вещество не только определяет механическую прочность миокарда, но и формирует микроокружение, оказывающее регуляторное влияние на клетки миокарда. Межклеточное вещество работает как резервуар цитокинов, матриксинов, некодирующих РНК, модулирующих различные клеточные процессы: клеточный цикл, дифференцировку, миграцию и гибель клетки (Silva et al., 2021). Преобразование межклеточного вещества важно для функционирования миокарда в норме и при патологии. Однако исследование экспрессии и активности ММР в миокарде преждевременно рожденных детей единичны. В настоящее время у преждевременно рожденных детей изучена только сывороточная концентрация ММР-2 и ММР-9 в период новорожденности (Schulz et al., 2004; Yan et al., 2020).

В раннем постнатальном периоде онтогенеза преобразование межклеточного вещества связано, в первую очередь, с продолжающимися процессами кардиоморфогенеза. Преждевременное рождение

ассоциировано со структурной и функциональной незрелостью миокарда, вегетативной и эндокринной систем, антиоксидантной системы, что может приводить к особенностям формирования и роста сердца (Ходкевич и др., 2020). Для оценки влияния преждевременного рождения на постнатальный кардиоморфогенез ранее мы проанализировали интенсивность иммунного окрашивания на ММР-2 и ММР-9 в миокарде крыс в ранние сроки постнатального периода онтогенеза (Иванова и др., 2022). Установлено влияние преждевременного рождения исключительно на интенсивность иммунного окрашивания на ММР-9 в миокарде крыс с 7 по 21 сут постнатального периода онтогенеза, тогда как интенсивность позитивного окрашивания на ММР-2 в миокарде преждевременно рожденных и доношенных крыс не отличалась (Иванова и др., 2022).

В отдаленном постнатальном периоде онтогенеза ремоделирование миокарда является отражением действия стрессовых факторов (например, повышенных гемодинамических нагрузок), а также следствием закономерных процессов старения. Известен эффект женских половых гормонов на ремоделирование соединительной ткани миокарда (Voloshenyuk, Gardner, 2010), однако исследования содержания или активности ММР-2 и ММР-9 в миокарде человека или животных с разной степенью недоношенности с учетом гендерных различий не проводились.

В настоящих экспериментах продемонстрировано, что преждевременное рождение приводит к повышению интенсивности иммунопозитивной реакции на ММР-2 и ММР-9 в стенке левого желудочка

сердца половозрелых животных. Выраженное повышение интенсивности реакции ММР-2 в левом желудочке сердца крыс наблюдается тем раньше, чем больше степень недоношенности. Интенсивность реакции ММР-9 в левом желудочке сердца самцов крыс больше при более выраженной степени недоношенности. Повышение интенсивности окрашивания на ММР-2 и ММР-9 в стенке левого желудочка сердца самок крыс вследствие преждевременного рождения определяется исключительно в группе 2, то есть при большей степени недоношенности. Таким образом, модулирующий эффект женских половых гормонов на ремоделирование миокарда нивелируется при большей степени недоношенности.

Данные экспериментов и клинических наблюдений указывают на развитие у преждевременно рожденных животных и человека в отдаленном периоде постнатального онтогенеза диффузного миокардиального фиброза (Bertagnolli et al., 2014; Lewandowski et al., 2021). ММР-2 и ММР-9 оказывают двоякое действие на межклеточный матрикс. С одной стороны, ММР-2 и ММР-9 разрушают нефибриллярные коллагены, денатурированные фибриллярные коллагены, фибронектин, ламинин, эластин и др. (DeCoux et al., 2014). С другой стороны, в результате деградации компонентов межклеточного вещества образуются биологически активные продукты — матриксины, многие из которых являются стимуляторами коллагеногенеза. К примеру, эндостатин, который образуется в результате деградации коллагена XVIII типа посредством ММР-9, индуцирует пролиферацию и миграцию миофибробластов (Sugiyama et al., 2018). Фрагмент p1158/59 — продукт деградации коллагена I типа при действии ММР-2 и ММР-9 — стимулирует образование грануляционной ткани при повреждении (Lindsey et al., 2015). Кроме того, ММР-2 способствует активации трансформирующего фактора роста бета, одной из функций которого является индукция экспрессии коллагена и фибронектина (Wang M. et al., 2006).

Известно, что повышенная активность ММР-2 приводит к увеличению жесткости и снижению сократительной функции миокарда (Wang G.Y. et al., 2006). Выраженность интерстициального фиброза, вызванного повышенной постнагрузкой на левый желудочек сердца, значительно ниже у животных, нокаутных по ММР-2 (Matsusaka et al., 2006). Возрастные изменения миокарда, заключающиеся в накоплении коллагеновых волокон в его строме, реализуются, в том числе, за счет ММР-9. При старении удельный объем коллагеновых волокон в строме миокарда левого желудочка сердца и его жесткость у животных дикого типа выше, чем у животных, нокаутных по ММР-9 (Chiao et al., 2012; Padmanabhan et al., 2016). Есть мнение, что повышенная концентрация ММР-9 в сыворотке может использоваться в качестве предиктора фиброза миокарда левого желудочка у пациентов с сердечной недостаточностью (Çelik et al., 2020).

По результатам настоящего исследования можно заключить, что преждевременное рождение приводит к увеличению интенсивности иммунного окрашивания ММР-2 и ММР-9 в миокарде левого желудочка крыс в отдаленном периоде постнатального онтогенеза, которое вносит вклад в ремоделирование сердца.

Важно заметить, что иммуногистохимическое выявление ММР-2 и ММР-9 не позволяет сделать вывод об их активности. Исследование активности ММР, а также изучение соотношения ММР и их ингибиторов необходимо для более глубокого понимания механизма ремоделирования миокарда у преждевременно рожденных животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках бюджетной темы Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Иванова В.В., Мильто И.В., Серебрякова О.Н., Суходоло И.В. 2022. Выявление матриксных металлопротеиназ в сердце преждевременно рожденных крыс. Изв. РАН. Серия биологическая. № 6. С. 642. (Ivanova V.V., Milto I.V., Serebryakova O.N., Sukhodolo I.V. 2022. Matrix metalloproteinases detection in the heart of preterm rats. Izevestiya RAN. Seriya Biologicheskaya. № 6. P. 642.)
- Кузьминых Т.У., Петросян М.А. 2009. Сравнительная оценка влияния синтетических антигестагенов на сроки наступления родовой деятельности крыс и постнатальное развитие потомства. Журн. акушерства и женских болезней. Т. 54. № 2. С. 34. (Kuzminykh T.U., Petrosyan M.A. 2009. The comparison of different synthetic antigestagens influence on beginning of contractive activity on pregnant rats and postnatal development of their offspring. V. 54. № 2. P. 34.)
- Попов М.А., Шумаков Д.В., Гуревич Л.Е., Федоров Д.Н., Зыбин Д.И., Ашевская В.Е., Коростелева П.А., Тюрина В.М. 2023. Оценка функциональных свойств гибернирующего миокарда. Клин. эксп. морфология. Т. 12. № 1.

- C. 59. (Popov M.A., Shumakov D.V., Gurevich L.E., Fedorov D.N., Zybin D.I., Ashevskaya V.E., Korosteleva P.A., Tyurina V.M. 2023. The evaluation of hibernating myocardium function. Clin. Exper. Morpho. V. 12. № 1. P. 59.)
- Цорин И.Б. 2020. Статистическая обработка результатов фармакологических экспериментов, измеренных в порядковых и количественных шкалах, при невозможности анализа с помощью параметрических методов. Фармакокинетика и фармакодинамика. Т. 3. № 3. С. 3. (Tsorin I.B. 2020. Statistical processing of pharmacological experiments results measured in ordinal and quantitative scales, if it is impossible to analyze using parametric methods. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. V. 3. № 3. P. 3.)
- Ходкевич П.Е., Куликова К.В., Горев В.В., Деев И.А. 2020. Эхоструктурные и функциональные особенности органов и систем у детей с низкой, очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении (обзор литературы). Росс. педиатрический ж. Т. 1. № 3. С. 11. (Khodkevich P.E., Kulikova K.V., Gorev V.V., Deev I.A. 2020. The echographic characteristics of structural and functional development of organs and systems in children born with low birth weight, very low birth weight and extremely low birth weight. Russian Pediatric J. V. 1. № 3. P. 11.)
- Bellafiore M., Battaglia G., Bianco A., Farina F., Palma A., Paoli A. 2013. The involvement of MMP-2 and MMP-9 in heart exercise-related angiogenesis. J. Transl. Med. V. 11. P. 283.
- Bertagnolli M., Huyard F., Cloutier A., Anstey Z., Huot-Marchand J.E., Fallaha C., Paradis P., Schiffrin E.L., Deblois D., Nuyt A.M. 2014. Transient neonatal high oxygen exposure leads to early adult cardiac dysfunction, remodeling, and activation of the renin-angiotensin system. Hypertension. V. 63. P. 143.
- Burchert H., Lewandowski A.J. 2019. Preterm birth is a novel, independent risk factor for altered cardiac remodeling and early heart failure: is it time for a new cardiomyopathy? Curr. Treat Options Cardiovasc. Med. V. 21. P. 8.
- Cadepond F., Ulmann A., Baulieu E.E. 1997. RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. Annu. Rev. Med. V. 48. P. 129.
- Çelik Ö., Şahin A.A., Sarıkaya S., Uygur B. 2020. Correlation between serum matrix metalloproteinase and myocardial fibrosis in heart failure patients with reduced ejection fraction: a retrospective analysis. Anatol. J. Cardiol. V. 24. P. 303.
- Chiao Y.A., Ramirez T.A., Zamilpa R., Okoronkwo S.M., Dai Q., Zhang J., Jin Y.F., Lindsey M.L. 2012. Matrix metalloproteinase-9 deletion attenuates myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in ageing mice. Cardiovasc. Res. V. 96. P. 444.
- DeCoux A., Lindsey M.L., Villarreal F., Garcia R.A., Schulz R. 2014. Myocardial matrix metalloproteinase-2: inside out and upside down. J. Mol. Cell Cardiol. V. 77. P. 64.
- Dudley D.J., Branch D.W., Edwin S.S., Mitchell M.D. 1996. Induction of preterm birth in mice by RU486. Biol. Reprod. V. 55. P. 992.
- Gonçalves P.R., Nascimento L.D., Gerlach R.F., Rodrigues K.E., Prado A.F. 2022. Matrix metalloproteinase 2 as a pharmacological target in heart failure. Pharmaceuticals (Basel). V. 15. P. 920.
- Lewandowski A.J., Raman B., Bertagnolli M., Mohamed A., Williamson W., Pelado J.L., McCance A., Lapidaire W., Neubauer S., Leeson P. 2021. Association of preterm birth with myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in young adulthood. J. Am. Coll. Cardiol. V. 78. P. 683.
- Li Y.Y., McTiernan C.F., Feldman A.M. 2000. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. Cardiovasc. Res. V. 46. P. 214.
- Lindsey M.L., Iyer R.P., Zamilpa R., Yabluchanskiy A., DeLeon-Pennell K.Y., Hall M.E., Kaplan A., Zouein F.A., Bratton D., Flynn E.R., Cannon P.L., Tian Y., Jin Y.F., Lange R.A., Tokmina-Roszyk D., Fields G.B., de Castro Brás L.E. 2015. A novel collagen matricryptin reduces left ventricular dilation post-myocardial infarction by promoting scar formation and angiogenesis. J. Am. Coll. Cardiol. V. 66. P. 1364.
- Matsusaka H., Ide T., Matsushima S., Ikeuchi M., Kubota T., Sunagawa K., Kinugawa S., Tsutsui H. 2006. Targeted deletion of matrix metalloproteinase 2 ameliorates myocardial remodeling in mice with chronic pressure overload. Hypertension. V. 47. P. 711.
- Meschiari C.A., Ero O.K., Pan H., Finkel T., Lindsey M.L. 2017. The impact of aging on cardiac extracellular matrix. Geroscience. V. 39. P. 7.
- Padmanabhan Iyer R., Chiao Y.A., Flynn E.R., Hakala K., Cates C.A., Weintraub S.T., de Castro Brás L.E. 2016. Matrix metalloproteinase-9-dependent mechanisms of reduced contractility and increased stiffness in the aging heart. Proteomics Clin. Appl. V. 10. P. 92.
- Saito F.H., Damasceno D.C., Kempinas W.G., Morceli G., Sinzato Y.K., Taylor K.N., Rudge M.V. 2010. Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development. Diabetol. Metab. Syndr. V. 2. P. 26.
- Schulz C.G., Sawicki G., Lemke R.P., Roeten B.M., Schulz R., Cheung P.Y. 2004. MMP-2 and MMP-9 and their tissue inhibitors in the plasma of preterm and term neonates. Pediatr. Res. V. 55. P. 794.
- Shynlova O., Kwong R., Lye S.J. 2010. Mechanical stretch regulates hypertrophic phenotype of the myometrium during pregnancy. Reproduction. V. 139. P. 247.
- Silva A.C., Pereira C., Fonseca A.C.R.G., Pinto-do-Ó P., Nascimento D.S. 2021. Bearing my heart: the role of extracellular matrix on cardiac development, homeostasis, and injury response. Front. Cell Dev. Biol. V. 8: 621644. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.621644>
- Sugiyama A., Hirano Y., Okada M., Yamawaki H. 2018. Endostatin stimulates proliferation and migration of myofibroblasts isolated from myocardial infarction model rats. Int. J. Mol. Sci. V. 19. P. 741.
- Villano A., Barcaro G., Monti S., Barbani N., Rizzo A., Rossin D., Rastaldo R., Giachino C., Cristallini C. 2022. Molecularly imprinted nanoparticles towards MMP9 for controlling cardiac ECM after myocardial infarction: a predictive experimental-computational chemistry investigation. Biomedicines. V. 10: 2070. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092070>
- Voloshenyuk T.G., Gardner J.D. 2010. Estrogen improves TIMP-MMP balance and collagen distribution in volume-overloaded hearts of ovariectomized females. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. V. 299. R. 683.
- Wang G.Y., Bergman M.R., Nguyen A.P., Turcato S., Swigart P.M., Rodrigo M.C., Simpson P.C., Karliner J.S., Lovett D.H., Baker A.J. 2006. Cardiac transgenic matrix metalloproteinase-2 expression directly induces impaired contractility. Cardiovasc. Res. V. 69. P. 688.

Wang M., Zhao D., Spinetti G., Zhang J., Jiang L.Q., Pintus G., Monticone R., Lakatta E.G. 2006. Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta1-type II receptor signaling within the aged arterial wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* V. 26. P. 1503.

Yan Y., Jiang L., Li M., Zhang H., Shen Y., Zhang W., Zhang W. 2020. Levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are related to cardiopulmonary injury in fetal inflammatory response syndrome. *Clinics (Sao Paulo)*. V. 75. e2049. Срез <https://doi.org/10.6061/clinics/2020/e2049>

Immunohistochemical Study of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in the Left Ventricle of Preterm Rats Heart in the Late Postnatal Development

V. V. Ivanova^{a, *}, O. N. Serebryakova^a, A. V. Erokhina^a, A. D. Nikonova^a, and I. V. Milto^{a, b}

^a*Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia*

^b*Seversk Biophysical Research Centre, Seversk, 636013 Russia*

**e-mail: ivvera92@rambler.ru*

Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMP) 2 and 9 was carried out in the myocardium of the left ventricle of prematurely born (21 and 21.5 days of gestation) and full-term (22 days of gestation) rats at 42, 56 and 180 days of the postnatal period of ontogenesis. The intensity of immunopositive staining was assessed by a scoring system. Preterm birth leads to an increase in the intensity of the immunopositive reaction to MMP-2 and MMP-9 in the wall of the left ventricle of rats. An increase in the intensity of the MMP-2 positive reaction in the left ventricle of rats is observed the earlier, the greater the degree of prematurity. The intensity of the MMP-9 positive reaction in the left ventricle of male rats is greater with a more pronounced degree of prematurity. An increase in the intensity of the MMP-2 and MMP-9 positive reaction in the wall of the left ventricle of female rats due to preterm birth is determined exclusively in animals born on the 21st day of pregnancy, that is, with a greater degree of prematurity.

Keywords: preterm birth, rats, left ventricle, heart, matrix metalloproteinases

УДК 611.018.8:612.73

ВЛИЯНИЕ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ (АСФИКСИИ) НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СУБЪЕДИНИЦЫ $\alpha 1$ GABA_A-РЕЦЕПТОРА В НЕОКОРТЕКСЕ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС

© 2023 г. Л. И. Хожай*

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

*E-mail: astarta0505@mail.ru

Поступила в редакцию 14.04.2023 г.

После доработки 15.05.2023 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

Цель работы заключалась в исследовании распределения субъединицы $\alpha 1$ GABA_A-рецептора в слоях неокортекса крыс в неонатальный период после воздействия гипоксии. Воздействие гипоксии на мозг новорожденных крыс осуществляли на 2-е неонатальные сут в течение 1 ч при содержании кислорода в дыхательной смеси 7.8%. Для выявления субъединицы $\alpha 1$ GABA_A-рецептора использовали иммуногистохимическую реакцию. Содержание белка оценивали по плотности иммунного окрашивания продукта реакции в цитоплазме и отростках нейронов. Изучали соматосенсорную область неокортекса на 5 и 10 неонатальные сутки (П5, П10). Установлено, что на ранних сроках неонатального периода в неокортексе присутствует значительная популяция молодых нейронов, в цитоплазме которых иммуногистохимически выявляется субъединица $\alpha 1$, входящая в состав GABA_A-рецептора. К концу неонатального периода у контрольных животных плотность окрашивания продукта иммуногистохимического выявления GABA_A $\alpha 1$ в слоях неокортекса существенно повышается. Воздействие перинатальной гипоксии вызывает сокращение числа нейронов, содержащих субъединицу $\alpha 1$ GABA_A-рецептора и значительное снижение плотности иммуногистохимического окрашивания во всех слоях неокортекса.

Ключевые слова: перинатальная гипоксия, субъединица $\alpha 1$ GABA_A-рецептора, неокортекс, неонатальный период

DOI: 10.31857/S004137712305005X, **EDN:** DIJGRD

Известно, что в центральной нервной системе (ЦНС) нейротрансмиссия GABA (γ -аминомасляная кислота) опосредуется GABA_A-рецепторами, при этом рецепторы, содержащие субъединицу $\alpha 1$, являются основными при быстрой синаптической тормозной нейротрансмиссии (Farrant, Nusser, 2005; Mohler, 2006; Rudolph, Mohler, 2006). Этот подтип рецептора GABA_A $\alpha 1$ составляет 40–60% всех кортикальных GABA_A-рецепторов, локализующихся преимущественно на телах и дендритах главных пирамидных нейронов (Klausberger et al., 2002).

GABA_A-рецепторы представлены различными структурно-функциональными подтипами, каждый из которых является гетеропентамерным протеином, чаще всего состоящим из пяти субъединиц: двух α -, двух β - и пятой субъединицы, которой может быть одна из β -, γ -, δ - или ϵ -субъединиц (Bauermann et al., 2001; Klausberger et al., 2001). Более того, разнообразие α -, β - и γ -субъединиц дополняется несколькими их изоформами (Nevers, Lüddens, 1998).

Отличительной особенностью GABA_A-рецепторов у взрослых животных является их широкая распространенность в разных отделах мозга, что, в общем, обуславливает их значительную структурно-функциональную гетерогенность. Клинические наблюдения показали, что качественные и количественные изменения состава субъединиц в GABA_A-рецепторах меняют их свойства и могут лежать в основе развития неврологических и психических расстройств (Pirker et al., 2000). При патологических состояниях, таких как эпилепсия, тревожность, аутизм, а также при неврологических расстройствах, связанных со стрессом, было отмечено изменение уровня экспрессии разных субъединиц GABA_A-рецептора (Blatt et al., 2001; Hales et al., 2006; Fatemi et al., 2009; Delahanty et al., 2011; Hernandez, Macdonald, 2019; Feng et al., 2022; Qin et al., 2022).

В развивающемся мозге млекопитающих GABA_A-рецепторы выявлены на достаточно ранних стадиях, еще до появления функциональных тормозных связей и синаптической нейротрансмиссии. В это время в переднем мозге было отмечено присутствие разных подтипов GABA_A-рецептора, содержащих субъ-

Принятые сокращения: GABA — γ -аминомасляная кислота.

единицы $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ и $\gamma 1$, при этом преобладающими были $\alpha 3$, $\beta 2/3$ и $\gamma 3$. Было показано, что интенсивность экспрессии разных субъединиц GABA_A-рецептора в различных структурах мозга различается и может меняться в процессе их развития (Owens et al., 1999; Pirker et al., 2000).

Известно, что воздействие гипоксии (ишемии) на ранних этапах онтогенеза оказывает существенное повреждающее действие на состояние центральной нервной системы, проявляющееся в отдаленные сроки, вызывая различные нарушения в цитоархитектонике, клеточной организации нейронов, утрате части клеток, потере нервных проекций, изменении синтеза нейротрансмиттеров и их трансмиссии (Dean et al., 2013; McClendon et al., 2014).

Вопрос о воздействии гипоксии (асфиксии) во время родов на экспрессию различных субъединиц, входящих в состав GABA_A-рецептора, и в частности субъединицы $\alpha 1$, в литературе практически не освещен. Тем не менее детальное знание временного распределения отдельных субъединиц GABA_A-рецептора в неокортексе как в норме, так и при воздействии повреждающих факторов, необходимо для правильного понимания влияния нейротрансмиссии GABA на развитие и функционирование коры в неонатальный период.

В связи с этим, задача настоящего исследования состояла в изучении распределения субъединицы $\alpha 1$ GABA_A-рецептора и изменения ее содержания в разных слоях неокортекса у крыс в неонатальный период после воздействия гипоксии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на лабораторных крысах линии Wistar из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН” (Санкт-Петербург).

Работа проведена на модели недоношенной беременности человека, т.е. модели общей гипоксии, которую испытывают преждевременно родившиеся дети, как правило, с недоразвитой респираторной системой. Эта модель, с одной стороны, исключает смертность животных, а с другой, воспроизводит широкий спектр повреждений разных отделов мозга, возникающих при асфиксии во время преждевременных родов (Otellin et al., 2021). В работе была исследована соматосенсорная область неокортекса.

Воздействие гипоксии осуществляли на 2-е неонатальные сут. Животных помещали на 1 ч в камеру с проточной газовой смесью, содержащей 7.8% кислорода, 0.4% углекислого газа и 91.8% азота, при температуре 21.5–23.0°C и нормальном давлении (760 мм рт. ст.). Исследование проводили в неонатальный период (период новорожденности) на 5 (П5) и 10 (П10) постнатальные сутки. Животных делили на 2 группы: 1) экспериментальную (П5 и П10, $n = 10$ в каждом случае), подвергавшихся в специальной камере

воздействию гипоксии и 2) контрольную (интактные крысы; П5 и П10, $n = 10$ в каждом случае).

Иммуногистохимическое выявление субъединицы $\alpha 1$ GABA_A-рецептора. У новорожденных крыс мозг извлекали и обрабатывали по общепринятой методике: фиксировали в цинк-этанолформальдегиде на фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), обезжизивали, заливали в парафин и готовили фронтальные серийные срезы толщиной 5–7 мкм на уровне брегмы – 0.60mm–0.40mm (по стереотаксическому атласу координатных таблиц мозга крыс в возрасте П5–П10 (Khazipov et al., 2015)). Срезы помещали на предметные стекла Super frost plus gold (Menzel-Glasser, Германия).

Иммуногистохимическое выявление субъединицы $\alpha 1$ ионотропного GABA_A-рецептора проводили с использованием кроличьих первичных поликлональных антител (anti-GABA_A-receptor alpha 1 antibody; Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 300. После проведения процедуры демаскирования белков в цитратном буфере (pH 6.1) (Dako, Дания) в течение 25 мин, срезы инкубировали в первичных антителах при температуре 4°C в течение 16 ч. В качестве вторичных антител использовали Goat anti-rabbit IgG H&L (HRP; Abcam, Великобритания). Срезы помещали во вторичные антитела на 30 мин при комнатной температуре. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). Специфичность иммунной реакции проверяли при помощи негативного контроля (без первичных антител). Общий морфологический анализ проводили на срезах мозга, окрашенных по Нисслю по общепринятой методике. Срезы заключали в синтетическую среду Permaunt (Termo, США).

Статистическая оценка результатов. При проведении иммуногистохимической реакции все процедуры были стандартизированы и осуществлялись одновременно для гистологических срезов мозга, полученных от контрольных и подопытных животных обеих возрастных групп. Материал анализировали на цифровых изображениях фронтальных серийных срезов, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия).

Количество клеток, содержащих GABA_A $\alpha 1$, оценивали на стандартной площади 0.1 мм² (усл. ед. площади) при увеличении объектива микроскопа 100×. Анализ данных осуществляли на цифровых изображениях 17–20 гистологических срезов мозга животных каждой исследуемой возрастной группы при помощи пакетов компьютерных программ ImageJ (NIH, США), Origin 5.0. Статистически обработанные данные представлены как средние значения и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$).

Оценку плотности окрашивания продукта иммунной реакции (или иммунореактивности) осуществляли при помощи системы анализа изображений, включающей световой микроскоп Olympus 1

(Япония), цветную цифровую камеру Video/Zavt Standart VZ-C31Sr и программное обеспечение (для денситометрии) Видеозавр Мультиметр 2.3 (ООО АТМ-практика, Санкт-Петербург). Анализ плотности окрашивания продукта иммунной реакции проводили при увеличении объектива микроскопа 60×. Цифровые изображения срезов мозга контрольных и экспериментальных животных были получены при одинаковых параметрах освещения, насыщенности цвета и контраста. Для оценки плотности окрашивания продукта иммунной реакции выделяли участки окрашенной цитоплазмы клеток, участки проксимальных отделов окрашенных отростков, крупных гранул, которые считаются терминальными синаптическими структурами (Guthmann et al., 1998). Количественный анализ данных осуществляли на цифровых изображениях, полученных с 20 гистологических срезов мозга животных каждой исследуемой возрастной группы, при этом на каждом срезе изучали по 7–8 участков в каждом из слоев II–VI неокортекса. Обработанные данные, выраженные в усл. ед. (D – плотность окраски продукта иммунной реакции), представлены как средние значения и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$).

Для анализа и сравнения полученных результатов между разными группами животных использовали *t*-критерий Стьюдента и oneway ANOVA (Statistica 8.0, Statsoft Inc. США), различия считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Количество нейронов, содержащих субъединицу $\alpha 1$ GABA_A-рецептора, в неокортексе крыс в контроле и после воздействия гипоксии на стадии П5 и П10. У контрольных животных на П5 во всех слоях неокортекса число клеток, содержащих $\alpha 1$ GABA_A-рецептора, на условной единице площади высокое. Наибольшее количество таких клеток присутствует в верхних слоях II–III (34.5 ± 0.2) (табл. 1), а в глубоких слоях IV, V и VI их количество меньше, при этом числовые значения в этих слоях очень близкие (25.5 ± 0.4 , 23.1 ± 0.1 и 21.5 ± 0.7 соответственно) (табл. 1).

После воздействия гипоксии количество клеток, содержащих субъединицу $\alpha 1$ GABA_A-рецептора, в верхних II–III и глубоких слоях V и VI остается высоким, а числовые показатели соответствуют контрольным, за исключением слоя IV, где их численность значимо выше (табл. 1).

На стадии П10 контрольных животных в глубоких слоях неокортекса IV, V и VI число клеток, содержащих $\alpha 1$ GABA_A-рецептора, оказывается близким по значению таковому у контрольных животных на П5 (табл. 1). В верхних слоях II–III количество таких клеток значимо снижается (в 1.4 раза).

После воздействия гипоксии в верхних слоях II–III число клеток, содержащих $\alpha 1$ GABA_A-рецептора,

Таблица 1. Число нейронов, содержащих субъединицу $\alpha 1$ GABA_A-рецептора в слоях соматосенсорной области неокортекса крыс на 5- и 10-е неонатальные сут в контроле и после воздействия гипоксии

Слои	Число нейронов, содержащих GABA _A $\alpha 1$, на 1 усл. ед. площади			
	срок развития			
	П5, контроль	П5, гипоксия	П10, контроль	П10, гипоксия
II–III	34.4 ± 0.2	35.0 ± 0.8	25.4 ± 0.9	28.7 ± 0.6
IV	25.5 ± 0.4	34.8 ± 0.6^a	22.7 ± 0.6	17.3 ± 0.8^a
V	23.1 ± 0.1	25.3 ± 0.2	18.3 ± 0.4	14.5 ± 0.6^a
VI	21.5 ± 0.7	20.1 ± 0.6	22.1 ± 0.8	13.5 ± 0.5^a

(^a) – Различия по отношению к контрольной группе достоверны при $p < 0.05$.

почти соответствует таковому в контроле (28.7 ± 0.6) (табл. 1), а в глубоких слоях IV, V и VI значимо снижается (в 1.3, 1.3 и 1.6 раза соответственно).

Таким образом, у контрольных животных на П5 во всех слоях неокортекса количество клеток, содержащих субъединицу $\alpha 1$ GABA_A-рецептора, достаточно высокое, и они примерно равномерно распределяются по слоям неокортекса. После воздействия гипоксии численность таких клеток в слоях неокортекса не изменяется и находится в пределах контрольных значений, кроме слоя IV. К концу неонатального периода (П10) у контрольных животных в глубоких слоях количество клеток, содержащих субъединицу $\alpha 1$, соответствует контрольным значениям на П5, однако в верхних слоях II–III существенно снижается по сравнению с П5. Воздействие гипоксии приводит к снижению количества этих клеток в глубоких слоях в 1.3 раза.

Плотность окрашивания продукта иммунной реакции (D) при выявлении субъединицы $\alpha 1$ GABA_A-рецептора в слоях неокортекса крыс в контроле и после воздействия гипоксии на стадии П5 и П10. У контрольных животных на П5 в слоях I, II–III, IV нейропил развит слабо, присутствуют отдельные отростки с варикозными расширениями, имеющие иммунное окрашивание, встречаются единичные гранулы (синаптические структуры). В этих слоях в цитоплазме нейронов и отростков плотность окрашивания продукта иммунной реакции относительно высокая и равна 0.240 ± 0.003 , 0.205 ± 0.006 и 0.188 ± 0.004 соответственно (табл. 2). В глубоких слоях V и VI нейропил представлен рыхлой сетью отростков с варикозными расширениями, имеющих иммунное окрашивание. В этих слоях в цитоплазме нейронов и отростков плотность окрашивания продукта иммунной реакции ниже, чем в верхних слоях (0.152 ± 0.007 и 0.071 ± 0.005 соответственно).

Таблица 2. Показатели оптической плотности (D) продукта иммунной реакции при выявлении субъединицы $\alpha 1$ GABA_A-рецептора в слоях соматосенсорной области неокортекса крыс на 5-е и 10-е неонатальные сут в контроле и после воздействия гипоксии

Слои неокортекса	D, усл. ед.			
	сроки развития			
	П5, контроль	П5, гипоксия	П10, контроль	П10, гипоксия
I	0.240 ± 0.003	0.166 ± 0.004 ^a	0.220 ± 0.003	0.158 ± 0.005 ^a
II–III	0.205 ± 0.006	0.130 ± 0.003 ^a	0.180 ± 0.008	0.116 ± 0.004 ^a
IV	0.188 ± 0.004	0.112 ± 0.008 ^a	0.206 ± 0.006	0.088 ± 0.007 ^a
V	0.152 ± 0.007	0.096 ± 0.006 ^a	0.178 ± 0.004	0.074 ± 0.008 ^a
VI	0.071 ± 0.005	0.048 ± 0.008 ^a	0.092 ± 0.006	0.067 ± 0.004 ^a

(^a) – Различия по отношению к контрольной группе достоверны при $p < 0.05$.

После воздействия гипоксии во всех слоях неокортекса – I, II–III, IV, V и VI – в цитоплазме нейронов и отростков плотность окрашивания продукта иммунной реакции значительно снижается по сравнению с контролем (в 1.4, 1.6, 1.7, 1.6 и 1.5 раза соответственно) (табл. 2).

Плотность окрашивания продукта иммунной реакции (D) при выявлении субъединицы $\alpha 1$ GABA_A-рецептора в слоях неокортекса на 10 неонатальные сутки у крыс в контроле и после воздействия гипоксии. У контрольных животных на П10 (к концу неонатального периода) в верхних слоях I, II–III в цитоплазме клеток и отростков показатели плотности окрашивания продукта иммунной реакции при выявлении субъединицы $\alpha 1$ по сравнению с предыдущим сроком исследования незначительно снижаются (в 1.1 раза), а в глубоких слоях IV, V и VI повышаются (в 1.1, 1.2 и 1.3 раза соответственно) (табл. 2).

После воздействия гипоксии во всех слоях неокортекса I, II–III, IV, V и VI показатели плотности окрашивания продукта иммунной реакции значимо снижаются в 1.4, 1.6, 2.3, 2.4 и 1.3 раза соответственно по сравнению с показателями в контроле (табл. 2, рис. 1).

Таким образом, на П5 у контрольных животных в цитоплазме нейронов и отростков во всех слоях неокортекса определяются достаточно высокие показатели плотности окрашивания продукта реакции при иммуногистохимическом выявлении GABA_A $\alpha 1$, а после воздействия гипоксии во всех слоях коры они заметно снижаются. На П10 у контрольных животных показатели плотности окрашивания продукта реакции во всех слоях неокортекса постепенно повышаются по сравнению с П5. Воздействие гипоксии приводит к существенному снижению показателей плотности окрашивания продукта реакции на GABA_A $\alpha 1$ по сравнению с контролем. К концу неонатального периода тенденция к снижению этих показателей продолжается.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенная работа показала, что у контрольных крыс в неокортексе, преимущественно в верхних слоях, на ранних сроках неонатального периода (П5) присутствует значительное число нейронов, содержащих субъединицу $\alpha 1$ GABA_A-рецептора. В глубоких слоях этих нейронов меньше и они примерно равномерно распределяются по слоям. Плотность окрашивания продукта иммунной реакции при выявлении субъединицы $\alpha 1$ GABA_A-рецептора в цитоплазме и отростках клеток на этом раннем сроке развития в верхних слоях I–IV также выше, чем в глубоких слоях V, VI. К концу неонатального периода (П10) в верхних слоях II–III число клеток, содержащих субъединицу $\alpha 1$ GABA_A-рецептора, существенно снижается, в остальных слоях их число не изменяется и соответствует таковому на П5. При этом плотность окрашивания продукта иммунной реакции при выявлении GABA_A $\alpha 1$ в верхних слоях снижается, а в более глубоких слоях неокортекса с увеличением возраста постепенно повышается. Полученные результаты дают основание предполагать, что в глубоких слоях, которые формируются раньше, определенное число нейронов, содержащих GABA_A $\alpha 1$, появляется в первые дни после рождения и сохраняется до конца неонатального периода. Колебание численности таких нейронов в верхних слоях, образующихся последними, объясняется тем, что процессы миграции, дифференцировки и созревания нейронов, их окончательное расположение в этих слоях, а также формирование нейрона завершаются только к концу неонатального периода (Marin-Padilla, 1992; Ignacio et al., 1995; Hou et al., 2011).

У крыс перед рождением в переднем мозге было отмечено присутствие субъединиц $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 2$ и $\beta 3$ рецептора GABA_A, при этом субъединица $\alpha 1$ не выявлялась иммуногистохимическим методом. Было показано, что в процессе развития существует временная смена экспрессии некоторых субъединиц.

Так, экспрессия субъединицы $\alpha 2$ к концу пренатального периода значительно снижается, а уровень экспрессии субъединицы $\alpha 1$ после рождения, напротив, начинает повышаться, т.е. на самых ранних сроках неонатального периода (П1–П3) происходит смена интенсивности экспрессии субъединицы $\alpha 2$ и субъединицы $\alpha 1$ в большинстве отделов мозга и неокортексе (Fritschy et al., 1994; Owens et al., 1999). Существует утверждение, что смена состава субъединиц, входящих в основные подтипы GABA_A -рецепторов, совпадает с началом активации синаптической нейротрансдачи (Owens et al., 1999; Dvorzhak et al., 2010).

Выявленное в нашей работе присутствие популяции нейронов, содержащих $\text{GABA}_A\alpha 1$, и постепенное повышение уровня содержания субъединицы $\alpha 1$ во время неонатального периода (от П5 до П10) согласуется с этими данными.

Следует отметить, что у взрослых крыс рецепторы к нейротрансмиттерам, как к возбуждающим, так и тормозным могут синтезировать астроциты (Schouboe, 2016). Поэтому необходимо остановиться на этом вопросе. У грызунов после рождения миграция нейронов в верхние слои неокортекса продолжается и заканчивается только к П7. Одновременно с этим в первую постнатальную неделю предшественники нейронов меняют программу дифференцировки и начинают продуцировать глиальные клетки, которые пролиферируют до конца первого месяца жизни, увеличиваясь в количестве (Namihira et al., 2009). Созревание астроцитов начинается в конце второй (П12–14) и в течение третьей постнатальной недели (П21), совпадая с процессами активного синаптогенеза. В это время астроциты в контакте с нейронами синтезируют ряд белков, связанных с транспортом и высвобождением пресинаптических пузырьков, с формированием постсинаптического уплотнения, секретируют синапс-регулирующие белки и рецепторы к нейротрансмиттерам (Blue, Parnavelas, 1983; Bandeira et al., 2009; Li et al., 2010; Buosi et al., 2017). К концу третьей постнатальной недели каждый астроцит занимает определенное положение в слоях коры (Bushong et al., 2004; Buosi et al., 2017).

Необходимо подчеркнуть, что в процессе развития в неокортексе созревание тормозных сетей происходит позже возбуждающих, поскольку на ранних стадиях развития высвобождение GABA приводит к возбуждению нейронов из-за сдвига равновесного потенциала ионов хлора, и только в течение второй постнатальной недели происходит переход функции GABA от возбуждения к торможению. В это время устанавливается баланс между возбуждением и торможением, являющегося, как известно, важным условием для нормального развития мозга. Кроме того, роль астроцитов в формировании и функционировании тормозных синапсов изучена не так широко, как формирование возбуждающих синапсов (Zhang et al., 2011; Ge et al., 2012; Farhy-Tselnick, Allen, 2018).

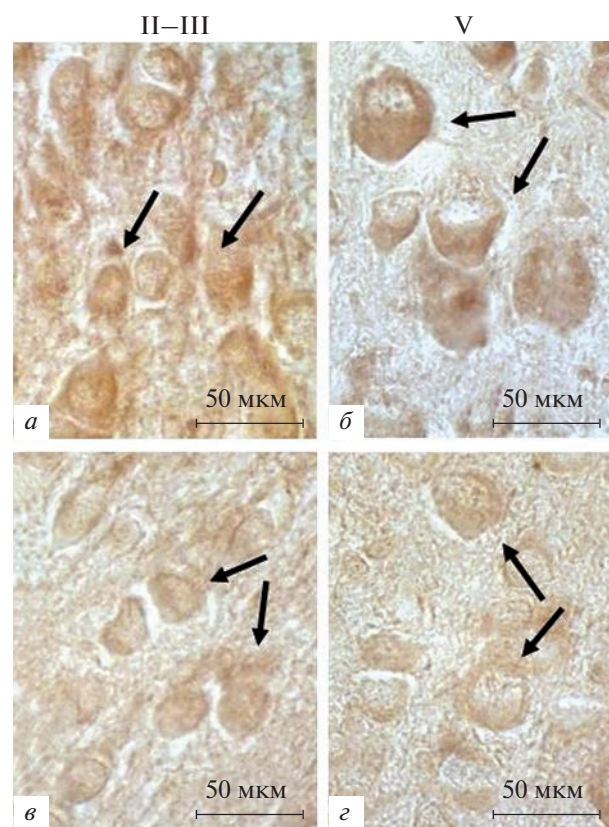


Рис. 1. Соматосенсорная область неокортекса крыс на 10-е неонатальные сутки в контроле (а, б) и после воздействия перинатальной гипоксии (в, г). Иммуногистохимическое выявление субъединицы $\alpha 1$ GABA_A -рецептора. а, в – Слои II–III; б, г – слой V. Отмечается снижение оптической плотности продукта иммунной реакции в слоях неокортекса II–III и V после воздействия гипоксии по сравнению с контролем. Стрелки – иммуноотмеченные нейроны. Увел. об. 100 $\times$.

В связи с выше изложенным, можно полагать, что все визуализируемые нами $\text{GABA}_A\alpha 1$ -иммунопозитивные клетки представляют собой только нейроны, поскольку выявление астроцитов, экспрессирующих $\text{GABA}_A\alpha 1$, на сроках П5–10 является маловероятным.

Результаты показали, что после воздействия гипоксии в течение первой неонатальной недели в слоях неокортекса количество нейронов, содержащих $\text{GABA}_A\alpha 1$, по сравнению с контролем почти не изменяется, за исключением слоя IV, где их число значимо повышается (в 1.4 раза). К концу неонатального периода в верхних слоях II–III число этих нейронов соответствует контрольному значению, а в остальных слоях существенно сокращается (в 1.3–1.6 раза). Что касается плотности иммунного окрашивания продукта реакции при выявлении $\text{GABA}_A\alpha 1$ после воздействия гипоксии, то на П5 она во всех слоях значительно снижается, несмотря на то, что количество нейронов, содержащих $\text{GABA}_A\alpha 1$, на этом сро-

ке развития соответствует контрольным значениям. К концу неонатального периода тенденция к снижению плотности продукта реакции в слоях неокортекса продолжается и значения этого показателя становятся еще ниже.

Установлено, что в ранние сроки неонатального периода активация GABA_A-рецепторов, опосредуемая GABA, приводит к сильной деполяризации мембраны незрелых молодых нейронов посредством открытия ионных каналов, оттока ионов хлора и значительного снижения его относительно высокой внутриклеточной концентрации, которая поддерживается в незрелых клетках. Эти события приводят к возникновению возбуждающего потенциала действия в нейронах. После чего в неокортексе у новорожденных грызунов и человека появляются коррелированные паттерны спонтанной сетевой активности нейронов, которая является ключевым регулятором процессов, происходящих на субклеточном уровне, таких как высвобождение хлоридов, экспрессия транспортеров и рецепторов к GABA, изменение функциональных свойств GABA_A-рецептора и GABAергический синаптогенез. Спонтанная нейронная активность также способствует росту и дифференцировке отростков — дендритов и аксонов — и необходима для формирования зрелых функциональных нейронных сетей (Gulledge, Stuart, 2003; Morita et al., 2006; Holmgren et al., 2010; Deidda et al., 2015; Marchetti et al., 2015).

Вероятно, воздействие перинатальной гипоксии на ранних этапах развития может вызывать нарушения активации GABA_A-рецепторов, снижение деполяризующего и возбуждающего эффекта GABA на ранних сроках, изменения спонтанной нейронной активности, что в результате и может приводить к резкому снижению экспрессии субъединицы $\alpha 1$ GABA_A-рецептора и сокращению в глубоких слоях коры числа нейронов, содержащих GABA_A $\alpha 1$. Последнее может быть вызвано и нарушением миграции молодых нейронов в глубокие слои, которая еще продолжается на начальных сроках неонатального периода, а также задержкой формирования аксональных и дендритных отростков, способствующих миграции, или частичной утратой клеток (Inada et al., 2011). Не исключено, что воздействие гипоксии на ранних этапах неонатального развития может изменять в нейронах внутреннюю программу появления и созревания разных подтипов GABA_A-рецепторов (Pausan, Fritschy, 1998; Bartolini et al., 2013). Выявленное в данной работе существенное снижение содержания GABA_A $\alpha 1$ на ранних сроках неонатального периода, вызванное воздействием перинатальной гипоксии, имеет отдаленный характер действия.

В предыдущей нашей работе, выполненной на взрослых половозрелых животных (P90), переживших воздействие перинатальной гипоксии, было показано, что число нейронов, содержащих GABA_A $\alpha 1$, к этому возрасту сокращалось на 37% по сравнению

с контролем, а в слоях неокортекса в цитоплазме нейронов имело место уменьшение содержания субъединицы $\alpha 1$ (Хожай, Отеллин, 2020), т.е. после воздействия перинатальной гипоксии изменение синтеза рецепторного белка сохраняется в течение продолжительного периода времени в онтогенезе. Такие нарушения, как правило, приводят к изменению нейротрансмиссии GABA и снижению тормозных эффектов.

Все больше данных свидетельствует о важности GABAергической тормозной дисфункции в патогенезе абсансной детской эпилепсии (Hassan et al., 2022), являющейся сложным генетическим неврологическим расстройством, характеризующимся генерализованными приступами. Одну из возможных причин развития этого типа эпилепсии связывают с изменением нейротрансмиссии GABA и нарушением тормозных эффектов. У грызунов на модели абсансной эпилепсии было обнаружено значительное снижение количества несинаптических и синаптических GABA_A $\alpha 1$ -рецепторов (на 18 и 12.2% соответственно) в неокортексе и гиппокампе (Hassan et al., 2022). Считают, что в основе одного из механизмов развития эпилепсии лежит нарушение экспрессии GABA_A-рецептора, вызванное мутациями генов, кодирующих субъединицы $\alpha 1$ и $\gamma 2$ (Baulac et al., 2001; Adotevi et al., 2021; Jafarian et al., 2021).

Мутации вызывают не только изменение экспрессии субъединиц GABA_A-рецептора, но и нарушение динамики нейротрансмиссии GABA на ранних сроках, что, в свою очередь, может влиять на развитие и созревание нейронов, синапсов и экспрессию самих GABA_A-рецепторов (Owens, Kriegstein, 2002). Эти нарушения считаются первичными генетическими дефектами. Однако часто возникают вторичные изменения трансмиссии GABA, происходящие после воздействия ряда повреждающих факторов, в том числе гипоксии, и играющие важную роль в патогенезе эпилепсии. Более того, показано, что в соматосенсорной области коры у грызунов и человека значительное снижение синтеза субъединицы $\alpha 1$ GABA_A-рецептора или ее отсутствие приводит к изменению экспрессии других коэкспрессирующихся субъединиц GABA_A-рецептора (Kralic et al., 2002). Это предполагает неизбежную перестройку пентамерной структуры самого рецептора, что также будет приводить к изменению динамики процесса торможения.

Таким образом, исследование показало, что у контрольных животных на ранних сроках неонатального периода присутствует значительная популяция нейронов, содержащих субъединицу $\alpha 1$ GABA_A-рецептора, с появлением которой связывают начало процессов созревания и становления неокортекса. К концу неонатального периода в цитоплазме нейронов всех слоев неокортекса существенно повышается содержание GABA_A $\alpha 1$. Воздействие перинатальной гипоксии вызывает сокращение как числа нейронов, содержащих GABA_A $\alpha 1$, так и значительное снижение

содержания рецепторного белка. Тормозные эффекты, опосредованные GABA_A-рецептором, содержащим субъединицу $\alpha 1$, являются неотъемлемой частью физиологического баланса возбуждения—торможения в нейронных сетях, и любое изменение в структуре или функционировании комплексов субъединиц GABA_A-рецептора может быть основой патогенеза многих заболеваний центральной нервной системы (Crunelli et al., 2020; Hassan et al., 2022). Полученные нами данные могут быть полезными для дальнейших исследований специфических изменений в нейротрансмиссии GABA, имеющих важное значение для разработки новых методов профилактики и лечения неврологических расстройств, возникающих у детей, переживших асфиксию во время родов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00052/22).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных при соблюдении требований Директив Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных животных, а также требованиям Комиссии по биоэтике ИФ РАН (Протокол этического комитета ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН № 10/14 от 14.10.2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор сообщает об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Хожай Л.И., Отеллин В.А. 2020. Экспрессия субъединицы $\alpha 1$ ионотропного ГАМК_A рецептора в неокортексе крыс после перинатальной гипоксии. Журн. эвол. Биохим. физиол. Т. 56. № 2. С. 75. (Khozhai L.I., Otellin V.A. 2020. Expression of the $\alpha 1$ subunit of the ionotropic GABA_A-receptor in the neocortex of rats after perinatal hypoxia. J. Evol. Biochem. Physiol. 2020. V. 56. № 2. P. 75.) <https://doi.org/10.31857/S0044452920020072>
- Adotevi N., Su A., Peiris D., Hassan M., Leitch B. 2021. Altered neurotransmitter expression in the corticothalamocortical network of an absence epilepsy model with impaired feed-forward inhibition. Neurosci. V. 467. P. 73. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.05.024>
- Bartolini G., Ciceri G., Marin O. 2013. Integration of GABAergic interneurons into cortical cell assemblies: lessons from embryos and adults. Neuron. V. 79. P. 849. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.014>
- Baulac S., Huberfeld G., Gourfinkel-An I., Mitropoulou G., Beranger A., Prud'homme J.-F., Baulac M., Brice A., Bruzzone R., Le Guern E. 2001. First genetic evidence of GABA_A-receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the $\gamma 2$ -subunit gene. Nat. Genet. V. 28. P. 46. <https://doi.org/10.1038.4267/10608/2027>
- Baumann S.W., Baur R., Sigel E. 2001. Subunit arrangement of γ -aminobutyric acid type A receptors. J. Biol. Chem. V. 276. P. 36275. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105240200>
- Blatt G.J., Fitzgerald C.M., Guptill J.T., Booker A.B., Kemper T.L., Bauman M.L. 2001. Density and distribution of hippocampal neurotransmitter receptors in autism: an autoradiographic study. J. Autism Dev. Disorders. V. 31. P. 537. <https://doi.org/10.1023/a:1013238809666>
- Bandeira F., Lent R., Herculano-Houzel S. 2009. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 106. P. 14108. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804650106>
- Blue M.E., Parnavelas J.G. 1983. The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. I. Qualitative analysis. Neurocytol. V. 12. P. 599. <https://doi.org/10.1007/BF01181526>
- Buosi A.S., Matias I., Araujo A.P.B., Batista C., Gomes F.C.A. 2017. Heterogeneity in synaptogenic profile of astrocytes from different brain regions. Mol. Neurobiol. V. 55. P. 751. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0343-z>
- Bushong E.A., Martone M.E., Ellisman M.H. 2004. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. Int. J. Dev. Neurosci. V. 22. 73. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2003.12.008>
- Crunelli V., Lorincz M.L., McCafferty C., Lambert R.C., Leresche N., Di Giovanni G., David F. 2020. Clinical and experimental insight into pathophysiology, comorbidity and therapy of absence seizures. Brain. V. 143. P. 2341. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa072>
- Dean J., McClendon E., Hansen K., Azimi-Zonooz A., Chen K., Riddle A., Gong X., Sharifnia E., Hagen M., Ahmad T., Leigland L., Hohimer A., Kroenke C., Back S. 2013. Prenatal cerebral ischemia disrupts MRI-defined cortical microstructure through disturbances in neuronal arborization. Sci. Transl. Med. V. 5: 168ra7. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004669>
- Deidda G., Allegra M., Cerri C., Naskar S., Bony G., Zunino G., Bozzi Y., Caleo M., Cancedda L. 2015. Early depolarizing GABA controls critical-period plasticity in the rat visual cortex. Nat. Neurosci. V. 18. P. 87. <https://doi.org/10.1038/nn.3890>
- Delahanty R.J., Kang J.Q., Brune C.W., Kistner E.O., Courchesne E., Cox N.J., Cook E.H., Macdonald R.L., Sutcliffe J.S. 2011. Maternal transmission of a rare GABRB3 signal peptide variant is associated with autism. Mol. Psychiatry. V. 16. P. 86. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.118>
- Dvorzhak A., Myakhar O., Unichenko P., Kirmse K., Kirischuk S. 2010. Estimation of ambient GABA levels in layer I of the mouse neonatal cortex in brain slices. J. Physiol. V. 588. P. 2351. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.187054>

- Farhy-Tselnick I., Allen N.J. 2018. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural. Dev.* V. 13. P. 7.
<https://doi.org/10.1186/s13064-018-0104-y>
- Farrant M., Nusser Z. 2005. Variations on an inhibitory theme: Phasic and tonic activation of GABA_A-receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 6. P. 215.
<https://doi.org/10.1038/nrn1625>
- Fatemi S.H., Reutiman T.J., Folsom T.D., Thuras P.D. 2009. GABA_A-receptor down regulation in brains of subjects with autism. *J. Autism Dev. Disorders.* V. 39. P. 223.
<https://doi.org/10.1007/s10803-008-0646-7>
- Feng Y., Wei Z.-H., Liu C., Li G.-Y., Qiao X.-Z., Gan Y.-J., Zhang C.-C., Deng Y.-C. 2022. Genetic variations in GABA metabolism and epilepsy. *Seizure.* V. 101. P. 22.
<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2022.07.007>
- Fritschy J.-M., Paysan J., Enna A., Mohler H. 1994. *J. Neurosci.* V. 14. P. 5302.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-09-05302.1994>
- Ge W.-P., Miyawaki A., Gage F.H., Jan Y.N., Jan L.Y. 2012. Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature.* V. 484. P. 376.
<https://doi.org/10.1038/nature10959>
- Gulledge A.T., Stuart G.J. 2003. Excitatory actions of GABA in the cortex. *Neuron.* V. 37. P. 299.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)01146-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01146-7)
- Guthmann A., Fritschy J.M., Ottersen O.P., Torp R., Herbert H. 1998. GABA, GABA transporters, GABA_A-receptor subunits and GAD mRNAs in the rat parabrachial and Kolliker-Fuse nuclei. *J. Comp. Neurol.* V. 400. P. 229.
- Hales T.G., Deeb T.Z., Tang H., Bollan K.A., King D.P., Johnson S.J., Connolly C.N. 2006. An asymmetric contribution to gamma-aminobutyric type A receptor function of a conserved lysine within TM2-3 of alpha1, beta2, and gamma2 subunits. *J. Biol. Chem.* V. 281. P. 17034.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M603599200>
- Hassan M., Adotevi N.K., Leitch B. 2022. Altered GABA_A-receptor expression in the primary somatosensory cortex of a mouse model of genetic absence epilepsy. *Intern. J. Mol. Sci.* V. 23. P. 15685.
<https://doi.org/10.3390/ijms232415685>
- Hernandez C.C., Macdonald R.L. 2019. A structural look at GABA_A-receptor mutations linked to epilepsy syndromes. *Brain Res.* V. 1714. P. 234.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.03.004>
- Hevers W., Lüddens H. 1998. The diversity of GABA_A-receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes. *Mol. Neurobiol.* V. 18. P. 35.
<https://doi.org/10.1007/BF02741459>
- Holmgren C.D., Mukhtarov M., Malkov A.E., Popova I.Y., Bregestovski P., Zilberter Y. 2010. Energy substrate availability as a determinant of neuronal resting potential, GABA signaling and spontaneous network activity in the neonatal cortex *in vitro*. *J. Neurochem.* V. 112. P. 900.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06506.x>
- Hou J., Eriksen N., Pakkenberg B. 2011. The temporal pattern of postnatal neurogenesis found in the neocortex of the Göttingen minipig brain. *Neuroscience.* V. 195. P. 176.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.025>
- Ignacio M.P., Kimm E.J., Kageyama G.H., Yu J., Robertson R.T. 1995. Postnatal migration of neurons and formation of laminae in rat cerebral cortex. *Anat. Embryol. (Berl.)* V. 191. P. 89.
<https://doi.org/10.1007/BF00186782>
- Inada H., Watanabe M., Uchida T., Ishibash H., Wake H., Nemoto T., Yanagawa Y., Fukuda A., Nabekura J. 2011. GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons in living neonatal mice. *PLoS One.* V. 6: e27048.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027048>
- Jafarian M., Mousavi S.M.M., Rahimi S., Ghaderi P.F., Lotfinia A.A., Lotfinia M., Gorji A. 2021. The effect of GABAergic neurotransmission on the seizure-related activity of the laterodorsal thalamic nuclei and the somatosensory cortex in a genetic model of absence epilepsy. *Brain Res.* V. 1757. P. 47304.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147304>
- Khazipov R., Zaynutdinova D., Ogievetsky E., Valeeva G., Mitrukhnina O., Manent J.-B., Represa A. 2015. Atlas of the postnatal rat brain in stereotaxic coordinates. *Front. Neuroanat.* V. 9. P. 161.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00161>
- Klausberger T., Roberts J.D., Somogyi P. 2002. Cell type- and input-specific differences in the number and subtypes of synaptic GABA_A-receptors in the hippocampus. *J. Neurosci.* V. 22. P. 2513.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02513.2002>
- Klausberger T., Sarto I., Ehya N., Fuchs K., Furtmüller R., Mayer B., Huck S., Sieghart W. 2001. Alternate use of distinct intersubunit contacts controls GABA_A-receptor assembly and stoichiometry. *J. Neurosci.* V. 21. P. 9124.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-23-09124.2001>
- Kralic J.E., Korpi E.R., O'Buckley T.K., Homanics G.E., Morrow A.L. 2002. Molecular and pharmacological characterization of GABA_A-receptor alpha1 subunit knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* V. 302. P. 1037.
<https://doi.org/10.1124/jpet.102.036665>
- Li M., Cui Z., Niu Y., Liu B., Fan W., Yu D., Deng J. 2010. Synaptogenesis in the developing mouse visual cortex. *Brain Res Bull.* V. 81. P. 107.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.08.028>
- Marchetti C., Tabak J., Chub N., O'Donovan M.J., Rinzel J. 2015. Modeling spontaneous activity in the developing spinal cord using activity-dependent variations of intracellular chloride. *J. Neurosci.* V. 25. P. 3601.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4290-04.2005>
- Marín-Padilla M. 1992. Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: a unifying theory. *J. Comp. Neurol.* V. 321. P. 223.
<https://doi.org/10.1002/cne.903210205>
- McClendon E., Kevin C., Gong X., Sharifnia E., Hagen M., Cai V., Shaver D., Riddle A., Dean J.M., Gunn A.J., Mohr C., Kaplan J.S., Rossi D.J., Kroenke C.D., Hohimer A.R., Back S.A. 2014. Prenatal cerebral ischemia triggers dysmaturation of caudate projection neurons. *Ann. Neurol.* V. 75. P. 508.
<https://doi.org/10.1002/ana.24100>
- Mohler H. 2006. GABA_A-receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res.* V. 26. P. 505.
<https://doi.org/10.1007/s00441-006-0284-3>
- Morita K., Tsumoto K., Aihara K. 2006. Bidirectional modulation of neuronal responses by depolarizing GABAergic inputs. *J. Biophys.* V. 90. P. 1925.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.105.063164>

- Namihira M., Kohyama J., Semi K., Sanosaka T., Deneen B., Taga T., Nakashima K. 2009. Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. *Dev. Cell.* V. 16. P. 245.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.12.014>
- Owens D.F., Liu X., Kriegstein A.R. 1999. Changing properties of GABA_A-receptor-mediated signaling during early neocortical development. *J. Neurophysiol.* V. 82. P. 570.
<https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.2.570>
- Owens D.F., Kriegstein A.R. 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat. Rev. Neurosci.* V. 3. P. 715.
<https://doi.org/10.1038/nrn919>
- Otellin V.A., Khozhai L.I., Shishko T.T., Vershinina E.A. 2021. Nucleolar ultrastructure in neurons of the rat neocortical sensorimotor area during the neonatal period after perinatal hypoxia and its pharmacological correction. *J. Evol. Biochem. Physiol.* V. 57. P. 1251.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021060053>
- Paysan J., Fritschy J.M. 1998. GABA_A-receptor subtypes in developing brain. Actors or spectators? *Perspect. Dev. Neurobiol.* V. 5. P. 179.
- Pirker S., Schwarzer C., Wieselthaler A., Sieghart W., Sperk G. 2000. GABA_A-receptors: Immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neurosci.* V. 101. P. 815.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00442-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00442-5)
- Qin X., Pan X.-Q., Huang S.-H., Zou J.-X., Zheng Z.-H., Liu X.-X., You W.-J., Liu Z.-P., Cao J.-L., Zhang W.-H., Pan B.-X. 2022. GABA_A-receptor hypofunction in the amygdala-hippocampal circuit underlies stress-induced anxiety. *Sci. Bull. (Beijing).* V. 67. P. 97.
<https://doi.org/10.1016/j.scib.2021.09.007>
- Rudolph U., Mohler H. 2006. GABA-based therapeutic approaches: GABA_A-receptor subtype functions. *Curr. Opin. Pharmacol.* V. 6. P. 18.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.10.003>
- Schousboe A. 2016 Metabolic signaling in the brain and the role of astrocytes in control of glutamate and GABA neurotransmission. *Neurosci. Lett.* V. 689. P. 11.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.01.038>
- Zhang Z., Jiao Y.-Y., Sun Q.-Q. 2011. Developmental maturation of excitation and inhibition balance in principal neurons across four layers of somatosensory cortex. *Neurosci.* V. 74. P. 10.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.11.045>

Effect of Perinatal Hypoxia (Asphyxia) on the Distribution of the $\alpha 1$ GABA_A-Receptor Subunit in the Neocortex of Newborn Rats

L. I. Khozhai*

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199034 Russia

**e-mail: astarta0505@mail.ru*

The aim of this work was to study the distribution of the $\alpha 1$ GABA_A-receptor subunit in the neocortical layers of rats in the neonatal period after exposure to hypoxia. The effect of hypoxia on the brain of newborn rats was carried out on the 2nd neonatal day for 1 h at an oxygen content in the respiratory mixture of 7.8%. An immunohistochemical reaction was used to detect the $\alpha 1$ GABA_A-receptor subunit. The quantitative protein content was estimated from the density of immunostaining of the reaction product in the cytoplasm and processes of neurons. The somatosensory area of the neocortex was studied on the 5th and 10th neonatal days (P5, P10). It has been established that in the neocortex there is a significant population of young neurons containing the $\alpha 1$ subunit, which is part of the GABA_A-receptor in the early stages of the neonatal period. By the end of the neonatal period in control animals, the staining density of the product of reaction to the detection of GABA_A $\alpha 1$ in the layers of the neocortex increases significantly. Exposure to perinatal hypoxia causes a reduction in the number of neurons containing the $\alpha 1$ GABA_A-receptor subunit and a significant decrease in the density of immune staining in all layers of the neocortex.

Keywords: perinatal hypoxia, $\alpha 1$ GABA_A-receptor subunit, neocortex, neonatal period

ИНТЕНСИВНОСТЬ ДЕГРАДАЦИИ И СИНТЕЗА МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЕРМЫ У КРЫС ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОЙ ХОЛОДОВОЙ ТРАВМЫ НА ФОНЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

© 2023 г. Н. А. Шутский^{1, 2}, Л. Н. Горбатова¹, С. Л. Кашутин¹, Н. С. Холопов^{1, 2, *},
Л. Л. Шагров¹, А. Л. Зашихин¹

¹Северный государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Архангельск, 163000 Россия

²Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, Архангельск, 163000 Россия

*E-mail: nikitaholopov@mail.ru

Поступила в редакцию 03.04.2023 г.

После доработки 25.04.2023 г.

Принята к публикации 29.04.2023 г.

Исследования процессов регенерации тканей в постхолодовой период в настоящее время востребованы в связи с освоением Арктики, которой свойственны чрезвычайно низкие температуры. Метаболические или гормональные отклонения на основе инсулинорезистентности и компенсаторной гиперинсулинемии, которые могут приводить к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, а, следовательно, и к нарушениям микроциркуляции, являются отягчающими факторами, усиливающими последствия холодовых повреждений. В настоящей работе изучали процессы деградации и синтеза межклеточного матрикса дермы, а также концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови после локальной холодовой травмы третьей степени. Выявлено, что регенеративный процесс после локального холодового повреждения начинался на 3-е сут и характеризовался увеличением содержания коллагена дермы и толщины коллагеновых волокон. Регенерация на фоне метаболического синдрома сопровождалась замедлением процессов восстановления тканей. Течение восстановительного процесса было сопряжено с изменением содержания сиаловых кислот в сыворотке крови, при этом отличительной чертой динамики этого показателя явилось увеличение концентрации сиаловых кислот при метаболических нарушениях на 7-е сут и медленному незначительному снижению в течение всего эксперимента, которое достигало контрольных значений к 21-м сут.

Ключевые слова: локальное холодовое повреждение, дерма, коллаген, ферментативный гидролиз, восстановление

DOI: 10.31857/S0041377123050085, **EDN:** DGLAZO

Холодовая травма является одной из важнейших медико-социальных проблем в военное время, при стихийных бедствиях, авариях, катастрофах, а также при освоении Арктики с ее экстремально суровым климатом. Медико-социальная и экономическая направленность данной проблемы определяется тяжестью осложнений и длительной (либо постоянной) потерей трудоспособности (Pulla et al., 1994; Mohr, 2009).

Неудовлетворительные результаты лечения холодовой травмы достигают 50%, что диктует необходимость поиска повышения эффективности лечения отморожений (Валентюкевич и др., 2021a).

Целью хирургического вмешательства, как одного из основных методов лечения при локальных холодовых поражениях, является удаление нежизнеспособных тканей и проведение реконструктивно-восстановительных операций, направленных на замещение образовавшихся дефектов собственными

тканями (Banzo et al., 2002; Ingram, Raymond, 2013; Kuht et al., 2018).

Одним из отягчающих факторов при регенеративных процессах могут играть метаболические нарушения. Как известно, метаболический синдром представляет комплекс метаболических, гормональных и клинических нарушений, которые способствуют развитию сердечно-сосудистых заболеваний, основанных на инсулинорезистентности и компенсаторной гиперинсулинемии (Беленков и др., 2018). Вследствие таких нарушений велика вероятность ухудшения микроциркуляции, что напрямую влияет на регенерацию в постхолодовом периоде (Eckel et al., 2010; Kaug, 2014).

В связи со значительной распространенностью метаболического синдрома и частой встречаемостью холодовой травмы в условиях климата северных широт, высока вероятность сочетания метаболического синдрома и холодовой травмы. Неясным остается

тот факт, оказывает ли метаболический синдром влияние на длительность и качество восстановления кожных покровов после холодовой травмы.

Вполне вероятно, что на подготовительном этапе при проведении реконструктивно-восстановительных операций, использование ресурсов сохранившейся ткани может быть одним из решений, повышающих эффективность лечения отморожений (McIntosh et al., 2019; Joshi et al., 2020). С учетом того, что метаболические нарушения широко распространены в Арктической зоне, изучение регенеративных механизмов, сопряженных с наличием метаболического синдрома, представляет теоретический и практический интерес.

Механизмы регенерации тканей после холодовой травмы освещены достаточно подробно, учитываются не только суточные изменения, но и изменения по часам; методами гистологии и иммуногистохимии авторы описывают клеточный состав дермы и внеклеточный матрикс (Aroga, 2018). Установлено, что в первые часы и сутки после холодовой травмы происходит деградация межклеточного матрикса дермы, связанная с расщеплением молекул коллагена под воздействием неспецифических и специфических протеиназ, а также матриксных металлопротеиназ 1, 8, 13, 14, 18 (Груздева, 2020).

В то же время гистологические и иммуногистохимические методы не позволяют количественно оценить интенсивность деградации межклеточного матрикса, равно как и синтез коллагена, что требует необходимость разработки методов, позволяющих количественно определить степень изменения данных процессов. С другой стороны, оценить интенсивность изменений межклеточного вещества возможно, определяя концентрацию сиаловых кислот. Известно, что сиаловые кислоты — это ациальные производные нейраминовой кислоты, являющейся одним из компонентов межклеточного вещества соединительной ткани, в том числе дермы. Уровень сиаловых кислот в сыворотке крови повышается в ходе деградации межклеточного матрикса дермы (Schauer, Kamerling, 2018). В связи с этим представляет интерес взаимосвязанности процессов разрушения коллагеновых волокон и межклеточного вещества, особенно при наличии метаболического синдрома.

Таким образом, цель настоящей работы заключалась в изучении интенсивности деградации и синтеза межклеточного матрикса дермы у крыс после локальной холодовой травмы на фоне метаболического синдрома.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Моделирование метаболического синдрома у крыс. Для индукции метаболического синдрома в соответствии с рекомендациями (Derkach et al., 2015), начиная с 26-суточного возраста, беспородных крысят

поили 30%-ным раствором сахарозы вместо воды. В рацион также добавляли насыщенные жиры (масло с жирностью 82.5%) из расчета 4 г масла за 1 сут на 1 крысу. Через 1 мес. повышали суточное количество масла до 5 г, еще через месяц — до 6 г. У четырехмесячных крыс с помощью глюкозотолерантного теста оценивали чувствительность к глюкозе, для чего внутрибрюшинно вводили раствор глюкозы (2 г на 1 кг веса животного) и в течение 120 мин в крови, полученной из хвостовой вены, измеряли ее концентрацию. Отбирали животных с повышенной массой тела и нарушенной толерантностью к глюкозе.

Моделирование контактного холодового повреждения. После установления наличия метаболического синдрома у лабораторных животных, моделировали локальное холодовое повреждение по следующей методике. Предварительно охлажденную в жидком азоте металлическую гирьку диаметром 2.5 см прикладывали к депилированной коже спины крысы на 3 мин, тем самым получая отморожение третьей степени. Кусочек пораженной кожи с неповрежденной зоной забирали сразу после передозировки средства для наркоза на 3, 7, 14 и 21 сут. В качестве контрольной группы были использованы беспородные крысы, содержащиеся в тех же условиях. Группы формировали по 5 животных ($n = 5$) (Валентюкевич и др., 2021б).

Определение процентного содержания коллагена в дерме. Кусочек пораженной кожи забирали посредством пинцета № 5 после выведения животного из эксперимента на 3, 7, 14 и 21 сут. В качестве контрольной группы были использованы беспородные крысы той же массы тела, содержащиеся в условиях, что и экспериментальная группа. Группы формировали из 7 животных. Определение содержания коллагена в дерме осуществляли по разработанной нами методике (Шутский и др., 2019).

Этап 1 — высушивание кожи. Предварительно взвешенный и замороженный при -80°C в 1 мл 0.9%-ного физиологического раствора хлористого натрия кусочек ткани лиофильно высушивали в лиофильной сушилке при температуре -46°C и давлении 0.040 мБар, взвешивали, получая массу лиофилизированного образца кожи ($m_{\text{сх}}$), и измельчали с помощью микротомного лезвия на фрагменты толщиной не более 3 мм.

Этап 2 — подготовка к ферментативному гидролизу. Полученные фрагменты помещали в градуированную пробирку Eppendorf (объемом 1.5 мл), заливали 1 мл 15%-ного водного раствора гидроксида натрия на 24 ч при температуре $18-20^{\circ}\text{C}$, после чего неоднократно промывали дистиллированной водой при температуре $18-20^{\circ}\text{C}$ в объеме 1 мл. После достижения целевого уровня pH надосадочной жидкости 7.0, супернатант аспирировали дозатором таким образом, чтобы количество осадка в пробирке не превышало 0.3 мл. Полученный материал замораживали при -80°C , лиофильно высушивали в лиофиль-

ной сушилке и взвешивали на аналитических весах, определяя массу материала m_1 .

Этап 3 — ферментативный гидролиз коллагена. Полученный безводный осадок разводили в 900 мкл фосфатного буферного раствора с pH 7.0 и добавляли 100 мкл раствора коллагеназы I типа (НПП Эко, Россия), который заранее приготавливали путем растворения лиофильно высушенного препарата коллагеназы в 10 мл фосфатного буферного раствора с pH 7.0. Концентрация фермента составила 5 мг/мл. Затем пробирку с содержимым устанавливали в шейкер-инкубатор ES-20 (BioSan, Латвия) при температуре 37°C и интенсивном перемешивании в течение 2 ч. После этого пробирку центрифугировали при 13400 об./мин в течение 5 мин, аспирировали дозатором надосадочную жидкость, добавляли дистиллированную воду до объема 1 мл, гомогенизировали полученный материал. Процедуру, включающую гомогенизацию путем ресуспендирования дозатором, центрифугирование, аспирацию надосадочной жидкости и добавление воды до объема 1 мл повторяли 5 раз. После этого материал замораживали при -80°C, лиофильно высушивали и взвешивали, определяя массу материала m_2 . По разнице масс m_1 и m_2 определяли массу коллагена, содержавшегося в исследуемой ткани. Процентное содержание коллагена в ткани определяют отношением конкретной массы коллагена к массе образца ткани.

Таким образом, содержание коллагена ($m_{\text{кол}}$, %) в ткани определяли по формуле:

$$m_{\text{кол}} = (m_1 - m_2) / (m_{\text{сх}}) \times 100\%,$$

где m_1 и m_2 — масса кожи до и после ферментативного гидролиза соответственно; $m_{\text{сх}}$ — масса образца абсолютно сухой кожи (после лиофилизации).

Определение толщины коллагеновых волокон. Этот параметр дермы осуществляли по разработанной нами методике (Горбатова и др., 2022). Фиксированный в гистологическом забуференном 10%-ном нейтральном формалине кусочек поврежденной кожи, полученный путем панч-биопсии, без предварительной заморозки нарезали микротомным ножом на мелкие фрагменты. Полученные фрагменты помещали в центрифужную градуированную пробирку, заливали фрагменты 1 мл 50%-ного водного раствора гидроксида калия на 15 ч. По истечению времени раствор щелочи удаляли путем аспирации пипеткой Пастера и наливали дистиллированную воду в объеме 5 мл. Гомогенизировали материал при помощи струи воды из пипетки Пастера в течение 2–3 мин, доводили объем воды в пробирке до 10 мл и центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об./мин. После центрифугирования аспирировали воду из пробирки таким образом, чтобы осадок на дне пробирки находился в объеме жидкости, не превышающем 0.5 мл, добавляли дистиллированную воду до объема 5 мл и повторно гомогенизировали материал способом, описанным выше. После пятикратной

промывки коллагенсодержащую суспензию замораживали при -80°C и лиофильно высушивали. После полного высушивания лиофилизат переносили в прободержатель сканирующего электронного микроскопа (Zeiss, Германия). После пятикратной промывки образцы высушивали на воздухе и переносили в сканирующий электронный микроскоп Sigma VP Zeiss (SEM, Германия) (ускоряющее напряжение 10 кВ, детектор InLens, апертура 7.5 мкм).

Для увеличения контрастности изображений поверхность сухих проб покрывали слоем сплава Au—Pd толщиной до 5 нм с помощью напылительной установки Q150T ES (Quorum, Великобритания). На рис. 1 представлены фотоснимки коллагеновых волокон поврежденного участка дермы у крысы контрольной группы и на фоне метаболического синдрома в зависимости от продолжительности эксперимента.

Определение сиаловых кислот в сыворотке крови. Взятие крови осуществляли путем пункции полости сердца перед выведением животного из эксперимента. Пробирки с кровью центрифугировали с помощью LMC-4200R (BioSan, Латвия) в течение 10 мин при температуре 8°C и 2700 об./мин. Сыворотку крови отбирали в пластиковые градуированные пробирки, после чего замораживали пробирки с сывороткой в низкотемпературном морозильнике DW-86W100 (Haier, Китай).

В центрифужную пробирку, содержащую 1 мл сыворотки крови, добавляли 1 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивали на вихре Microspin FV-2400 (BioSan, Латвия). Пробирку с сывороткой крови помещали на 5 мин в термостат Combitherm-2 CH 3-150 (BioSan, Латвия) при 100°C, затем охлаждали ее в течение 5 мин при -3°C, после чего центрифугировали 5 мин при 13400 об./мин с помощью Minispin (Eppendorf, Германия). Отделяли надосадочную жидкость и повторно ее центрифугировали для полного удаления осадка. В стеклянную пробирку отбирали 0.4 мл надосадочной жидкости, добавляли 5 мл уксусно-сернокислрой смеси (реактив Гесса) и нагревали в кипящей водяной бане ПЭ-4300 (Экрос, Россия) при 100°C в течение 30 мин. Далее охлаждали под струей холодной воды. Оптическую плотность полученных образцов определяли на спектрофотометре 2800 UV/VIS (United Products & Instruments, США) в кварцевой кювете с шириной слоя 10 мм при длине волны 545 нм против кюветы сравнения с реактивом Гесса. Результат выражали в усл. ед., умножая величину экстинкции на 1000.

Статистическая обработка. Обработку полученных результатов проводили с помощью программы SPSS 13.0 for Windows. Распределение параметров было ненормальным, в связи с чем описание выборок проводили посредством подсчета медианы (Me) и межквартильного интервала (Q25; Q75). Вероятность различий оценивали по непараметрическому критерию Колмогорова—Смирнова (Z). При прове-

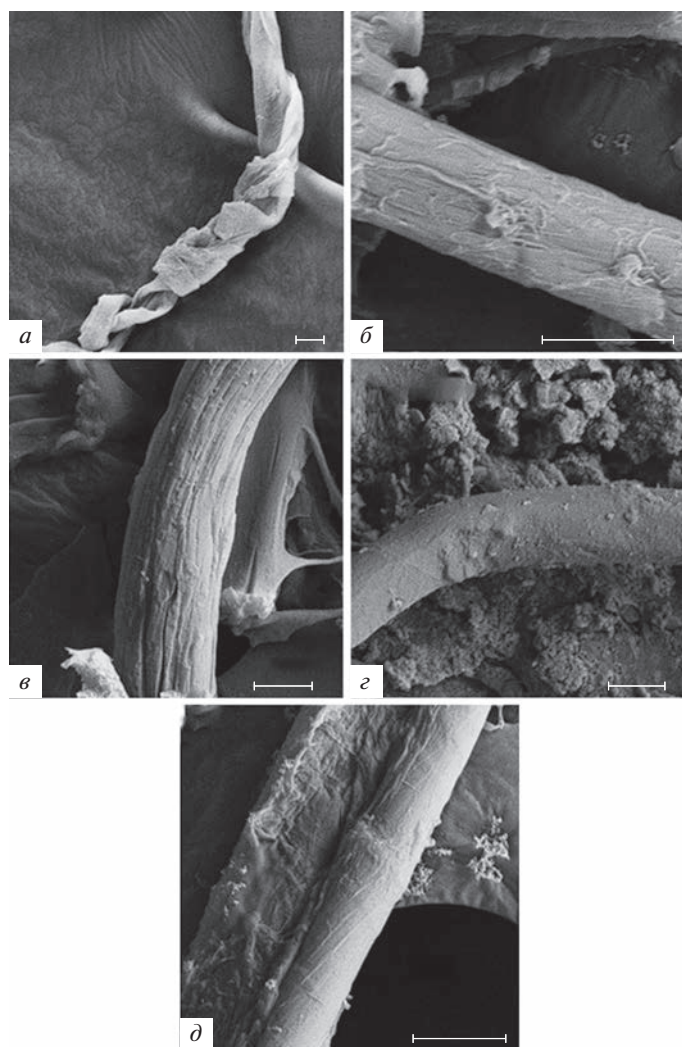


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия коллагеновых волокон дермы поврежденного участка после холодовой травмы у крыс с метаболическим синдромом. *а* – Контрольная группа; *б* – 3 сут; *в* – 7 сут; *г* – 14 сут; *д* – 21 сут. Масштабная линейка – 10 мкм.

дении корреляционного анализа использовали критерий Кендалла (τ). Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Реактивы. В работе использовали глюкозу, гидроксид натрия (Вектон, Россия), фосфатно-солевой буферный раствор PBS (Melford, Великобритания), коллагеназу I тип, лиофилизированную (НПП Эко, Россия), формалин, гидроксид калия (ВитаХим, Россия), трихлоруксусную кислоту квалификации “х. ч.” (Chemical line, Россия), концентрированную серную кислоту (ООО Сигма Тек, Россия) и ледяную уксусную кислоту квалификации “х. ч.” (PanReas, Испания).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из данных, представленных на рис. 2*а*, у крыс на 3-и сут после локального холодового повреждения регистрировали статистически значимое снижение содержания коллагена дермы с 69.69 (67.58; 70.16) до 26.92% (23.48; 30.80) при $Z = 1.41$ и $p = 0.030$. Но уже на 7-е сут значение показателя составляло 40.51% (38.43; 42.12) при $Z = 1.65$ и $p = 0.009$. Увеличение показателя до 53.22% (49.98; 56.22) при $Z = 1.65$ и $p = 0.009$ продолжалось до 14-х сут, и в период 14–21-х сут содержание коллагена дермы имело лишь тенденцию к увеличению (всего на 3.0%) без статистически значимого подтверждения и составило 56.28% (54.23; 56.78) при $Z = 0.89$ и $p = 0.390$. Таким образом, в течение 21-х сут после локальной холодовой травмы содержание коллагена дермы не возвращается к уровню соответствующего показателя в контрольной группе и составляет 56.28 (54.23; 56.78) против 69.69% (67.58; 70.16) при $Z = 1.44$ и $p = 0.030$.

На 3-и сут после холодовой травмы снижение содержания коллагена дермы сопровождалось со статистически значимым уменьшением толщины коллагеновых волокон с 10.31 (9.11; 11.17) до 4.48 (3.43; 4.37) мкм при $Z = 1.36$; $p = 0.047$) (рис. 2*б*).

Увеличение толщины начиналось на 7-е сут (5.62 мкм (5.14; 6.10) при $Z = 1.49$ и $p = 0.023$) и продолжилось до 14-х сут. На 21-е сут после холодовой травмы толщина коллагеновых волокон составляла 9.36 мкм (9.17; 9.53) и уже не отличалась от аналогичного показателя в группе контроля ($Z = 0.87$; $p = 0.431$).

На рис. 2*в* представлена динамика содержания сиаловых кислот в сыворотке крови у крыс с метаболическим синдромом после локальной холодовой травмы. Тенденцию к увеличению концентрации сиаловых кислот в крови у крыс регистрировали только на 7-е сут эксперимента с 237.0 (236.0; 286.0) до 299.0 усл. ед. (253.0; 314.0) при $Z = 0.91$ и $p = 0.370$. К 14-м сут наблюдали незначительную тенденцию к снижению – до 283.0 (246.0; 295.0) при $Z = 0.72$ и $p = 0.680$. В период 14–21-е сут снижение уровня сиаловых кислот в крови было малозаметным и составляло 278.0 усл. ед. (274.0; 294.5) при $Z = 0.77$ и $p = 0.593$. Таким образом, в течение 21-х сут после локальной холодовой травмы у крыс с метаболическим синдромом содержание сиаловых кислот в сыворотке крови не имело статистически значимого различия с соответствующим показателем крыс контрольной группы (278.0 усл. ед. (274.0; 294.5) и 237.0 усл. ед. (236.0; 286.0) при $Z = 0.91$; $p = 0.375$).

Итак, после локальной холодовой травмы изменения в дерме касались как изменений общего содержания коллагена, о чем свидетельствовала динамика содержания коллагена, так и изменений толщины коллагеновых волокон.

Уменьшение содержания коллагена дермы на 3-и сут после холодовой травмы является свидетельством разрушения соединительной ткани, что под-

тверждается гистологически — наличием фибриноидного некроза в зоне повреждения (Шагров и др., 2020), а также нарастанием концентрации сиаловых кислот вплоть до 7-х сут и наличием сильной статистически значимой корреляцией ($\tau = 0.97$; $p = 0.040$) (рис. 3).

Известно, что сиаловые кислоты характеризуют степень воспалительного процесса, и их концентрация резко повышается при поражении тканей, в частности синовиальной оболочки при различных клинических формах артритов (Schauer et al., 2018). Снижение содержания коллагена дермы сопряжено с уменьшением толщины коллагеновых волокон, о чем свидетельствует сильная статистически значимая коррелятивная связь между этими показателями ($\tau = 0.98$; $p = 0.001$). Вследствие деградации коллагеновых волокон нарушается межклеточный матрикс поврежденного участка дермы. Необходимо учитывать тот факт, что физические свойства коллагеновых волокон оказывают непосредственное влияние на функциональную активность фибробластов дермы: нарушение целостности коллагеновой сети межклеточного матрикса проявляется в нарушении фокальных контактов между фибробластами и коллагеновым матриксом, что снижает уровень метаболической активности фибробластов (Diegelmann, 2003; Борзых и др., 2021). Однако полного прекращения синтетической активности фибробластов в зоне повреждения к 3 сут не наступает, поскольку уже на 7-е сут регистрируется увеличение содержания коллагена дермы. Наряду с увеличением количества коллагена изменяется толщина коллагеновых волокон.

Известно, что завершение формирования коллагеновых волокон осуществляется во внеклеточной среде, и толщина их зависит от количества тройных спиралей тропоколлагена (Diegelmann, 2003; Борзых и др., 2021). Полученные результаты по толщине коллагеновых волокон хорошо согласуются с исследованиями волокон соединительной ткани методом поляризационной микроскопии, описанными в работе Данилова (2008), а также Омеляненко с соавт. (2009). Указанные изменения происходили на фоне продолжающегося увеличения концентрации сиаловых кислот в сыворотке. Таким образом, можно полагать, что на 7-е сут после холодовой травмы в зоне повреждения дермы процесс деградации соединительной ткани продолжался на фоне увеличения синтетической активности фибробластов и формирования зрелых коллагеновых волокон.

В период с 7–14-е сут после холодовой травмы продолжающееся увеличение содержания коллагеновых волокон и их толщины происходило уже на фоне снижения концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови. Вполне очевидно, что именно в период с 7–14-е сут синтетическая активность фибробластов в соединительной ткани стала превалировать над деградацией.

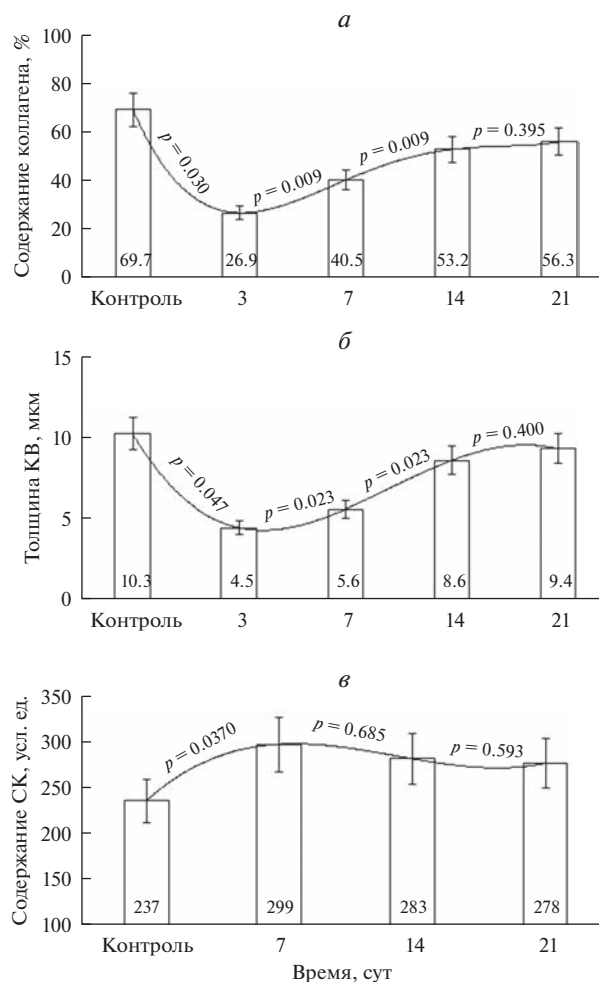


Рис. 2. Динамика медианных значений содержания коллагена (а) и толщины коллагеновых волокон (КВ) дермы (б), а также сиаловых кислот (СК) сыворотки крови (в) в течение 21 сут после локальной холодовой травмы у крыс на фоне метаболического синдрома.

Учитывая, что к 21-м сут статистически значимых различий по содержанию коллагена дермы, толщине коллагеновых волокон и концентрации сиаловых кислот в экспериментальной и контрольной группах не наблюдали, можно предполагать наступление восстановления соединительной ткани кожи именно к этому времени.

Итак, на 3-е сут после холодовой травмы происходит активная деградация соединительной ткани дермы, о чем свидетельствует снижение содержания коллагена дермы, уменьшение толщины коллагеновых волокон и увеличение концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови. На 7-е сут после холодовой травмы увеличивается содержание коллагена дермы и толщина коллагеновых волокон на фоне высокого содержания сиаловых кислот. Продолжающееся увеличение содержания и толщины коллагеновых волокон происходило уже на фоне снижения концентрации сиаловых кислот в сыворотке

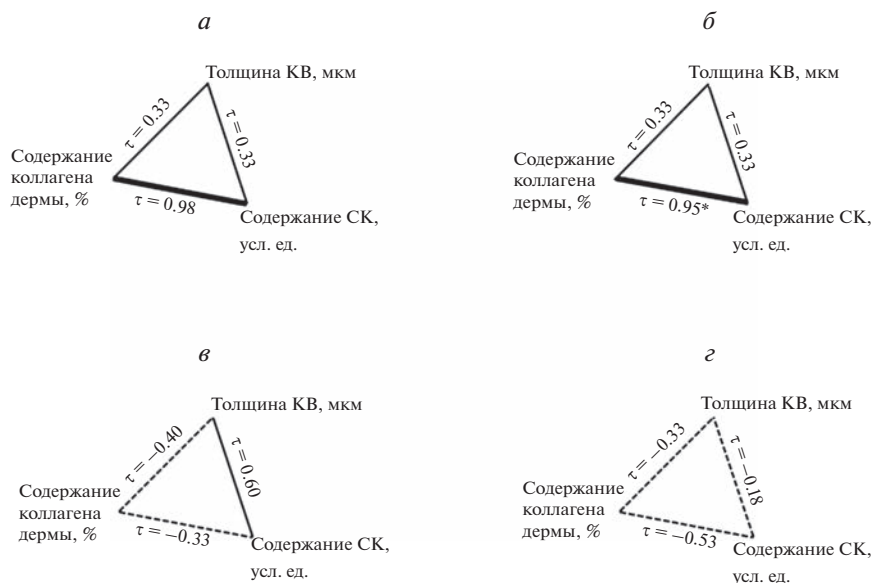


Рис. 3. Корреляционный анализ содержания коллагена, толщины коллагеновых волокон (КВ) дермы и сиаловых кислот (СК) сыворотки крови после локального холодового воздействия у крыс с метаболическим синдромом. а – Контроль, б – 7 сут, в – 14 сут, г – 21 сут. (*) – различие достоверно при $p < 0.05$.

крови в период 7–14-е сут после холодовой травмы, а к 21-м сут содержание изучаемых параметров в экспериментальной группе уже не отличалось от группы контроля, что может указывать на восстановление соединительной ткани дермы. Однако полностью сформированного рубца не наблюдали.

Исходя из полученных результатов, можно выделить следующие особенности регенерации кожи после локального холодового повреждения на фоне метаболического синдрома. Регенеративный процесс после локального холодового повреждения начинался на 3-е сут и характеризовался увеличением содержания коллагена дермы и толщины коллагеновых волокон. Регенерация на фоне метаболического синдрома сопровождалась замедлением процессов восстановления тканей. Течение восстановительного процесса сопряжено с изменением содержания сиаловых кислот в сыворотке крови. При этом отличительной чертой динамики этого показателя является увеличение их концентрации при метаболических нарушениях на 7-е сут (до 299.0 усл. ед. (253.0; 314.0)) и медленное снижение их концентрации в течение всего эксперимента, которое достигает контрольных значений к 21-м сут ($Z = 0.91$; $p = 0.375$).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП НО “Арктика” Северного (Арктического) федерального университета им. М.В. Ломоносова (г. Архангельск).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет бюджетных средств Северного государственного медицинского университета Министерства здравоохранения РФ (Архангельск).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и утверждены положительным решением локального этического комитета Северного государственного медицинского университета Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 05/06-18 от 28.06.2018).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беленков Ю.Н., Привалова Е.В., Каплунова В.Ю., Зекцер В.Ю., Виноградова Н.Н., Ильишонис И.С., Шакарьянц Г.А., Кожеевникова М.В., Лишута А.С. 2018. Метаболический синдром: история развития, основные критерии диагностики. Рациональная фармакотерапия в кардиологии. Т. 14. № 5. С. 757. (Belenkov Yu.N., Privalova E.V., Kaplunova V.Yu., Zektser V.Yu., Vinogradova N.N., Ilgisonis I.S., Shakaryants G.A., Kozhevnikova M.V., Lishuta A.S. 2018. Metabolic syndrome: the history of development, the main diagnostic criteria. Rational Pharmacother. Cardiol. (Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii). V. 14. P. 757.)
<https://doi.org/10.20996/1819-6446-2018-14-5-757-764>

- Борzych О.Б., Шнайдер Н.А., Карпова Е.И., Петрова М.М., Демина О.М., Насырова Р.Ф. 2021. Синтез коллагена в коже, его функциональные и структурные особенности. Медицинский вестник Северного Кавказа. Т. 16. № 4. С. 443. (Borzykh O.B., Schneider N.A., Karpova E.I. 2021. Synthesis of collagen in the skin, its functional and structural features. Medical news of the North Caucasus (Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza). V. 16. P. 443.) <https://doi.org/10.14300/mnnc.2021.16108>
- Валентюкевич А.Л., Гарелик П.В., Меламед Д.В. 2021а. Способ воспроизведения отморожений. В кн.: Актуальные вопросы и современные подходы в оказании хирургической помощи в Республике Беларусь. В кн.: Сборник материалов республиканской научно-практической конференции с международным участием и XXVIII Пленума Правления Белорусской ассоциации хирургов. Минск: Белорусский государственный медицинский университет. С. 57. (Valentyukevich A.L., Garelik P.V., Melamed D.V. 2021. A way to reproduce frostbite. In: Topical issues and modern approaches in the provision of surgical care in the Republic of Belarus: a collection of materials of the republican scientific and practical conference with international participation and the XXVIII Plenum of the Board of the Belarusian Association of Surgeons. Minsk: Belarusian State Medical University (Minsk: Belorusskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet). P. 57.)
- Валентюкевич А.Л., Меламед В.Д., Прокопчик Н.И. 2021б. Экспериментальное моделирование отморожений разной степени тяжести у лабораторных животных. Часть 2. Морфологическая оценка эффективности устройства для моделирования контактных отморожений. Журн. Гродненского государственного медицинского университета. Т. 19. № 1. С. 46. (Valentyukevich A.L., Melamed V.D., Prokopchik N.I. 2021. Experimental modeling of frostbites of varying severity in laboratory animals. Part 2. Morphological assessment of the effectiveness of the device for simulating contact frostbite. J. Grodno State Medical University (Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta). V. 19. № 1. P. 46.) <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2021-19-1-46-54>
- Груздева О.С. 2020. Патологическая анатомия отморожений. Забайкальский медицинский вестник. Т. 4. С. 137. (Gruzdeva O.S. 2020. Pathological anatomy of frostbite. Transbaikalian Medical Bulletin (Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik). V. 4. P. 137.) https://doi.org/10.52485/19986173_2020_4_137
- Горбатова Л.Н., Шутский Н.А., Кашутин С.Л., Малявская С.И., Шагров Л.Л., Мизгирев Д.В., Чухчин Д.Г. 2022. Способ выделения коллагеновых волокон дермы. Патент на изобретение РФ 2764514 С1, 18.01.2022, заявка № 2020142837 от 23.12.2020. (Gorbatova L.N., Shutskiy N.A., Kashutin S.L., Malyavskaya S.I., Shagrov L.L., Mizgirev D.V., Chukhchin D.G. 2022. Method of isolation of collagen fibers of the dermis. Patent for invention RF 2764514 C1, 18.01.2022, application № 2020142837 from 23.12.2020.)
- Данилов Р.К. 2008. Раневой процесс: гистогенетические основы. Санкт-Петербург: ВМедА им. С.М. Кирова. (Danilov R.K. 2008. Wound process: histogenetic bases. St. Petersburg: Kirov VMedA.)
- Омельяненко Н.П., Слуцкий Л.И. 2009. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). М.: Известия. (Omelianenko N.P., Slutsky L.I. 2009. Connective tissue (histophysiology and biochemistry). Moscow: News (Izvestia).)
- Шагров Л.Л., Шутский Н.А., Кашутин С.Л., Николаев В.И., Малявская С.И., 2020. Об участии эозинофилов в восстановлении тканей после локальной холодовой травмы. Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. Т. 12. № 2. С. 71. (Shagrov L.L., Shutskiy N.A., Kashutin S.L., Nikolaev V.I., Malyavskaya S.I. 2020. On the participation of eosinophils in tissue recovery after a local cold injury. Herald of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Vestnik Severo-Zapadnogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta im. I.I. Mechnikova). V. 12. P. 71.) <https://doi.org/10.17816/mechnikov202012271-78>
- Шутский Н.А., Шагров Л.Л., Кашутин С.Л., Аксенов А.С., Малявская С.И. 2019. Динамика содержания коллагена дермы крыс после локального холодового повреждения. Труды Карельского научного центра Российской академии наук. № 6. С. 85. (Shutskiy N.A., Shagrov L.L., Kashutin S.L., Aksenov A.S., Malyavskaya S.I. 2019. Changes in the collagen content in the dermis of rats after local cold injuries. Transactions of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences (Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk). P. 85.) <https://doi.org/10.17076/eb967>
- Arora R. 2018. Mechanism of freeze-thaw injury and recovery: a cool retrospective and warming up to new ideas. Plant Sci. V. 270. P. 301. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.03.002>
- Banzo J., Martínez V.G., Abós M.D. 2002. Frostbite of the upper and lower limbs in an expert mountain climber: the value of bone scan in the prediction of amputation level. Revista Espanola de Medicina Nuclear. V. 21. P. 366.
- Derkach K.V., Bondareva V.M., Chistyakova O.V., Berstein L.M., Shpakov A.O. 2015. The effect of long-term intranasal serotonin treatment on metabolic parameters and hormonal signaling in rats with high-fat diet/low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes. Int. J. Endocrinol. V. 2015. P. 245459. <https://doi.org/10.1155/2015/245459>
- Diegelmann R.F. 2003. Analysis of collagen synthesis. In: Wound healing: methods and protocols. P. 349.
- Eckel R.H., Alberti K.G., Grundy S.M., Zimmet P.Z. 2010. The metabolic syndrome. Lancet. V. 375. P. 181. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61794-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61794-3)
- Ingram B.J., Raymond T.J. 2013. Recognition and treatment of freezing and nonfreezing cold injuries. Curr. Sports. Med. Rep., V. 12. P. 125. <https://doi.org/10.1249/JSR.0b013e3182877454>
- Joshi K., Goyary D., Mazumder B., Chattopadhyay P., Chakrabort R., Bhuti Y.D., Dwivedi S.K. 2020. Frostbite: current status and advancements in therapeutics. J. Thermal. Biol. V. 93. P. 102716. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102716>

- Kaur J.A. 2014. Comprehensive review on metabolic syndrome. *Am. Heart J. Plus.* V. 2014. 943162. <https://doi.org/10.1155/2014/943162>
- Kuht J., Smith B., Brown A. 2018. Field recognition and management of freezing and non-freezing cold injuries. *J. R. Nav. Med. Serv.* V. 104. P. 41. <https://doi.org/10.1136/jrnms-104-41>
- McIntosh S.E., Freer L., Grissom C.K., Auerbach P.S., Rodway G.W., Cochran A., Giesbrecht G.G., McDevitt M., Imray C.H., Johnson E.L., Pandey P., Dow J., Hackett P.H. 2019. Wilderness medical society clinical practice guidelines for the prevention and treatment of frostbite. *Wilderness & Environmental Medicine.* V. 30. P. 19. <https://doi.org/10.1016/j.wem.2019.05.002>
- Mohr W.J., Jenabzadeh K., Ahrenholz D.H. 2009. Cold Injury. *Hand Clinics.* V. 25. P. 481. <https://doi.org/10.1016/j.hcl.2009.06.004>
- Pulla R.J., Pickard L.J., Carnett T.S. 1994. Frostbite: an overview with case presentations. *The Journal of foot and ankle surgery.* V. 33. № 1. P. 53.
- Schauer R., Kamerling J.P. 2018. Exploration of the sialic acid world. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* V. 75. P. 1. <https://doi.org/10.1016/bs.accb.2018.09.001>

The Intensity of Degradation and Synthesis of Derma Intercellular Matrix in Rats after Local Cold Injury in the Presence of Metabolic Syndrome

N. A. Shutskiy^{a, b}, L. N. Gorbato^a, S. L. Kashutin^a, N. S. Kholopov^{a, b, *}, L. L. Shagrov^a, and A. L. Zashihin^a

^aNorthern State Medical University, Arkhangelsk, 163000 Russia

^bLomonosov Northern (Arctic) Federal University, Arkhangelsk, 163000 Russia

*e-mail: nikitaholopov@mail.ru

Studies of tissue regeneration processes in the post-cold period are currently in demand in connection with the development of the Arctic, which is characterized by extremely low temperatures. Metabolic or hormonal abnormalities based on insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia, which can lead to the development of cardiovascular diseases, and, consequently, to microcirculation disorders, are aggravating factors that increase the consequences of cold injuries. In this work, we studied the processes of degradation and synthesis of the intercellular matrix of the dermis, as well as the concentration of sialic acids in the blood serum after a local cold injury of the third degree. It was revealed that the regenerative process after local cold damage began on day 3 and was characterized by an increase in the collagen content of the dermis and the thickness of collagen fibers. Regeneration in the case of metabolic syndrome was accompanied by a slowdown in tissue repair processes. The course of the recovery process was associated with a change in the content of sialic acids in the blood serum, while a distinctive feature of the dynamics of this indicator was an increase in the concentration of sialic acids in metabolic disorders on day 7 and a slow slight decrease throughout the experiment, reaching the control values by day 21.

Keywords: local cold damage, dermis, collagen, enzymatic hydrolysis, restoration