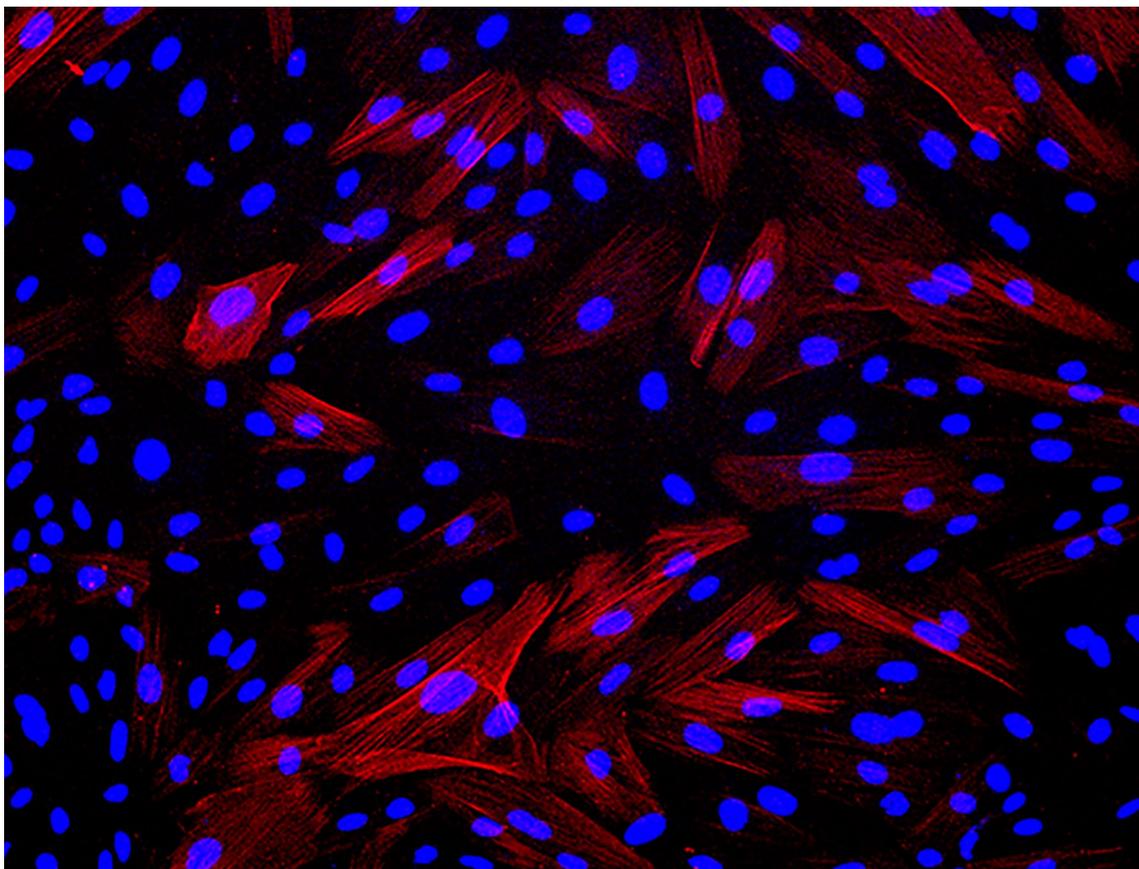


Гены & Клетки

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ



Препарат Р.Ю. Еремичева

- **Памяти Юрия Ивановича Денисова-Никольского**
- **К вопросу о создании трансгенных млекопитающих в СССР: малоизвестные детали начального этапа**
- **Fusion-феномен в нормальном гистогенезе и при патологии: часть 1**
- **Раковые стволовые клетки как терапевтические мишени**
- **Влияние трансплантации аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на регенерацию печени после обширной резекции в эксперименте**
- **Растворимые факторы, образуемые при заживлении эндометрия, подавляют его «фиброзирование» in vitro**

www.genescells.ru

ISSN 2313-1829

SCIENTIFIC AND PRACTICAL JOURNAL

Genes & Cells

Vol. XIII, № 2, 2018

© Human Stem Cells Institute, 2018

ISSN 2313-1829

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Гены & Клетки

Том XIII, № 2, 2018

Журнал рекомендован ВАК Министерства образования
и науки РФ для публикации основных научных
результатов диссертаций на соискание
ученой степени доктора и кандидата наук

Журнал включен в российские и международные
библиографические и реферативные базы данных:
eLIBRARY (www.elibrary.ru), Scopus (www.scopus.com)

© Институт стволовых клеток человека, 2018

EDITORIAL COUNCIL

Editor-in-Chief

R.V. Deev
Human Stem Cells Institute (Moscow)
I.P. Pavlov Ryazan State Medical University (Ryazan)

Executive Editor

I.Y. Bozo
Histografit, LLC (Moscow)
A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia (Moscow)

Editorial Board:

B.V. Afanasiev
I.P. Pavlov Saint-Petersburg State Medical University (Saint-Petersburg)

V.S. Akatov
Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS (Pushchino)

V.P. Baklaushev
Federal Scientific and Clinical Center, FMBA of Russia (Moscow)

A.S. Bryukhovetsky
State Medical University of Russia (Moscow)

R.K. Chailakhian
N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Moscow)

I.A. Chekmareva
A.V. Vishnevskiy Institute of Surgery (Moscow)

V.S. Chirsky
S.M. Kirov Military Medical Academy (Saint-Petersburg)

G.D. Dalgatov
Federal Scientific Clinical Center of Otorhinolaryngology FMBA of Russia (Moscow)

M.I. Davydov
Medsi, LLC (Moscow)

A.A. Doctorov
Research and Training Center of Biomedical Technologies RRIMAP of RAAS (Moscow)

P.A. Dyban
Scientific Research Institute of Experimental Medicine, (Saint-Petersburg)

V.G. Gololobov
S.M. Kirov Military Medical Academy (Saint-Petersburg)

Y.P. Gribunov
Central Clinical Hospital with Outpatient Health Center of the Business Administration for the President of the Russian Federation (Moscow)

A.A. Gumerova
Kazan (Volga region) Federal University (Kazan)

R.E. Kalinin
I.P. Pavlov Ryazan State Medical University (Ryazan)

A.P. Kiasov
Kazan (Volga region) Federal University (Kazan)

S.L. Kiselev
N.I. Vavilov Institute of General Genetics RAS (Moscow)

K.V. Kotenko
Corresponding member of the RAS (Moscow)

V.A. Kozlov
Research Institute of Clinical Immunology (Novosibirsk)

A. Kuliev
Florida International University (Miami, USA)

A.V. Kulikov
Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS (Pushchino)

V.S. Komlev
A.A. Baykov Institute of Metallurgy and Materials Science, RAS (Moscow)

M.R. Lichinitser
Russian N.N. Blokhin Scientific Center of Oncology (Moscow)

Editorial Board:

A.V. Bersenev (San Francisco, USA)
A. Chogovadze (Moscow)
A.Y. Efimenko (Moscow)
I.I. Eremin (Moscow)
G. Feichtinger (Leeds, United Kingdom)
M.S. Fominyh (Saint-Petersburg)
A.S. Grigoryan (Saint-Petersburg)
P.V. Kruglyakov (Saint-Petersburg)
P.I. Makarevich (Moscow)
Ch.M. Nasadyuk (Lviv, Ukraine)
I.V. Potapov (Moscow)
V.S. Sergeev (Saint-Petersburg)
R.G. Vasiliev (Kiev, Ukraine)
N.V. Tsupkina (Saint-Petersburg)

A.A. Maschan
D. Rogachev Federal Scientific and Clinical Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (Moscow)

S.A. Matveev
N.I. Pirogov National Medical-Surgical Center (Moscow)

G.L. Mentkevich
N.N. Blokhin Institute of Children's Oncology (Moscow)

Sh.M. Mitalipov
Oregon Health and Science University (Beaverton, USA)

B.B. Moroz
A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia (Moscow)

I.A. Odintsova
S.M. Kirov Military Medical Academy (Saint-Petersburg)

N.A. Onishchenko
V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantation and Artificial Organs (Moscow)

O.V. Paklina
S.P. Botkin City Clinical Hospital (Moscow)

Ye.V. Parfyonova
Moscow State University (Moscow)

A.S. Pavliuk
Research Institute of Eye Diseases (Moscow)

Yu.A. Petrenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine (Kharkov, UA)

A.G. Popandopulo
V. Gusak Institute Emergency and Reconstructionist Surgery (Donetsk)

A.V. Prikhodko
Gemabank (Moscow)

S.A. Rumyantsev
N.I. Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow)

S.V. Sazonov
Ural State Medical University (Ekaterinburg)

N.S. Sergeeva
P.A. Herzen Moscow Oncological Research Institute (Moscow)

E.I. Shishatskaya
Institute of Biophysics SB RAS (Krasnoyarsk)

E.V. Skorobogatova
Russian clinical children hospital (Moscow)

I.A. Suchkov
I.P. Pavlov Ryazan State Medical University (Ryazan)

A.N. Tomilin
Institute of Cytology of RAS (Saint-Petersburg)

V.V. Tsymborg
«Biovitrum» Co. Ltd. (Moscow)

S.E. Voskanyan
A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia (Moscow)

S.M. Zakian
Institute of Cytology and Genetics, SB RAS (Novosibirsk)

V.L. Zorin
Human Stem Cells Institute (Moscow)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Главный редактор

Р.В. Деев
Институт стволовых клеток человека (Москва)
Рязанский государственный медицинский университет
им. И.П. Павлова (Рязань)

Ответственный редактор

И.Я. Бозо
ООО «Гистографт» (Москва)
Федеральный медицинский биофизический центр
им. А.И. Бурназяна ФМБА России (Москва)

Участники редакционного совета:

В.С. Акатов
Институт теоретической и экспериментальной
биофизики РАН (Пушино, Московская обл.)

Б.В. Афанасьев
Санкт-Петербургский государственный медицинский
университет им. акад. И.П. Павлова (Санкт-Петербург)

В.П. Баклаушев
Федеральный научно-клинический центр ФМБА России (Москва)

А.С. Брюховецкий
Российский государственный медицинский университет (Москва)

С.Э. Восканян
Федеральный медицинский биофизический центр
им. А.И. Бурназяна ФМБА России (Москва)

В.Г. Гололобов
Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург)

Ю.П. Грибунов
Центральная клиническая больница с поликлиникой
Управления делами президента РФ (Москва)

А.А. Гумерова
Казанский (Приволжский) федеральный университет (Казань)

М.И. Давыдов
ООО «Медси»

Г.Д. Далгатов
Федеральный научно-клинический центр
оториноларингологии ФМБА России (Москва)

А.А. Докторов
Научно-исследовательский и учебно-методический центр
биомедицинских технологий ГНУ ВИЛАР РАСХН (Москва)

П.А. Дыбан
Научно-исследовательский институт экспериментальной
медицины (Санкт-Петербург)

С.М. Закиян
Институт цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск)

В.Л. Зорин
Институт стволовых клеток человека (Москва)

Р.Е. Калинин
Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова (Рязань)

А.П. Киясов
Казанский (Приволжский) федеральный университет (Казань)

С.Л. Киселев
Институт общей генетики РАН им. Н.И. Вавилова (Москва)

К.В. Котенко
Член-корреспондент РАН (Москва)

В.А. Козлов
НИИ клинической иммунологии (Новосибирск)

А. Кулиев
Международный университет Флориды (Майами, США)

А.В. Куликов
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (Пушино)

В.С. Комлев
Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН (Москва)

М.Р. Личиницер
Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина (Москва)

Адрес редакции:
119333 г. Москва, ул. Губкина, д. 3, стр 2, а/я 373
Тел./факс: +7 (495) 734-91-70
E-mail: redaktor@celltranspl.ru

Присылать материал для публикации, ознакомиться
с правилами для авторов, оформить подписку можно
в Интернете по адресу: www.genescells.ru
+7(495) 646-80-76

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору
за соблюдением законодательства в сфере массовых
коммуникаций и охране культурного наследия

Свидетельство о регистрации
ПИ № 77 – 57156 от 11.03.2014 г.

ISSN 2313-1829

Редакционная коллегия:

А.В. Берсенев (Сан-Франциско, США)
Р.Г. Васильев (Киев, Украина)
А.С. Григорян (Санкт-Петербург)
И.И. Еремин (Москва)
А.Ю. Ефименко (Москва)
П.В. Кругляков (Санкт-Петербург)
П.И. Макаревич (Москва)
К.М. Насадюк (Львов, Украина)
И.В. Потапов (Москва)
В.С. Сергеев (Санкт-Петербург)
Г. Файштингер (Лидс, Великобритания)
М.С. Фоминых (Санкт-Петербург)
Н.В. Цупкина (Санкт-Петербург)
А.Г. Чоговадзе (Москва)

А.А. Масчан
Федеральный научно-клинический центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева (Москва)

С.А. Матвеев
Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова (Москва)

Г.Л. Менткевич
НИИ детской онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина (Москва)

Ш.М. Миталипов
Орегонский университет здоровья и науки (Портленд, США)

Б.Б. Мороз
Федеральный медицинский биофизический центр им.
А.И. Бурназяна ФМБА России (Москва)

И.А. Одинцова
Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург)

Н.А. Онищенко
Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных
органов им. академика В.И. Шумакова (Москва)

А.С. Павлюк
Российский национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова (Москва)

О.В. Паклина
Городская клиническая больница им. С.П. Боткина (Москва)

Е.В. Парфенова
Московский государственный университет (Москва)

Ю.А. Петренко
Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины (Харьков, Украина)

А.Г. Попандоупло
Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака (Донецк)

А.В. Приходько
Гемабанк (Москва)

С.А. Румянцев
Российский национальный исследовательский медицинский
университет им. Н.И. Пирогова (Москва)

С.В. Сазонов
Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург)

Н.С. Сергеева
Московский научно-исследовательский онкологический
институт им. П.А. Герцена (Москва)

Е.В. Скоробогатова
Российская детская клиническая больница (Москва)

И.А. Сучков
Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова (Рязань)

А.Н. Томилин
Институт цитологии РАН (Санкт-Петербург)

Р.К. Чайлахян
НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (Москва)

И.А. Чекмарева,
Институт хирургии им. А.В. Вишневского (Москва)

В.С. Чирский
Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург)

В.В. Цимберг
ООО «БиоВитрум» (Москва)

Е.И. Шишацкая
Сибирский федеральный университет (Красноярск)

Электронная версия журнала www.genescells.ru
ISSN электронной версии: 2500-2562

Свидетельство о регистрации
Эл №ФС77-58034 от 08.05.2014 г.

Администратор сайта И.А. Яковлев
Корректор Н.В. Квашина
Верстка С.А. Климентовский

Подписано в печать 05.08.2018. Формат бумаги 60×84/8.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 12,5.

Тираж 100 экз. Заказ № 1679.
Отпечатано в типографии Book Jet, 390005, г. Рязань, ул. Пушкина,
д. 18, тел.: +7 (4912) 466-151, www.bookjet.ru

Полное или частичное воспроизведение материалов, содержащихся
в настоящем издании, допускается с письменного разрешения
редакции. Ссылка на журнал «Гены & клетки» обязательна.

CONTENTS

FROM EDITORIAL	6	ORIGINAL ARTICLES	56
In the memory of Yuri Ivanovich Denisov-Nikolsky	6	<i>A.V. Lokhonina, A.V. Elchaninov, I.V. Arutyunyan, A.S. Pokusaev, A.V. Makarov, I.Z. Eremina, V.V. Surovtsev, G.B. Bolshakova, D.V. Goldshtein, T.Kh. Fatkhudinov</i>	
HYSTORY	9	Morphofunctional characteristic of macrophages of embryonic and monocytic origin	56
<i>P.A. Dyban</i>		<i>R.Y. Eremichev, O.A. Grigorieva, K.Y. Kulebyakin, A.Yu. Efimenko, P.I. Makarevich</i>	
Aspects for generation of transgenic mammals in the USSR: little-known details of an initial step	9	Soluble factors formed during the healing of the endometrium suppress its "fibrosis" in vitro	63
REVIEWS	13	<i>Y.V. Grigoryeva, G.N. Suvorova, S.N. Iukhimets, O.N. Pavlova, A.A. Devyatkin, O.N. Tulayeva, O.V. Kulakova</i>	
<i>D.O. Buev, A.M. Emelin, R.V. Deev</i>		Tissue morphogenesis features of the laboratory rats cervix a day before and in labor	67
Fusion-phenomenon in normal histogenesis and in pathology: part 1	13	<i>V.Yu. Denisenko, T.I. Kuzmina, E.N. Boytseva</i>	
<i>N.S. Sergeeva, Yu.D. Hesuani, A.P. Poljakov, V.A. Mironov, A.D. Kaprin</i>		Induction of capacitation of bovine spermatozoa before cryopreservation increases their viability after thawing	72
Stem (progenitor) thyroid cells and their probable applications in tissue engineering	22	<i>A.A. Zhloba, T.F. Subbotina, N.A. Smolina, A.A. Kostareva</i>	
<i>N.S. Alkon, A.E. Ivanova, E.I. Frolova, S.P. Chumakov</i>		Dynamics of humanin release and consumption of amino acids by differentiating C2C12 myoblasts ..	77
Therapeutic strategies for targeting cancer stem cells	25	<i>V.S. Rudakov, R.V. Deev, K.K. Gubarev, T.A. Astrelina, I.I. Eremin, Yu.A. Zhgutov, E.I. Onnitsev, M.O. Mavlikeev, A.A. Titova, S.E. Voskanyan</i>	
<i>G.S. Kopeina, A.V. Zamaraev, B.D. Zhivotovsky, I.N. Lavrik</i>		Effect of transplantation of allogeneic multipotent mesenchymal bone marrow stromal cells on regeneration of liver after extended hepatectomy (experimental study)	83
Programmed necrosis and tissue regeneration ...	35	DISCUSSION ARTICLES	89
<i>E.A. Zhiryayeva, A.P. Kiassov, A.A. Rizvanov</i>		<i>A.V. Pavlov</i>	
The effect of oxygen concentration on embryo development and assisted reproductive technologies efficiency	39	Place of the discipline "Human Anatomy" in Medical Education of the 21st Century	89
<i>O.P. Tuchina, M.V. Sidorova, A.V. Turkin, D.A. Shvaiko, I.G. Shalaginova, I.A. Vakolyuk</i>		INSTRUCTIONS FOR AUTHORS	94
Molecular mechanisms of neuroinflammation initiation and development in a model of post- traumatic stress disorder	47		

СОДЕРЖАНИЕ

ОТ РЕДАКЦИИ	6	ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	56
Памяти Юрия Ивановича Денисова-Никольского ...	6	<i>А.В. Лохонина, А.В. Ельчанинов, И.В. Арутюнян, А.С. Покусаев, А.В. Макаров, И.З. Еремина, В.В. Суровцев, Г.Б. Большакова, Д.В. Гольдштейн, Т.Х. Фатхудинов</i>	
ИСТОРИЯ	9	Морфофункциональная характеристика макрофагов эмбрионального и моноцитарного происхождения	56
<i>П.А. Дыбан</i>		<i>Р.Ю. Еремичев, О.А. Григорьева, К.Ю. Кулебякин, А.Ю. Ефименко, П.И. Макарович</i>	
К вопросу о создании трансгенных млекопитающих в СССР: малоизвестные детали начального этапа	9	Растворимые факторы, образуемые при заживлении эндометрия, подавляют его «фиброзирование» in vitro	63
ОБЗОРЫ	13	<i>Ю.В. Григорьева, Г.Н. Суворова, С.Н. Юхимец, О.Н. Павлова, А.А. Девяткин, О.Н. Тулаева, О.В. Кулакова</i>	
<i>Д.О. Буев, А.М. Емелин, Р.В. Деев</i>		Некоторые аспекты морфогенеза тканей шейки матки белых беспородных лабораторных крыс накануне и в период родов	67
Fusion-феномен в нормальном гистогенезе и при патологии: часть 1	13	<i>В.Ю. Денисенко, Т.И. Кузьмина, Е.Н. Бойцева</i>	
<i>Н.С. Сергеева, Ю.Д. Хесуани, А.П. Поляков, В.А. Миронов, А.Д. Каприн</i>		Индукция капацитации бычьих сперматозоидов до криоконсервации повышает их жизнеспособность после размораживания	72
Стволовые и (или) прогениторные клетки щитовидной железы и возможности их использования в тканевой инженерии	22	<i>А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, Н.А. Смолина, А.А. Костарева</i>	
<i>Н.С. Алкон, А.Е. Иванова, Е.И. Фролова, С.П. Чумаков</i>		Динамика высвобождения хуманина и потребления аминокислот дифференцирующимися C2C12 миобластами ...	77
Раковые стволовые клетки как терапевтические мишени	25	<i>В.С. Рудаков, Р.В. Деев, К.К. Губарев, Т.А. Астрелина, И.И. Еремин, Ю.А. Жгутов, Е.И. Онницев, М.О. Мавликеев, А.А. Титова, С.Э. Восканян</i>	
<i>Г.С. Копеина, А.В. Замараев, Б.Д. Животовский, И.Н. Лаврик</i>		Влияние трансплантации аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на регенерацию печени после обширной резекции в эксперименте	83
Программируемый некроз и регенерация тканей	35	ДИСКУССИОННЫЕ И ОБЩЕТЕОРЕТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ	89
<i>Е.А. Жиряева, А.П. Киясов, А.А. Ризванов</i>		<i>А.В. Павлов</i>	
Влияние концентрации кислорода на развитие эмбрионов и эффективность вспомогательных репродуктивных технологий	39	Место дисциплины «Анатомия человека» в медицинском образовании XXI века	89
<i>О.П. Тучина, М.В. Сидорова, А.В. Туркин, Д.А. Швайко, И.Г. Шалагинова, И.А. Ваколюк</i>		ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ	92
Молекулярные механизмы инициации и развития нейровоспаления в модели посттравматического стрессового расстройства	47		

ПАМЯТИ ЮРИЯ ИВАНОВИЧА ДЕНИСОВА-НИКОЛЬСКОГО

Юрий Иванович Денисов-Никольский, наряду с академиками В.В. Куприяновым, М.Р. Сапиным, А.П. Авцыным, принадлежал к блестящей плеяде отечественных ученых-морфологов второй половины XX века. Он по праву является гордостью отечественной и мировой науки, выдающимся советским и российским ученым, крупным организатором медицинской науки, посвятившим ей более 60 лет жизни.

Юрий Иванович Денисов-Никольский родился 15 мая 1932 года в Баку. Он — представитель того поколения, на плечи которого выпала нелёгкая судьба суровых испытаний военных и последующих лет, адаптация к сложным послевоенным условиям, становление и определение для себя будущей профессии в годы восстановления страны. Сделанный Юрием Ивановичем выбор стать военным врачом, посвятить себя медицине определил всю его дальнейшую жизнь. В 1956 году после окончания Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова в Ленинграде, он продолжил службу в рядах Советской Армии. С 1959 по 1963 годы Ю.И. Денисов-Никольский был адъюнктом кафедры нормальной анатомии человека Военно-медицинской академии под руководством члена-корреспондента АМН СССР, генерала-майора медицинской службы Б.А. Долго-Сабурова. Однако последующая карьера военного врача не сложилась, наступило время хрущевских сокращений офицерского корпуса. Одному из авторов этих строк Юрий Иванович с некоторой досадой рассказывал, что ему пришлось оставить Alma mater и перебраться в Москву, где начался новый, серьезный и чрезвычайно насыщенный этап жизни и профессионального развития.



Ю.И. Денисов-Никольский прошел многие ступени должностной лестницы, работая ассистентом кафедры нормальной анатомии Университета дружбы народов, ученым секретарем НИИ морфологии человека АМН СССР, заместителем директора Научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий ФГБНУ ВИЛАР, заместителем директора ФГБНУ ВИЛАР.

В 1963 году Ю.И. Денисов-Никольский защитил кандидатскую диссертацию («Состояние внутриорганного кровеносного русла тазовой конечности кролика при развитии коллатерального кровообращения»), а в 1986 — стал доктором медицинских наук («Морфологическая характеристика сохранности костей бальзамированных тел и определяющие ее факторы»).

Академик Ю.И. Денисов-Никольский создал мощную российскую школу остеологов и стал крупнейшим ученым в этой области. Имея возможность работать с самой совершенной электронно-микроскопической техникой, он с коллегами начал писать новую страницу остеологии — исследование ультраструктурных особенностей клеток и внеклеточного матрикса скелетных тканей. Юрий Иванович внёс значительный вклад в развитие многих теоретических и прикладных проблем современной морфологии костно-суставного аппарата, что позволило

создать научную базу для успешного развития нового научного направления — «Репродукция клеток, тканей и биопротезирование», которое он возглавлял в РАН. Научные труды, посвященные костной ткани, области, которую он сделал такой интересной, фактически продолжили дело крупнейших отечественных ученых патологоанатомов и гистологов — А.В. Русакова, Т.П. Виноградовой и др., которые не позволили пресечься отечественной остеологии на рубеже XX и XXI веков.

Вместе с многочисленными учениками он предложил оригинальные подходы к решению ряда актуальных проблем современной морфологии, биомеханики, биоимплантологии и биоматериаловедения. Эти исследования отличаются высоким научным и методическим уровнем, имеют приоритетный характер. Основные результаты его научных работ последних десятилетий обобщены в ряде монографий, одной из которых является «Актуальные проблемы теоретической и клинической ортоартрологии» (2005), написанной в соавторстве с академиком РАН С.П. Мироновым, профессорами Н.П. Омеляненко и И.В. Матвейчуком.

С начала 70-х Ю.И. Денисов-Никольский активно участвовал в разработке одной из прикладных проблем анатомии, связанной с бальзамированием тел умерших. Полученные в этом направлении новые данные успешно используются в настоящее время при проведении специальных работ как в России, так и за ее пределами, в том числе для поддержания состояния тела великого русского хирурга и анатома — Николая Ивановича Пирогова (Украина).

Признанием выдающегося вклада в развитие отечественной медицинской науки является присвоение Ю.И. Денисову-Никольскому звания профессора (1988), избрание его в последующие годы членом-корреспондентом (1991), действительным членом Российской академии медицинских наук (2000), Российской академии медико-технических наук (2001), Российской академии наук (2013).



Ю.И. Денисов-Никольский (крайний справа) в составе группы ученых-морфологов в Виннице (Украинская ССР)

Ю.И. Денисов-Никольский много сил отдавал научно-общественной работе, успех которой во многом был обусловлен его ярким, многогранным талантом, незаурядными организаторскими способностями. Он одним из первых поддержал создание журнала «Клеточная трансплантология и тканевая инженерия» (сейчас — «Гены и клетки»), участвовал в работе его редколлегии; являлся членом редакционных советов журналов «Морфология», «Технологии живых систем», заместителем главного редактора издания НИЦ БМТ «Биомедицинские технологии», председателем проблемной комиссии «Репродукция клеток, тканей и биопротезирование» Научного совета по медицинской биотехнологии РАН. Широкий кругозор, эрудиция, высокий профессионализм, внимание к людям снискали Ю.И. Денисову-Никольскому огромный авторитет и всеобщее признание среди морфологов как нашей страны, так и за рубежом. Это послужило основанием для избрания его Генеральным секретарем Международной Ассоциации морфологов и награждения в 2006 году Юбилейной медалью ВРНОАГЭ «За большие заслуги в морфологии».

Благодаря целеустремленности, энергичности, требовательности Ю.И. Денисов-Никольский стал крупным организатором современных научных разработок, оставил серьезное научное наследие. Он — автор многих изобретений,

им опубликовано свыше 400 научных работ. Свой богатый опыт Юрий Иванович щедро передавал молодым ученым, что позволило подготовить десятки высококлассных научных специалистов.

Важно отметить то внимание, с которым Юрий Иванович относился к молодым научным сотрудникам, порой даже к незнакомым, иногда допоздна задерживаясь с ними в рабочем кабинете и обсуждая новые научные данные, концепции или известия из Alma mater. При этом он был максимально дипломатичен в своих суждениях, интеллигентен и внимателен к молодому поколению исследователей.

За большие заслуги в подготовке высококвалифицированных научных кадров в 1997 году ему присвоено звание Заслуженного деятеля науки Российской Федерации. Многие из его учеников стали известными учеными — докторами наук, профессорами, заслуженными деятелями науки Российской Федерации и успешно трудятся в России и за рубежом. Среди его наград — орден «Знак почета» (1973), орден «Дружбы народов» (1976), орден «Трудового Красного Знамени» (1986), медали «40 лет ВС СССР» (1959), «За 10 лет безупречной службы в ВС СССР» (1962), «Ветеран труда» (1984), «В память 850-летия Москвы» (1997). Правительством Социалистической Республики Вьетнам он награжден Орденами труда I и II степеней (1999, 2004), медалью «Дружба» (1980), медалью «За защиту здоровья народа» (1999). В 1987 году на основании указа Президента Кооперативной республики Гайаны Ю.И. Денисова-Никольский был принят в почетные члены ордена Заслуг Гайаны и награжден Золотой Стрелой Достижений. Одной из значимых для себя наград академик Ю.И. Денисов-Никольский считал ведомственную награду ФГБНУ ВИЛАР — «За заслуги перед ВИЛАР. Польза. Честь. Слава».

27 января 2018 года перестало биться сердце Юрия Ивановича... Он — многое успел, но и не успел многое. Дело чести всех тех, кому судьба подарила уникальную возможность работать с этим выдающимся учёным и прекрасным человеком достойно продолжить развитие его идей и нереализованных замыслов на благо российской и мировой науки.

Ученики и редколлегия

Ключевые публикации Ю.И. Денисова-Никольского

Докторов А.А., **Денисов-Никольский Ю.И.** Особенности структуры губчатого вещества позвонков человека в пожилом возрасте. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии 1981; 80(5): 5–12.

Докторов А.А., **Денисов-Никольский Ю.И.** Особенности рельефа поверхности трабекул губчатого вещества позвонков у человека. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии 1982; 82(5): 61–70.

Докторов А.А., **Денисов-Никольский Ю.И.** Структура стенок костных лакун в процессе их формирования. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии 1983; 83(9): 70–9.

Докторов А.А., **Денисов-Никольский Ю.И.** Рельеф фронта минерализации на различных поверхностях тела позвонка. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии 1985; 89(10): 21–8.

Денисов-Никольский Ю.И., Смольков Ю.А., Докторов А.А., Структура эрозионных лакун на периостальной и эндостальной поверхностях кости. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии 1985; 89(2): 62–9.

Докторов А.А., **Денисов-Никольский Ю.И.** Пространственная организация лакунарно-канальцевой системы в структурах пластинчатой кости. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии 1987; 93(8): 37–43.

Докторов А.А., **Денисов-Никольский Ю.И.** Морфофункциональная характеристика эндоста. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии 1988; 95(2): 11–21.

Докторов А.А., **Денисов-Никольский Ю.И.** Морфофункциональные корреляции структуры костных клеток и подлежащего матрикса в развивающейся кости. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии 1991; 100(1): 68–74.

Докторов А.А., **Денисов-Никольский Ю.И.** Особенности рельефа минерализованной поверхности лакун и канальцев в пластинчатой кости. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 1993; 119(1): 61–65.

Денисов-Никольский Ю.И., Жилкин Б.А., Докторов А.А., Матвейчук И.В. Ультраструктурная организация минерального компонента пластинчатой костной ткани у людей зрелого и старческого возраста. Морфология 2002; 122(5): 79–83.

Денисов-Никольский Ю.И., Жилкин Б.А., Докторов А.А., Матвейчук И.В. Структура и функция костной ткани в норме. В кн.: Руководство по остеопорозу / под ред. Л.И. Беневаленской. М.: Бином, Лаборатория знаний 2003: 56–76.

Жилкин Б.А., **Денисов-Никольский Ю.И.**, Докторов А.А. Структурная организация минерального компонента пластинчатой кости и процесс его формирования. Успехи современной биологии 2003; 123(6): 590–8.

Денисов-Никольский Ю.И., Миронов С.П., Омельяненко Н.П., Матвейчук И.В. Актуальные проблемы теоретической и клинической остеоартрологии. М: ОАО «Типография «Новости» 2005: 336.

Жилкин Б.А., Докторов А.А., **Денисов-Никольский Ю.И.** Особенности строения минерального компонента обызвествляющихся видов соединительной ткани скелета у людей зрелого и старческого возраста. Успехи современного естествознания 2005; 12: 75–7.

Воложин А., **Денисов-Никольский Ю.**, Посев Ф., Докторов А., Татаренко-Козмина Т., Матвеева В., Мальгинов Н., Холодов С. Оптимизация костной регенерации с помощью стволовых клеток — предшественников остеобластов, фиксированных на композитных материалах. Cathedra — кафедра. Стоматологическое образование 2006; 5(1): 37–43.

Татаренко-Козмина Т.Ю., **Денисов-Никольский Ю.И.**, Воложин А.И., Докторов А.А., Мальгинов Н.Н., Краснов А.П. Влияние гидроксиапатита в составе биостабильных композитов на заселение и пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток. Клеточные технологии в биологии и медицине 2007; 2: 83–7.

Жилкин Б.А., Докторов А.А., **Денисов-Никольский Ю.И.** Морфологическая характеристика минерального компонента кальцифицированных атеросклеротических бляшек. Морфология 2009; 136(4): 57–8.

Денисов-Никольский Ю.И., Матвейчук И.В., Розанов В.В. Инновационные подходы к структурно-функциональному анализу костной ткани для решения фундаментальных и прикладных задач в биоимплантологии и биоматериаловедении. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2012; 10(1): 223–8.

Матвейчук И.В., Розанов В.В., **Денисов-Никольский Ю.И.** Сравнительная структурно-функциональная характеристика костных алло- и ксеноимплантатов. Технологии живых систем 2013; 10(8): 25–30.

ИСТОРИЯ

DOI: 10.23868/201808013

К ВОПРОСУ О СОЗДАНИИ ТРАНСГЕННЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В СССР: МАЛОИЗВЕСТНЫЕ ДЕТАЛИ НАЧАЛЬНОГО ЭТАПА

П.А. Дыбан

*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия***ASPECTS FOR GENERATION OF TRANSGENIC MAMMALS IN THE USSR: LITTLE-KNOWN DETAILS OF AN INITIAL STEP**

P.A. Dyban

Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

e-mail: pavandy@mail.ru

В статье приведены как известные, так и малоизвестные данные о начальных этапах создания трансгенных млекопитающих в СССР — о совместной работе Отдела эмбриологии (профессор А.П. Дыбан) НИИ экспериментальной медицины АМН СССР (Ленинград) и лаборатории клеточной инженерии (к.м.н. С.И. Городецкий) Института общей генетики АН СССР (Москва), а также сведения о некоторых деталях жизненного пути руководителей этих научных подразделений.

Ключевые слова: трансгеноз млекопитающих, трансгенные мыши, трансгенные крысы, А.П. Дыбан, С.И. Городецкий.

История разработки генетической трансформации на уровне отдельных клеток, а также создания трансгенных животных подробно описана в многочисленных публикациях, однако следует отметить, что первая работа об успешной генетической трансформации млекопитающих (мышей) посредством метода микроинъекции рекомбинантных плазмид с клонированным геном в мужской пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки была опубликована зарубежными исследователями в 1980 году. За последующие три года (1981–1983) были опубликованы данные о рождении трансгенных мышей полученных посредством микроинъекций в пронуклеус оплодотворенных яйцеклеток различных клонированных генов: тимидинкиназы вируса *herpes simplex*, β -глобина человека и кролика, лейкоцитарного интерферона человека, трансферрина курицы, гормона роста крысы и человека [1].

Ничуть не умаляя заслуг отечественных ученых, внесших большой вклад в создание не только трансгенных лабораторных млекопитающих, но и сельскохозяйственных животных, в настоящей статье пойдет речь о первопроходцах и их пионерских исследованиях, то есть о коллективах доктора медицинских наук, профессора Андрея Павловича Дыбана (Отдел эмбриологии Института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград) и кандидата медицинских наук Станислава Ивановича Городецкого (Лаборатория генной инженерии Института общей генетики АН СССР, Москва).

Энциклопедичность знаний не только в своей профессиональной области, уникальные аналитические способности позволяли выдающемуся ученому — эмбриологу, специалисту в области биологии развития, профессору А.П. Дыбану (1922–2013), не утонуть в море литературных данных, а трезво оценивать, сравнивать, синтезировать и вследствие этого не только выявлять современные перспективные пути развития науки, но и, обогащая их, направлять действия коллектива на передовые рубежи мировой науки. Особенностью научного творчества А.П. Дыбана являлось то, что он не замыкался в рамках только одного научного направления, а,

This paper provides well-known as well as little-known data for initial steps of the development of transgenic mammals in the USSR, namely for the collaboration of the Department of Embryology (professor A.P. Dyban) of the Research Institute of Experimental Medicine of the Academy of Medical Sciences, USSR (Leningrad) and the Laboratory of Cellular Engineering (PhD. S.I. Gorodetsky) of the Institute of General Genetics of the Academy of Sciences, USSR (Moscow), and some details about the life journey of these research unit leaders.

Keywords: transgenesis of mammals, transgenic mice, transgenic rats, A.P. Dyban, S.I. Gorodetsky.

обладая энциклопедическими знаниями не только в области экспериментальной эмбриологии и научным предвидением, успешно развивал и вносил существенный вклад в новые научные области — экспериментальную тератологию, цитогенетику развития млекопитающих, генетику поведения, трансгеноз млекопитающих [2].



Рис. 1. Профессор Андрей Павлович Дыбан, 1992 г.

К моменту первой зарубежной публикации об успешной генетической трансформации зародышей млекопитающих Отдел эмбриологии НИИЭМ АМН СССР уже на протяжении 15 лет являлся общепризнанным Всесоюзным центром в области экспериментальной

эмбриологии, тератологии, цитогенетики раннего развития лабораторных млекопитающих. Сотрудники Отдела и их руководитель не только проводили современные исследования действительно мирового уровня, но и обучали прикомандированных из других институтов, как теоретическим основам раннего развития, так и практическим навыкам работы на зародышах млекопитающих, в том числе и культивированию *in vitro* доимплантационных и постимплантационных эмбрионов мышей и крыс. Большим достижением профессора А.П. Дыбана было создание уникального коллектива исследователей, причем каждый из его сотрудников стал известным высококлассным специалистом, занимая конкретную нишу в области экспериментальной эмбриологии лабораторных млекопитающих. В связи с чем, одной из причин, обусловившей преимущество в получении пионерских результатов Отделом эмбриологии НИИЭМ АМН СССР в области создания трансгенных млекопитающих, являлся уникальный коллектив, которому в отличие от других подразделений страны, не нужно было приобретать «с нуля» или совершенствовать навыки работы с зародышами мышевидных грызунов.

В начале 80-х годов С.И. Городецкий (Институт общей генетики АН СССР, Москва), яркий представитель отечественной геномной инженерии, понимая, что биотехнологии млекопитающих принадлежит будущее, принял «путешествия» по академическим коридорам власти с целью выяснить, кто в СССР способен создать трансгенных млекопитающих. Сотрудники аппарата общились, что если кто и сможет реализовать эту задачу, то это профессор А.П. Дыбан из Ленинграда — руководитель Отдела эмбриологии НИИ экспериментальной медицины АМН СССР, головного научного центра по экспериментальной эмбриологии млекопитающих. Так возникло плодотворное научное сотрудничество С.И. Городецкого и А.П. Дыбана, с годами перешедшее в доверительные отношения и дружбу. Это и немудрено, ведь яркость личности С.И. Городецкого привлекала к нему творческих людей (певицу Г. Образцову, композитора В. Гладилина, писателя В. Войновича и др.). Имя Станислава Ивановича Городецкого (а также А.С. Каледина и А.Г. Слюсаренко) останется в истории науки в связи с описанием термостабильной ДНК-полимеразы [3], которая в настоящее время используется во всем мире в цепных полимеразных реакциях для молекулярно-генетических исследований и диагностики заболеваний. Однако, патент на это открытие был выдан одной из зарубежных фирм — то есть и не нашим ученым и не группе американских биохимиков, которые ранее также описали ДНК полимеразу; а Нобелевская премия (1993) за метод ПЦР, как известно, была присуждена К. Мулису и М. Смиту. На вопрос о том, почему не была запатентована термостабильная ДНК-полимераза и ее свойства, С.И. Городецкий отвечал, что он не сделал это сознательно, ибо открытие это должно принадлежать не кому-либо, а всему мировому научному сообществу.

Об отсутствии у С.И. Городецкого стандартной реакции на реальную действительность можно также судить не только не только по тому, что он не стремился защитить докторскую диссертацию, которой он был давно достоин благодаря своим научным достижениям. О принципиальности С.И. Городецкого свидетельствует и факт отказа (в начале 2000-х годов) от значительного контракта на работу в одной из зарубежных стран по созданию трансгенных млекопитающих. Накануне подписания договора С.И. Городецкий выявил невозможность выполнения задания, причем не в той части, за которую



Рис. 2. Станислав Иванович Городецкий, 2001

отвечал, а на следующем этапе работы исследователей в связи с появившимися новыми сведениями об особенностях работы одного из белков у данного вида животных.

Таким образом, в начале 1980 годов в нашей стране был сформирован не закрепленный юридически межведомственный коллектив единомышленников, идейно возглавляемый профессором А.П. Дыбаном, представленный сотрудниками Отдела эмбриологии Института экспериментальной медицины АМН СССР (Ленинград) и лаборатории геномной инженерии Института общей генетики АН СССР (Москва). К этому времени сотрудники Отдела эмбриологии ИЭМ имели не только многолетний опыт работы по манипуляциям с зародышами: их трансплантацией, культивированием *in vitro*, но и навыками микроинъекций в мужской пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки. Коллектив же лаборатории, возглавляемой С.И. Городецким, в совместных исследованиях выполнял чрезвычайно важную гено-инженерную часть работы: создавал конструкции с выбором эффективных промоторов, клонировал рекомбинантные молекулы ДНК, выявлял наличие чужеродных генов в клетках родившихся животных и т.п.

В 1983 году ученые опубликовали первые совместные результаты об успешной интеграции в геном мышей клонированных генов тимидинкиназы вируса герпеса и SV40 и высокомолекулярных трансгенных животных [1, 4–8]. Дальнейший прорыв в исследованиях, получивший большой резонанс, наступил в результате продолжения совместной работы — впервые в стране были созданы трансгенные мыши (1984) [1, 7, 9, 10] и впервые в мире — трансгенные крысы (1986) [11–13] с интегрированным геном гормона роста человека. Дело в том, что признание научных заслуг профессора А.П. Дыбана мировым сообществом эмбриологов, тератологов, цитогенетиков раннего развития млекопитающих и его личные контакты способствовали созданию безупречной репутации и доверительных отношений

среди элиты зарубежных исследователей. Эти обстоятельства и позволили Андрею Павловичу обратиться с просьбой и на безвозмездной основе получить от известного ученого профессора Р. Пальмитера (R. Palmiter) (еще до публикации одной из его статей по данной тематике) в личное распоряжение плазмиды с геном гормона роста человека. На созданных таким образом трансгенных мышах и крысах изучали влияние чужеродных генов на различные процессы в пре- и постнатальном онтогенезе [1, 8, 10–12], распределение клонированной и интродуцированной ДНК в ранних зародышах [14]. Были получены пионерские данные, свидетельствующие не только о стимуляции, но и торможении роста и возникновении карликовости у трансгенных мышей [1, 4, 10–12]. У трансгенных крыс были выявлены особенности работы генов гормона роста человека в разные периоды постнатального онтогенеза. Используя интродукцию клонированных генов, изучали особенности организации и функции генома в начальном эмбриогенезе млекопитающих. При интеграции чужеродных клонированных генов млекопитающих в зиготу мышей не во всех случаях происходила экспрессия генов, что, как было показано, зависело от многих причин, а не только от наличия сильных промоторов и энхансеров [1, 15]. А.П. Дыбан сформулировал гипотезу о том, что во время первого раунда репликации ДНК происходит репрограммирование хроматина пронуклеусов и создается такая структурно-функциональная организация ядра, при которой одни гены доступны для стадийспецифической и органоспецифической регуляции, а другие на ранних стадиях развития экспрессируются вне этих регуляторных систем, обеспечивая общие метаболические потребности клеток [16, 17]. Таким образом, исследования на трансгенных мышах и крысах были сосредоточены на изучении механизмов индивидуального развития млекопитающих [17, 18], хотя и отдавалось должное возможности получения животных-продуцентов биологически активных веществ с помощью метода микроинъекций клонированных генов в оплодотворенные яйцеклетки и достижений генной инженерии млекопитающих для разработки методов генной терапии [13, 19]. В рамках второй группы исследований в Отделе проводили, в частности, и генетический анализ нескольких поколений животных, полученных от трансгенных мышей.

На объединенном заседании Президиума АН СССР (1984) профессор А.П. Дыбан выступил с программным докладом об успехах в создании трансгенных животных в СССР, которое проводилось не только с целью перспектив познания механизмов раннего развития млекопитающих, но и получения биопродуцентов, в частности, лекарственных и биологически активных веществ. Вице-президент АН СССР, академик АН СССР Юрий Александрович Овчинников публично, в присутствии всех, в том числе и руководства НИИ экспериментальной медицины АМН СССР поддержал развитие этих исследований и добавил, что «...профессора в обиду мы не дадим». Дело в том, что на Ученом Совете Института экспериментальной медицины (1983) Андрей Павлович сделал Отчетный доклад с демонстрацией полученных коллективом данных о трансгенных млекопитающих и перспективами дальнейшего развития исследований, который был высоко оценен и поддержан, в частности, известным ученым членом-корреспондентом АМН СССР С.А. Нейфахом (зав. лабораторией биохимической генетики того же института). Однако у тогдашнего директора, мягко говоря, не только не было понимания важности данного направления исследований, но и были свои соображения о судьбе Отдела и его руководителя.

Однако после выступления на заседании Президиума АН СССР (1984) Отдел эмбриологии не только получил от Академии целевым назначением определенное финансирование, но и карт-бланш на продолжение исследований по данной тематике.

Работы коллективов А.П. Дыбана и С.И. Городецкого по созданию и изучению трансгенных млекопитающих были признаны пионерскими не только всем научным сообществом страны, но и официальными лицами. Так, например, результаты их исследований и дальнейшие перспективы этого направления в качестве примера достижений отечественной науки на мировом уровне прозвучали в докладе вице-президента ВАСХНИЛ директора Института общей генетики академика А.А. Созинова на XXVII съезде КПСС (1986).

Неоценимая роль в получении первых трансгенных млекопитающих принадлежала ученикам Андрея Павловича: кандидатам наук Б.Л. Вайсману, Г.Ф. Голинскому, Г.Г. Секириной, И.Б. Архангельской, Л.И. Хожай, а впоследствии и Т.В. Игнатъевой, А.В. Сорокину, О.В. Кидготко и другим исследователям. В частности, Борис Львович Вайсман и Георгий Фаддеевич Голинский, имея в своем распоряжении довольно скромное оборудование, проявляя «кулибинскую» смекалку совершенствовали технику, необходимую для трансплантации генетического материала в мужской пронуклеус, были не только первыми сотрудниками Отдела, которые выполняли микроинъекции, но и ведущими исполнителями и соавторами всех пионерских исследований коллектива. Г.Г. Секирина, И.Б. Архангельская, Л.И. Хожай и другие исследователи отвечали за чрезвычайно важный участок эмбриологической части работы — работу с зародышами и самками-реципиентами, которым трансплантировали зародыши с интегрированными генами. Велика роль Т.В. Игнатъевой, принимавшей участие в создании трансгенных крыс с интегрированным геном гормона роста человека и защитившей впоследствии кандидатскую диссертацию по изучению действия гена гормона роста человека на онтогенез крыс.

Коллектив С.И. Городецкого и его единомышленники (А.С. Каледин, Т.В. Капелинская, Г.А. Попкова и др.) не только размножили плазмиды на основе промотора гена металлотинейна 1 мышцы с геном гормона роста человека, любезно предоставленные Р. Пальмитером, но и конструировали новые, подходящие для решения поставленных теоретических и прикладных задач, в том числе и тканеспецифические векторы. С.И. Городецким лично и его сотрудниками были созданы плазмиды на основе иных промоторов, в частности, гена тирозинаминотрансферазы крысы с геном гормона роста человека; фрагмента генома вируса бычьей папилломы с геном гормона роста человека; гена металлотинейна 1 мышцы с кДНК гормона роста человека и сигналом терминации транскрипции природного гена гормона роста человека; под контролем регуляторных элементов генов белка казеина, а также интерлейкина-13 человека (В.А. Торопова и В.Г. Коробко — ИБХ РАН) и другие конструкции, необходимые для создания трансгенных млекопитающих.

Несомненным достижением коллективов А.П. Дыбана и С.И. Городецкого являлось использование трансгенных моделей для исследования особенностей организации и функции генома в начальном эмбриогенезе млекопитающих. Действительно, впервые в мире были получены крысы с интегрированным геном гормона роста человека, впервые в стране мыши с интегрированным геном гормона роста человека, а в дальнейшем в содружестве с другими исследователями трансгенные мыши с интегрированным геном интерлейкина-13 человека

(совместно с В.А. Тороповой и В.Г. Коробко); были созданы модели для изучения: сахарного диабета [20], а в содружестве с Отделом биохимии НИИЭМ АМН СССР и атеросклероза [21]. Официальное признание вице-президентом АН СССР академиком Ю.А. Овчинниковым и Президиумом АН СССР указанных работ коллективов двух крупных отечественных ученых и соответствующее постановление о чрезвычайной актуальности исследований по созданию трансгенных млекопитающих послужили сигналом для мощного всплеска исследований по этому направлению в СССР. Впоследствии, особенно после Постановления Совмина СССР (1985 год) «О дальнейшем развитии новых направлений биологии и биотехнологии», были созданы ведомственные, межведомственные, межреспубликанские, союзные, а в дальнейшем и межгосударственные Программы, что позволило

получить другим коллективам, как работавшим в этом направлении, так и переключившимся на эту тематику, гигантское финансирование, в основном, на создание трансгенных сельскохозяйственных-биопродуцентов.

В заключение необходимо отметить, что трансгенные млекопитающие сыграли свою роль не только для возможного использования их в качестве продуцентов биологически активных веществ и лекарственных препаратов, но и в качестве моделей тех или иных заболеваний, а также моделей для познания механики развития лабораторных млекопитающих. Были получены важные результаты, характеризующие развитие тех или иных систем в присутствии чужеродного гена и генопродукта. В дальнейшем же акцент исследований этого направления сместился в сторону другой модели, т.е. от трансгенных к нокаутным животным.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Дыбан А.П., Городецкий С.И. Интродукция в геном млекопитающих чужеродных генов. Пути и перспективы. В кн.: С.В. Инге-Вечтомов, ред. Молекулярные и клеточные аспекты биотехнологии. Л.: Наука; 1986а: 82–97.
2. Васецкий С.Г., Дыбан П.А. Андрей Павлович Дыбан (к 90-летию со дня рождения). Онтогенез 2012; 43(6): 447–9.
3. Каледин А.С., Слюсаренко А.Г., Городецкий С.И. Выделение и свойства ДНК-полимеразы из экстремально термофильной бактерии *Thermus aquaticus* YTV. Биохимия 1980; 45(4): 644–53.
4. Вайсман Б.Л., Голинский Г.Ф., Каледин А.С. и др. Опыты по интеграции в геном мышей клонированных генов тимидинкиназы вируса герпеса и SV40. В кн.: Молекулярные механизмы генетических процессов. V Всесоюзный симпозиум. М.: Наука; 1983: 12.
5. Дыбан А.П., Городецкий С.И. Генетическая трансформация млекопитающих. В кн.: Молекулярные механизмы генетических процессов. V Всесоюзный симпозиум. М.: Наука; 1983: 22–3.
6. Городецкий С.И. Генетическая инженерия высших животных. Журнал Всесоюзного Хим. общества 1984; 29: 153–77.
7. Вайсман Б.Л., Городецкий С.И., Архангельская И.Б. и др. Особенности фенотипической экспрессии у трансгеномных мышей гормона роста человека (hGH) и гена тимидинкиназы вируса герпеса (TK-YSV). Онтогенез 1984; 15 (6): 429.
8. Вайсман Б.Л., Голинский Г.Ф., Каледин А.С. и др. Трансформация генома мышей с помощью микроинъекции гена тимидинкиназы вируса герпеса в оплодотворенные яйцеклетки. Молекулярная генетика, микробиол. и вирусол. 1986; 73(3): 28–34.
9. Вайсман Б.Л., Голинский Г.Ф. Техника микроинъекции клонированных фрагментов ДНК (чужеродных генов) в ядро оплодотворенной яйцеклетки мышей. В кн.: А.П. Дыбан, ред. Общие закономерности и контролирующие механизмы раннего эмбриогенеза млекопитающих в норме и патологии. Л.: Ленуприздат; 1985: 108–14.
10. Городецкий С.И., Дыбан А.П., Вайсман Б.Л. и др. Стимуляция и торможение роста мышей, несущих ген гормона роста человека. Булл. эксл. биол. и мед. 1986; 101(6): 698–702.
11. Дыбан А.П., Городецкий С.И., Вайсман Б.Л. и др. Интродукция гена гормона роста человека в геном мышей и крыс. Изучение

фенотипических эффектов. В кн.: Состояние и перспективы развития сельскохозяйственной биотехнологии. Всесоюзная конференция. Л.: Наука; 1986б: 61–7.

12. Дыбан А.П., Городецкий С.И. Трансгенные млекопитающие: изучение фенотипических эффектов гормона роста человека, интродуцированного животным. Биотехнология 1987; 3(3): 352–7.

13. Вайсман Б.Л., Дыбан А.П. Возможности использования достижений генной инженерии млекопитающих для разработки методов генной терапии. Биополимеры и клетка 1990а; 6(1): 3–12.

14. Вайсман Б.Л., Сорокин А.В., Рутковская Ю.М. и др. Изучение распределения в ранних зародышах мышей клонированной ДНК после ее введения в зиготы. В кн.: Новые направления биотехнологии. V Всесоюзная конференция. Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР; 1990б: 31.

15. Дыбан А.П., Городецкий С.И. Генетическая трансформация млекопитающих. В: Молекулярные аспекты генетических процессов. М.: Наука; 1985: 84–9.

16. Dyban A.P. Studies of cellular, chromosomal and molecular mechanisms of very early mammalian embryogenesis. Sov. Sci. Rev. J. Physiol. gen. Biol. 1987; 1: 651–705.

17. Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих. Л.: Наука; 1988. 229 с.

18. Дыбан А.П. Трансгенные млекопитающие в биологии развития. Онтогенез 1989; 20(6): 577–92.

19. Вайсман Б.Л., Капелинская Т.В., Городецкий С.И. и др. Возможность получения животных-продуцентов биологически активных веществ с помощью метода микроинъекций клонированных генов в яйцеклетки. Антибиотики и мед. биотехнология. 1988; 33(2): 154–8.

20. Игнатьева Т.В., Голинский Г.Ф. Моделирование некоторых форм диабета на трансгенных крысах, экспрессирующих ген гормона роста человека. Биополимеры и клетка 1990; 6(2): 24–30.

21. Перевозчиков А.П., Вайсман Б.Л., Дозорцев Д.И. и др. Создание модели — трансгенных кроликов, содержащих в геноме антисмысловые конструкции гена аполипопротеина AL человека для генетической коррекции атерогенных нарушений липидного обмена. Биополимеры и клетка 1990; 6(2): 17–24.

Поступила: 10.07.2018

ОБЗОРЫ

DOI: 10.23868/201808014

FUSION-ФЕНОМЕН В НОРМАЛЬНОМ ГИСТОГЕНЕЗЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ: ЧАСТЬ 1Д.О. Був¹, А.М. Емелин¹, Р.В. Деев^{1, 2, 3}¹ Рязанский государственный медицинский университет имени И.П. Павлова, Рязань, Россия² Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия³ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия**FUSION-PHENOMENON IN NORMAL HISTOGENESIS AND IN PATHOLOGY: PART 1**D.O. Buev¹, A.M. Emelin¹, R.V. Deev^{1, 2}¹ I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia² Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia³ Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

e-mail: romdey@gmail.com

Процесс слияния клеток (fusion-феномен) лежит в основе множества явлений, протекающих в человеческом организме. Настоящий обзор посвящен роли этого явления в гистогенезе различных тканей, а также его молекулярным механизмам. В первой части описывается fusion-феномен в нормальных — физиологических условиях.

Ключевые слова: слияние клеток, fusion-феномен, оплодотворение, миогенез, трофобласт, макрофаги, гистогенез.

Введение

Fusion-феноменом или клеточным слиянием называется процесс объединения двух или более клеток в одну более крупную многоядерную структуру — симпласт. Этот процесс в ходе нормального и патологического гистогенеза может быть обнаружен у многих организмов, включая человека. Слияние является одним из ключевых этапов цито- и гистогенеза при формировании поперечнополосатой скелетной мышечной ткани, синцитиального слоя трофобласта (синцитиотрофобласт). Кроме того, даже оплодотворение также можно рассматривать как одно из проявлений fusion-феномена [1]. Значение слияния клеток не ограничивается эмбриональным развитием, данное явление происходит во время регенерации и роста скелетных мышц [2], в ходе образования остеокластов [3]. Fusion-феномен является частью патоморфогенеза при некоторых заболеваниях, таких как гранулематозное воспаление — образование гигантских многоядерных клеток; вирусных инфекций — многие вирусы посредством своих белков вызывают слияние клеток; опухоли — происходит слияние злокачественно трансформированных клеток друг с другом и с нормальными клетками.

Одно из первых упоминаний о возможности слияния клеток встречается в монографии Теодора Шванна (1839) «Микроскопические исследования о соответствии в структуре и росте животных и растений» (рис. 1) [4]. В частности, он выделяет первичные и вторичные клетки, последние образуются путем объединения первичных. Такой механизм был предложен им для описания формирования мышечных волокон: «Однако возникает вопрос, как развивается последняя упомянутая форма мышечных волокон, т.е. их основная форма. Она представляла собой цилиндр, по всей вероятности полый и предположительно закрытый на концах, там где мышечные волокна разом заканчиваются притупленным, закругленным краем на сухожилиях. В этом цилиндре ядра клеток лежат рядом друг с другом на малых расстояниях. Является ли цилиндр удлиненной клеткой, в которой ядра

Various processes happening in human organism depend on cell fusion (also called "fusion-phenomenon"). This review focuses on role of this phenomenon in the histogenesis of different tissues and molecular mechanism of the cell fusion. The Part 1 describes fusion-phenomenon in the normal, physiological conditions.

Keywords: cell fusion, fusion-phenomenon, fertilization, myogenesis, trophoblast, macrophages.

составляют основу новых, но не развивающихся клеток, или же являются ядрами остатков клеток, которые путем слияния друг с другом и резорбции перегородок образуют цельное волокно или цилиндр? Другими словами, было ли волокно создано слиянием клеток? Вряд ли можно сомневаться в том, что каждый примитивный пучок мышц является вторичной клеткой, образованной слиянием первичных круглых исходных клеток, которые располагались в ряд друг за другом» (стр. 161–164).

Механизмы слияния разных клеток сильно отличаются друг от друга, однако во всех случаях выделяют пять основных этапов этого процесса (рис. 2):

1. Дифференцировка. В ходе реализации своей генетической программы, либо же в результате воздействия каких-либо специфических молекул на рецепторы, клетки начинают экспрессировать белки, которые участвуют в процессе слияния.

2. Миграция. Клетки сближаются под влиянием хемотаксических факторов.

3. Распознавание мембраны другой клетки и прикрепление к ней. На этом этапе взаимодействие между клетками осуществляется с помощью большого количества рецепторов и молекул межклеточной адгезии.

4. Слияние мембран и образование отверстия (поры) в плазмалемме. Взаимодействие двух мембран начинается в тот момент, когда они сближаются на расстоянии ~10 нм [4]. На первом этапе клеточная мембрана деформируется в результате взаимодействия мембранного фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата с ионами кальция [3, 5]. Это приводит к тому, что наружные слои мембран приближаются друг к другу, соединяются и формируют липидный мостик (fusion stalk) между двумя клетками. Мостик, поначалу очень тонкий, расширяется в радиальном направлении, формируя двуслойную структуру (hemifusion diaphragm), образованную двумя внутренними липидными слоями. Затем эта диафрагма разрывается и образуется отверстие в мембранах (пора), которая расширяется за счет деполимеризации актиновых филаментов [4].

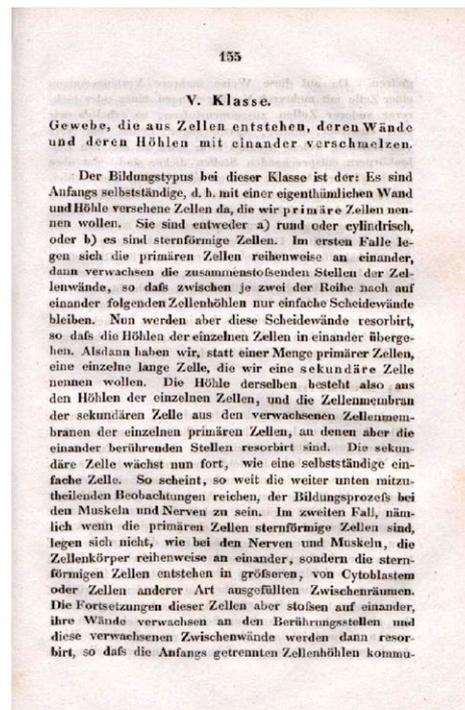
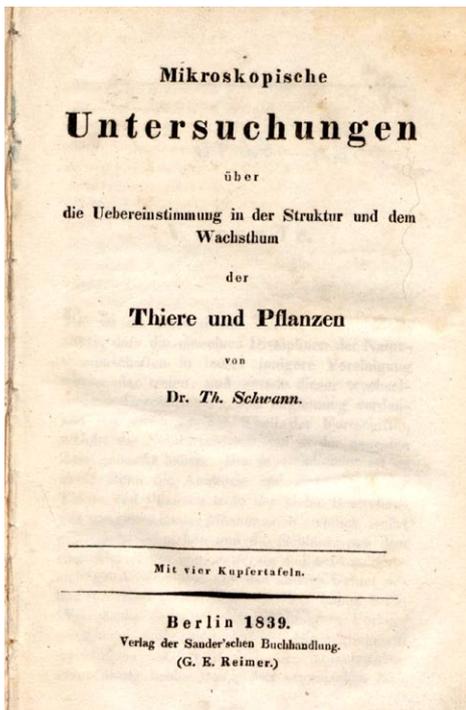
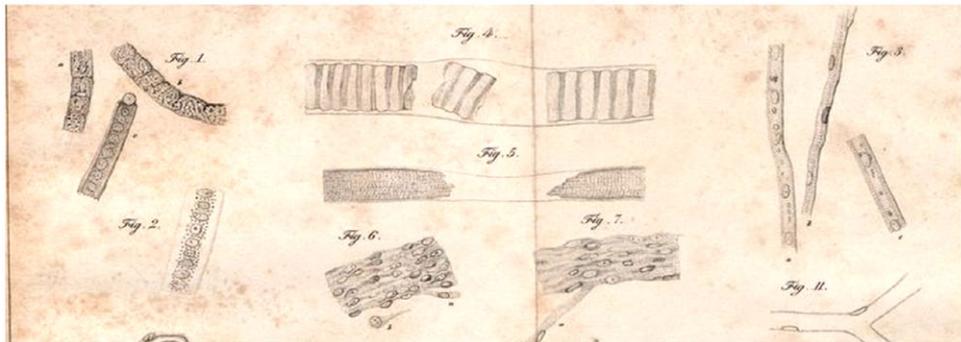


Рис. 1. Изображения некоторых страниц из монографии Т. Шванна «Микроскопические исследования о соответствии в структуре и росте животных и растений» (1839): титульный лист; раздел «Класс 5. Ткани, формирующиеся из клеток, стенки и полости (содержимое) которых сливаются друг с другом»; иллюстрации: 1 — мышца спины 3,5-дюймового плода свиньи; 2 — то же после обработки уксусной кислотой; 3 — мышца (волокно) плеча 7-дюймового плода свиньи; 4 — мышцы майского жука; 5 — мышечный пучок щуки; 6 — седалищный нерв 4-дюймового плода свиньи; 7 — мышца плеча 4-дюймового плода свиньи; 11 — капилляры хвоста головастика



Некоторые этапы слияния мембран, а именно удаление гидратной оболочки, окружающей клетки, а также образование двуслойной диафрагмы и расширение отверстия в мембране, требуют преодоления значительных энергетических барьеров, следовательно, не могут протекать спонтанно. В частности, в указанных процессах принимают участие фузогенные белки (фузогены) [4].

У млекопитающих, включая человека, описаны два фузогена — синцитины 1 и 2. Эти белки принимают участие в формировании синцитиотрофобласта [1]. Синцитин-1 присутствует на яйцеклетке, а его рецептор ASCT2 — на сперматозоиде [6]. Также экспрессия синцитина-1 выявлена в остеокластах [7] и миобластах [8]. Синцитин-2 обнаружен только в трофобласте, его рецептором является MFSD2a [9].

Синцитины представляют собой гликопротеины, состоящие из трех доменов: внеклеточного, трансмембранного и внутриклеточного. Благодаря мотиву «лейциновая застежка-молния» в трансмембранном домене синцитин-1 образует тример. Взаимодействие внеклеточного домена с рецептором ASCT2 приводит к серии конформационных изменений, которые завершаются проникновением участка синцитина, называемого фузогенным доменом, в мембрану другой клетки (рис. 3). После этого синцитиновый тример осуществляет изменение конформации, приводящее к слиянию двух мембран и образованию небольшого отверстия между ними, которое затем расширяется [5].

Существует и альтернативная модель слияния мембран. Согласно ей, основную роль в данном случае играют

белковые трансмембранные каналы, которые взаимодействуют с аналогичными каналами на другой мембране [5].

Завершающий этап — образование гибридной клетки: происходит смешивание цитоплазм и приобретение нового фенотипа и профиля экспрессии генов [10]. Образовавшаяся гибридная клетка может иметь одно ядро, в таком случае она будет носить название синкарион, либо несколько ядер — гетерокарион. В зависимости от типа клеток, между которыми произошло слияние, различают гомотипическое слияние — между одинаковыми клетками (например, слияние моноцитоподобных клеток с образованием остеокластов) и гетеротипическое — между разными клетками (например, слияние сперматозоида и яйцеклетки) [11].

Оплодотворение как процесс слияния клеток

Оплодотворение является особым частным случаем fusion-феномена, который отличается от других типов слияния рядом особенностей [1]. Во-первых, в оплодотворении принимают участие две гаплоидные клетки, в то время как во всех остальных случаях сливаются либо диплоидные, либо полиплоидные. Во-вторых, после оплодотворения дальнейшие слияния становятся невозможны, так как реализуются механизмы, блокирующие полиспермию. Во всех остальных случаях клетки способны проходить через множество событий слияния и формировать крупные многоядерные структуры.

Непосредственно перед оплодотворением сперматозоиды претерпевают функциональные изменения, совокупность которых называется капациацией.

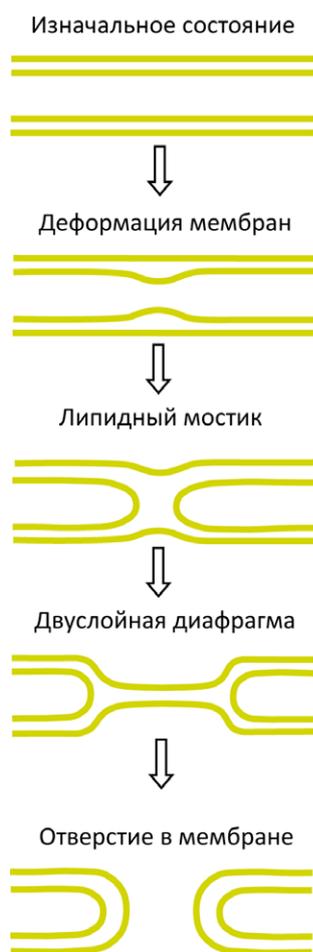


Рис. 2. Схема взаимодействия мембран при слиянии клеток. Пояснения в тексте. Из [5], с изм.

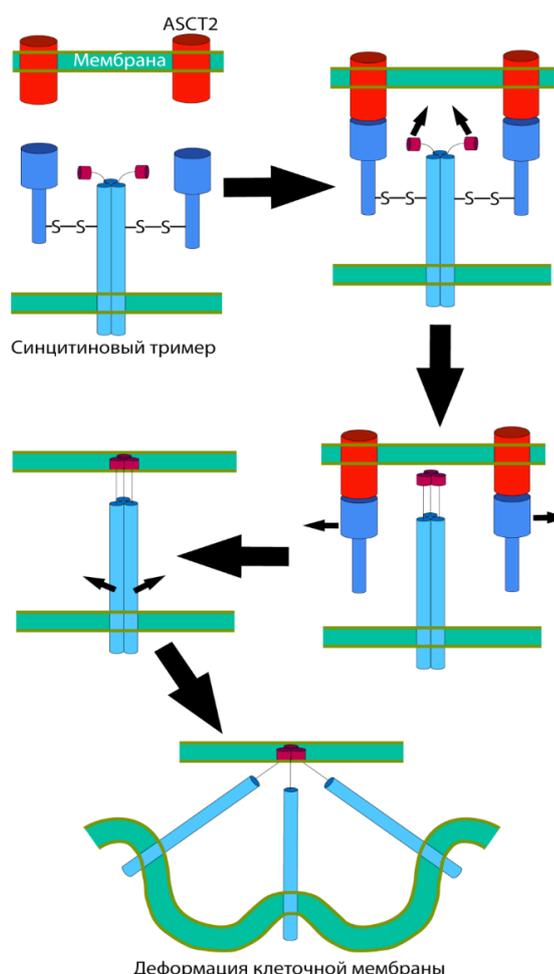


Рис. 3. Схема конформационных изменений синцитинового тримера, приводящих к слиянию клеток: красный — ASCT2, розовый — фузогенный домен синцитина; синий — домен, связывающий рецептор; голубой — остальные домены. Пояснения в тексте. Из [5] с изм.

У сперматозоидов увеличивается текучесть мембраны из-за эффлюкса холестерина, изменяется мембранный потенциал [12]. Затем происходит акросомная реакция, которая заключается в слиянии цитоплазматической мембраны сперматозоида и мембраны акросомы и последующем выбросе протеолитических ферментов. Данное слияние обеспечивается белком экваторином [13]. Акросомная реакция активируется контактом с блестящей оболочкой (*zona pellucida*), изменением концентрации прогестерона, либо протекает спонтанно [14]. Выделяемые при этом ферменты разрушают блестящую оболочку, что позволяет сперматозоиду слиться с яйцеклеткой.

Контактное взаимодействие гамет происходит на специализированных участках мембраны — экваториальной зоне сперматозоида и ворсинчатой зоне яйцеклетки [15]. Существует гипотеза, согласно которой на обеих мембранах имеются крупные мультимолекулярные комплексы, взаимодействующие друг с другом [14]. Для описания взаимодействия гамет предложено использовать термин «синапс», по аналогии с иммунологическим синапсом [16]. Среди множества белков, принимающих участие в слиянии (табл. 1), присутствует синцитин-1 и его рецептор ASCT-2, предположительно отвечающие за формирование отверстий в мембране [7, 17]. Точная роль синцитина-1 в оплодотворении не установлена.

Исключительно важную роль в процессе оплодотворения играет белок IZUMO1 — молекула межклеточной адгезии, относящаяся к суперсемейству иммуноглобулинов [18]. Этот белок перемещается с мембраны акросомы в экваториальную область сперматозоида по завершению

акросомной реакции [14]. Функция IZUMO1 заключается в связывании белка Juno (фолатный рецептор 4), который расположен на яйцеклетке. IZUMO1 часто ошибочно описывается как фузогенный белок, однако он таковым не является, так как не имеет фузогенного домена, в отличие от истинного фузогена синцитина [19]. Процесс взаимодействия Juno и IZUMO1 протекает в три стадии (рис. 4). На первом этапе Juno распознает молекулу IZUMO1, после чего образовавшийся комплекс рецептор-лиганд димеризуется. Затем белок семейства протеиндисульфидизомераз «складывает» молекулу IZUMO1 пополам, погружая её внеклеточный домен в мембрану сперматозоида. После этого конформационного изменения Juno открепляется от рецептора и более не принимает участия в адгезии. Наконец, последняя стадия, заключается в том, что сложенный пополам димер IZUMO1 взаимодействует с пока не идентифицированным рецептором на ооците [20]. Данные конформационные изменения требуются для того, чтобы сблизить мембраны клеток между собой и тем самым снизить необходимый уровень изменения свободной энергии, который требуется для образования липидного мостика между двумя мембранами.

На поверхности яйцеклетки имеются CD 81 и CD9 (тетраспанин 28 и 29 соответственно) [16]. Это небольшие мембранные белки, которые структурируют определенные участки мембраны, формируя так называемые домены, обогащенные тетраспанинами, и взаимодействуют с цитоскелетом и сигнальными молекулами [21]. Кроме того, белки этого семейства принимают участие в процессе слияния миобластов [22] и моноцитов [23].

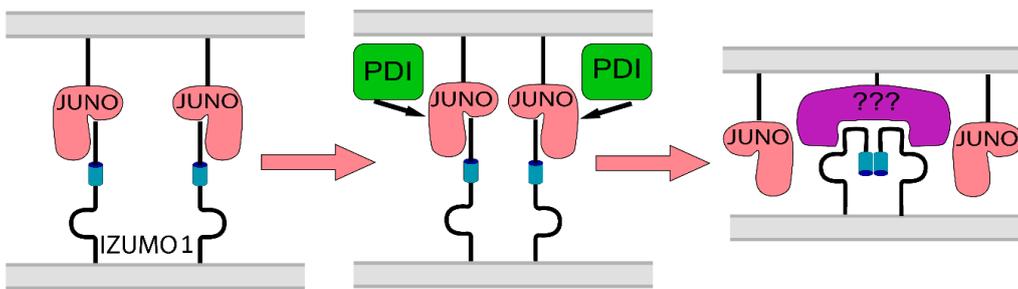


Рис. 4. Схема взаимодействия Juno и IZUMO1. Пояснения в тексте. Из [20] с изм.

CD9 принимает участие в процессе оплодотворения, однако его точная функция неизвестна. Показано, что CD9 локализуется на яйцеклетке в области микроворсинок — участке мембраны, в котором происходит слияние [24]. У мышей, нокаутных по гену белка CD9, изменена структура микроворсинок: они короче и тоньше [24]. Другая гипотеза предполагает, что CD9 является кофактором одного из белков адгезии и увеличивает его аффинность к рецепторам [16]. Не исключено также взаимодействие CD9 со специфическими рецепторами сперматозоида [25]. Также, согласно данным компьютерного моделирования, CD9 взаимодействует с интегринами, CD49, IZUMO1 и ADAM2 [26, 27]

В адгезии сперматозоида к яйцеклетке принимают участие белки семейства интегринов, в частности интегрин $\alpha\beta 1$, находящийся на мембране сперматозоида [17]. Предположительно, рецептором $\alpha\beta 1$ является фертиллин β (ADAM2) [28].

Таблица 1. Белки слияния половых клеток

Сперматозоид	Яйцеклетка
IZUMO1	Juno
Интегрин $\alpha\beta 1$	Тетраспанины 28 и 29 (CD81 и CD9)
Синцитин 1	Фертиллин β (ADAM2)
ASCT-2	ASCT-2

После завершения слияния со сперматозоидами происходит кортикальная реакция, в ходе которой яйцеклетка секретирует содержимое кортикальных гранул. Одним из выделяемых белков является овастацин — протеаза, которая расщепляет белок ZP2, входящий в состав блестящей оболочки. Разрушение ZP2 нарушает адгезию сперматозоидов к зона pellucida. Дополнительно происходит удаление Juno с мембраны яйцеклетки посредством везикулярного транспорта, а образующиеся при этом везикулы служат своего рода «ловушками» для других сперматозоидов [16].

Слияние клеток в трофобласте

Большое количество клеток в трофобласте сливаются между собой во время плацентации. На 15–21 сутки после оплодотворения образуется синцитиотрофобласт — крупная многоядерная структура, покрывающая ворсины хориона [29]. Его функция заключается в инвазии в эндометрий, питании эмбриона и освобождении последнего от метаболитов, газообмене между зародышем и организмом матери и выработке специфических плацентарных гормонов. Синцитиотрофобласт образуется путем слияния клеток цитотрофобласта [5].

В процессе слияния синцитиотрофобласта выделяют несколько этапов. На этапе коммитирования клетка останавливает клеточный цикл и экспрессирует специфические белки, необходимые для слияния. Коммитирование обеспечивается EGF (Epidermal Growth Factor, эпидермальный фактор роста), EGFR (EGF Receptor, рецептор

эпидермального фактора роста), GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), LIF (Leukemia Inhibitory Factor, ингибирующий фактор лейкемии), MIC-1 (Macrophage Inhibitory Cytokine 1, ингибирующий цитокин макрофагов 1), активином A и хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ) [5]. ХГЧ увеличивает транскрипцию генов белков, участвующих в слиянии: синцитинов, коннексина 43, кадгерина E, а также увеличивает выработку ХГЧ другими клетками, тем самым обеспечивая положительную обратную связь. Механизм действия ХГЧ заключается в стимуляции рецептора LH/CG-R, что приводит к активации аденилатциклазы и протеинкиназы A и в итоге изменяет экспрессию генов белков, участвующих в слиянии. Помимо активирующих веществ, синцитий вырабатывает молекулы, замедляющие процесс слияния. Кандидатами на роль этих факторов являются TGF β (transforming growth factor beta) и TNF α (tumor necrosis factor alpha) [5].

На этапе адгезии происходит образование межклеточных контактов. Адгезионные контакты состоят из E-кадгерина и кадгерина-11 и участвуют в прикреплении клеток друг к другу [30]. Также E-кадгерин в ассоциации с сигнальным комплексом β -катенина обеспечивает формирование плотных и щелевых контактов [31]. В дальнейшем внеклеточный домен E-кадгерина отщепляется посредством ADAM12 [32]. Другой тип контактов — щелевые контакты — обеспечивают межклеточную коммуникацию — обмен малыми молекулами, ионами и белками. В состав щелевых контактов трофобласта входят коннексин 43, который формирует трансмембранные каналы и эзрин. К эзрину прикрепляется протеинкиназа A, которая, фосфорилируя коннексины, открывает и закрывает щелевые контакты, и тем самым контролирует межклеточную коммуникацию [33]. Плотные контакты имеют в своем составе мембранную гуанилаткиназу ZO-1 (Zona Occludens-1), которая обеспечивает межклеточную адгезию и стабилизацию щелевых контактов путем взаимодействия с коннексином-43 [5].

В последнем этапе — слиянии мембран, участвуют фузогенные белки синцитины. Они обеспечивают слияние клеток путем взаимодействия с рецепторами: рецептором синцитина-1 является ASCT2, синцитина-2 — MFSD2a [34, 35]. Также в плаценте обнаружен ретровирусный белок супрессин, который конкурентно блокирует рецептор синцитина-1, ASCT-2. Предположительно, его роль заключается в торможении слияния вирусов с плацентой и повышении устойчивости фетоплацентарного барьера для патогенов [36].

Слияние миобластов

Скелетные мышцы человека состоят из мышечных волокон — симпластов, длина которых достигает нескольких сантиметров. Источником их развития служат стволовые клетки миотома, которые мигрируют в места закладок скелетных мышц. Из стволовых клеток образуются промиобласты, которые претерпевают несколько

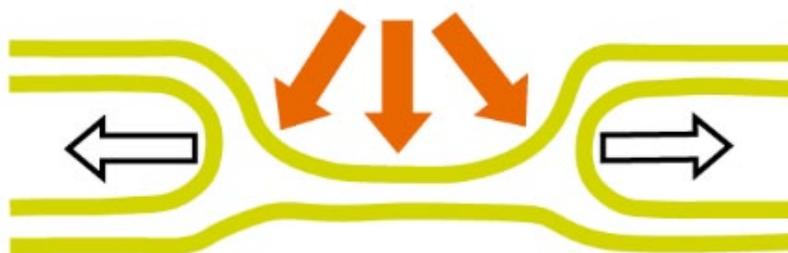


Рис. 5. Предположительная функция циркулярных подосом. Подосома оказывает механическое воздействие (показано стрелками) на двуслойную диафрагму, ускоряя её формирование и расширение

митотических делений, образуя инициальные миобласты (миобластическая стадия гистогенеза). Инициальные миобласты путем слияния образуют миосимпласты (миосимпластическая стадия). Миосимпласты растут как за счет синтеза специфических мышечных белков, так и за счет слияния с миобластами [37]. В результате роста образуются первичные миотубы, которые своими концами прикрепляются к сухожилиям (стадия мышечных трубочек). Популяция миотуб экспрессирует медленную изоформу тяжелых цепей миозина [38]. Вблизи первичных миотуб из промиоцитов формируются новые симпластические центры, являющиеся предшественниками вторичных миотуб [37, 39]. Из вторичных миотуб формируются быстрые мышечные волокна [40]. Также из промиоцитов образуются клетки-сателлиты [37]. Финальная стадия — стадия мышечных волокон — заключается в росте и созревании мышечных трубочек с образованием зрелых мышечных волокон. Таким образом, две стадии эмбрионального миогенеза из четырех зависят от процессов слияния клеток. Кроме того, после повреждения мышцы происходит активация миосателлитов, образование миобластов, их пролиферация и слияние друг с другом и с мышечными волокнами, за счет чего обеспечивается репаративная регенерация [2, 37]. Таким образом, процесс слияния клеток играет исключительно важную роль в развитии и восстановлении скелетной мышечной ткани.

Регуляцию миграции миобластов осуществляют интерлейкин 4, CD164 и маннозный рецептор, усиливающие скорость миграции. Однако простаглицлин, который замедляет миграцию миобластов, также ускоряет образование мышечных трубочек за счет того, что рецепторам малоподвижной клетки легче связаться с лигандами на мембране других клеток. Таким образом число образующихся мышечных трубочек зависит от соотношения концентраций позитивных и негативных регуляторов скорости миграции [41].

В адгезии миобластов участвуют нефрин [42], интегрины $\alpha 9 \beta 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, и цитоплазматический адаптерный белок киндлин-2 [43, 44], М-кадгерин [45], неогенин, CD36, нефронектин [2], галектин [46]. Контакт первичных миобластов между собой происходит в особых участках мембраны (липидных рафтах), обогащенных фосфатидилсеринем и холестерином [47]. В них располагается стабиллин-2, рецептор фосфатидилсерина, роль которого заключается в активации сигнальных путей ELMO/DOCK1/Rac1 и Gulp/Rac1 [48]. Оба сигнальных пути заканчиваются на Rac1, который является членом семейства малых ГТФаз. Данный белок активирует Arp 2/3, который инициирует полимеризацию актина, тем самым управляя цитоскелетом клетки. Также в реорганизацию актинового цитоскелета вовлечен динамин, который взаимодействует с множеством актин-связывающих белков, такими как профилин и контрактин [49]. Другим важным компонентом сигнальных путей, регулирующих слияние, является киназа FAK (Focal Adhesion Kinase, киназа фокальной адгезии), активирующаяся в ответ на связывание интегринными внеклеточных

лигандов. Ингибирование аутофосфорилирования FAK во время миогенной дифференцировки никак не влияет на экспрессию генов, связанных с дифференцировкой, но останавливает слияние миобластов, что указывает на наличие важной функции FAK в слиянии [2].

В мышечной ткани млекопитающих обнаружен фузоген синцитин-1 [6]. Нокаут гена данного белка приводит к достоверному уменьшению количества мышечной ткани у самцов, но не у самок, что означает, что он не участвует в процессах слияния миобластов у особой женского пола [50]. В настоящее время считается, что именно синцитин-1 ответственен за различия в количестве мышечной ткани у самцов и у самок [51].

Кандидатом на роль фузогена является трансмембранный белок 8с (Tmem8c), также известный как Myomaker, который экспрессируется в скелетных мышцах [52]. Нокаут гена *myomaker* приводит к гибели мышечных эмбрионов из-за полного отсутствия скелетных мышечных волокон: в тканях обнаруживаются только одноядерные предшественники. Отсутствие Myomaker не влияет на уровень миогенина, миозина и MyoD, что говорит о том, что этот белок выполняет свою функцию после дифференцировки и участвует непосредственно в слиянии. Это предположение подтверждается тем, что искусственно вызванная экспрессия Myomaker на мезенхимальных стромальных клетках и на фибробластах придает им способность к слиянию с миобластами [52]. Однако модифицированные таким образом фибробласты сливаются лишь с миобластами, но не между собой, что указывает на присутствие дополнительного фактора слияния именно на миобластах. Таким фактором является белок Gm7325 (Myomegrer/Myomixer/Minion) [53]. Фибробласты с экспрессией Myomegrer способны сливаться с Myomaker-позитивными клетками. В отличие от Myomaker, отсутствие Myomegrer блокирует слияние не полностью. Вероятно, существуют и другие фузогенные факторы [53].

При исследовании миобластов плодовых мушек *Drosophila melanogaster* в местах контакта миобластов были обнаружены инвазивные подосомы, или инвазиосомы [54, 55]. Они представляют собой выпячивания мембраны, структурно сходные с подосомами. В организме человека инвазиосомы образуются в процессе трансцитоза лейкоцитов через эндотелий сосудов [56]. Похожие структуры участвуют в слиянии предшественников остеокластов, их предположительная функция заключается в сближении определенных участков клеточных мембран на максимально близкое расстояние, что облегчает формирование липидного мостика, а также в формировании и расширении мембранной поры в месте контакта мембран двух клеток (рис. 5).

Вполне вероятно, что в организме млекопитающих слияние миобластов происходит также с помощью инвазивных подосом. Есть несколько свидетельств в пользу данной гипотезы. Во-первых, в процессе слияния миобластов участвует большое количество белков, гомологичных таковым у дрозофил [54, 57], что свидетельствует об эволюционной консервативности этого процесса.

Во-вторых, существуют описания структур, напоминающих инвазиосомы. Многие авторы описывают филоподии и подосомы в культуре мышечных клеток [58–63]. Таким образом, есть основания считать, что инвазиосомы участвуют в миогистогенезе человека.

Слияние макрофагов

Слияние макрофагов приводит к образованию двух типов многоядерных клеток: остеокластов, предназначенных для резорбции костной ткани и гигантских клеток инородных тел и гигантских клеток гранулем. Молекулярные механизмы, обеспечивающие формирование этих клеток, имеют некоторые различия.

Формирование гигантских клеток инородных тел происходит под влиянием IL-4 и IL-13 [64]. Их эффект заключается в увеличении экспрессии белков, участвующих в слиянии (таких как *e*-кадгерин и DC-STAMP) и реализуется при помощи сигнального пути STAT-6 [64–66]. Также слияние усиливается под воздействием гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, IL-17A и интерферона гамма [67]. Клетки Лангханса в туберкулезных гранулемах образуются под воздействием микобактериальных гликолипидов – фосфатидил-*мио*-инозитолманнозидов и липоманнанов. Эти вещества распознаются при помощи toll-подобного рецептора 2, что приводит к активации сигнального пути, включающего в себя ADAM9 и интегрин β 1 [68]. Кроме этого, макрофаги экспрессируют на своей мембране рецептор TREM2 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2). TREM2 связан с адаптерным белком DAP12 [69], который влияет на экспрессию DC-STAMP и *e*-кадгерина [68, 70]. Лиганд TREM2 не известен, предположительно, он располагается на макрофагах [68]. Если это предположение верно, то макрофаги способны коммитироваться к слиянию только лишь за счет взаимодействия друг с другом. Следует отметить, что макрофаги в норме сливаются друг с другом без видимых внешних воздействий, и уровень такого слияния снижается при ингибировании активности DAP12 [71].

Для активации формирования остеокластов требуются другой набор цитокинов: RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor κ B Ligand) и макрофагальный колониестимулирующий фактор. RANKL связывается со своим рецептором RANK, находящимся на мембране предшественников остеокластов. Это событие приводит к активации фактора транскрипции NFATc1, что влечет за собой изменение транскрипции большого количества генов, происходящее при участии транскрипционного фактора NF- κ B [72]. Под управлением RANK находится большая часть белков, влияющих на слияние макрофагов, за исключением CD44, CD47 и TREM2 [73]. Остеокласты увеличивают количество ядер не только посредством слияния, но и путем незавершенного цитокинеза. Данный процесс также регулируется при помощи RANK [74]. RANK не является единственным активатором NF- κ B, другим активатором является цитоплазматический домен CD44 (рецептора гиалуроновой кислоты) [75].

Хемокин CCL2 является одним из факторов хемотаксиса макрофагов, а также способствует их слиянию, влияя на экспрессию DC-STAMP, MMP9 [76, 77]. Предположительно, рецептором CCL2 является мембранный белок DC-STAMP, который регулирует формирование остеокластов и гигантских клеток. Его инактивация приводит к нарушению слияния клеток без нарушения их функций [78]. Существует несколько гипотез насчет функций этой молекулы: участие в перестройках цитоскелета, выбор партнера для слияния, рецепция мембранного или растворимого белка [79]. Наличие в цитоплазматическом домене мотива ITIM указывает на роль DC-STAMP

в проведении внутриклеточного сигнала. Кроме того, на остеокластах обнаружен сходный по строению белок OS-STAMP, который также оказывает значительное влияние на их формирование. Вероятно, DS-STAMP и OS-STAMP функционируют как димер [79]. Экспрессия обеих молекул регулируется с помощью STAT-1 и STAT-6 [80].

Адгезия макрофагов друг к другу происходит за счет E-кадгерина [71] и, вероятно, интегринов. Интегрины- β опосредуют адгезию макрофагов между собой под действием липидов клеточной стенки бактерий, антитела к интегрину- β 1 и 2 блокируют слияние *in vitro*. Однако, есть данные, что интегрины не обеспечивают адгезию макрофагов между собой, а участвуют в их прикреплении к субстрату [81].

Образование остеокластов сопровождается формированием циркулярных подосом. Известно, что в формировании этих структур принимают участие белок Tks5 и тирозинкиназа Src [72].

Перестройки цитоскелета, которые необходимы для образования подосом, включают в себя механизмы, аналогичные процессам в миобластах: фактор обмена гуаниновых нуклеотидов DOCK180 активирует малую ГТФазу Ras1, что приводит к передаче сигнала на белки, связанные с актином [81, 82]. Также в перестройках цитоскелета участвует динамин-2 [83]. Формирование гигантских клеток сопровождается образованием ламеллоподий, что происходит при участии Ras1 [81].

На этапе слияния плазмалемм происходят изменения в распределении фосфолипидов: в участках контакта фосфатидилсерин перемещается из внутреннего слоя мембраны в наружный [84]. Фосфолипиды распознаются scavenger-рецепторами CD36 [85]. Предположительно, распределение фосфолипидов на мембране изменяется с помощью пуринового рецептора P2X7: его непродолжительная активация изменяет расположение фосфатидилсерина на мембране [86]. P2X7 необходим для формирования всех типов гигантских клеток [68]. Наличие фосфатидилсерина на наружном слое мембраны является признаком, по которому макрофаги распознают (с помощью CD36) апоптотические тельца перед их фагоцитозом [87]. Чтобы избежать случайного фагоцитоза, данный процесс блокируется с помощью CD47 и его рецептора SIRP-а (MFR) [88].

В слиянии макрофагов принимают участие белки, влияющие на процесс слияния других клеток. В частности, на макрофагах обнаружена экспрессия синцитина-1 и коннексина-43, которые работают на поздних стадиях остеокластогенеза [89, 90]. Доказано, что в слиянии участвует ADAM12, однако функция этого белка не ясна [91]. Тетраспанины CD9 и CD81 тормозят образование гигантских клеток из макрофагов, хотя усиливают слияние миобластов и процесс оплодотворения [17, 92]. Предположительно, эти тетраспанины оказывают ингибирующий эффект на матриксную металлопротеазу MMP9 [93], которая отщепляет внеклеточные домены различных мембранных белков, переводя их в активную форму, либо способствуя максимальному сближению мембран [76]. Примечательно, что одномоментный нокаут CD9 и CD81 способствует значительному увеличению уровня слияния. Другой тетраспанин CD63, напротив, способствует слиянию макрофагов [93].

Гетеротипическое слияние клеток костномозгового происхождения

Костный мозг является источником клеток, способных сливаться с множеством других видов клеток человеческого организма. Стромальные клетки костного мозга способны сливаться с миобластами [94],

гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), предположительно, сливаются с гепатоцитами [95] и энтероцитами [96], а также между собой [97]. К слиянию с кардиомиоцитами, нейронами Пуркинье и гепатоцитами способны как клетки миелоидного ряда, так и лимфоциты [98].

Слияние клеток, образовавшихся в костном мозге, с клетками печени было подтверждено во время экспериментов на мышцах с мутацией в гене *Fah* (фумарил-ацетат-гидролаза): после пересадки костного мозга от здоровой мыши к мутанту, в гепатоцитах обнаруживалась экспрессия *Fah*, а при пересадках от самцов к самкам в некоторых гепатоцитах появлялась Y-хромосома [99]. Следует отметить, что, хотя у взрослого человека 30–40% гепатоцитов являются полиплоидными, большая их часть образуется из-за нарушения цитокинеза, а не путем слияния [100]. Незначительное количество многоядерных гепатоцитов (менее 1 клетки на 30000000) образуются в результате гомотипического слияния [101]. Однако, некоторые исследователи [102] отрицают возможность слияния ГСК с гепатоцитами. По одной из версий, данное слияние происходит спонтанно из-за того, что у модельных животных мембрана гепатоцитов была повреждена токсическими агентами, которые использовались для изучения процессов повреждения и регенерации печени. Кроме того, это явление обнаружено только у модельных животных, но не у человека.

Другой вид клеток, способный к слиянию с клетками костного мозга, — нейроны Пуркинье [7]. То, что двухъядерные нейроны в мозжечке образуются именно путем

слияния, было доказано экспериментами с пересадкой костного мозга мышам от GFP-позитивных доноров к GFP-негативным реципиентам противоположного пола (GFP-зеленый флуоресцентный белок) [103]. Со временем гибридные клетки прекращали экспрессию белков CD11b и CD45, характерных для клеток костномозгового происхождения, и начинали экспрессировать зеленый флуоресцентный белок GFP, который находился под контролем промотора L7-rscr-2, специфичного для клеток Пуркинье. Эти наблюдения указывают на то, что в донорском ядре началась экспрессия нейрональных генов [103].

Количество слияний клеток костномозгового происхождения с клетками других тканей значительно увеличивается если в этих тканях протекает воспалительный процесс, и снижается под воздействием противовоспалительных препаратов (преднизолон) [11, 104], что указывает связь этого феномена с воспалением. Однако, имеющихся данных явно недостаточно, чтобы можно было сделать фундаментальные выводы. Данное явление требует дальнейшего тщательного изучения. Суммарные данные о белках, задействованных на различных этапах клеточного слияния, представлены в таблице 2.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-30066).

Таблица 2. Белки, задействованные на различных этапах слияния клеток

Событие	Коммитирование	Миграция	Адгезия	Слияние
Оплодотворение	—	—	IZUMO1, Juno TSSK6 CD9 CD81	Синцитин1 ASCT2
Формирование трофобласта	EGF/EGFR LIF GM-CSF Активин А ХГЧ	—	Е-кадгерин Кадгерин-1 ZO-1 Эзрин Коннексин-43	синцитин-1 ASCT2, синцитин-2 MFSD2a
Слияние миобластов	—	IL-4 Маннозный рецептор CD164 Простаглицин	Нефрин Интегрины Киндлин Е-кадгерин Неогенин Нефронектин	Синцитины (мужчины) Myomaker? Myomerger?
Слияние макрофагов	IL-4 IL-13 RANK TLR-2 TREM-2 DAP-12 M-CSF CD44 CCL2 DC-STAMP	CCL2 DC-STAMP	Е-кадгерин Интегрины CD36 Коннексин-43 MMP9 Тетраспанины	P2X7 Синцитины

ЛИТЕРАТУРА:

- Batsida-Ruiz D., Van Hoesen K., Cohen M. The dark side of cell fusion. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(5). doi: 10.3390/ijms17050638.
- Hindi S.M., Tajrishi M.M., Kumar A. Signaling Mechanisms in Mamalian Myoblast Fusion. *Sci. Signal.* 2013; 6(272): re2. doi: 10.1126/scisignal.2003832.
- Ishii M., Saeki Y. Osteoclast cell fusion: mechanisms and molecules. *Modern Rheumatology* 2008; 18(3): 220–7.
- Hernandez J.M., Podbilewicz B. The hallmarks of cell-cell fusion. *Development* 2017; 144(24): 4481–95.
- Gerbaud P., Pidoux G. Review: An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. *Placenta* 2015; 36 Suppl 1: 35–42.
- Bjerregaard B., Lemmen J.G., Petersen M.R. et al. Syncytin-1 and its receptor is present in human gametes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2014; 31(5): 533–9.

7. Søre K., Andersen T.L., Hobolt-Pedersen A.S. et al. Involvement of human endogenous retroviral syncytin-1 in human osteoclast fusion. *Bone* 2011; 48(4): 837–46.
8. Bjerregard B., Ziolkiewicz I., Schulz A. et al. Syncytin-1 in differentiating human myoblasts: relationship to caveolin-3 and myogenin. *Cell Tissue Res.* 2014; 357(1): 355–62.
9. Lokossou A.G., Toudic C., Barbeau B. Implication of Human Endogenous Retrovirus Envelope Proteins in Placental Functions. *Viruses* 2014; 6(11): 4609–27.
10. Palermo A., Doyonnas R., Bhutani N. et al. Nuclear reprogramming in heterokaryons is rapid, extensive, and bidirectional. *FASEB Journal* 2009; 23(5): 1431–40.
11. Kemp K., Wilkins A., Scolding N. Cell fusion in the brain: two cells forward, one cell back. *Acta Neuropathol.* 2014; 128(5): 629–38.
12. Tash J.S., Means A.R. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol. Reprod.* 1983; 28(1): 75–104.
13. Sebkova N., Ded L., Vesela K. et al. Progress of sperm IZUMO1 relocation during spontaneous acrosome reaction. *Reproduction* 2013; 147(2): 231–40.
14. Inoue N., Ikawa M., Okabe M. The mechanism of sperm-egg interaction and the involvement of IZUMO1 in fusion. *Asian J. Androl.* 2011; 13(1): 81–7.
15. Stein K.K., Primakoff P., Myles D. Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *J. Cell Sci.* 2004; 117(Pt 26): 6269–74.
16. Krauchunas A.R., Marcello M.R., Singson A. The molecular complexity of fertilization: Introducing the concept of a fertilization synapse. *Mol. Reprod. Dev.* 2016; 83(5): 376–86.
17. Barraud-Lange V., Naud-Barriant N., Saffar L. Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization. *BMC Dev Biol.* 2007; 7: 102. doi: 10.1186/1471-213X-7-102.
18. Inoue N., Hamada D., Kamikubo H. et al. Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development* 2013; 140(15): 3221–9.
19. Bianchi E., Doe B., Goulding D. et al. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 2014; 508(7497): 483–7.
20. Inoue N., Hagihara Y., Wright D. et al. Oocyte-triggered dimerization of sperm IZUMO1 promotes sperm-egg fusion in mice. *Nat. Commun.* 2015; 6:8858. doi: 10.1038/ncomms9858.
21. Termini C.M., Gillette J.M. Tetraspanins Function as Regulators of Cellular Signaling. *Front. Cell. Dev. Biol.* 6; 5: 34. doi: 10.3389/fcell.2017.00034.
22. Tachibana I., Hemler M.E. Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J. Cell Biol.* 1999; 146(4): 893–904.
23. Takeda Y., Tachibana I., Miyado K. Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *J. Cell Biol.* 2003; 161(5): 945–56.
24. Le Naour F., Rubinstein E., Jasmin C. et al. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 2000; 287(5451): 319–21.
25. Klinovska K., Sebkova N., Dvorakova-Hortova K. Sperm-Egg fusion: a molecular enigma of mammalian reproduction. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15(6): 10652–68.
26. Jahromi S., Shamsir M. Construction and Analysis of the Cell Surface's Protein Network for Human Sperm-Egg Interaction. *ISRN Bioinformatics* 2013; doi:10.1155/2013/962760.
27. Sabetian S., Shamsir M.S., Abu Naser M. Functional features and protein network of human sperm-egg interaction. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2014; 60(6): 329–37.
28. Chen H., Sampson N.S. Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg alpha6beta1 integrin is the receptor for sperm fertilin beta. *Chemistry & Biology* 1999; 6(1): 1–10.
29. Gauster M., Moser G., Orendi K. et al. Factors Involved in Regulating Trophoblast Fusion: Potential Role in the Development of Preeclampsia. *Placenta* 2009; 30 Suppl A: 49–54.
30. Getsios S., MacCalman C.D. Cadherin-11 modulates the terminal differentiation and fusion of human trophoblastic cells in vitro. *Dev. Biol.* 2003; 257(1): 41–54.
31. Getsios S., Chen G.T., MacCalman C.D. Alpha-, beta-, gamma-catenin, and p120(CTN) expression during the terminal differentiation and fusion of human mononucleate cytotrophoblasts in vitro and in vivo. *Mol. Reprod. Dev.* 2001; 59(2): 168–77.
32. Aghababaei M., Hogg K., Perdu S. et al. ADAM12-directed ectodomain shedding of E-cadherin potentiates trophoblast fusion. *Cell Death Differ.* 2015; 22(12): 1970–84.
33. Pidoux G., Gerbaud P., Dompierre J. et al. PKA-ezrin-connexin 43 signaling controls gap junction communication and thereby trophoblast cell fusion. *J. Cell Sci.* 2014; 127(Pt 19): 4172–85.
34. Kudo Y., Boyd C.A. Changes in expression and function of syncytin and its receptor, amino acid transport system B(O) (ASCT2), in human placental choriocarcinoma BeWo cells during syncytialization. *Placenta* 2002; 23(7): 536–41.
35. Toufaily C., Vargas A., Lemire M. et al. MFSD2a, the Syncytin-2 receptor, is important for trophoblast fusion. *Placenta* 2013; 34(1): 85–8.
36. Sugimoto J., Sugimoto M., Bernstein H. et al. A novel human endogenous retroviral protein inhibits cell-cell fusion. *Sci. Rep.* 2013; 3: 1462. doi: 10.1038/srep01462.
37. Данилов Р.К. Руководство по гистологии. Том 1. 2-е издание, исправленное и дополненное. СПб: СпецЛит; 2011.
38. Kelly A.M., Rubinstein N.A. Why are fetal muscles slow? *Nature* 1980; 288: 266–9.
39. Duxson M.J., Usson Y., Harris A.J. The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies. *Development* 1989; 107: 743–50.
40. Matsakas A., Otto A., Elashry M.I. et al. Altered primary and secondary myogenesis in the myostatin-null mouse. *Rejuvenation Res.* 2010; 13(6): 717–27.
41. Zhou X., Platt J.L. Molecular and Cellular Mechanisms of Mammalian Cell Fusion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011; 713: 33–64.
42. Sohn R.L., Huang P., Kawahara G. et al. A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate skeletal muscle cell fusion. *PNAS USA* 2009; 106(23): 9274–9.
43. Lafuste P., Sonnet C., Chazaud B. et al. ADAM12 and alpha9beta1 integrin are instrumental in human myogenic cell differentiation. *Mol. Biol. Cell* 2005; 16(2): 861–70.
44. Schwander M., Leu M., Stumm M. et al. Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev. Cell* 2003; 4(5): 673–85.
45. Hollnagel A., Grund C., Franke W.W. et al. The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration. *Mol. Cell Biol.* 2002; 22(13): 4760–70.
46. Georgiadis V., Stewart H.J., Pollard H.J. Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. *Dev. Dyn.* 2007; 236(4): 1014–24.
47. Demombreun A.R., Biersmith B.H., McNally E.M. Membrane fusion in muscle development and repair. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015; 45: 48–56.
48. Kim G.W., Park S.Y., Kim I.S. Novel function of stabilin-2 in myoblast fusion: the recognition of extracellular phosphatidylserine as a "fuse-me" signal. *BMB Rep.* 2016; 49(6): 303–4.
49. Shin N.Y., Choi H., Neff L. et al. Dynamin and endocytosis are required for the fusion of osteoclasts and myoblasts. *Journal of Cellular Biology* 2014; 207(1): 73–89.
50. Redelsperger F., Raddi N., Bacquin A. et al. Genetic Evidence That Captured Retroviral Envelope Syncytins Contribute to Myoblast Fusion and Muscle Sexual Dimorphism in Mice. *PLoS Genet.* 2016; 12(9): e1006289. doi:10.1371/journal.pgen.1006289.
51. Frese S., Ruebner M., Suhr F. et al. Long-Term Endurance Exercise in Humans Stimulates Cell Fusion of Myoblasts along with Fusogenic Endogenous Retroviral Genes In Vivo. *PLoS One* 2015; 10(7): e0132099. doi: 10.1371/journal.pone.0132099.
52. Millay D.P., O'Rourke F.R., Sutherland L.B. et al. Myomaker: A membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* 2013; 499(7458): 301–5.
53. Quinn M.E., Goh Q., Kurosaka M. et al. Myomerger induces fusion of non-fusogenic cells and is required for skeletal muscle development. *Nat. Commun.* 2017; 8: 15665. doi: 10.1038/ncomms15665.
54. Kim J.H., Jin P., Duan R. et al. Mechanisms of myoblast fusion during muscle development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2015; 32: 162–70.
55. Sung B.H., Weaver A. Cell-cell fusion: a new function for invadosomes. *Curr. Biol.* 2011; 21(3): 121–3.
56. Carman C.V., Sage P.T., Sciuto T.E. et al. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* 2007; 26(6): 784–97.
57. Abmayr S.M., Pavlath G.K. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* 2012; 139(4): 641–56.
58. Yoon S., Molloy M.J., Wu M.P. et al. C6ORF32 is upregulated during muscle cell differentiation and induces the formation of cellular filopodia. *Dev. Biol.* 2007; 301(1): 70–81.
59. Mukai A., Hashimoto N. Localized cyclic AMP-dependent protein kinase activity is required for myogenic cell fusion. *Exp. Cell Res.* 2008; 314(2): 387–97.
60. Mukai A., Kurisaki T., Sato S.B. et al. Dynamic clustering and dispersion of lipid rafts contribute to fusion competence of myogenic cells. *Exp. Cell Res.* 2009; 315(17): 3052–63.
61. Nowak S.J., Nahirney P.C., Hadjantonakis A.K. et al. Nap1-mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion. *J. Cell Sci.* 2009; 122(Pt 18): 3282–93.
62. Städler B., Blättler T.M., Franco-Obregón A. Time-lapse imaging of In Vitro myogenesis using atomic force microscopy. *J. Microsc.* 2010; 237(1): 63–9.
63. Шурьгина О.В., Ямщиков Н.В., Абрамов В.Н. и соавт. Эмбриональное развитие мышечных тканей стенки влагалища крыс. *Фундаментальные исследования* 2014; 7(часть 4): 812–6.
64. Helming L., Gordon S. The molecular basis of macrophage fusion. *Immunobiology* 2007; 212(9–10): 785–93.
65. Moreno J.L., Mikhailenko I., Tondravi M.M. et al. IL-4 promotes the formation of multinucleated giant cells from macrophage precursors by a STAT6-dependent, homotypic mechanism: contribution of E-cadherin. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 82(6): 1542–53.
66. Yagi M., Ninomiya K., Fujita N. et al. Induction of DC-STAMP by alternative activation and downstream signaling mechanisms. *J. Bone Miner. Res.* 2007; 22(7): 992–1001.
67. Helming L., Gordon S. Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends Cell Biol.* 2009; 19(10): 514–22.
68. Brodbeck W.G., Anderson J.M. Giant cell formation and function. *Curr. Opin. Hematol.* 2009; 16(1): 53–7.

69. Peng G., Malhotra S., Torchia J.A. et al. TREM2- and DAP12-dependent activation of PI3K requires DAP10 and is inhibited by SHIP1. *Sci. Signal.* 2010; 3(122): ra38. doi: 10.1126/scisignal.2000500.
70. Vivier E., Nunès J.A., Vély F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* 2004; 306(5701): 1517–9.
71. Helming L., Tomasello E., Kyriakides T.R. et al. Essential role of DAP12 signaling in macrophage programming into a fusion-competent state. *Sci. Signal.* 2008; 1(43): ra11. doi: 10.1126/scisignal.1159665.
72. Oikawa T., Oyama M., Kozuka-Hata H. et al. Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion. *J. Cell Biol.* 2012; 197(4): 553–68.
73. Xing L., Xiu Y., Boyce B.F. Osteoclast fusion and regulation by RANKL-dependent and independent factors. *World J. Orthop.* 2012; 3(12): 212–22.
74. Takegahara N., Kim H., Mizuno H. et al. Involvement of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL)-induced Incomplete Cytokinesis in the Polyploidization of Osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 2016; 291(7): 3439–54.
75. Cui W., Ke J.Z., Zhang Q. et al. The intracellular domain of CD44 promotes the fusion of macrophages. *Blood* 2006; 107(2): 796–805.
76. Miyamoto K., Ninomiya K., Sonoda K. et al. MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 383(3): 373–7.
77. MacLauchlan S., Skokos E.A., Meznarich N. et al. Macrophage fusion, giant cell formation, and the foreign body response require matrix metalloproteinase 9. *J. Leukoc. Biol.* 2009; 85(4): 617–26.
78. Yagi M., Miyamoto T., Sawatani Y. et al. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J. Exp. Med.* 2005; 202(3): 345–51.
79. Chiu Y.H., Ritchlin C.T. DC-STAMP: A Key Regulator in Osteoclast Differentiation. *J. Cell. Physiol.* 2016; 231(11): 2402–7.
80. Miyamoto H., Katsuyama E., Miyauchi Y. et al. An essential role for STAT6-STAT1 protein signaling in promoting macrophage cell-cell fusion. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(39): 32479–84.
81. Jay S.M., Skokos E., Laiwalla F. et al. Foreign body giant cell formation is preceded by lamellipodia formation and can be attenuated by inhibition of Rac1 activation. *Am. J. Pathol.* 2007; 171(2): 632–40.
82. Pajcini K.V., Pomerantz J.H., Alkan O. et al. Myoblasts and macrophages share molecular components that contribute to cell-cell fusion. *J. Cell Biol.* 2008; 180(5): 1005–19.
83. Verma S.K., Leikina E., Melikov K. et al. Late stages of the synchronized macrophage fusion in osteoclast formation depend on dynamin. *Biochem. J.* 2014; 464(3): 293–300.
84. van den Eijnde S.M., van den Hoff M.J., Reutelingsperger C.P. et al. Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *J. Cell Sci.* 2001; 114(Pt. 20): 3631–42.
85. Helming L., Winter J., Gordon S. The scavenger receptor CD36 plays a role in cytokine-induced macrophage fusion. *J. Cell Sci.* 2009; 122(Pt. 4): 453–9.
86. Lemaire I., Falzoni S., Leduc N. et al. Involvement of the purinergic P2X7 receptor in the formation of multinucleated giant cells. *Biochem. J.* 2014; 464(3): 293–300.
87. Greenberg M.E., Sun M., Zhang R. et al. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 2006; 203(12): 2613–25.
88. Lundberga P., Koskinena C., Baldock P.O. et al. Osteoclast formation is strongly reduced both in vivo and in vitro in the absence of CD47/SIRP α -interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 352(2): 444–8.
89. Hobolt-Pedersen A.S., Delaisse J.N., Sørensen K. Osteoclast Fusion is Based on Heterogeneity Between Fusion Partners. *Calcif. Tissue Int.* 2014; 95(1): 73–82.
90. Møller A.M., Delaisse J.M., Sørensen K. Osteoclast Fusion: Time-Lapse Reveals Involvement of CD47 and Syncytin-1 at Different Stages of Nuclearity. *J. Cell. Physiol.* 2017; 232(6): 1396–403.
91. Miyamoto T. STATs and macrophage fusion. *JAKSTAT* 2013; 2(3): e24777. doi: 10.4161/jkst.24777.
92. Takeda Y., He P., Tachibana I. et al. Double deficiency of tetraspanins CD9 and CD81 alters cell motility and protease production of macrophages and causes chronic obstructive pulmonary disease-like phenotype in mice. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(38): 26089–97.
93. Parthasarathy V., Martin F., Higginbottom A. et al. Distinct roles for tetraspanins CD9, CD63 and CD81 in the formation of multinucleated giant cells. *Immunology* 2009; 127(2): 237–48.
94. Shi D., Reinecke H., Murry C.E. et al. Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells. *Blood* 2004; 104(1): 290–4.
95. Körbling M., Katz R.L., Khanna A. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N. Eng. J. Med.* 2002; 346(10): 738–46.
96. de Jong J.H., Rodermond H.M., Zimmerlin C.D. et al. Fusion of intestinal epithelial cells with bone marrow derived cells is dispensable for tissue homeostasis. *Sci. Rep.* 2012; 2: 271. doi: 10.1038/srep00271.
97. Skinner A.M., Grompe M., Kurre P. Intra-hematopoietic cell fusion as a source of somatic variation in the hematopoietic system. *J. Cell Sci.* 2012; 125(12): 2837–43.
98. Nygren J.M., Liuba K., Breitbach M. et al. Myeloid and lymphoid contribution to non-hematopoietic lineages through irradiation-induced heterotypic cell fusion. *Nat. Cell Biol.* 2008; 10(5): 584–92.
99. Wang X., Willenbring H., Akkari Y. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422(6934): 897–901.
100. Gentric G., Desdouets C. Polyploidization in liver tissue. *Am. J. Pathol.* 2014; 184(2): 322–31.
101. Willenbring H., Bailey A.S., Foster M. et al. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat. Med.* 2004; 10(7): 744–8.
102. Masson S., Harrison D.J., Plevris J.N. et al. Potential of Hematopoietic Stem Cell Therapy in Hepatology: A Critical Review. *Stem Cells* 2004; 22(6): 897–907.
103. Weimann J.M., Johansson C.B., Trejo A. et al. Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat. Cell Biol.* 2003; 5(11): 959–66.
104. Davies P.S., Powell A.E., Swain J.R. et al. Inflammation and Proliferation Act Together to Mediate Intestinal Cell Fusion. *PLoS One* 2009; 4(8): e6530. doi: 10.1371/journal.pone.0006530.

Поступила: 20.04.2018

СТВОЛОВЫЕ И (ИЛИ) ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Н.С. Сергеева^{1,2}, Ю.Д. Хесуани³, А.П. Поляков¹, В.А. Миронов³, А.Д. Каприн¹

¹ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена — филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский Университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

³ 3D-Биопринтинг Солюшенс, Москва, Россия

STEM (PROGENITOR) THYROID CELLS AND THEIR PROBABLE APPLICATIONS IN TISSUE ENGENIRING N.S. Sergeeva^{1,2}, Yu.D. Hesuan³, A.P. Poljakov¹, V.A. Mironov³, A.D. Kaprin¹

¹ P.A. Herzen Moscow Oncology Research Institute — a branch of National Medical Research Center of Radiology, Moscow, Russia

² N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ 3D-bioprinting solutions, Moscow, Russia

e-mail: prognoz.O1@mail.ru

В обзоре представлены данные литературы, касающиеся эмбриогенеза, физиологической и репаративной регенерации щитовидной железы (ЩЖ) в постнатальном периоде в аспекте обоснования наличия в ее тканях стволовых и(или) прогениторных клеток. Систематизированы данные, касающиеся генетических и белковых маркеров стволовых клеток ЩЖ, а также маркеров их тиреоидифференцировки. Обсуждаются нерешенные проблемы и перспективы использования стволовых и(или) прогениторных клеток ЩЖ в тканевой инженерии.

Ключевые слова: щитовидная железа, стволовые клетки, физиологическая и репаративная регенерация.

К наиболее распространенным заболеваниям щитовидной железы (ЩЖ), компрометирующим ее функцию, относятся зоб, аденомы, а также аутоиммунные процессы. В схему лечения больных с этими заболеваниями входит заместительная гормонотерапия. Альтернативой заместительной гормонотерапии могли бы стать новые, более физиологичные биомедицинские стратегии восстановления ее функции, и, в частности, клеточная терапия и тканевая инженерия [1, 2]. Однако сегодня биофабрикация эндокринных желез пока находится на самых ранних этапах становления, являясь в то же время, одним из наиболее активно развивающихся сегментов биоинженерии органов [2–5].

Обоснованием реальности такого биотехнологического подхода к использованию ЩЖ явились результаты исследований механизмов физиологической и репаративной регенерации ЩЖ и гиперпластических процессов в этом органе.

Так, было установлено, что в норме клетки ЩЖ за жизнь индивидуума обновляются около 5 раз [6, 7]. При резекции ЩЖ, она, как и печень, в ряде случаев регенерирует до исходного объема [8]. При гемитиреоидэктомии остаточная ЩЖ гипертрофируется по механизму обратной связи [9]. Свидетельством способности ЩЖ к обновлению являются гиперпластические и гипертрофические процессы в этом органе, например, при зобе [10]. Эти факты закономерно привели к предположению о наличии в структуре ЩЖ стволовых клеток (СК), а, следовательно, создали предпосылки к возможности биоинженеринга ЩЖ.

Фундаментом этого направления стали эмбриологические исследования, систематизированные в ряде обзоров. В частности, T.F. Davis и соавт. (2011) представили клеточные и молекулярные механизмы, обеспечивающие развитие ЩЖ мыши и человека [2]. Значимость этих исследований в аспекте

The review presents literature data on embryogenesis, physiological and reparative thyroid gland (TG) regeneration in the postnatal period in terms of substantiating the presence of stem/progenitor cells in its tissue. The data concerning genetic and protein markers of thyroid stem cells, as well as markers of their thyroid differentiation, are systematized. Unresolved problems and perspectives of the use of thyroid stem/progenitor cells in tissue engineering are discussed.

Keywords: thyroid gland, stem cells, physiological and reparative regeneration.

биоинженеринга состоит в создании основ для понимания того, как из СК ЩЖ *in vitro* получить дифференцированные тиреоциты (ТЦ) и функционально полноценные тиреоидные фолликулы (ТФ). На основе накопленных знаний авторами сформирована схема последовательной экспрессии в ранних клетках зародыша ряда транскрипционных факторов, обеспечивающих миграцию, активацию дифференцировки и функционализацию потомков эмбриональных СК (ЭСК) — то есть каскада событий, приводящих в эмбриогенезе к формированию фолликулов ЩЖ.

Так, миграцию и пролиферацию прогениторов, согласно этой схеме, обеспечивает экспрессия *Hhex*, *Ttf1*, *Foxe1* и *Pax8*. Активация рецептора (r) тиреотропного гормона гипофиза (rТТГ) индуцируется экспрессией транскрипционного фактора NIS (sodium iodide symporter). А присоединение ТТГ к активному рецептору на поверхности прогениторов приводит к активации синтеза тиреоидной пероксидазы (ТП), тиреоглобулина (ТГ), и, как следствие — к появлению у дифференцирующихся клеток способности захватывать йод и синтезировать тиреоидные гормоны. Эти процессы сопровождаются формированием фолликулов и созреванием в них прогениторов до ТЦ. Автор полагает, что часть ЭСК остается в сформированной в эмбриогенезе ЩЖ в так называемых «гнездах» — небольших скоплениях тиреоцито-подобных клеток между ТФ [2].

В 2012–2013 гг. нескольким группам ученых [1, 11–13] из ЭСК мыши и далее из ЭСК человека *in vitro* удалось получить ТЦ и ТФ. Протоколы дифференцировки ЭСК, использованные в обоих случаях, были сходными. Так, R. Ma и соавт. (2013) [12] показано, что для дифференцировки ЭСК мыши в тиреоидном направлении необходимы 2 транскрипционных фактора — NKX2-1 (он же TF-1 — тиреотропный фактор-1) и Pax8 (paired box gene), которые были описаны группой под руководством P. Cruss (1998) [14]. Данные гены синергично

активируются с генами NIS, rTТГ, ТГ и ТП, если при индукции тиреоидифференцировки использовали активин А и ТТГ. Экспрессия генов ТЦ в ЭСК начиналась после их трансфекции Pax8 и NKX2-1. При 3D культивировании ТЦ спонтанно формировали фолликулы [12]. Однако функциональность этих фолликулов доказана не была.

В сходных условиях из ЭСК человека удалось получить *in vitro* ТФ, в клетках которых были экспрессированы гены ТГ, ТП и rTТГ [11, 15–22]. Позднее с помощью трансфекций генетических конструкций было доказано, что и для тиреоидной дифференцировки человеческих ЭСК необходима активация тех же транскрипционных факторов Pax8 и NKX2-1. Авторы показали, что в клетках сформированных ТФ экспрессирован и NIS, что в сочетании с экспрессией ТГ и ТП косвенно свидетельствует об активации йод-захватывающего каскада.

Данные об эмбриогенезе ЩЖ в сочетании с данными о возможности *ex vivo* дифференцировать ЭСК в тиреоидном направлении, а также клинические наблюдения физиологической и репаративной регенерации ЩЖ закономерно привели к поиску резидентных СК ЩЖ человека как возможному биоматериалу для ее биофабрикации.

Идентификация тиреоидных СК была почти одновременно осуществлена несколькими группами ученых [1, 23–25]. Источником клеток служила ткань ЩЖ, полученная после оперативных вмешательств по поводу зоба Хашимото или гипертиреозов. Общими генетическими маркерами этих клеток были Oct4, Pax8, Sox2 и NANOG, а дополнительными — GATA-4, HNF4 α (энтодермальные маркеры комитированных СК) и ABC-транспортёры (в частности, ABCG2), то есть все те же гены и транскрипционные факторы, которые активированы в ЭСК и в индуцированных плюрипотентных клетках. По иммунофенотипу СК ЩЖ характеризовались логичным сочетанием признаков — CD34⁺CD45⁻. Уникальных (для ЩЖ) маркеров СК пока не найдено.

Доля СК в ЩЖ составляет примерно 1/1000 [6]. Считается, что для них могут быть установлены, по крайней мере, три направления дифференцировки [26, 27]. В соответствующих индуцирующих «коктейлях» они способны дифференцироваться не только в «тиреоидном», но и «в адипогенном» направлении, экспрессируя соответствующие маркеры. А при культивировании с клетками нейробластомы в СК из ЩЖ экспрессировался β -тубулин, что косвенно свидетельствует о возможности их нейрональной дифференцировки. Таким образом «стволовость» этих клеток была подтверждена не только экспрессией ансамбля соответствующих генов, но и их пластичностью — способностью давать несколько клеточных линий.

Популяция СК ЩЖ, как и многих других тканей, оказалась фенотипически неоднородной. Так, N. Hoshi и соавт. (2007) в соответствии с экспрессией гена стволовых клеток Sca 1 разделили ее на 2 субпопуляции — CD45⁻cKit⁺, Oct4⁺, Sca1⁺ и CD45⁺cKit⁻, Oct4⁺, Sca1⁻ [28]. Обе эти субпопуляции не экспрессировали маркеры тиреоидной дифференцировки ТГ, rTТГ и транскрипционные факторы ТФ-1 и Pax8.

Кроме того, среди СК ЩЖ была выделена минорная популяция клеток — SP (side population), присутствующая среди резидентных СК ЩЖ во многих тканях, и не превышающая 0,3–1,4% всех клеток ЩЖ [3, 28–30]. SP-клетки в ЩЖ, как и общая популяция СК, подразделялась на 2 субпопуляции — Sca1⁺ и Sca1⁻ [19, 20]. Отличительной чертой SP клеток является способность выводить прижизненный краситель Hoechst 33342 [28, 30–33], что обусловлено экспрессией в этих клетках каскада ABC-транспортёров, и, в частности, ABCG2 [28, 34].

При 3D-культивировании в коллагене [3], на децеллюляризованном матриксе [5], в матригеле [28] или на оригинальном матриксе с повторяющимися полостями при задаваемом механическом векторе [5] СК ЩЖ формируют сфероидные колонии, которые после индукции тиреоидной дифференцировки реаранжируются в фолликулоподобные структуры, клетки которых позитивны по ТГ, ТП и rTТГ, перестают экспрессировать гены СК и начинают захватывать I¹²⁵. По мнению S. Kimura (2014) тиреоидные сферы формируют вокруг себя нишу, в которой СК дифференцируются в ТЦ [3].

Эта сформированная СК *in vitro* ниша является аналогом естественных ниш СК ЩЖ в межфолликулярном пространстве [3, 30]. Данные об участии SP-клеток в морфогенезе *in vitro* противоречивы: одни авторы отводят им ведущую роль [3], другие считают, что SP-клетки не участвуют в образовании фолликулов, оставаясь в межфолликулярных территориях [6].

В моделях гипотиреоза, вызванного химическими агентами, облучением, резекцией ЩЖ или аутоиммунизацией [3, 30], «помощь» в восстановлении фолликулов из СК в ЩЖ оказывают и ММСК, также находящиеся в межфолликулярной территории, и, кроме того, возможные, мигрирующие в ЩЖ из костного мозга.

Работы в области молекулярной биологии и биомоделирования с использованием стволовых и (или) прогениторных клеток ЩЖ закономерно привели к обсуждению проблемы биобезопасности. Ряд важных, накопленных к этому времени сведений, представлены ниже.

В СК ЩЖ, в том числе в SP-клетках экспрессирован ряд общих со стволовыми опухолевыми клетками (СОК) маркеров: Sca1, Oct4, p63 [35–40]. И в СК ЩЖ и в СОК ЩЖ активированы сходные сигнальные пути, в частности, β -катенин-ассоциированный Wnt сигнальный путь [40]. В SP-клетках ЩЖ экспрессирован STC (стагниокальцин), активированный и в опухолевых клетках ЩЖ [29].

Введение животным после тиреоидэктомии первичной культуры клеток из ЩЖ привело к формированию новых фолликулов, количество которых было пропорционально количеству имплантированных клеток, а также зависело от уровней Т3, Т4 и ТТГ [41–43]. Однако в отдельных случаях в графтах развивались аденомы и недифференцированные раки ЩЖ. Таким образом, было сделано заключение, что СОК ЩЖ (как и СОК новообразований других органов) происходят из резидентных СК ЩЖ [1].

В целом не вызывает сомнений, что физиологическая и репаративная регенерация ЩЖ — это реальные процессы, обеспечивающиеся наличием в ткани ЩЖ резидентных стволовых и(или) прогениторных клеток. Это открывает перспективы клеточной терапии и тканевой инженерии ЩЖ. В то же время многие авторы отмечают, что для трансляции экспериментальных достижений в клиническую практику нужно решить ряд проблем: создать приемлемые пошаговые (step-by-step) протоколы масштабирования стволовых и(или) прогениторных клеток ЩЖ *ex vivo* и их дифференцировки, формирования тиреоидных тиреоидных фолликулов, контроля их пролиферации и оценки их функциональности, включая способность захватывать йод и синтезировать гормоны [1, 4, 5]. Не подобраны пока и органотипические скаффолды, обеспечивающие формирование в биореакторах или при 3D-биопринтинге тканевых эквивалентов ЩЖ. Открытым остается вопрос об аллотрансплантациях, требующих иммуносупрессивной поддержки в аспекте обеспечения длительного функционирования тканевых эквивалентов ЩЖ в организме реципиента. И, наконец, протоколы биоинженеринга должны исключать или минимизировать риск злокачественной трансформации клеток на этапах *ex vivo*.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Fierabracci A. Identifying thyroid stem/progenitor cells: advances and limitations. *J. Endocrinol.* 2012; 213(1): 1–13.
2. Davies T.F., Latif R., Minshy N.C. et al. The Emerging Cell Biology of Thyroid Stem Cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; 96(9): 2692–702.
3. Kimura S. Thyroid Regeneration: How Stem Cells Play a Role? *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 2014; 5: 55.
4. Lin R.Y. New insights into thyroid stem cells. *Thyroid* 2007; 17(10): 1019–23.
5. Toni R., Tampieri A., Zini N. et al. Ex situ bioengineering of bioartificial endocrine glands: a new frontier in regenerative medicine of soft tissue organs. *Anat.* 2011; 193(5): 381–94.
6. Dumont J.E., Lamy F., Roger P. et al. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol. Rev.* 1992; 72(3): 667–97.
7. Coclet J., Foureaux F., Ketelbant P. et al. Cell population kinetics in dog and human adult thyroid. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 1989; 31(6): 655–65.
8. Johansen R., Gardner R.E., Galante M. et al. An experimental study of thyroid regeneration following subtotal thyroidectomy. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1951; 93(3): 303–9.
9. Clark O.H., Lambert W.R., Cavalieri R.R. et al. Compensatory thyroid hypertrophy after hemithyroidectomy in rats. *Endocrinology* 1976; 99(4): 988–95.
10. Gibelli B., El-Fattah A., Giugliano G. et al. Thyroid stem cells—danger or resource? *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 2009; 29(6): 290–5.
11. Antonica F., Kasprzyk D.F., Opitz R. et al. Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. *Nature* 2012; 491(7422): 66–71.
12. Ma R., Latif R., Davies T.F. Thyroid follicle formation and thyroglobulin expression in multipotent endodermal stem cells. *Thyroid* 2013; 23(4): 385–91.
13. Ma R., Latif R., Davies T.F. Human embryonic stem cells form functional thyroid follicles. *Thyroid* 2015; 25(4): 455–61.
14. Mansouri A., Chowdhury K., Cruss P. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nature Genetics* 1998; 19: 87–90.
15. Kikkawa F., Gonzalez F.J., Kimura S. Characterization of a thyroid-specific enhancer located 5.5 kilobase pairs upstream of the human thyroid peroxidase gene. *Mol. Cell. Biol.* 1990; 10(12): 6216–24.
16. Mizuno K., Gonzalez F.J., Kimura S. Thyroid-specific enhancer-binding protein (T/EBP): cDNA cloning, functional characterization, and structural identity with thyroid transcription factor TTF-1. *Mol. Cell. Biol.* 1991; 11(10): 4927–33.
17. Francis-Lang H., Price M., Polycarpou-Schwarz M. et al. Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 1992; 12(2): 576–88.
18. Civitareale D., Castelli M.P., Falasca P. et al. Thyroid transcription factor 1 activates the promoter of the thyrotropin receptor gene. *Mol. Endocrinol.* 1993; 7(12): 1589–95.
19. Civitareale D., Lonigro R., Sinclair A.J. et al. A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *EMBO J.* 1989; 8(9): 2537–42.
20. Shimura H., Okajima F., Ikuyama S. et al. Thyroid-specific expression and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate autoregulation of the thyrotropin receptor gene involves thyroid transcription factor-1. *Mol. Endocrinol.* 1994; 8(8): 1049–69.
21. Endo T., Kaneshige M., Nakazato M. et al. Thyroid transcription factor-1 activates the promoter activity of rat thyroid Na⁺/I⁻symporter gene. *Mol. Endocrinol.* 1997; 11(11): 1747–55.
22. Damante G., Tell G., DiLauro R. A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2001; 66: 307–56.
23. Thomas T., Nowka K., Lan L. et al. Expression of endoderm stem cell markers: evidence for the presence of adult stem cells in human thyroid glands. *Thyroid* 2006; 16: 537–44.
24. Lan L., Cui D., Nowka K. et al. Stem cells derived from goiters in adults form spheres in response to intense growth stimulation and require thyrotropin for differentiation into thyrocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 3681–8.
25. Fierabracci A., Puglisi M.A., Giuliani L. et al. Identification of an adult stem/progenitor cell-like population in the human thyroid. *J. Endocrinol.* 2008; 198: 471–87.
26. Pasca di Magliano M., Di Lauro R., Zannini M. Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *PNAS USA* 2000; 97(24): 13144–9.
27. Fierabracci A., Puglisi M.A., Giuliani L. et al. Identification of an adult stem/progenitor cell-like population in the human thyroid. *J. Endocrinol.* 2008; 198(3): 471–87.
28. Hoshi N., Kusakabe T., Taylor B.J. et al. Side population cells in the mouse thyroid exhibit stem/progenitor cell-like characteristics. *Endocrinology* 2007; 148(9): 4251–8.
29. Hayase S., Sasaki Y., Matsubara T. et al. Expression of stanniocalcin 1 in thyroid side population cells and thyroid cancer cells. *Thyroid* 2015; 25(4): 425–36.
30. Okamoto M., Hayase S., Miyakoshi M. et al. Stem cell antigen 1-positive mesenchymal cells are the origin of follicular cells during thyroid regeneration. *PLoS One* 2013; 8(11): e80801.
31. Goodell M.A., Brose K., Paradis G. et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* 1996; 183(4): 1797–806.
32. Zhou S., Schuetz J.D., Bunting K.D. et al. The ABC transporter Bcrp1/ABC2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* 2001; 7(9): 1028–34.
33. Golebiewska A., Brons N.H., Bjerkvig R. et al. Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. *Cell Stem Cell* 2011; 8(2): 136–47.
34. Hoshi N., Kusakabe T., Taylor B.J. et al. Side population cells in the mouse thyroid exhibit stem/progenitor cell-like characteristics. *Endocrinology* 2007; 148(9): 4251–8.
35. Thomas D., Friedman S., Lin R.Y. Thyroid stem cells: lessons from normal development and thyroid cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 2008; 15(1): 51–8.
36. Welm B.E., Tepera S.B., Venezia T.G. et al. Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Dev. Biol.* 2002; 245: 42–56.
37. Burger P.E., Xiong X., Coetzee S. et al. Sca-1 expression identifies stem cells in the proximal region of prostatic ducts with high capacity to reconstitute prostatic tissue. *PNAS USA* 2005; 102: 7180–5.
38. Xin L., Lawson D.A., Witte O.N. The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. *PNAS USA* 2005; 102: 6942–7.
39. Oh H., Bradfute S.B., Gallardo T.D. et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *PNAS USA* 2003; 100: 12313–8.
40. Gibelli B., El-Fattah A.M.A., Giugliano G. et al. Thyroid stem cells—danger or resource? *ACTA Otorhinolaryngologica Italica* 2009; 29: 290–5.
41. Clifton K.H., DeMott R.K., Mulcahy R.T. et al. Thyroid gland formation from inocula of monodispersed cells: early results on quantitation, function, neoplasia and radiation effects. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1978; 4(11–12): 987–90.
42. Mulcahy R.T., Rose D.P., Mitchen J.M. et al. Hormonal effects on the quantitative transplantation of monodispersed rat thyroid cells. *Endocrinology* 1980; 106(6): 1769–75.
43. Domann F.E., Mitchen J.M., Clifton K.H. Restoration of thyroid function after total thyroidectomy and quantitative thyroid cell transplantation. *Endocrinology* 1990; 127(6): 2673–8.

Поступила: 22.02.2018

РАКОВЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ

Н.С. Алкон¹, А.Е. Иванова¹, Е.И. Фролова¹, С.П. Чумаков^{1,2}

¹ Институт биоорганической химии имени акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

THERAPEUTIC STRATEGIES FOR TARGETING CANCER STEM CELLS

N.S. Alkon¹, A.E. Ivanova¹, E.I. Frolova¹, S.P. Chumakov^{1,2}

¹ M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the RAS, Moscow, Russia

² V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the RAS, Moscow, Russia

e-mail: stepan@chumakov.email

Раковые стволовые клетки (РСК) получают все большее признание как важные терапевтические мишени для лечения злокачественных опухолей. РСК обладают способностью к поддержанию собственной популяции и непрерывному пополнению гетероморфной массы опухоли новыми клетками. Считается, что рецидивы заболеваний могут возникать после терапии из-за сохранения в организме РСК. Поэтому сейчас особенное внимание уделяется исследованию сигнальных путей, активированных в РСК, а также потенциальных терапевтических мишеней, имеющих в фенотипе РСК. Выявленные маркеры, а также компоненты сигнальных путей, используются в доклинических и клинических исследованиях новых терапевтических подходов, среди которых выделяют поиск блокаторов сигнальных путей РСК, создание вакцин на основе активированных против РСК дендритных клеток, а также конструирование химерных антигенных рецепторов для применения в адоптивной клеточной терапии.

Ключевые слова: раковые стволовые клетки, иммунотерапия, маркеры раковых стволовых клеток, терапия рака.

Введение

Раковые стволовые клетки (РСК) — субпопуляция опухолевых клеток, способная в течение неограниченного или продолжительного времени поддерживать рост и развитие злокачественной опухоли [1]. Предполагается, что именно эти клетки принимают участие в формировании лекарственной устойчивости опухоли, а также в процессах метастазирования и возникновения рецидивов рака [2]. РСК составляют малую долю общей популяции опухолевых клеток, экспрессируют специфический набор маркеров, селективно поддерживают способность к онкогенезу, пополняют гетероморфную массу более дифференцированных опухолевых клеток, а также обладают устойчивостью к стандартной терапии.

Для успешного проведения комбинированной терапии необходимо уделить должное внимание целенаправленному уничтожению РСК. Современная биомедицина уже владеет целым арсеналом терапевтических агентов; продолжается непрерывная разработка новых, направленных против маркеров РСК и блокирующих их ключевые сигнальные пути. Такие терапевтические средства имеют разную природу и могут представлять собой низкомолекулярные вещества, моноклональные антитела, вакцины на основе дендритных клеток или химерные антигенные рецепторы. В этом обзоре мы сопоставили целевые мишени-компоненты сигнальных путей РСК и направленные против них наиболее перспективные терапевтические агенты в контексте проводимых доклинических и клинических испытаний.

Терапия против компонентов сигнальных путей, активных в РСК

В РСК активны некоторые сигнальные пути, характерные для нормальных стволовых клеток, такие как Notch, Wnt и Hedgehog (рис. 1) [3]. Аномальная

Cancer stem cells (CSCs) are gaining extensive acknowledge as crucial therapeutic targets for treatment of malignant tumors. CSCs are able to maintain their population and to constantly generate newly differentiated tumor cells. Cancer stem cells that escape treatment are often considered the main source of tumor relapse. Resulting clinical significance had led to extensive studies of stem phenotype-contributing signaling pathways that are often abnormally active in cancer stem cells and CSC-specific traits, that could be used as selective therapeutic targets. Many CSC-targeting therapeutic strategies are currently undergoing clinical trials and evaluation, including various stem cell-specific signaling pathway inhibitors, cancer vaccines based on CSC-primed dendritic cells, monoclonal antibodies and chimeric antigen receptors for adoptive cell immunotherapy.

Keywords: cancer stem cells, immunotherapy, cancer stem cell markers, cancer therapy.

активность сигнальных каскадов, контролирующих самообновление стволовых клеток и процессы эмбрионального развития и дифференцировки, может являться ключевым фактором онкогенного потенциала РСК. Эмбриональные сигнальные пути тесно переплетены с сигнальными путями, которые обеспечивают рост, пролиферацию и репарацию ДНК, такими как NF-κB, STAT3, MAPK и PI3K [4], поэтому и они могут служить важными терапевтическими мишенями для блокирования самообновления и пролиферации РСК и подавления опухолевой прогрессии (рис. 1). Вопрос о том, как воздействовать на мишени РСК, не затрагивая жизненно важных участников сигнальных каскадов нормальных клеток, до сих пор не решён и требует дальнейшего изучения.

Сигнальный путь Notch

Сигнальный путь Notch участвует в процессах дифференцировки плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток, регулирует количество и активность стволовых клеток в контексте возрастной дегенерации тканей, восстановления тканей после повреждения и, кроме того, при злокачественном перерождении клеток [5].

Передача сигнала инициируется связыванием лигандов DLL (Delta-like ligand) или Jagged на поверхности передающей клетки с Notch-рецептором эффекторной клетки, после чего внутриклеточный домен Notch отщепляется гамма-секретазой и перемещается в ядро, где запускает транскрипцию Notch-специфичных генов [3]. К ним относятся гены семейства HES (Hairy and enhancer of split), отвечающие за поддержание пула нейтральных стволовых клеток; *Myc*, принимающий участие в регуляции клеточного цикла, апоптоза и клеточной трансформации; *p21*, регулирующий клеточный цикл на стадиях G₁ и S, а также процессы клеточного старения [6–8].

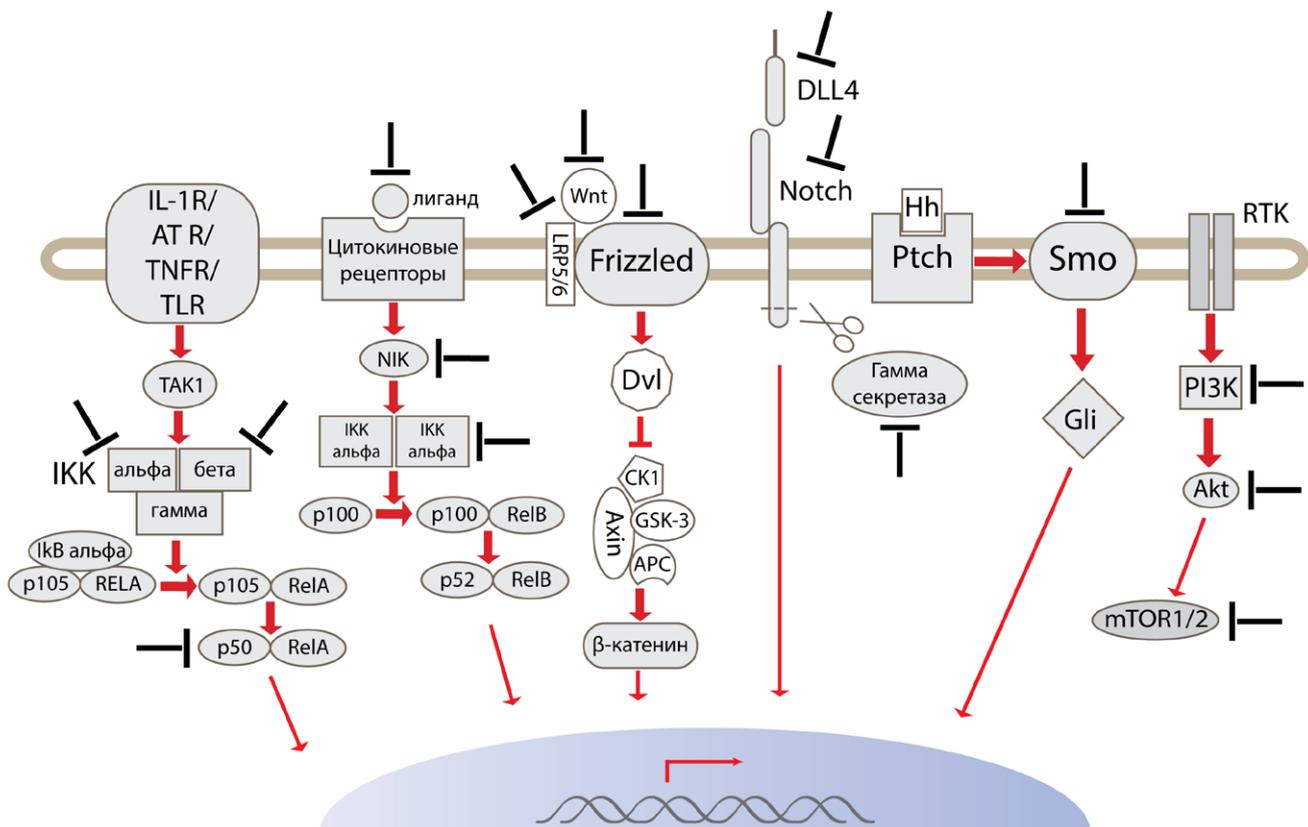


Рис. 1. Участники сигнальных каскадов, активных в РСК, как потенциальные мишени для терапии опухолевой прогрессии. Основные мишени разрабатываемых методов лечения обозначены символом **⊥**. IL-1R — Interleukin 1 receptor; AT R — Antigen receptor; TNFR — TNF receptor; TLR — Toll-like receptor; TAK1 — TGFβ-activated kinase 1; IKK — IκB kinase; NIK — NF-κB-inducing kinase; LRP5/6 — Lipoprotein receptor-related protein 5 or 6; Dvl — Disheveled; DLL-4 — Delta-like ligand 4; Hh — Hedgehog; Smo — Smoothened; RTK — Receptor tyrosine kinase; PI3K — Phosphatidylinositol 3-kinase

Терапия

Было найдено несколько агентов, блокирующих сигнальный путь Notch за счет подавления гамма-секретазы в РСК различных опухолей [4, 9]. Гамма-секретаза способна ингибировать низкомолекулярные вещества MK0752, RO4929097, PF-03084014 [3, 10, 11]. MK0752 подавлял сигнальный путь Notch в опухолевых ксенографтах рака молочной железы, усиливая воздействие препарата доцетаксела [12]. Препарат RO4929097 прошел первую фазу клинических испытаний в группе пациентов с местно-распространенными солидными опухолями и вызвал частичный ответ, полный ответ или стабилизацию заболевания у некоторых пациентов с колоректальной аденокарциномой, эпителиоидной саркомой и меланомой [13]. Перспективным, хорошо переносимым препаратом является и PF-03084014: в ходе испытаний в группе пациентов с агрессивным фиброматозом у 29% пациентов наблюдался частичный ответ на терапию [11].

Блокирование сигнального пути Notch также можно проводить с помощью антител против DLL-4 и рецепторов Notch (рис. 1), некоторые антитела против DLL-4, способные подавлять активность РСК, уже проходят клинические испытания [14, 15]. Ряд препаратов на основе гуманизированных моноклональных антител против DLL-4 тестируются среди пациентов с раком желудка, легких, яичника, колоректальной карциномой и некоторыми другими солидными опухолями, при этом активность в отношении РСК у таких антител сочетается со стимуляцией aberrантного роста опухолевой сосудистой сети, что также способствует подавлению развития опухоли [14–18]. В группе пациентов с солидными опухолями проведены

испытания фазы I моноклонального антитела к DLL-4 энотикумаба (enoticumab, REGN421), препарат показал хорошую переносимость, малую частоту серьезных побочных эффектов (у 4 пациентов из 53); частичный ответ на терапию или стабилизация заболевания наблюдались у 18 пациентов [16]. Первую фазу клинических испытаний проходит и OMP-305B83 — биспецифичное антитело против DLL-4 и VEGF (Vascular endothelial growth factor). Препарат тестируется среди пациентов с метастатическим раком толстой кишки в комбинации с терапией FOLFIRI, и среди пациентов с раком легких в комбинации с карбоплатином и пеметрекседом [19]. Такая же комбинация использовалась в испытаниях фазы Ib в группе пациентов с немелкоклеточным раком легкого для другого антитела к DLL-4 — демцизумаба, в ходе которых у 20 пациентов из 40 наблюдался ответ на терапию [20]. Другой перспективный препарат OMP-52M51, или бронтиктуцумаб (brontictuzumab) — моноклональное антитело, связывающееся непосредственно с рецептором Notch-1 [21]; доклинические исследования выявили, что блокирование Notch-1 при помощи OMP-52M51 приводит к подавлению роста РСК, стимулирует клеточную дифференцировку и останавливает опухолевый ангиогенез [22, 23]. OMP-52M51 уже прошел фазу I испытаний среди пациентов с различными солидными и лимфоидными опухолями, показал хорошую переносимость и вызвал частичный ответ и стабилизацию заболевания у 17% пациентов [24]. Антитело OMP-59R5 (тарекстумаб, tarextumab) против Notch-2/Notch-3 способно снижать размер фракции РСК различных опухолей и вызывает регрессию ксенографтов рака поджелудочной железы [19, 25]. За клиническими испытаниями

первой фазы OMP-59R5 (NCT01277146) последовали испытания фазы Ib/II среди пациентов с раком желудка и легких (NCT01647828, NCT01859741) [21].

Сигнальный путь Hedgehog

Сигнальный путь Hedgehog (Hh) регулирует полярность клеток, участвует в организации структуры тканей и сохранении пулов стволовых клеток в ходе эмбрионального развития [3]. Нарушения регуляции этого сигнального пути могут приводить к опухолевой трансформации клеток широкого спектра тканей [26].

Передача сигнала происходит в результате связывания растворимого Hh с рецептором Ptch [3]. В комплексе с Hh, Ptch теряет способность ингибировать транспорт белка Smoothed (Smo) в первичные цилии, в результате Smo запускает транскрипционные факторы, регулирующие Hh-зависимые гены (рис. 1). К запускаемым факторам принадлежит семейство GLI, включающее в себя как репрессоры, так и активаторы транскрипции, причем соотношение активных факторов из каждой группы определяется взаимодействием сигнального пути Hh с другими сигнальными путями [27]. Баланс между формами GLI-активаторов и GLI-репрессоров может регулировать «стволовые» свойства клеток, организацию структуры ткани, а также процессы опухолевой трансформации и метастазирования [3, 27].

Hh регулирует и другие мишени, сопряженные с поддержанием PCK, в частности, NANOG и BMI1. Эффекторы сигнального пути Hedgehog — GLI1 и GLI2 — напрямую могут связываться с цис-регуляторной последовательностью гена *NANOG*, активируя его транскрипцию [28]. Транскрипционный репрессор BMI1 из семейства Polycomb-group участвует в регуляции процессов старения, апоптоза и дифференцировки, а также процессов им-мортализации клеток и стимуляции их пролиферации [29]. Принято считать, что злокачественные клетки некоторых типов опухолей, обладающие повышенной экспрессией *BMI1*, являются PCK [29, 30]. В PCK медуллобластомы и рака молочной железы экспрессия *BMI1* регулируется сигнальным путем Hedgehog: GLI1 предпочтительно связывается с промотором *BMI1* и уровень транскрипции *BMI1* коррелирует с экспрессией *GLI1* [30, 31].

Терапия

GDC-0449, или висмодегиб (*vismodegib*), является низкомолекулярным антагонистом Smo, который ингибирует сигнальный путь Hedgehog [32]. Препарат прошел первую фазу испытаний среди пациентов с солидными опухолями (NCT00607724), в ходе которых показал хорошую переносимость и обнадеживающую противоопухолевую активность [33]. Будучи антагонистом Hh, GDC-0449 подавляет активность транскрипционных факторов GLI1 и GLI2, и вызывает апоптоз панкреатических PCK [34]. Другие антагонисты Smo, а также низкомолекулярные ингибиторы внутриклеточных участников сигнального каскада Hh, также показали свою эффективность в исследованиях на животных и в клинических испытаниях [3, 32].

Сигнальный путь Wnt

Белки семейства Wnt — сигнальные молекулы, контролирующие множество биологических процессов в клетке, включая развитие и онкогенез [35]. Тип молекулы Wnt, связывающейся с рецептором Frizzled (Fz) и его корецептором, определяет запуск канонического или неканонического путей передачи сигнала. [3].

При связывании канонического лиганда Wnt (например, WNT1, WNT3A, WNT7A или WNT8 [36])

с рецептором Fz и его корецепторами LRP5/6 (lipoprotein receptor-related protein 5 или 6), Fz образует комплекс с белком Disheveled (Dvl), который дестабилизирует комплекс белков (аксин, APC, CK-1 и GSK-3 β), разрушающих β -катенин (рис. 1). Накапливающийся в цитозоле и ядре β -катенин формирует комплекс с TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor), в результате запускается транскрипция зависимых генов [37]. Применительно к функционированию PCK, наиболее важными участниками сигнального пути Wnt являются транскрипционные факторы OCT4, SOX2 и NANOG.

OCT4

Транскрипционный фактор OCT4 признан в качестве маркера PCK рака желудка, мочевого пузыря, печени, молочной железы, плоскоклеточной карциномы полости рта, головы и шеи [38–41]. G. Ravindran с соавт. (2015) выявили положительную корреляцию между экспрессией *OCT4*, *NANOG* и β -катенина [38]. Интересно, что *Helicobacter pylori* также может приводить к повышению экспрессии *NANOG* и *OCT4* через сигнальный путь Wnt/ β -катенин и усиливать способность к самообновлению PCK рака желудка, в том числе благодаря повышению экспрессии *CD44* и *c-Myc* [39]. OCT4 может неканоническим способом активировать сигнальный путь Wnt/ β -катенина в CD133⁺ PCK рака печени с помощью микро-РНК miR1246: OCT4 вызывает повышение уровня miR1246, мишенями которой являются мРНК аксина и GSK-3 β , что подавляет активность комплекса деструкции β -катенина, который в свою очередь запускает экспрессию генов, контролирующих самообновление, устойчивость к лекарственным препаратам, онкогенный потенциал клеток и процессы метастазирования [40].

SOX2

SOX2 экспрессируется в PCK плоскоклеточного рака гортани, плоскоклеточного рака кожи, сарком детского возраста (саркомы Юинга, рабдомиосаркомы и остеосаркомы) и опухолей мозга [42–44]. В опытах на мышах с введенным *SOX2*-зависимым репортером и на мышах-опухоленосителях было показано, что *SOX2* отсутствует в клетках нормального эпидермиса, но детектируется в значительном количестве пре-неопластических кожных опухолей мышей и человека, а также в инвазивных PCK плоскоклеточной карциномы [42]. В клетках остеосаркомы, обладающих молекулярным фенотипом PCK, оказались значительно повышены не только уровни β -катенина и циклина D1, но и уровни белков, ассоциированных со стволовыми свойствами, в том числе CD133, OCT4, SOX2 и NANOG [43]. Такие клетки проявляли повышенную инвазивность, способность к самообновлению и пролиферации, а также к формированию опухолей *in vivo*. На клетках плоскоклеточного рака гортани было показано, что гиперэкспрессия *SOX2* обеспечивает способность клеток к инвазии и миграции [44].

NANOG

Во многих PCK повышены уровни гетеродимеров OCT4 и SOX2, а взаимодействие OCT4 и SOX2 с промоторной областью *NANOG* индуцирует транскрипцию этого гена [45]. Транскрипционный фактор NANOG считается маркером PCK большого количества опухолей, в частности, плоскоклеточного рака головы и шеи, рака легких, простаты, печени, молочной железы, лейкемии, глиобластомы, колоректальной аденокарциномы и др. [28, 41, 46]. Экспрессия *NANOG* может также регулироваться сигнальными путями Hedgehog, PI3K/Akt и некоторыми другими [28]. Достоверно показано, что

NANOG обладает онкогенным потенциалом: повышение экспрессии *NANOG* в неонкогенных клетках линии HEK-293 приводило к злокачественной трансформации, сопровождавшейся усиленной пролиферацией и формированием опухолей у бестимусных мышей линии Nude [47]. Экспрессия *OCT4* и *NANOG* в клетках аденокарциномы легких повышала процент CD133⁺ субпопуляции и стимулировала формирование маммосфер, усиливала устойчивость к лекарственным препаратам и способствовала эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) [46]. В клинических исследованиях обнаружено, что высокий уровень экспрессии *NANOG* и *OCT4* ассоциирован со сниженной общей выживаемостью пациентов с плоскоклеточной карциномой головы и шеи [41].

Терапия

Низкомолекулярное вещество куркумин способно индуцировать апоптоз путем подавления *OCT4*, что было продемонстрировано на клетках эмбриональной тератоканциномы [48]. Куркумин индуцирует активацию GSK-3 β , ингибируя сигнальный путь Wnt в результате протеасомной деградации β -катенина.

Для имитации некоторых природных ингибиторов Wnt были синтезированы антитела к LRP6. Однако было выявлено, что подавление антителами одних изоформ Wnt, может способствовать усилению действия других изоформ, поэтому для определения полного спектра действия таких антител необходимы дальнейшие исследования [49]. Другие ингибиторы действуют путем связывания лиганда Wnt, в частности, препарат OMP-54F28 представляет собой растворимый рецептор Wnt, в состав которого входят домены FZD8 и Fc [50]. Доклинические испытания показали, что OMP-54F28 подавляет опухолевый рост колоректальной аденокарциномы, рака легких, молочной железы и поджелудочной железы [50]. OMP-54F28 прошел первые фазы клинических испытаний в комбинации с сорафенибом в группе пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой, в комбинации с паклитакселом и карбоплатином в группе пациенток с раком яичника, в комбинации с паклитакселом и гемцитабином в группе пациентов с терминальными стадиями рака поджелудочной железы и в составе монотерапии в группе пациентов с различными солидными опухолями [51]. Еще одним подходом к прерыванию сигнального пути Wnt является блокирование рецепторов Frizzled. Моноклональное антитело OMP-18R5, или ванктикумаб (vantictumab), селективно связываясь с Fz-рецепторами, снижает содержание PCK и подавляет рост человеческих ксенотрансплантов колоректальной аденокарциномы, рака молочной железы и поджелудочной железы [52]. OMP-18R5 прошел первую фазу испытаний в группе пациентов с распространенными солидными опухолями (NCT01345201), продолжается отбор пациентов для участия в другом испытании препарата (NCT01973309).

Сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR

Сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR часто активируется в PCK различных типов опухолей [53]. Этот сигнальный путь пока остается не до конца изученным; здесь приводятся его этапы, ключевые для поддержания популяции PCK.

После связывания лиганда с рецепторными тирозинными киназами происходит фосфорилирование PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase), которая, в свою очередь, активирует серин-треониновую киназу AKT [54]. AKT способна подавлять апоптоз, воздействуя на белок BAX и активировать синтез белка через S6K, что стимулирует пролиферацию [55]. AKT запускает активацию

киназы mTOR как путем ее прямого фосфорилирования, так и путем ингибирования TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) — негативного регулятора mTOR [56]. На модели рака простаты было показано, что возникновение радиорезистентности, связанное с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП) и усилением проявления фенотипических признаков PCK, происходит за счет активации PI3K/AKT/mTOR [57]. В обзоре L. Chang и соавт. (2015) сообщается, что ингибиторы mTOR значительно снижают выживаемость PCK многих типов опухолей, в частности, глиобластомы, рака простаты, молочной железы, поджелудочной железы, колоректальной аденокарциномы и некоторых других [58]. Подавление mTOR также снижает активность альдегиддегидрогеназы 1 (ALDH1) — маркера PCK колоректальной карциномы и других видов рака, ответственного за формирование химиорезистентности [53].

Терапия

Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR считается перспективной мишенью для препаратов, направленных на уничтожение PCK: были найдены ингибиторы его компонентов, действующие против PCK различных опухолей (рис. 1) [53]. Проходят доклинические и клинические испытания I-III фазы ингибиторы PI3K, AKT, mTOR, а также ингибиторы двойного действия, воздействующие одновременно на мишени PI3K/mTOR [53, 58–62].

Препарат рапамицин оказался способен значительно снижать пролиферацию и онкогенный потенциал PCK глиобластомы в опытах *in vitro*, однако в опытах *in vivo* эффект был чрезвычайно низким [59]. Модифицированные аналоги рапамицина — эверолимус, темсиролимус и ридафоролимус — были намного эффективнее [60, 61]. Детальный анализ результатов клинических испытаний этих и некоторых других препаратов представлен в обзоре Z. Huang с соавт. (2015) [63].

Белок mTOR может существовать в составе двух типов структурно и функционально отличающихся комплексов: mTORC1 или mTORC2 [58]. Рапамицин и его производные подавляют только mTORC1, поэтому более перспективными выглядят двойные ингибиторы mTORC1/2 [58, 62, 64].

Интересно, что уничтожение PCK рака молочной железы и подавление формирования маммосфер происходит и под действием препарата метформина. Предположительно, противоопухолевое действие метформина обусловлено модулированием сигнального пути mTOR и снижением уровня ряда характерных маркеров PCK — CD44, CD133, ALDH1 и EpCAM [53].

Сигнальный путь NF- κ B

Сигнальный путь NF- κ B принимает участие в поддержании, экспансии, пролиферации и выживании PCK [65]. Семейство транскрипционных факторов NF- κ B состоит из пяти белков: RELA (p65), RELB, c-REL, NF- κ B1 (предшественник p105, подвергается процессированию до p50) и NF- κ B2 (p100, процессируется до p52) [66].

Передача сигнала через NF- κ B может осуществляться каноническим и неканоническим способами (рис. 1) [67, 68]. Канонический транзиентный путь запускается после активации рецепторов семейства TNFR (tumor necrosis factor receptor), рецепторов интерлейкина 1, рецепторов антигенов и некоторых рецепторов системы врожденного иммунитета, например TLR4 (Toll-like receptor 4). Затем, киназа TAK1 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1) активирует тройной комплекс IKK (I κ B kinase), состоящий из IKK α , IKK β и IKK γ (NEMO) [67, 68]. Это приводит к фосфорилированию

и дальнейшей протеасомной деградации белка IκBα, связывающего цитоплазматический NF-κB. В результате гетеродимер RELA/p50 высвобождается и перемещается в ядро, где запускает гены широкого спектра действия [67, 68]. Неканонический путь инициируется некоторыми рецепторами семейства TNFR, такими как CD40, BAFFR, рецептором лимфотоксина β или RANK [68]. В запуске принимают участие киназа NIK (NF-κappa-B-inducing kinase) и IKKα, фосфорилирующая p100, что приводит к его процессингу и устойчивой активации комплекса RELB/p52 [67, 68].

Повышенная экспрессия членов семейства NF-κB в PCK была зафиксирована при остром миелоидном лейкозе, раке простаты, яичника и глиобластоме [69]. Кроме того, фактор NF-κB часто упоминается в контексте ERBB2-зависимого рака молочной железы, в котором NF-κB выполняет роль регулятора процессов самообновления в PCK, причем между экспрессией NF-κB и ERBB2 наблюдается положительная обратная связь [70]. Предположительно, взаимосвязь ERBB2-NF-κB-ERBB2 активируется как механизм выживания PCK при радиотерапии, что приводит к появлению радиорезистентных PCK [71]. Активацию NF-κB также вызывает гиперэкспрессия *BMI1*, что косвенно указывает на то, что *BMI1* регулирует стволовые свойства клеток путем модуляции экспрессии *NANOG* через сигнальный путь NF-κB [70]. Помимо этого, NF-κB может напрямую регулировать экспрессию генов *CD44*, *SOX2* и *NANOG* в PCK некоторых опухолей *in vitro* и *in vivo* [70, 72], а также участвовать в активации сигнального пути Notch в опухолях молочной железы базального типа, способствуя экспансии PCK [73].

Терапия

Многие широко известные химиотерапевтические средства действуют через сигнальный путь NF-κB: метформин обладает способностью селективно подавлять ядерную локализацию NF-κB в PCK рака молочной железы [74, 75], дисульфидом подавляет NF-κB в PCK рака молочной железы и глиобластомы [76, 77], а куркумин ингибирует комплекс NIK/IKKα [78]. Несмотря на то, что NF-κB является перспективной молекулярной мишенью для терапии, клинические испытания препарата для лечения глиом сульфасалазина (sulfasalazine) — селективного ингибитора NF-κB и цистеин/глутаматного антипорта — оказались малоуспешными [77]. В то же время комбинация дисульфидома с гемцитабином (gemcitabine) считается более перспективной: дисульфидом может усиливать цитотоксический эффект гемцитабина на PCK глиобластомы путем подавления как NF-κB, так и ALDH [77].

В обзорной статье 2013 г. [79] рассматривается значительное количество ингибиторов NF-κB, в том числе и агенты, подавляющие IKKα и IKKβ [79, 80]. Интересно, что один из таких препаратов является ингибитором Hsp90 (Heat shock protein 90) — шаперона, необходимого для стабильного функционирования некоторых важных белков, в частности, АКТ, IKKα и IKKβ [80]. Низкомолекулярное вещество гелданамицин (geldanamycin) обладает способностью подавлять взаимодействие Hsp90 с NIK, что приводит к деградации NIK и последующему блокированию процессинга p100 [81]. Однако, некоторые авторы выражают опасения, что продолжительное блокирование IKKβ-опосредованного канонического сигнального пути, равно как и киназы NIK, может привести к развитию гиперэозинофильного синдрома, что наблюдается у NIK-нокаутных мышей [73]. Для терапии рака молочной железы с метастазами

в кости в РФ в 2011 г. одобрено (с 2016 г. — включено в список ЖНВЛП) моноклональное антитело деносуаб (denosumab), которое нейтрализует лиганд рецептора RANK и блокирует NIK/IKKα-опосредованную активацию NF-κB, [73].

Таргетная терапия против маркеров PCK CD19

B-лимфоцитарный антиген — маркер, встречающийся в PCK множественной миеломы и лейкемии (рис. 2) [82, 83]. Было показано, что клетки, в которых происходила экспрессия *CD19*, индуцировали лейкемию: при трансплантации *CD19*⁺ клеток от человека мышам NOD/SCID, у последних устанавливался полностью идентичный человеку фенотип лейкемии [84].

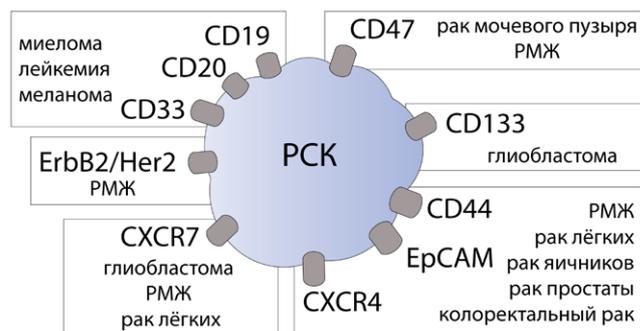


Рис. 2. Варьирование маркеров PCK в зависимости от онкологического заболевания. Экспрессия некоторые молекул характерна лишь для ограниченного круга онкопатологий, например, ERBB2/HER2 при РМЖ. Другие молекулы более универсальны и экспрессируются при большем числе заболеваний, как, например, CXCR7

CD19 активно используется в качестве мишени для иммунотерапии B-клеточных неоплазий. Среди пациентов с хроническим миелоидным лейкозом прошла первая фаза клинических испытаний (NCT01161511) препарата MOR208 (XmAb5574), который является моноклональным антителом к CD19 с модифицированным Fc фрагментом [85]. Разработаны и испытываются ряд других моноклональных антител к CD19 и их конъюгаты: SAR3419, MEDI-551, SGN-CD19A, XmAb5871, MDX-1342, AFM11, блинатумомаб (blinatumomab) [86], причем AFM11 и блинатумомаб являются биспецифичными антителами к CD19 и CD3.

На основе моноклональных антител к CD19 созданы и применяются химерные антигенные рецепторы, или XAP (Chimeric Antigen Receptors, CARs), в состав которых входит антиген-связывающий домен и внутриклеточный сигнальный домен для активации T-лимфоцитов [87]. После терапии T-клетками с XAP к CD19, полная ремиссия наблюдалась в 90% случаев заболеваний детей и взрослых с острым лимфобластным лейкозом [88]. T-клеточные препараты показали свою эффективность при множественной миеломе, лимфоме, хроническом и остром лимфолейкозе [47].

CD20

Другой B-лимфоцитарный антиген, CD20, характерен для PCK миеломы, меланомы, лейкемии [89–91]. CD20 принимает участие в активации B-лимфоцитов, их пролиферации и обеспечении оптимального иммунного ответа, в том числе и против T-независимых антигенов [92]. Лиганд молекулы CD20 пока остается неизвестен [93]. Согласно некоторым данным, миеломные стволовые клетки — это B-лимфоциты, экспрессирующие *CD20* и не экспрессирующие *CD138* [89], однако

более современные результаты опровергают данное наблюдение: Т. Raino с соавт. (2012) утверждают, что CD20 не связан с фенотипом РСК множественной миеломы [94]. CD20⁺ В-клетки острого миелоидного лейкоза обладают лейкогенным потенциалом, что парадоксально, поскольку CD20 является маркером зрелости В-клеток [91].

В исследовании 2011 г. было показано, что элиминация CD20⁺ стволовых клеток меланомы, составляющих всего 2% опухоли, полностью излечивала заболевание в опытах с мышами-опухоленосителями [90]. Препарат на основе моноклонального антитела к CD20, ритуксимаб (rituximab), успешно прошел фазу II испытаний, в которых приняли участие 131 пациент с мантийноклеточной лимфомой, иммуноцитомой и мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой [95]. Ритуксимаб относят к моноклональным антителам первого поколения; ко второму поколению принадлежат гуманизированные или полностью человеческие антитела окрелизумаб (ocrelizumab), велтузумаб (veltuzumab) и офатумумаб (ofatumumab); а к третьему — гуманизированные препараты с модифицированными фрагментами Fc и адаптированными эффекторными функциями [96].

CD33

Трансмембранный рецептор клеток миелоидного ряда CD33 является маркером лейкоэмических стволовых клеток [97, 98]. CD33 способствует регуляции клеточной дифференцировки и присутствует на поверхности 80–90% лейкоэмических клеток у пациентов с ОМЛ [98]. А. Ehninger и соавт. (2014) в своем обзоре обращают внимание на то, что CD33 встречается исключительно на гемопоэтических клетках и отсутствует на нормальных стволовых клетках-предшественницах, что делает этот маркер практически идеальной мишенью для направленной терапии ОМЛ [99].

В 2000 г. для терапии ОМЛ в США был одобрен препарат Гемтузумаб озогамин, или Милотарг (Gemtuzumab ozogamicin (GO), Mylotarg), представляющий собой связанное с противоопухолевым антибиотиком калихеамицином моноклональное антитело к CD33 [98]. Неоднозначные результаты последующих испытаний остановили внедрение препарата, однако в 2017 г., после завершения дополнительных клинических испытаний III фазы (NCT00091234, NCT00372593), препарат был повторно одобрен в качестве средства для терапии острого миелоидного лейкоза. Последние данные связывают эффективность действия милотарга с генотипом пациента с ОМЛ [100].

CD44

CD44 — рецептор гиалуроновой кислоты, маркер РСК рака мочевого пузыря, молочной железы, желудка, головы и шеи, яичников, поджелудочной железы, простаты, колоректальной аденокарциномы и лейкемии [101–106]. CD44 активирует низкомолекулярный гиалуронан, что индуцирует процессы клеточной миграции и инвазии, также он может служить корецептором для некоторых онкогенных белков, например, ERBB2 [106]. Изоформа CD44v играет ключевую роль в регуляции химио- и радиорезистентности РСК, их способностей к самообновлению, метастазированию и инициации опухоли [103]. CD44 регулируется сигнальным путем Wnt, но может и сам выступать в роли регулятора Wnt: снижение экспрессии CD44 уменьшает активность Wnt, а увеличение, соответственно, усиливает [107, 108].

Комбинация гуманизированного моноклонального антитела к изоформе CD44v6 биватуцумаба

(bivatuzumab) и цитотоксического агента мертанзина (mertansine) в экспериментах *in vivo* подавляла рост плоскоклеточного гипофарингеального рака за счет блокирования G2/M фазы клеточного цикла, т.е. остановки митоза [109]. Препарат прошел испытания среди пациентов с плоскоклеточной карциномой головы и шеи (NCT02254018), а также с метастатическим раком молочной железы (NCT02254005) [110]. Другое моноклональное антитело против CD44, R05429083, или RG7356, прошло первые фазы клинических испытаний среди пациентов с ОМЛ и CD44⁺ солидными опухолями, показав хорошую переносимость и безопасность (NCT01641250, NCT01358903) [111].

CD47

CD47 является маркером РСК рака молочной железы, мочевого пузыря и лейкемии [112–114]. Гиперэкспрессия CD47 способствует поддержанию фенотипа РСК [112] и позволяет раковым клеткам избегать фагоцитоза макрофагами в результате связывания с макрофагальным поверхностным белком SIRPα (Signal-Regulated Protein Alpha) [115]. В опухолевых клетках экспрессия CD47 активируется HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1) [112].

Блокирующие моноклональные антитела против CD47 Hu5F9-G4 сейчас проходят первую и вторую фазы клинических испытаний среди пациентов с распространенными солидными опухолями, ОМЛ и В-клеточной неходжскинской лимфомой (NCT02216409, NCT02953782, NCT02678338, NCT02953509) [116]. Hu5F9-G4 стимулируют фагоцитоз и элиминацию ОМЛ, неходжскинской лимфомы и многих солидных опухолей на ксенографтных моделях, показывая при этом хорошие результаты в исследованиях токсикокинетики препарата. Также Hu5F9-G4 оказались эффективными в опытах *in vitro* и *in vivo* в отношении агрессивных детских опухолей мозга [117]. Аналогичный эффект имеет и гуманизированный вариант мышинового блокирующего антитела B6H12 [118].

CD133

CD133 встречается на РСК рака легких, яичника, поджелудочной железы, головы и шеи, колоректальной аденокарциномы и глиобластомы [41, 106, 119]. Биологическая функция CD133 не полностью ясна, специфическая локализация белка указывает на то, что он необходим для организации топологии клеточной мембраны [120]. CD133 является довольно противоречивым маркером РСК: согласно одним данным клетки с фенотипом CD133⁺ обладают многими стволовыми свойствами, устойчивостью к химиотерапии и способны индуцировать формирование опухолей в ксенографтных моделях; согласно другим — популяция клеток с фенотипом CD133⁻ обладает такими же свойствами, что и CD133⁺ [120]. Показано, что онкосупрессор p53 может подавлять экспрессию CD133, что, в свою очередь, снижает экспрессию стволовых транскрипционных факторов NANOG, OCT4, SOX2 и c-MYC, и наоборот, снижение CD133 может опосредовать супрессорную активность белка p53 [121]. Ген PROM1, кодирующий белок CD133, регулируется сигнальным путем Wnt [107].

BsAb-Clk — биспецифичное моноклональное антитело к CD133 и CD3, связанное с цитокин-индуцируемыми Т-клетками, [122] показало высокую эффективность *in vitro* и *in vivo* против опухолей поджелудочной железы и рака печени. Специфичным связыванием с CD133 и действием против РСК также обладает химерный белок dCD133KDEL, представляющий собой

scFv (single-chain variable fragment, одноцепочечный фрагмент антитела) к CD133, слитый с модифицированным псевдомонадным экзотоксином А, что обеспечивает уничтожение опухолевых клеток без развития иммунного ответа на токсин (NCT02845414) [15].

ERBB2

ERBB2/HER2 — тирозиновая протеинкиназа из семейства рецепторов эпидермального фактора роста EGFR/ERBB, с которой часто ассоциирован рак молочной железы [123]. Гиперэкспрессия *ERBB2* наблюдается у 25–30% пациенток с РМЖ [71] и указывает на неблагоприятный прогноз течения заболевания [124]. ERBB2 — предпочтительный партнер димеризации для всех рецепторов семейства ERBB [125]. После димеризации рецептора происходит аутофосфорилирование его цитоплазматического домена и запускается целый ряд сигнальных каскадов, направленных на усиление клеточной пролиферации и подавление апоптоза [125]. Было обнаружено, что гиперэкспрессия *ERBB2* приводит к усилению экспрессии компонентов сигнального пути PI3K-АКТ-mTOR [126]. Кроме того, в РСК под действием радиотерапии активируется петлеобразный сигнальный путь ERBB2-NF-κB-ERBB2, активирующий выживание клеток [71].

Трастуцумаб — одно из первых терапевтических моноклональных антител, селективно блокирующих ERBB2. В исследовании на маммоферах, применение комбинации трастуцумаба и метформина приводило к снижению способности ERBB2⁺ РСК к самообновлению и пролиферации [127]. Поскольку в РСК РМЖ часто активирован сигнальный путь PI3K/АКТ/mTOR, трастуцумаб показал хорошие результаты в комбинации с ингибитором PI3K NVP-БКМ120 в экспериментах *in vivo* [128]. Введение Т-клеток с ХАР к ERBB2 значительно улучшило состояние 4 из 19 пациентов с ERBB2⁺ саркомой [129]. Такой же подход тестируется и для терапии глиобластом: Т-клетки с ХАР к ERBB2 уже показали высокую противоопухолевую активность *in vitro* и на ксенографтных моделях у мышей [130].

CXCR4/CXCR7/CXCL12

CXCR4 (CXC chemokine receptor type 4) является маркером РСК рака молочной железы, яичников, поджелудочной железы, легких, глиобластомы, колоректальной аденокарциномы, а также радиорезистентных РСК [131–133]. Другой рецептор хемокинов, CXCR7 (CXC chemokine receptor type 7) — маркер РСК рака молочной железы, легких и глиобластомы [134]. И CXCR4, и CXCR7 участвуют в регуляции иммунитета, ангиогенезе и направленной миграции стволовых клеток [135]. Их общий лиганд CXCL12 — хемокин — вовлечен в регуляцию миграции, инвазии и выживания нормальных и злокачественных клеток [132]. Взаимодействие CXCR4-CXCL12 играет важную роль в процессах опухолевого роста, инвазии, метастазирования, формирования резистентности к химиотерапии и рецидивов [136]. Гиперэкспрессия *CXCL12* может активировать сигнальный путь Wnt и индуцировать фенотип РСК рака молочной железы, а также повышает экспрессию других маркеров РСК, *ALDH1*, *OCT4*, *NANOG*, и *SOX2* [137]. На модели немелкоклеточного рака легких было показано, что активация сигнального пути PI3K/АКТ/mTOR приводит к гиперэкспрессии *CXCR4*, что обеспечивает поддержание пула РСК [53, 133, 138]. В исследованиях РСК РМЖ, снижение количества CXCR7 приводило к подавлению экспрессии других маркеров РСК — *ALDH1*, *OCT4* и *NANOG* [134].

Поиск препаратов, блокирующих связывание CXCL12 с CXCR4 — одно из интенсивно

развивающихся направлений исследований. Ингибитор CXCR4 AMD3100, или плериксафор (plerixafor), подавляет рост внутричерепной глиобластомы и медуллобластомных ксенографтов, а также внутрибрюшинное распространение эпителиального рака яичника. AMD3100 оказался способен снижать метастатический рост, но не частоту метастазов на модели метастатического немелкоклеточного рака легких у мышей, при этом не влияя на общую выживаемость [139, 140]. AMD3100 прошел испытания фазы I среди пациентов с ОМЛ (NCT00512252), причем 46% пациентов достигли полной ремиссии (CR) [141].

EPCAM

Молекула адгезии эпителиальных клеток EPCAM (Epithelial cell adhesion molecule) характерна для РСК рака молочной железы, легких, простаты, поджелудочной железы, печени и колоректальной аденокарциномы [142, 143]. Некоторые EPCAM-положительные РСК рака легких обладают высокой онкогенностью и мультипотентными характеристиками стволовых клеток, включая способность к дифференцировке в адипогенные и остеогенные клетки [142]. EPCAM способен блокировать катепсины — протеазы, часто сопряженные с метаболизмом опухолевых клеток и метастазами [144], его вероятной функцией в РСК является защита опухолевых клеток от секретируемых ими же катепсинов [144]. EPCAM также может непосредственно стимулировать экспрессию *c-MYC*, одного из индукторов стволовых свойств нормальных и раковых клеток [145, 146].

Т-лимфоциты с ХАР к EPCAM показали высокую противоопухолевую активность в опытах *in vitro* и *in vivo* в отношении рака простаты [147]. Такие модифицированные Т-клетки оказались способны элиминировать клетки не только клона РСЗМ, гиперэкспрессирующие EPCAM, но и линии РСЗ, обладающие низким уровнем экспрессии EPCAM. Начаты клинические испытания Т-лимфоцитов с ХАР к EPCAM на пациентах с различными солидными опухолями (NCT03013712).

ALDH

Альдегиддегидрогеназа ALDH1 — маркер РСК рака молочной железы, головы и шеи, легких, колоректальной аденокарциномы [105, 148–152] — фермент, необходимый для детоксификации эндогенных и экзогенных субстратов путем NAD(P)⁺-зависимого окисления [153]. Выделяют три главных изоформа ALDH1: ALDH1-A1, ALDH1-A2, ALDH1-A3, наибольший вклад в функционирование РСК вносит ALDH1-A1 [153]. ALDH⁺ РСК рака легких отличается повышенной устойчивостью к терапии ингибитором тирозинкиназ EGFR гефитинибом (gefitinib). Фенотипом РСК некоторых субтипов рака легких принято также считать комбинацию ALDH1^{high}/CD133^{high} [149]. Для идентификации РСК колоректального рака гиперэкспрессия *ALDH1A1* не всегда является надежным маркером: в одном клиническом исследовании она была ассоциирована с плохими прогнозами течения заболевания [152], но в другой работе на клеточной линии HT-29 было показано, что колоносферы с пониженной экспрессией *ALDH1A1* обладали повышенным онкогенным потенциалом и стволовыми свойствами [150].

ALDH1 был использован в качестве маркера РСК в опытах *in vivo* по испытанию дендритноклеточных вакцин против клеток меланомы и плоскоклеточной карциномы [154]. Дендритные клетки, активированные с помощью лизатов клеток ALDH^{bright}, более эффективно подавляли опухолевый рост в сравнении с дендритными

клетками, которые были активированы лизатами клеток ALDH^{dim} или тотальными опухолевыми лизатами.

Заключение

Терапия, избирательно нацеленная на раковые стволовые клетки, в случае своей клинической эффективности может позволить радикально снизить частоту развития рецидивов заболевания, поскольку РСК обладают исключительно высокой способностью к самообновлению и дифференцировке, а также отвечают за постоянное пополнение опухоли новыми раковыми клетками и поддерживают рост гетерогенной массы опухоли. При этом, оптимальной стратегией лечения по-прежнему является применение комплексного подхода, направленного на удаление и раковых стволовых клеток, и клеток основной массы опухоли. Пока установлены не все особенности формирования и поддержания популяции РСК, поэтому остается вероятностью существования неизвестных путей дедифференцировки терминальных опухолевых клеток с восстановлением фенотипа РСК. В связи с этим, большинство проводимых в настоящий момент клинических

испытаний РСК-направленной терапии проводятся в комплексе с применением традиционных химиотерапевтических средств. Детальные исследования сигнальных путей, характерных для РСК, привели к выявлению селективных мишеней, а терапевтические подходы, основанные на удалении фракции РСК, уже показывают свою относительную безопасность, при этом значительно усиливая общий эффект от лечения, и в большом количестве случаев позволяют избежать рецидивов заболевания.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» в рамках Соглашения № 14.607.21.0156 (уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60716X0156).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Виноградова Т.В., Чернов И.П., Монастырская Г.С. и др. Раковые стволовые клетки: пластичность против терапии. *Acta Naturae* 2015; 7: 53–63.
2. Vinogradov S., Wei X. Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine (Lond.)* 2012; 7(4): 597–615.
3. Takebe N., Harris P.J., Warren R.Q. et al. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2011; 8(2): 97–106.
4. Takebe N., Miele L., Harris P.J. et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2015; 12(8): 445–64.
5. Liu J., Sato C., Cerletti M. et al. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2010; 92: 367–409.
6. Ross D.A., Rao P.K., Kadesch T. Dual roles for the Notch target gene *Hes-1* in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24(8): 3505–13.
7. Weng A.P., Millholland J.M., Yashiro-Ohtani Y. et al. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev.* 2006; 20(15): 2096–109.
8. Ichida J.K., Tcw J., Williams L.A. et al. Notch inhibition allows oncogene-independent generation of iPS cells. *Nat. Chem. Biol.* 2014; 10(8): 632–9.
9. Zhang C.C., Yan Z., Zong Q. et al. Synergistic effect of the gamma-secretase inhibitor PF-03084014 and docetaxel in breast cancer models. *Stem Cells Transl. Med.* 2013; 2(3): 233–42.
10. Andersson E.R., Lendahl U. Therapeutic modulation of Notch signaling—are we there yet? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014; 13(5): 357–78.
11. Kummar S., O'Sullivan Coyne G., Do K.T. et al. Clinical Activity of the gamma-Secretase Inhibitor PF-03084014 in Adults With Desmoid Tumors (Aggressive Fibromatosis). *J. Clin. Oncol.* 2017; 35(14): 1561–9.
12. Schott A.F., Landis M.D., Dontu G. et al. Preclinical and clinical studies of gamma secretase inhibitors with docetaxel on human breast tumors. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19(6): 1512–24.
13. Tolcher A.W., Messersmith W.A., Mikulski S.M. et al. Phase I study of RO4929097, a gamma secretase inhibitor of Notch signaling, in patients with refractory metastatic or locally advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30(19): 2348–53.
14. Kwiatkowska-Borowczyk E.P., Gabka-Buszek A., Jankowski J. et al. Immunotargeting of cancer stem cells. *Contemp. Oncol. (Pozn.)* 2015; 19(1A): A52–9.
15. Naujokat C. Monoclonal antibodies against human cancer stem cells. *Immunotherapy* 2014; 6(3): 290–308.
16. Chiorean E.G., LoRusso P., Strother R.M. et al. A Phase I First-in-Human Study of Enoticumab (REGN421), a Fully Human Delta-like Ligand 4 (Dl4) Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* 2015; 21(12): 2695–703.
17. Clarke J.M., Hurwitz H.I. Understanding and targeting resistance to anti-angiogenic therapies. *J. Gastrointest. Oncol.* 2013; 4(3): 253–63.
18. Jenkins D.W., Ross S., Veldman-Jones M. et al. MEDI0639: a novel therapeutic antibody targeting Dll4 modulates endothelial cell function and angiogenesis in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 2012; 11(8): 1650–60.
19. Marcucci F., Rumio C., Lefoulon F. Anti-Cancer Stem-like Cell Compounds in Clinical Development — An Overview and Critical Appraisal. *Front. Oncol.* 2016; 6: 115.
20. McKeage M.J., Kotasek D., Markman B. et al. Phase IB Trial of the Anti-Cancer Stem Cell DLL4-Binding Agent Demcizumab with Pemetrexed

and Carboplatin as First-Line Treatment of Metastatic Non-Squamous NSCLC. *Target. Oncol.* 2018; 13(1): 89–98.

21. Teodorczyk M., Schmidt M.H. Notching on Cancer's Door: Notch Signaling in Brain Tumors. *Front. Oncol.* 2014; 4: 341.
22. Cancilla B., Cain J., Wang M. et al. Abstract 3728: Anti-Notch1 antibody (OMP-52M51) impedes tumor growth and cancer stem cell frequency (CSC) in a chemo-refractory breast cancer xenograft model with an activating Notch1 mutation and screening for activated Notch1 across multiple solid tumor types. *Cancer Res.* 2013; 73 Suppl 8: 3728.
23. Adorno-Cruz V., Kibria G., Liu X. et al. Cancer stem cells: targeting the roots of cancer, seeds of metastasis, and sources of therapy resistance. *Cancer Res.* 2015; 75(6): 924–9.
24. Ferrarotto R., Eckhardt G., Patnaik A. et al. A Phase 1 dose-escalation and dose-expansion study of brontictuzumab in subjects with selected solid tumors. *Ann. Oncol. In press* 2018.
25. Yen W.C., Fischer M.M., Axelrod F. et al. Targeting Notch signaling with a Notch2/Notch3 antagonist (tarexumab) inhibits tumor growth and decreases tumor-initiating cell frequency. *Clin. Cancer Res.* 2015; 21(9): 2084–95.
26. Campbell V., Copland M. Hedgehog signaling in cancer stem cells: a focus on hematological cancers. *Stem Cells Cloning* 2015; 8: 27–38.
27. Ruiz i Altaba A., Mas C., Stecca B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol.* 2007; 17(9): 438–47.
28. Wang M.L., Chiou S.H., Wu C.W. Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor. *Oncotargets Ther.* 2013; 6: 1207–20.
29. Wang Y., Zhe H., Ding Z. et al. Cancer stem cell marker Bmi-1 expression is associated with basal-like phenotype and poor survival in breast cancer. *World J. Surg.* 2012; 36(5): 1189–94.
30. Wang X., Venugopal C., Manoranjan B. et al. Sonic hedgehog regulates Bmi1 in human medulloblastoma brain tumor-initiating cells. *Oncogene* 2012; 31(2): 187–99.
31. Jiang L., Li J., Song L. Bmi-1, stem cells and cancer. *Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 2009; 41(7): 527–34.
32. Borah A., Raveendran S., Rochani A. et al. Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy. *Oncogenesis* 2015; 4: e177.
33. LoRusso P.M., Rudin C.M., Reddy J.C. et al. Phase I trial of hedgehog pathway inhibitor vismodegib (GDC-0449) in patients with refractory, locally advanced or metastatic solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17(8): 2502–11.
34. Singh B.N., Fu J., Srivastava R.K. et al. Hedgehog signaling antagonist GDC-0449 (Vismodegib) inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics: molecular mechanisms. *PLoS One* 2011; 6(11): e27306.
35. Nusse R. Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res.* 2008; 18(5): 523–7.
36. Takahashi N., Maeda K., Ishihara A. et al. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 2011; 16: 21–30.
37. Sugimura R., Li L. Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth Defects Res. C: Embryo Today* 2010; 90(4): 243–56.
38. Ravindran G., Sawant S.S., Hague A. et al. Association of differential beta-catenin expression with Oct-4 and Nanog in oral squamous cell carcinoma and their correlation with clinicopathological factors and prognosis. *Head Neck* 2015; 37(7): 982–93.

39. Yong X., Tang B., Xiao Y.F. et al. Helicobacter pylori upregulates Nanog and Oct4 via Wnt/ β -catenin signaling pathway to promote cancer stem cell-like properties in human gastric cancer. *Cancer Lett.* 2016; 374(2): 292–303.
40. Chai S., Ng K.Y., Tong M. et al. Octamer 4/ β -catenin signaling axis drives Wnt/ β -catenin activation in liver cancer stem cells. *Hepatology* 2016; 64(6): 2062–76.
41. Fan Z., Li M., Chen X. et al. Prognostic Value of Cancer Stem Cell Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a Meta-analysis. *Sci. Rep.* 2017; 7: 43008.
42. Boumahdi S., Driessens G., Lapouge G. et al. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature* 2014; 511(7508): 246–50.
43. Yi X.J., Zhao Y.H., Qiao L.X. et al. Aberrant Wnt/ β -catenin signaling and elevated expression of stem cell proteins are associated with osteosarcoma side population cells of high tumorigenicity. *Mol. Med. Rep.* 2015; 12(4): 5042–8.
44. Yang N., Hui L., Wang Y. et al. Overexpression of SOX2 promotes migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition through the Wnt/ β -catenin pathway in laryngeal cancer Hep-2 cells. *Tumour Biol.* 2014; 35(8): 7965–73.
45. Kuroda T., Tada M., Kubota H. et al. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 2005; 25(6): 2475–85.
46. Chiou S.H., Wang M.L., Chou Y.T. et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Res.* 2010; 70(24): 10433–44.
47. Dai H., Wang Y., Lu X. et al. Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 2016; 108(7).
48. Yun J.H., Park Y.G., Lee K.M. et al. Curcumin induces apoptotic cell death via Oct4 inhibition and GSK-3 β activation in NCCIT cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015; 59(6): 1053–62.
49. Valkenburg K.C., Graveel C.R., Zylstra-Diegel C.R. et al. Wnt/ β -catenin Signaling in Normal and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)* 2011; 3(2): 2050–79.
50. Le P.N., McDermott J.D., Jimeno A. Targeting the Wnt pathway in human cancers: therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28. *Pharmacol. Ther.* 2015; 146: 1–11.
51. Kim Y.M., Kahn M. The role of the Wnt signaling pathway in cancer stem cells: prospects for drug development. *Res. Rep. Biochem.* 2014; 4: 1–12.
52. Masuda M., Sawa M., Yamada T. Therapeutic targets in the Wnt signaling pathway: Feasibility of targeting TNF α in colorectal cancer. *Pharmacol. Ther.* 2015; 156: 1–9.
53. Xia P., Xu X.Y. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application. *Am. J. Cancer. Res.* 2015; 5(5): 1602–9.
54. Chandarlapaty S., Sawai A., Scaltriti M. et al. AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell* 2011; 19(1): 58–71.
55. Song M.S., Salmena L., Pandolfi P.P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012; 13(5): 283–96.
56. Hahn-Windgassen A., Nogueira V., Chen C.C. et al. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(37): 32081–9.
57. Chang L., Graham P.H., Hao J. et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance. *Cell Death Dis.* 2013; 4: e875.
58. Francipane M.G., Lagasse E. Therapeutic potential of mTOR inhibitors for targeting cancer stem cells. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2016; 82(5): 1180–8.
59. Mendiburu-Elicabe M., Gil-Ranedo J., Izquierdo M. Efficacy of rapamycin against glioblastoma cancer stem cells. *Clin. Transl. Oncol.* 2014; 16(5): 495–502.
60. Liu Y., Zhang X., Liu J. et al. Everolimus in combination with letrozole inhibit human breast cancer MCF-7/Aro stem cells via PI3K/mTOR pathway: an experimental study. *Tumour Biol.* 2014; 35(2): 1275–86.
61. Oza A.M., Pignata S., Poveda A. et al. Randomized Phase II Trial of Ridaforolimus in Advanced Endometrial Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2015; 33(31): 3576–82.
62. Lee J.J., Loh K., Yap Y.S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biol. Med.* 2015; 12(4): 342–54.
63. Huang Z., Wu Y., Zhou X. et al. Clinical efficacy of mTOR inhibitors in solid tumors: a systematic review. *Future Oncol.* 2015; 11(11): 1687–99.
64. Musa F., Alard A., David-West G. et al. Dual mTORC1/2 Inhibition as a Novel Strategy for the Resensitization and Treatment of Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *Mol. Cancer Ther.* 2016; 15(7): 1557–67.
65. Vazquez-Santillan K., Melendez-Zajgla J., Jimenez-Hernandez L. et al. NF- κ B signaling in cancer stem cells: a promising therapeutic target? *Cell Oncol. (Dordr.)* 2015; 38(5): 327–39.
66. Oeckinghaus A., Ghosh S. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009; 1(4): a000034.
67. Oeckinghaus A., Hayden M.S., Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* 2011; 12(8): 695–708.
68. Sun S.C. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res.* 2011; 21(1): 71–85.
69. Rinkenbaugh A.L., Baldwin A.S. The NF- κ B Pathway and Cancer Stem Cells. *Cells* 2016; 5(2).
70. Paranjape A.N., Balaji S.A., Mandal T. et al. Bmi1 regulates self-renewal and epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells through Nanog. *BMC Cancer* 2014; 14: 785.
71. Duru N., Candas D., Jiang G. et al. Breast cancer adaptive resistance: HER2 and cancer stem cell repopulation in a heterogeneous tumor society. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2014; 140(1): 1–14.
72. Liu M., Sakamaki T., Casimiro M.C. et al. The canonical NF- κ B pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res.* 2010; 70(24): 10464–73.
73. Zhang W., Grivnickov S.I. Top Notch cancer stem cells by paracrine NF- κ B signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2013; 15(5): 316.
74. Hirsch H.A., Iliopoulos D., Struhl K. Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. *PNAS USA* 2013; 110(3): 972–7.
75. Lei Y., Yi Y., Liu Y. et al. Metformin targets multiple signaling pathways in cancer. *Chin. J. Cancer* 2017; 36(1): 17.
76. Yip N.C., Fombon I.S., Liu P. et al. Disulfiram modulated ROS-MAPK and NF- κ B pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. *Br. J. Cancer* 2011; 104(10): 1564–74.
77. Liu P., Brown S., Goktug T. et al. Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *Br. J. Cancer* 2012; 107(9): 1488–97.
78. Storz P. Targeting the alternative NF- κ B pathway in pancreatic cancer: a new direction for therapy? *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2013; 13(5): 501–4.
79. Hoessel B., Schmid J.A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* 2013; 12: 86.
80. Walsby E., Pearce L., Burnett A.K. et al. The Hsp90 inhibitor NVP-AUY922-AG inhibits NF- κ B signaling, overcomes microenvironmental cytoprotection and is highly synergistic with fludarabine in primary CLL cells. *Oncotarget* 2012; 3(5): 525–34.
81. Qing G., Yan P., Gu Z. et al. Hsp90 regulates processing of NF- κ B p100 involving protection of NF- κ B-inducing kinase (NIK) from autophagy-mediated degradation. *Cell Res.* 2007; 17(6): 520–30.
82. Ormhøj M., Bedoya F., Frigault M.J. et al. CARs in the Lead Against Multiple Myeloma. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2017; 12(2): 119–25.
83. Bernt K.M., Armstrong S.A. Leukemia stem cells and human acute lymphoblastic leukemia. *Semin. Hematol.* 2009; 46(1): 33–8.
84. le Viseur C., Hotfilder M., Bomken S. et al. In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties. *Cancer Cell* 2008; 14(1): 47–58.
85. Woyach J.A., Awan F., Flinn I.W. et al. A phase 1 trial of the Fc-engineered CD19 antibody XmAb5574 (MOROO208) demonstrates safety and preliminary efficacy in relapsed CLL. *Blood* 2014; 124(24): 3553–60.
86. Naddafi F., Davami F. Anti-CD19 Monoclonal Antibodies: a New Approach to Lymphoma Therapy. *Int. J. Mol. Cell. Med.* 2015; 4(3): 143–51.
87. Curran K.J., Pegram H.J., Brentjens R.J. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. *J. Gene Med.* 2012; 14(6): 405–15.
88. Maude S.L., Teachey D.T., Porter D.L. et al. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015; 125(26): 4017–23.
89. Kapoor P., Greppe P.T., Morice W.G. et al. Anti-CD20 monoclonal antibody therapy in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 2008; 141(2): 135–48.
90. Schmidt P., Kopecky C., Hombach A. et al. Eradication of melanomas by targeted elimination of a minor subset of tumor cells. *PNAS USA* 2011; 108(6): 2474–9.
91. McClellan J.S., Majeti R. The cancer stem cell model: B cell acute lymphoblastic leukaemia breaks the mould. *EMBO Mol. Med.* 2013; 5(1): 7–9.
92. Kuijpers T.W., Bende R.J., Baars P.A. et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J. Clin. Invest.* 2010; 120(1): 214–22.
93. Cragg M.S., Walshe C.A., Ivanov A.O. et al. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr. Dir. Autoimmun.* 2005; 8: 140–74.
94. Paino T., Ocio E.M., Paiva B. et al. CD20 positive cells are undetectable in the majority of multiple myeloma cell lines and are not associated with a cancer stem cell phenotype. *Haematologica* 2012; 97(7): 1110–4.
95. Foran J.M., Rohatiner A.Z., Cunningham D. et al. European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18(2): 317–24.
96. Lim S.H., Beers S.A., French R.R. et al. Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica* 2010; 95(1): 135–43.
97. Walter R.B., Appelbaum F.R., Estey E.H. et al. Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. *Blood* 2012; 119(26): 6198–208.

98. Clayton S., Mousa S.A. Therapeutics formulated to target cancer stem cells: Is it in our future? *Cancer Cell Int.* 2011; 11: 7.
99. Ehninger A., Kramer M., Rollig C. et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* 2014; 4: e218.
100. Godwin C.D., Gale R.P., Walter R.B. Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2017; 31(9): 1855–68.
101. Hofner T., Macher-Goeppinger S., Klein C. et al. Expression and prognostic significance of cancer stem cell markers CD24 and CD44 in urothelial bladder cancer xenografts and patients undergoing radical cystectomy. *Urol. Oncol.* 2014; 32(5): 678–86.
102. Nosrati A., Naghshvar F., Khanari S. Cancer Stem Cell Markers CD44, CD133 in Primary Gastric Adenocarcinoma. *Int. J. Mol. Cell. Med.* 2014; 3(4): 279–86.
103. Yan Y., Zuo X., Wei D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl. Med.* 2015; 4(9): 1033–43.
104. Lin J., Ding D. The prognostic role of the cancer stem cell marker CD44 in ovarian cancer: a meta-analysis. *Cancer Cell Int.* 2017; 17: 8.
105. Horimoto Y., Arakawa A., Sasahara N. et al. Combination of Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD24 Is Superior to ALDH1 as a Prognostic Indicator in Breast Cancer Patients with Distant Metastases. *PLoS One* 2016; 11(10): e0165253.
106. Sahlberg S.H., Spiegelberg D., Glimelius B. et al. Evaluation of cancer stem cell markers CD133, CD44, CD24: association with AKT isoforms and radiation resistance in colon cancer cells. *PLoS One* 2014; 9(4): e94621.
107. de Sousa E.M., Vermeulen L. Wnt Signaling in Cancer Stem Cell Biology. *Cancers (Basel)* 2016; 8(7).
108. Schmitt M., Metzger M., Gradl D. et al. CD44 functions in Wnt signaling by regulating LRP6 localization and activation. *Cell Death Differ.* 2015; 22(4): 677–89.
109. Gurtner K., Hessel F., Eicheler W. et al. Combined treatment of the immunoconjugate bivatuzumab mertansine and fractionated irradiation improves local tumour control in vivo. *Radiother. Oncol.* 2012; 102(3): 444–9.
110. Riechelmann H., Sauter A., Golze W. et al. Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2008; 44(9): 823–9.
111. Vey N., Delaunay J., Martinelli G. et al. Phase I clinical study of RG7356, an anti-CD44 humanized antibody, in patients with acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 2016; 7(22): 32532–42.
112. Zhang H., Lu H., Xiang L. et al. HIF-1 regulates CD47 expression in breast cancer cells to promote evasion of phagocytosis and maintenance of cancer stem cells. *PNAS USA* 2015; 112(45): E6215–23.
113. Chan K.S., Volkmer J.P., Weissman I. Cancer stem cells in bladder cancer: a revisited and evolving concept. *Curr. Opin. Urol.* 2010; 20(5): 393–7.
114. Cheng Q.S., Wang X.B. [CD47 and leukemia stem cells]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2010; 18(4): 1088–91.
115. Liu X., Pu Y., Cron K. et al. CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors. *Nat. Med.* 2015; 21(10): 1209–15.
116. Liu J., Wang L., Zhao F. et al. Pre-Clinical Development of a Humanized Anti-CD47 Antibody with Anti-Cancer Therapeutic Potential. *PLoS One* 2015; 10(9): e0137345.
117. Gholamin S., Mitra S.S., Feroze A.H. et al. Disrupting the CD47-SIRPalpha anti-phagocytic axis by a humanized anti-CD47 antibody is an efficacious treatment for malignant pediatric brain tumors. *Sci. Transl. Med.* 2017; 9(381).
118. Kaur S., Elkahlon A.G., Singh S.P. et al. A function-blocking CD47 antibody suppresses stem cell and EGF signaling in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 2016; 7(9): 10133–52.
119. Cheng J.X., Liu B.L., Zhang X. How powerful is CD133 as a cancer stem cell marker in brain tumors? *Cancer Treat. Rev.* 2009; 35(5): 403–8.
120. Irollo E., Pirozzi G. CD133: to be or not to be, is this the real question? *Am. J. Transl. Res.* 2013; 5(6): 563–81.
121. Park E.K., Lee J.C., Park J.W. et al. Transcriptional repression of cancer stem cell marker CD133 by tumor suppressor p53. *Cell Death Dis.* 2015; 6: e1964.
122. Huang J., Li C., Wang Y. et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells bound with anti-CD3/anti-CD133 bispecific antibodies target CD133(high) cancer stem cells in vitro and in vivo. *Clin. Immunol.* 2013; 149(1): 156–68.
123. Wang X., Sun Y., Wong J. et al. PPARgamma maintains ERBB2-positive breast cancer stem cells. *Oncogene* 2013; 32(49): 5512–21.
124. De Abreu F.B., Wells W.A., Tsongalis G.J. The emerging role of the molecular diagnostics laboratory in breast cancer personalized medicine. *Am. J. Pathol.* 2013; 183(4): 1075–83.
125. Roy V., Perez E.A. Beyond trastuzumab: small molecule tyrosine kinase inhibitors in HER-2-positive breast cancer. *Oncologist* 2009; 14(11): 1061–9.
126. Steelman L.S., Chappell W.H., Abrams S.L. et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)* 2011; 3(3): 192–222.
127. Vazquez-Martin A., Oliveras-Ferreras C., Del Barco S. et al. The anti-diabetic drug metformin suppresses self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant tumor-initiating breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011; 126(2): 355–64.
128. Yu F., Zhao J., Hu Y. et al. The combination of NVP-BKM120 with trastuzumab or RAD001 synergistically inhibits the growth of breast cancer stem cells in vivo. *Oncol. Rep.* 2016; 36(1): 356–64.
129. Ahmed N., Brawley V.S., Hegde M. et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J. Clin. Oncol.* 2015; 33(15): 1688–96.
130. Sengupta S., Mao G., Gokaslan Z.S. et al. Chimeric antigen receptors for treatment of glioblastoma: a practical review of challenges and ways to overcome them. *Cancer Gene Ther.* 2017; 24(3): 121–9.
131. Dubrovskaya A., Hartung A., Bouchez L.C. et al. CXCR4 activation maintains a stem cell population in tamoxifen-resistant breast cancer cells through AhR signalling. *Br. J. Cancer* 2012; 107(1): 43–52.
132. Wurth R., Bajetto A., Harrison J.K. et al. CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Front. Cell. Neurosci.* 2014; 8: 144.
133. Trautmann F., Cojoc M., Kurth I. et al. CXCR4 as biomarker for radioresistant cancer stem cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 2014; 90(8): 687–99.
134. Tang X., Li X., Li Z. et al. Downregulation of CXCR7 inhibits proliferative capacity and stem cell-like properties in breast cancer stem cells. *Tumour Biol.* 2016; 37(10): 13425–33.
135. Sun X., Cheng G., Hao M. et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2010; 29(4): 709–22.
136. Chatterjee S., Behnam Azad B., Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv. Cancer Res.* 2014; 124: 31–82.
137. Shan S., Lv Q., Zhao Y. et al. Wnt/beta-catenin pathway is required for epithelial to mesenchymal transition in CXCL12 over expressed breast cancer cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015; 8(10): 12357–67.
138. Jung M.J., Rho J.K., Kim Y.M. et al. Upregulation of CXCR4 is functionally crucial for maintenance of stemness in drug-resistant non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 2013; 32(2): 209–21.
139. Dragu D.L., Necula L.G., Bleotu C. et al. Therapies targeting cancer stem cells: Current trends and future challenges. *World J. Stem Cells* 2015; 7(9): 1185–201.
140. Singla A.K., Downey C.M., Bebb G.D. et al. Characterization of a murine model of metastatic human non-small cell lung cancer and effect of CXCR4 inhibition on the growth of metastases. *Oncoscience* 2015; 2(3): 263–71.
141. Uy G.L., Rettig M.P., Motabi I.H. et al. A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; 119(17): 3917–24.
142. Zakaria N., Yusoff N.M., Zakaria Z. et al. Human non-small cell lung cancer expresses putative cancer stem cell markers and exhibits the transcriptomic profile of multipotent cells. *BMC Cancer* 2015; 15: 84.
143. Gires O., Klein C.A., Baeuerle P.A. On the abundance of EpCAM on cancer stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 2009; 9(2): 143.
144. Baeuerle P.A., Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br. J. Cancer* 2007; 96(3): 417–23.
145. Sadeghi S., Hojati Z., Tabatabaieian H. Coexpression of EpCAM and c-myc genes in malignant breast tumours. *J. Genet.* 2017; 96(1): 109–18.
146. Imrich S., Hachmeister M., Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh. Migr.* 2012; 6(1): 30–8.
147. Deng Z., Wu Y., Ma W. et al. Adoptive T-cell therapy of prostate cancer targeting the cancer stem cell antigen EpCAM. *BMC Immunol.* 2015; 16: 1.
148. Clay M.R., Tabor M., Owen J.H. et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck* 2010; 32(9): 1195–201.
149. Roudi R., Korourian A., Sharifabrizi A. et al. Differential Expression of Cancer Stem Cell Markers ALDH1 and CD133 in Various Lung Cancer Subtypes. *Cancer Invest.* 2015; 33(7): 294–302.
150. Khorrami S., Zavarani Hosseini A., Mowla S.J. et al. Verification of ALDH Activity as a Biomarker in Colon Cancer Stem Cells-Derived HT-29 Cell Line. *Iran. J. Cancer Prev.* 2015; 8(5): e3446.
151. Ricardo S., Vieira A.F., Gerhard R. et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J. Clin. Pathol.* 2011; 64(11): 937–46.
152. Chen J., Xia G., Jiang B. et al. Prognostic Value of Cancer Stem Cell Marker ALDH1 Expression in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2015; 10(12): e0145164.
153. Tomita H., Tanaka K., Tanaka T. et al. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* 2016; 7(2): 11018–32.
154. Teitz-Tennenbaum S., Wicha M.S., Chang A.E. et al. Targeting cancer stem cells via dendritic-cell vaccination. *Oncoimmunology* 2012; 1(8): 1401–3.

Поступила: 28.12.2017

ПРОГРАММИРУЕМЫЙ НЕКРОЗ И РЕГЕНЕРАЦИЯ ТКАНЕЙ

Г.С. Копейна¹, А.В. Замараев¹, Б.Д. Животовский^{1,2}, И.Н. Лаврик¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

PROGRAMMED NECROSIS AND TISSUE REGENERATION

G.S. Kopeina¹, A.V. Zamaraev¹, B.D. Zhivotovsky^{1,2}, I.N. Lavrik¹

¹ M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

e-mail: Boris.Zhivotovsky@ki.se

Программируемый некроз или некроптоз, играет существенную роль в физиологических процессах в организме. Нарушение процесса некроптоза связано с избыточной гибелью клеток, развитием ряда патологических состояний, включая воспалительные и нейродегенеративные заболевания. В последнее время появляются данные об участии некроптоза в индукции пролиферации стволовых клеток и регенерации тканей. Запуск некроптотической гибели может осуществляться через рецепторы фактора некроза опухоли, TRAILR1/2, FAS, а также через эндосомальные Toll-подобные и NOD-подобные рецепторы. Основные механизмы регуляции некроптотической гибели осуществляются на уровне главных белков — RIPK1 и RIPK3, которые способны принимать участие в пролиферации стволовых клеток и процессе регенерации. Последние работы показали, что некротические процессы могут приводить к быстрой активации клеток-предшественниц и регенерации печени, а также на модели инфаркта миокарда была продемонстрирована некроптоз-индуцированная регенерация ткани и дифференцировка c-kit⁺ клеток. Таким образом, изучение механизмов взаимосвязи некроптоза и регенерации поврежденных тканей позволит лучше понять фундаментальные аспекты программируемой гибели и деления клеток.

Ключевые слова: некроптоз, регенерация, гибель клеток.

Введение

В последнее время границы регенеративной медицины существенно расширились благодаря активному изучению физиологического гомеостаза тканей организма. Наиболее актуальными и приоритетными стали исследования процессов программируемой гибели клеток (ПГК) в организме и их роли в процессах дифференцировки клеток и формирования тканей и органов. На текущий момент номенклатурный комитет по исследованию гибели клеток, по совокупности морфологических и биохимических изменений выделил четыре типичных вида клеточной смерти — апоптоз, некроз, аутофагию и корнификацию (ороговение), а также восемь атипичных видов [1, 2]. Процесс апоптотической клеточной гибели встречается у большинства эукариотов. В многоклеточных организмах он обеспечивает морфогенез и гомеостаз тканей, а также задействован в важных этапах развития и функционирования иммунной системы. Помимо апоптоза в настоящее время достаточно хорошо охарактеризован еще один тип ПГК, программируемый некроз или некроптоз, который играет существенную роль в физиологических процессах. При этом его дисрегуляция связана с избыточной гибелью клеток и развитием ряда патологических состояний, включая воспалительные и нейродегенеративные заболевания. В последнее время появляются данные об участии некроптоза в индукции пролиферации стволовых клеток и регенерации тканей.

Некроптоз как форма программируемой гибели клеток

За последнее десятилетие парадигма регуляции клеточной гибели сильно изменилась. Доказано, что

Programmed necrosis or necroptosis plays an important role in cell physiology. Disturbances in necroptotic process are associated with excessive cell death, the development of a number of pathological conditions, including inflammatory and neurodegenerative diseases. Accumulated evidences suggest the involvement of necroptosis in the induction of stem cell proliferation and tissue regeneration. The necrotic death can be triggered through the family of receptors of tumor necrosis factor, TRAILR1/2, FAS, as well as endosomal Toll-like and NOD-like receptors. An important role in the regulation of necroptosis belongs to proteins RIPK1 and RIPK3, which also might be essential for proliferation of stem cells and the regeneration process. Recent study has shown that necroptosis can lead to rapid activation of progenitor cells and regeneration of the hepatic tissues, as well as a necrotic-induced tissue regeneration and differentiation of c-kit⁺ cells in a model of myocardial infarction. Thus, the investigation of interplay between necroptosis and regeneration of damaged tissues will allow us to understand the fundamental aspects of programmed cell death and cell division.

Keywords: necroptosis, regeneration, cell death.

помимо апоптоза, регулируемым может быть и процесс некроза [3]. Одним из наиболее хорошо изученных типов программируемого некроза является тип клеточной гибели, который принято называть некроптозом. Некроптоз — не зависящий от каспаз процесс гибели клеток, запускаемый через рецепторы смерти и регулируемый киназами RIPK1, RIPK3 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1/3; рецептор-связанный белок 1/3) и MLKL (Mixed lineage kinase domain-like protein; псевдокиназа смешанного происхождения) [1]. Морфологически некроптоз обладает всеми характерными признаками некроза и достаточно сильно отличается от апоптоза: клетка увеличивается в размере, органеллы набухают, и происходит разрыв цитоплазматической мембраны. Однако, как отмечено выше, процесс некроптоза является генетически регулируемым механизмом гибели клеток по сравнению с некрозом, который происходит вследствие нерепарируемого механического, теплового или химического повреждений клеток. В отличие от апоптоза при некроптотической гибели все содержимое клеток выходит во внеклеточное пространство, что вызывает сильный иммунный ответ. Запуск некроптотической гибели может осуществляться через рецепторы фактора некроза опухоли (ФНО), TRAILR1/2, FAS, а также через эндосомальные Toll-подобные и NOD-подобные рецепторы [4]. Помимо рецепторов, индуктором некроптоза могут стать и внутренние стимулы, такие как повреждение ДНК, действие ДНК-зависимых регуляторных факторов интерферона DAI (DNA-dependent activator of interferon regulatory factors; ДНК-зависимый активатор регуляторных факторов интерферона) или протеинкиназы R [5].

Наиболее изученной моделью активации некроптоза является внешний путь, индуцируемый через рецептор ФНО и ингибирование каспаз (рис. 1). В зависимости от ткани, внешнего стимула и микроокружения клетки, связывание ФНО может приводить как к выживанию клетки, так и к апоптотической или некротической гибели [6]. После взаимодействия с ФНО, рецептор ФНО претерпевает конформационные изменения, которые способствуют связыванию белков TRADD, RIPK1, cIAP1/2 и TRAF2/5 (TNF receptor-associated factor 2/5; фактор, ассоциированный с рецептором ФНО). Такой высокомолекулярный мембранный комплекс называется комплекс I. cIAP (cellular inhibitor of apoptosis protein; клеточный ингибитор белков апоптоза) в данном комплексе является не только связующим звеном с TRAF2, но и способен участвовать в убиквитинилировании протеинкиназы RIPK1. Помимо cIAP, который осуществляет КБЗ убиквитинилирование RIPK1, RIPK1 также подвергается так называемому линейному (M1) убиквитинилированию под действием комплекса LUBAC (Linear Ubiquitin chain Assembly Complex; комплекс, связывающий линейные цепи убиквитина). Степень убиквитинилирования RIPK1 является определяющим фактором в дальнейшей судьбе клетки. КБЗ и M1 полиубиквитинилирование RIPK1 приводит к связыванию белков NEMO (NF- κ B essential modulator; модулятор фактора NF- κ B) и IKK α/β , и последующей активации NF- κ B пути (nuclear factor

кappa-light-chain-enhancer of activated B cells; транскрипционный фактор NF- κ B), что стимулирует выживание клетки [7]. Запуск NF- κ B пути положительно регулирует экспрессию ряда анти-апоптотических генов таких, как *A20* и *c-FLIP*, что вызывает ингибирование ПГК. Однако, если RIPK1 подвергается деубиквитинилированию, например, при ингибировании белков cIAP, происходит высвобождение RIPK1 из комплекса I и его переход в цитоплазму, где он связывается с белками апоптотического или некротического путей. Во время апоптотической гибели активная каспаза-8 способна расщеплять RIPK1 и инактивировать данный белок. При блокировании каспазной активности синтетическим пан-каспазным ингибитором zVAD-fmk или вирусными белками серпинами RIPK1 не расщепляется и связывается с компонентом интернализированного комплекса I — TRADD, а также с белками FADD, RIPK3 и каспазой-8, образуя комплекс, называемый некротомой [8] (рис. 1). В дальнейшем, в составе этого комплекса происходит каскад пост-трансляционных модификаций, таких как фосфорилирование RIPK3, RIPK1, а также белка MLKL, который является ключевым звеном в передаче сигнала некроптоза [9–11]. Фосфорилирование MLKL ведет к олигомеризации данного белка и его связыванию с фосфатидилинозитол-фосфатом плазматической мембраны, что вызывает ее пермеабиллизацию и выход содержимого клетки во внеклеточное пространство [12].

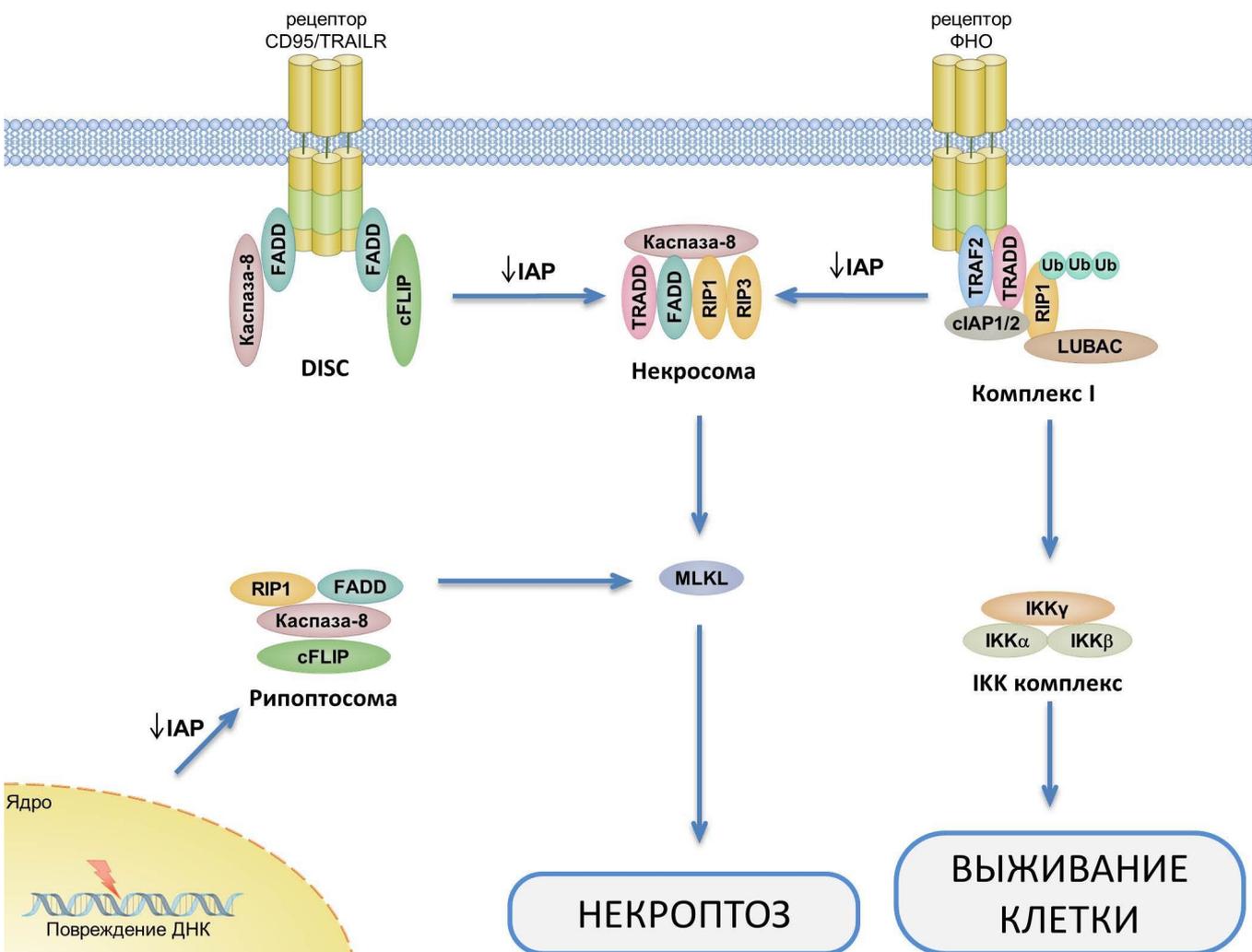


Рис. 1. Механизм активации различных высокомолекулярных комплексов, контролирующих ПГК и пути их регуляции. По [26] с изм.

Как отмечалось выше, некроптотическая гибель может быть также индуцирована внутренними стимулами в условиях пониженного содержания клеточных ингибиторов апоптоза cIAP1/2 [13, 14]. Такие условия предотвращают К63-убиквитинирование RIPK1 и инициацию активации NF-κB пути. Внутренним стимулом может, в частности, выступать генотоксический стресс, ведущий к образованию комплекса каспаза-8/RIPK1/FADD/c-FLIP, называемого рипоптосомой [13, 14]. В составе этого комплекса может происходить как активация каспазы-8 и запуск апоптотического пути, так и инициация некроптотической гибели. Для инициации некроптотической клеточной гибели в клетках необходимо наличие белка RIPK3, который входит в состав комплекса каспаза-8/RIPK1/RIPK3/FADD/c-FLIP — некрисомы. Важным фактором, определяющим дальнейшую судьбу клетки, является соотношение между каспазой-8 и ее ингибитором белком c-FLIP, которые входят в состав данного комплекса [13, 15]. В ходе исследований было сделано предположение, что образование гомодимера каспазы-8 в составе комплекса способствует ее активации и запуску апоптоза. В случае образования гетеродимера каспазы-8 с длинной изоформой белка c-FLIP, последний ограничивает каталитическую активность каспазы-8, необходимую для запуска апоптоза, но достаточную для расщепления RIPK1. Такие условия приводят к разрушению некрисомы и выживанию клетки. Однако, в случае образования гетеродимера каспазы-8 с короткой формой белка c-FLIP каспазная активность блокируется и происходит индукция некроптотической гибели [13, 15] (рис. 1). Таким образом, вышеприведенные факты демонстрируют ключевую роль образования комплексов — рипоптосомы или некрисомы — в выборе клеткой типа гибели — апоптоза или некроптоза.

Некроптоз и регенерация

Усиление регенерации тканей после некроза — широко описанное в научной литературе явление, которое наблюдается, например, для тканей печени [16]. Так, синдром массивного некроза печени (МНП) характеризуется обширным поражением тканей печени и высокой смертностью. Однако, некротические процессы приводят к быстрой активации клеток-предшественниц и регенерации тканей печени, от интенсивности которой зависит клинический исход болезни [17]. Необходимо отметить, что механизм массовой гибели гепатоцитов в этом случае до конца не ясен, но у пациентов с МНП было зафиксировано повышение уровня фосфорилированной формы белка MLKL, ответственного за эффекторную фазу некроптоза [18]. Более того, исследование механизмов развития МНП на мышах показало, что ингибирование или нокаут гена ключевого регулятора некроптоза — белка RIPK3 — существенно снижало гибель гепатоцитов на ранней стадии развития заболевания [19]. Полученные результаты свидетельствуют, что при развитии данного заболевания клетки печени гибнут по механизму некроптоза. При этом быстрая активация клеток-предшественниц печени и их пролиферация в случае синдрома МНП, по-видимому, обусловлены воспалением, вызванным массовой гибелью гепатоцитов.

Другим примером некроптоз-индуцированной регенерации является пролиферация и дифференцировка c-kit⁺ клеток, продемонстрированная на модели инфаркта миокарда у крыс [20]. Авторами исследования было показано, что введение в сердечную мышцу

аденовирусного вектора, содержащего ген фактора роста гепатоцитов, повышало уровень экспрессии RIPK1 и RIPK3 в тканях сердца после инфаркта. Повышенный уровень этих белков индуцировал запуск некроптотической гибели кардиомиоцитов, что, в свою очередь, стимулировало активацию и деление c-kit⁺ клеток. При этом ингибирование некроптоза кардиомиоцитов в данной экспериментальной модели вело к снижению пролиферации и дифференцировки c-kit⁺ клеток, а также к подавлению ангиогенеза.

Однако, связь между регенерацией и некроптотическим типом гибели осуществляется не только на уровне системного ответа на воспаление, возникающего вследствие попадания содержимого погибших клеток в окружающие ткани. Более тонкие механизмы регуляции осуществляются на уровне главных белков-участников некроптоза — RIPK1 и RIPK3, которые могут принимать участие в пролиферации стволовых клеток отдельных типов и процессе регенерации тканей. Так, RIPK1 может регулировать активацию путей JNK (c-Jun N-terminal kinase; c-Jun N-концевая киназа) и фосфатидилинозитол-3-киназа/Akt, стимулирующих выживание и пролиферацию клеток [21, 22]. Например, было показано, что в экспериментах на мышцах с тканеспецифичными нокуатами отсутствие RIPK1 приводило к гибели гемопоэтических стволовых клеток-предшественниц, что вызывало острую недостаточность костного мозга у животных [23]. При этом RIPK1-дефицитные клетки-предшественницы не были способны восстановить гемопоэз при их трансплантации животным, получившим смертельную дозу радиации. С другой стороны, также были получены данные о RIPK3-зависимой регенерации тканей после их повреждения. Так, в дефицитных по этому белку дендритных клетках экспериментальных мышей продуцировалось заметно меньше воспалительных цитокинов IL-1β, IL-23 и IL-22, что существенно снижало силу иммунного ответа на введение сульфата декстрана и активацию процессов регенерации тканей кишечника после повреждения [24, 25]. При этом RIPK3 нокаутные мыши были подвержены развитию колитов вследствие замедления обновления эпителиальных клеток кишечника. Несмотря на свою роль в процессе программируемого некроза, RIPK1 и RIPK3 обладают функциями запуска и контроля регенерации, что делает их перспективными мишенями для регенеративной медицины.

Заключение

Таким образом, изучение механизмов некроптоз-индуцируемого запуска пролиферации стволовых клеток и восстановления поврежденных тканей позволит понять фундаментальные аспекты взаимодействия противоположных физиологических процессов — программируемой гибели и размножения клеток. Поскольку при различного рода повреждениях органов и их систем некроз тканей является одним из наиболее часто наблюдаемых последствий, то поиск путей регуляции регенеративных процессов через некроптоз открывает возможности для минимизации таких последствий и сохранения поврежденного органа в его функциональном состоянии.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Благодарности

Работа выполнена за счет грантов РФФИ № 18-04-00207А, 18-015-00211А.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018; 25(3): 486–541.
2. Деев Р.В., Билялов А.И., Жампеисов Т.М. Современные представления о клеточной гибели. *Гены и Клетки* 2018; 13(1): 6–19.
3. Zhou W., Yuan J. Necroptosis in health and diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2014; 35: 14–23.
4. Wu W., Liu P., Li J. Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2012; 82(3): 249–58.
5. Linkermann A., Green D.R. Necroptosis. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370(V): 455–65.
6. Wilson N.S., Dixit V., Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat. Immunol.* 2009; 10(4): 348–55.
7. Hacker H., Karin M. Regulation and Function of IKK and IKK-Related Kinases. *Sci. STKE* 2006; 357: re13.
8. Cho Y.S., Challa S., Moquin D. et al. Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell* 2009; 137(6): 1112–23.
9. Moriwaki K., Chan F.K. RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev.* 2013; 27: 1640–9.
10. Sun L., Wang H., Wang Z. et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* 2012; 148: 213–27.
11. Murphy J.M., Czabotar P.E., Hildebrand J.M. et al. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity* 2013; 39: 443–53.
12. Dondelinger Y., Declercq W., Montessuit S. et al. MLKL compromises plasma membrane integrity upon binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell Rep.* 2014; 7: 1–11.
13. Feoktistova M., Geserick P., Kellert B. et al. CIAPs Block Ripoptosome Formation, a RIP1/Caspase-8 Containing Intracellular Cell Death Complex Differentially Regulated by cFLIP Isoforms. *Mol. Cell* 2011; 43: 449–63.
14. Tenev T., Bianchi K., Darding M. et al. The Ripoptosome, a Signaling Platform that Assembles in Response to Genotoxic Stress and Loss of IAPs. *Mol. Cell* 2011; 43: 432–48.
15. Feoktistova M., Geserick P., Panayotova-Dimitrova D. et al. Pick your poison: The Ripoptosome, a cell death platform regulating apoptosis and necroptosis. *Cell Cycle* 2012; 11: 460–7.
16. Craig C.E., Quaglia A., Selden C. et al. The Histopathology of Regeneration in Massive Hepatic Necrosis. *Semin. Liver Dis.* 2004; 24(1): 49–64.
17. Weng H., Cai X., Yuan X. et al. Two sides of one coin: Massive hepatic necrosis and progenitor cell-mediated regeneration in acute liver failure. *Front. Physiol.* 2015; doi:10.3389/fphys.2015.00178.
18. Wang H., Sun L., Su L. et al. Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3. *Mol. Cell* 2014; 54: 133–46.
19. Ramachandran A., McGill M.R., Xie Y. et al. Receptor interacting protein kinase 3 is a critical early mediator of acetaminophen-induced hepatocyte necrosis in mice. *Hepatology* 2013; 58(6): 2099–108.
20. Liu J., Wu P., Wang H. et al. Necroptosis Induced by Ad-HGF Activates Endogenous C-Kit⁺ Cardiac Stem Cells and Promotes Cardiomyocyte Proliferation and Angiogenesis in the Infarcted Aged Heart. *Cell. Physiol. Biochem.* 2016; 40(5): 847–60.
21. Habib A.A., Chatterjee S., Park S.K. et al. The epidermal growth factor receptor engages receptor interacting protein and nuclear factor-kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase to activate NF-kappa B. Identification of a novel receptor-tyrosine kinase signalosome. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(12): 8865–74.
22. Park S., Zhao D., Hatanpaa K.J. et al. RIP1 activates PI3K-Akt via a dual mechanism involving NF- κ B-mediated inhibition of the mTOR-S6K-IRS1 negative feedback loop and down-regulation of PTEN. *Cancer Res.* 2009; 69(10): 4107–11.
23. Roderick J.E., Hermance N., Zelic M. et al. Hematopoietic RIPK1 deficiency results in bone marrow failure caused by apoptosis and RIPK3-mediated necroptosis. *PNAS USA* 2014; 111(40): 14436–41.
24. Moriwaki K., Balaji S., McQuade T. et al. The Necroptosis Adaptor RIPK3 Promotes Injury-Induced Cytokine Expression and Tissue Repair. *Immunity* 2014; 41(4): 567–78.
25. Moriwaki K., Balaji S., Bertin J. et al. Distinct Kinase-Independent Role of RIPK3 in CD11c⁺ Mononuclear Phagocytes in Cytokine-Induced Tissue Repair. *Cell Rep.* 2017; 18(10): 2441–51.
26. Zamaraev A.V., Kopeina G.S., Zhivotovsky B. et al. Cell death controlling complexes and their potential therapeutic role. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015; 72(3): 505–17.

Поступила: 04.06.2018

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КИСЛОРОДА НА РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНОВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Е.А. Жиряева^{1,2}, А.П. Киясов², А.А. Ризванов²

¹ ООО «Клиника семейной медицины», Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

THE EFFECT OF OXYGEN CONCENTRATION ON EMBRYO DEVELOPMENT AND ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES EFFICIENCY

E.A. Zhiryayeva^{1,2}, A.P. Kiassov², A.A. Rizvanov²

¹ "Klinika semejnoy mediciny" LLC, Kazan, Russia

² Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

e-mail: Albert.Rizvanov@kpfu.ru

На преимплантационное развитие эмбрионов в условиях *in vitro* оказывают влияние множество различных факторов. Одним из таких факторов является концентрация кислорода в среде культивирования. В настоящее время лаборатории ЭКО имеют возможность культивировать эмбрионы как в условиях атмосферного содержания кислорода, так и при пониженных концентрациях кислорода (гипоксии).

Настоящий обзор посвящен анализу проведенных исследований по выявлению «оптимальной» концентрации газовой смеси в инкубаторе с целью получения более жизнеспособных эмбрионов и увеличению результативности программ вспомогательных репродуктивных технологий.

Ключевые слова: бластоциста, концентрация кислорода, гипоксия, среда культивирования, преимплантационное развитие, ЭКО, вспомогательные репродуктивные технологии.

Введение

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в сфере вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), результативность циклов ВРТ, по данным Европейского общества по вопросам репродукции человека и эмбриологии (ESHRE), опубликованным в 2016 г., невелика и составляет 30–40% [1]. Основной целью клиник экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) является достижение и поддержание максимально высокого процента наступления беременностей и живорождения.

Один из этапов, необходимых для выполнения данной задачи, — это создание оптимальных условий культивирования эмбрионов, наиболее приближенных к условиям *in vivo*. Важным фактором, оказывающим влияние на процесс развития эмбриона в рамках протокола ЭКО, является концентрация кислорода в среде культивирования. В естественных условиях эмбрион находится в гипоксической среде, где также поддерживается баланс между уровнем образования активных форм кислорода и антиоксидантных ферментов [2]. Редокс-система гарантирует идеальную среду для эмбрионального развития в физиологических условиях, но не в условиях ЭКО [3, 4]. В некоторых исследованиях показано, что культуральные среды сами могут быть источником активных форм кислорода [5], которые, в свою очередь, могут вызывать повреждение ДНК, липидов, клеточных мембран, митохондрий, эндоплазматического ретикулума [6–9].

Однако создания только оптимального газового окружения не достаточно. Без объективной оценки морфологического, генетического, эпигенетического, метаболического статусов эмбрионов в программах ЭКО с использованием современных технологий увеличение результативности программ ВРТ невозможно [10].

Целью данной работы стал анализ имеющихся данных о влиянии различных концентраций O₂ на качество эмбрионов и исход протоколов ЭКО.

Many different factors have an effect on the preimplantation development of embryos under conditions *in vitro*. One of these factors is the oxygen concentration in the culture medium. Currently, IVF labs have ability to cultivate embryos either under conditions of atmospheric oxygen concentration or at low oxygen concentration (hypoxia). This review is focused on the analysis of up to date research and clinical results which are trying to establish an "optimal" composition of the gas mixture in the incubator to generate more viable embryos and increase the effectiveness of assisted reproductive technologies programs.

Keywords: blastocyst, oxygen concentration, hypoxia, environment, cultivation, preimplantation development, IVF, assisted reproductive technologies.

Концентрация кислорода в различных органах и тканях. Физиологическая роль концентрации кислорода *in vivo*

Абсолютным условием существования аэробных организмов является снабжение их кислородом. Для нормального роста, функционирования клеток и производства энергии необходим молекулярный кислород. Кислород — основной окислитель в процессе гликолиза. Хотя процесс гликолиза может происходить и в анаэробных условиях, этот путь является энергетически менее выгодным. То есть недостаток кислорода приводит к снижению синтеза АТФ митохондриями и, как следствие, возникает «энергетический голод» [11].

Кислород является конечным акцептором электронов в процессе окислительного фосфорилирования, что, в свою очередь, несет риск образования свободных радикалов, приводящих к нарушению функционирования клеток и их гибели. В результате этого эволюционно возникли метаболические и физиологические системы, поддерживающие гомеостаз кислорода в организме [12].

Парциальное давление кислорода определяет процесс газообмена в организме. Скорость диффузии газов через физиологическую мембрану зависит от парциального давления газа по обе стороны мембраны. Чем больше разница между парциальными давлениями газа по обе стороны мембраны, тем быстрее происходит диффузия [13].

Парциальное давление кислорода в атмосферном воздухе составляет 150 мм рт. ст.; в артериальной крови около 90 мм рт. ст.; в тканях — 20 мм рт. ст., в венозной крови — 40 мм рт. ст. [13].

В условиях гипоксии транскрипция большинства генов в клетках подавляется. Однако существует группа генов, транскрипция которых усиливается при недостатке кислорода. Эти гены кодируют

гипоксия-индуцибельные факторы, которые улучшают доставку кислорода (фактор роста эндотелия сосудов-А, эритропоэтин 4), и контролируют метаболические пути (пируват дегидрогеназа и др.) [14]. Кроме того, гипоксия-индуцибельные факторы участвуют в канцерогенезе, вызывают повышенную пролиферацию злокачественных клеток и метастазирование [15].

Влияние концентрации кислорода на эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) *in vitro*

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), как правило, выделяют из клеток эпибласта бластоцист, полученных в программе ЭКО. Благодаря своей плюрипотентности, ЭСК имеют значительный потенциал для использования в регенеративной медицине. Однако одним из их недостатков является тенденция к спонтанной дифференцировке в культуре [16]. Следовательно, их рост в культуре требует определенных условий для поддержания их плюрипотентного потенциала и стабильности генома.

Экспериментально было доказано, что колонии ЭСК, культивируемые в условиях гипоксии (3–5%), имеют меньше признаков морфологической дифференцировки, чем колонии, культивируемые при атмосферной концентрации кислорода (21%). Уровень экспрессии гена *oct-4* (белок OCT4 участвует в самообновлении и поддержании недифференцированных стволовых клеток) выше у ЭСК в условиях пониженной концентрации кислорода [17]. Условия гипоксии увеличивают клональную выживаемость ЭСК мыши [18].

Y. Yoshida с соавт. (2009) показали, что репрограммирование соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) значительно эффективнее в гипоксических условиях, чем при нормоксии, как у мышей, так и у человека [19].

M.A. Ramirez с соавт. (2011) установили, что после 3 сут. культивирования мышиных ЭСК в условиях гипоксии, уровень апоптоза ЭСК был выше 6%. Однако при непрерывном выращивании ЭСК в течение месяца в тех же условиях, уровень апоптоза был менее 4% [20].

Культивирование ЭСК или ИПСК в условиях гипоксии перед трансплантацией (регенеративная терапия при инфаркте миокарда) повышает их терапевтический потенциал [21].

В ряде исследований было обнаружено, что пониженная концентрация кислорода способствует направленной дифференцировке ЭСК (под действием внешних факторов).

J.M. Shin с соавт. (2011) выявили, что в условиях гипоксии эффективность дифференцировки ЭСК в эндотелиальные клетки достоверно выше. Уровень маркеров сосудистых клеток (PECAM, KDR, CD144, Tie-2) был в 1,5–2 раза выше у клеток, культивировавшихся в условиях гипоксии [22]. Также было установлено увеличение экспрессии генов *VEGF* (вазо-эндотелиальный фактор роста), *bFGF* (основной фактор роста фибробластов), *ANGPT1* (фактор роста, стимулирующий ангиогенез), *PDGF* (фактор роста тромбоцитов) и др. при низких концентрациях кислорода.

Эти данные были подтверждены в работе K.M. Tsang с соавт. (2017): авторы отмечают, что ЭСК наиболее чувствительны к гипоксии в первые 2 сут. дифференцировки [23].

Таким образом, концентрация кислорода в среде культивирования оказывает значительное влияние на пролиферацию и дифференцировку ЭСК. Учитывая тот факт, что ЭСК получают из бластоцист, можно предположить, что влияние концентрации кислорода играет важную роль в развитии эмбрионов.

Влияние концентрации кислорода при культивировании эмбрионов на эффективность ВРТ

Существуют две стратегии культивирования эмбрионов: в условиях атмосферной концентрации кислорода (~20%) и при пониженном содержании кислорода (~5%). Установлено, что в естественных условиях эмбрионы подвергаются воздействию O_2 в концентрации 2–8% [24], причем наблюдается уменьшение концентрации O_2 по мере «перехода» эмбриона из маточных труб в полость матки [25].

За последние годы было выполнено большое количество экспериментов, направленных на изучение влияния концентрации кислорода на процесс доимплантационного развития эмбрионов.

Одно из первых исследований по данной теме осуществили J.C. Dumoulin с соавт. (1999) [26]. Они провели 1380 циклов ЭКО и проанализировали результаты культивирования ооцитов и эмбрионов в течение первых 2–3 сут. развития либо в условиях атмосферной концентрации кислорода (690 циклов), либо при пониженной концентрации O_2 (690 циклов). Процент оплодотворения, имплантации и наступления беременности оказался сопоставим в обеих группах. Эмбрионы, оставшиеся после переноса на 2–3 сут., продолжали культивировать до 5 сут. В результате процент формирования бластоцист был статистически выше в группе с 5% O_2 по сравнению с группой 20% O_2 (25,8 против 20,4% соответственно). Авторы отметили незначительное увеличение жизнеспособности эмбрионов при культивировании в условиях низкой концентрации кислорода. Возможно, концентрация O_2 оказывает влияние на более поздних этапах преимплантационного развития.

M. Bahceci с соавт. (2005) предположили, что результаты ИКСИ (ICSI — IntraCytoplasmic Sperm Injection, введение сперматозоида в цитоплазму, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида) можно улучшить, используя культивирование эмбрионов в условиях 5% O_2 [27]. В данной работе было проанализировано 712 ооцитов. Культивирование осуществлялось при 5 и 20% O_2 . Эмбриотрансфер производили на 2–3 сут. культивирования. Статистически значимых различий между группами эмбрионов, культивировавшихся в условиях различной концентрации кислорода, в клинических исходах циклов не наблюдалось. Авторы сделали вывод об отсутствии влияния концентрации O_2 на результативность циклов ИКСИ.

В своем обзоре A. Petersen с соавт. (2005) сравнили культивирование размороженных эмбрионов человека в двух различных системах (атмосферная и пониженная концентрация кислорода) [28]. На 4 сут. культивирования процент эмбрионов, развившихся до стадии морулы, составил 43%/68% в группах нормоксия/гипоксия соответственно.

P. Rinaudo с соавт. (2006) изучали влияние концентрации кислорода на экспрессию генов в преимплантационных мышиных эмбрионах и отметили, что 5% концентрация кислорода способствует лучшему развитию эмбрионов в условиях *in vitro* [29]. Они также выявили, что эмбрионы, развивающиеся в условиях пониженной концентрации кислорода, содержали большее количество клеток, в том числе входящих в состав ВКМ (внутриклеточной массы), чем эмбрионы, культивировавшиеся при 20% O_2 . Кроме того, было обнаружено, что в условиях атмосферной концентрации кислорода значительно увеличивается экспрессия гена *ccng1* (кодирует белок, отвечающий за правильное течение клеточного цикла; избыточная экспрессия этого гена ускоряет

прогрессию клеточного цикла и может способствовать онкогенезу) и снижается экспрессия гена *ube2a* (кодирует белок, необходимый для пострепликативного восстановления поврежденной ДНК, участвует в транскрипционной регуляции) [29].

В. Кеа с соавт. (2006) оценивали влияние пониженной концентрации кислорода на процент оплодотворения, развитие эмбрионов и процент наступления беременностей [30]. Число, возраст пациентов, причина бесплодия, среднее число полученных ооцитов, процент оплодотворения и наступления беременностей были сопоставимы в группах с пониженным и атмосферным содержанием кислорода. Перенос эмбрионов осуществлялся на 3 сут. Хотя авторы не наблюдали статистически значимой разницы по ранее перечисленным параметрам в обеих группах, они отметили улучшение качества эмбрионов к 3 сут. культивирования в группе с 5% O₂.

J.M. Cieslak Janzen с соавт. (2007–2008) исследовали развитие сиблинговых эмбрионов после ЭКО/ИКСИ в зависимости от концентрации кислорода [31]. Хотя авторы отметили улучшение «качества» эмбрионов и увеличение количества пролонгирующих беременностей в группе, культивировавшейся в условиях гипоксии, эти различия не были статистически значимыми.

Влияние концентрации кислорода на развитие эмбрионов при длительном культивировании (до 5 сут.) изучали В. Kovacic с соавт. (2008) [32]. Оценивались следующие параметры: частота оплодотворения, процент морфологически «нормальных» эмбрионов, частота формирования бластоцист. Учитывался также способ оплодотворения: ЭКО (988 ооцитов) или ИКСИ (928 ооцитов). Было установлено, что концентрация кислорода не оказывает влияния на частоту оплодотворения. Но доля эмбрионов с «хорошей» морфологией на 3 сут. была выше в группе культивирования при 5% O₂ по сравнению с 20% O₂: для циклов ИКСИ 51% против 28%; для циклов ЭКО 59% против 43%. Важно отметить, что для обоих способов оплодотворения наблюдалось увеличение доли бластоцист на 5 сут. развития в группах культивирования с пониженным содержанием кислорода.

U. Waldenstrom с соавт. (2009) опубликовали данные о влиянии газовой смеси, в которой культивировались эмбрионы, на исход программы ВРТ [33]. Было рассмотрено развитие ооцитов, полученных от 396 пациенток. Эмбрионы 199 пациенток культивировались в двухгазовой смеси (6% CO₂ и 19% O₂), а эмбрионы 197 пациенток — в условиях трехгазовой смеси (6% CO₂, 5% O₂, 90% N₂). Полученные результаты были схожи с результатами предыдущих исследований. Процент формирования бластоцист (47,8 против 42,1%), так же, как и процент наступления беременности (56,9 против 38,7%) был выше в группе с пониженным содержанием кислорода. Авторы сделали вывод, что культивирование в системе трех газов увеличивает уровень рождаемости на 10%.

Н. Ciray с соавт. (2009) провели эксперимент, направленный на подтверждение гипотезы о положительном влиянии пониженной концентрации кислорода на качество эмбрионов человека, полученных в программе ЭКО [34]. Были проанализированы 75 ооцитов, разделенных на 2 группы: первая группа ооцитов культивировалась в условиях 5% O₂ с момента оплодотворения до дня переноса (на 5 сут.); вторая группа — в условиях атмосферного содержания кислорода с момента оплодотворения до 3 сут., а затем в условиях пониженного содержания O₂. Различий между группами в морфологических характеристиках эмбрионов на 3 сут. не наблюдалось. Однако, данные о развитии эмбрионов, начиная

с 3 сут., свидетельствуют об увеличении процента формирования бластоцист и улучшении качества эмбрионов при культивировании в условиях низкой концентрации кислорода с момента оплодотворения до дня переноса (1 группа).

М. Meintjes с соавт. (2009) проверили обоснованность культивирования эмбрионов при низкой концентрации O₂ [35]. В исследовании было изучено 230 циклов ЭКО/ИКСИ (первая программа ВРТ у всех пациентов). Оценивались следующие параметры: процент имплантации и живорождения. У эмбрионов, культивировавшихся при 5% O₂, уровень имплантации был выше на 12,2%, а показатель живорождения вырос на 14,8%. Авторы пришли к заключению, что при культивировании эмбрионов в условиях пониженной концентрации кислорода результативность программ ЭКО/ИКСИ увеличивается.

J. Graham с соавт. (2010) наблюдали за развитием эмбрионов в условиях различных концентраций кислорода у 84 пар, проходивших лечение бесплодия методом ЭКО, и обнаружили явные и существенные клинические преимущества при культивировании эмбрионов в условиях гипоксии: увеличение числа переносимых и криоконсервированных эмбрионов, а также увеличение их имплантационного потенциала [36].

Цель работы В. Kovacic с соавт. (2010) заключалась в том, чтобы установить, влияет ли низкая концентрация O₂ при культивировании эмбрионов на результативность программ ЭКО, если в качестве метода оплодотворения применяется технология ИКСИ [37]. В эксперименте приняли участие 647 пациенток:

1 подгруппа (348 женщин): пациентки моложе 40 лет, у которых получено 5 и более ооцитов в стадии метафазы второго деления мейоза;

2 подгруппа (169 женщин): пациентки моложе 40 лет, у которых получено менее 5 ооцитов в стадии метафазы второго деления мейоза;

3 подгруппа (130 женщин): пациентки старше 40 лет, у которых получена хотя бы одна яйцеклетка в стадии метафазы второго деления мейоза.

Все пациентки были разделены на 2 группы (ооциты 326 пациенток культивировались при 5% O₂, а 321 — при атмосферном содержании кислорода). Авторы отметили, что, несмотря на улучшение качества эмбрионов на 2 сут. развития в группе с пониженным содержанием кислорода, процент имплантации и процент развивающихся беременностей был сопоставим в обеих группах. Однако в группе, где ооциты культивировали в условиях 5% O₂, частота наступления беременностей была выше по сравнению с группой культивирования в условиях атмосферной концентрации кислорода (суммарно, без разделения на подгруппы; 38 против 28,3%). Также и у пациенток с «бедным ответом» яичников процент наступления беременностей был достоверно выше при культивировании в условиях 5% O₂ (2 подгруппа; 23 против 9,8%) при переносе эмбрионов на 3 сут. развития.

Ученые сделали вывод, что использование пониженной концентрации кислорода при культивировании эмбрионов в программах ЭКО является обоснованным независимо от продолжительности культивирования.

А. Mitsoli с соавт. (2011) также изучали развитие эмбрионов, культивируемых в условиях нормоксии/гипоксии [38] и наблюдали улучшение морфологического «качества» эмбрионов 3 сут. развития в группе гипоксии [38].

Однако D.G. Sobrinho с соавт. (2011) пришли к заключению, что, несмотря на положительную тенденцию в исходах программ ЭКО при культивировании эмбрионов в условиях гипоксии, рекомендовать культивирование

ооцитов и эмбрионов в таких условиях преждевременно, т.к. в некоторых проанализированных ими исследованиях (4 из 7) обнаружены сходные показатели оплодотворения, имплантации и числа прогрессирующих беременностей при гипоксии и при нормоксии [39].

Тем не менее, в более позднем обзоре, опубликованном в Кокрейновской базе в 2012 г. [40], S. Bontekoe с соавт. дали положительные рекомендации по культивированию эмбрионов в условиях пониженной концентрации кислорода (в сравнении с культивированием при атмосферной концентрации). Авторы считают, что гипоксия достоверно способствует возрастанию темпов деления, морфологического «качества» и жизнеспособности эмбрионов, что в свою очередь поможет увеличить результативность программ экстракорпорального оплодотворения.

P. Wale с соавт. (2012) изучали влияние концентрации кислорода на метаболизм аминокислот и углеводный обмен на мышинных эмбрионах [41]. Было отмечено, что эмбрионы, культивировавшиеся при более физиологической концентрации кислорода (5%), характеризуются более низкими показателями поглощения пирувата и некоторых аминокислот (серин, глутамин, аспартат) до стадии компактизации, чем эмбрионы, культивировавшиеся при 20% O₂. И наоборот, начиная со стадии морулы, эмбрионы в условиях 5% O₂ демонстрировали более высокие показатели поглощения глюкозы и усвоения аминокислот (аспарагин, глутамат, триптофан, лизин, треонин, тирозин, метионин, валин, изолейцин, лейцин, фенилаланин). F. Houghton с соавт. (2002) обнаружили, что значительная часть эмбрионов с повышенным уровнем потребления аминокислот на стадии дробления не достигает стадии бластоцисты [42]. Уровень гликолиза был ниже у бластоцист, культивировавшихся при сниженной концентрации кислорода. Эти результаты согласуются с данными о том, что повышение поглощения глюкозы эмбрионами на 4–5 сут. развития связано с увеличением успешности имплантации [43]. Сниженные показатели поглощения глюкозы могут свидетельствовать о низкой жизнеспособности данных эмбрионов [44].

Научная работа E. Kasterstein с соавт. (2013) была направлена на изучение влияния различных концентраций кислорода на развитие сиблинговых ооцитов и клинические исходы после инкубации в среде с двумя различными концентрациями кислорода [45]. Было проанализировано 258 циклов ЭКО, получено 3638 ооцитов III, 1833 из них культивировались при 5% O₂, 1805 — при 20% O₂. Процент оплодотворения и деления был сопоставим в обеих группах культивирования, что согласуется с результатами других исследований [26, 27, 30, 32]. Однако количество blastomeres в эмбрионах на 3 сут. развития, количество эмбрионов на перенос и криоконсервацию было больше в группе с пониженным содержанием кислорода.

Для того чтобы определить, влияет ли концентрация кислорода на клинические исходы программ ЭКО, были отдельно проанализированы циклы, в которых эмбрионы перенесли из групп с одинаковой концентрацией O₂. Из 258 циклов в 76 случаях эмбрионы перенесли из группы с 5% O₂, а в 38 — из группы с 20% O₂. Уровень имплантации, наступления беременности и частота родов живым плодом были значительно выше в группе с низкой концентрацией O₂ по сравнению с группой с атмосферной концентрацией.

E. Bontekoe с соавт. (2013) на основании анализа опубликованных данных в своем обзоре также считают, что культивирование эмбрионов при низких концентрациях кислорода увеличивает результативность программ ЭКО/ИКСИ, а, следовательно, и рождаемость [46].

Однако G. Paternot с соавт. (2013) пришли к выводу об отсутствии улучшений в качестве эмбрионов на 2 и 3 сут. развития при использовании низкой концентрации кислорода [47].

Исследование N. Guo с соавт. (2014) состояло в изучении влияния кислорода на различных стадиях развития эмбриона [48]. Наблюдала за развитием 1254 ооцитов, полученных от 92 пациенток. Как и в предыдущих работах, ооциты были разделены на две группы в зависимости от концентрации кислорода. Статистически значимой разницы в частоте оплодотворения между двумя группами обнаружено не было. Однако в группе с 5% O₂ количество «оптимальных» эмбрионов на 3 сут. развития было выше (72,4 против 64,2%). Также был выше процент формирования бластоцист в группе с пониженным содержанием кислорода (64,5 против 52,9%). Авторы пришли к заключению, что низкая концентрация кислорода может существенно повысить потенциал развития эмбриона, что положительно повлияет на результативность цикла ЭКО.

Z. Peng с соавт. (2015) проанализировали 3484 цикла ЭКО/ИКСИ, разделенные на 3 группы, отличающиеся условиями инкубации с момента трансвагинальной пункции фолликулов до переноса эмбрионов (на 3 сут. развития):

I группа: 5% CO₂, 20% O₂ — 1131 цикл;

II группа: 1 сут. культивирования: 5% CO₂, 20% O₂; 2 сут. культивирования: 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ — 1258 циклов;

III группа: 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ — 1095 циклов [49].

Эмбрионы из III группы показали более высокий процент оплодотворения и имплантации, чем эмбрионы из других групп. Данные показатели оказались самыми низкими во II группе. Не наблюдалось различий между тремя группами по уровню многоплодных беременностей и замерших беременностей.

S.O. Natri с соавт. (2016) провели анализ более 20 обзоров, в которых опубликованы данные о влиянии концентрации кислорода на развитие эмбрионов и исход программ ВРТ и считают, что на сегодняшний день нельзя сделать однозначный вывод о целесообразности культивирования эмбрионов в условиях гипоксии [50].

Ниже представлена таблица, обобщающая и дополняющая вышеперечисленные исследования (включает работы, объектом изучения которых стали ооциты и эмбрионы человека).

В целом, различия в эффективности процедур ЭКО при гипоксии и нормоксии, описанные выше, возможно связаны с разными подходами к формированию низкокислородной среды и манипуляциями с эмбрионами (групповое или отдельное культивирование, одноступенчатые или многоступенчатые среды). Рассмотрим некоторые технические аспекты.

Технические решения для достижения гипоксии для ВРТ

Для культивирования культур клеток, требующих пониженного парциального давления кислорода в атмосфере, используются мультигазовые инкубаторы, обеспечивающие контроль уровня и CO₂ и O₂, используя азот для вытеснения окружающего воздуха. Азот снижает уровень кислорода ниже атмосферного для создания микроаэрофильных (гипоксических) условий клеток в диапазоне от 0,2 до 20% кислорода. Также возможно использование уже готовой высокоочищенной газовой смеси с заданными концентрациями входящих в состав газов.

В последнее время все большее применение находят планшетные инкубаторы. Они могут работать в двух режимах: мультигазовом или моногазовом. Планшетный

Таблица. Сводный анализ научных работ, посвященных оценке влияния гипоксических условий культивирования на эмбриональное развитие и результативность ЭКО

Исследование	Число участников	Продолжительность культивирования	Инкубатор	Среда культивирования	Результаты исследований
J.C. Dumoulin и соавт., 1999 [26]	1380 циклов	3 сут.	—	—	Нет статистически значимых различий
M. Bahceci, 2005 [27]	712 ооцитов	3 сут.	—	—	Нет статистически значимых различий
A. Petersen и соавт., 2005 [28]	126 криоконсервированных эмбрионов	6 сут.	Анаэробная рабочая станция, Thermo Forma	Medicult	Увеличение процента образования морул/бластоцист в группе с гипоксией
V. Kea и соавт., 2006 [30]	1045 ооцитов	3 сут.	—	—	Нет статистически значимых различий
J.M. Cieslak Janzen и соавт., 2008 [31]	1379 ооцитов	3 сут., 5 сут.	—	Global medium	Нет статистически значимых различий
V. Kovacic и соавт., 2008 [32]	1916 ооцитов	5 сут.	—	—	Увеличение процента формирования бластоцист в группе с гипоксией
U. Waldenstrom и соавт., 2009 [33]	396 циклов	5 сут.	Labrum Klimat	BlastAssist System	Увеличение процента формирования бластоцист и процента наступления беременностей в группе с гипоксией
H. Ciray и соавт., 2009 [34]	75 ооцитов	3 сут., 5 сут.	Thermo Forma 3141 Forma Scientific	Quinn's Advantage Plus Cleavage Medium, Quinn's Advantage Plus Blastosyst Medium	Увеличение процента формирования бластоцист в группе с гипоксией
M. Meinties и соавт., 2009 [35]	230 циклов	3 сут., 5 сут.	Forma 3120	G-1 medium, G-2 medium, HSA-supplemented (Vitrolife)	Увеличение процента рождаемости в группе с гипоксией
J. Graham и соавт., 2010 [36]	84 цикла	3 сут., 5 сут.	—	—	Увеличение процента формирования бластоцист и процента наступления беременностей в группе с гипоксией
S. Kovacic и соавт., 2010 [37]	647 циклов	3 сут.	CB 150 Binder	BlastAssist (Medicult)	Увеличение процента наступления беременностей в группе с гипоксией
A. Mitsoli и соавт., 2011 [38]	464 циклов	3 сут.	—	COOK	Улучшение морфологии эмбрионов на 3 сут. развития в группе с гипоксией
E. Kasterstein и соавт., 2013 [45]	3638 ооцитов	3 сут., 5 сут.	NuAire	Vitrolife	Увеличение процента формирования бластоцист, процента имплантации и процента наступления беременностей в группе с гипоксией
G. Paternot и соавт., 2013 [47]	790 эмбрионов	3 сут.	Мини-инкубатор, стандартный инкубатор	—	Нет статистически значимых различий

Исследование	Число участников	Продолжительность культивирования	Инкубатор	Среда культивирования	Результаты исследований
N. Guo и соавт., 2014 [48]	1254 ооцитов	3 сут., 5 сут.	K-MINC 1000, Labotect C200	Vitrolife	Увеличение процента формирования blastocyst в группе с гипоксией
Z. Peng и соавт., 2015 [49]	3484 циклов	3 сут.	K-MINC 1000, SANYO MCO-5AC	Vitrolife	Увеличение процента имплантации в группе с гипоксией
Y. Yang и соавт., 2016 [51]	122 эмбриона после криоконсервации	с 3 по 5 сут.	APC-30D, SMA30DR (ASTEC)	SAGE	Более высокая скорость деления, низкий уровень апоптоза в группе с гипоксией

инкубатор состоит из нескольких отдельных камер с крышками. Эмбрионы каждой пациентки находятся в отдельной ячейке. Открытие камеры и осмотр эмбрионов одной пациентки не оказывает отрицательного воздействия на другие эмбрионы, находящиеся в инкубаторе, так как условия их культивирования остаются неизменными. Культивирование в отдельных камерах, не зависящих друг от друга, позволяет свести к минимуму метаболический стресс для эмбрионов при открывании, что невозможно в обычных мультигазовых инкубаторах. В некоторых планшетных инкубаторах предусмотрен встроенный смеситель газов, то есть готовая газовая смесь не требуется, а заданные соотношения CO_2 и N_2 смешиваются автоматически.

Важно отметить, что в настоящее время у лабораторий ЭКО нет технической возможности обеспечить постоянную гипоксическую (физиологическую) концентрацию кислорода при культивировании эмбрионов со дня оплодотворения и до момента переноса, так как оценка морфологических характеристик эмбриона и смена культуральных сред (при использовании последовательной системы культивирования) сопряжены с извлечением их из инкубатора в условиях атмосферной концентрации O_2 . Таким образом, даже при использовании мультигазовых инкубаторов, эмбрионы подвергаются периодическому воздействию высоких концентраций O_2 , что может привести к неисследованным на данный момент изменениям в экспрессии генов, биохимических процессов и повлиять на развитие эмбрионов. Возможно, именно различия в кратности и продолжительности воздействия атмосферного кислорода во время манипуляций с эмбрионами в экспериментах по культивированию их в гипоксических условиях объясняют различия в эффективности описанных выше исследований.

С появлением технологии Timelapse (метод покадровой съемки) появилась возможность непрерывно наблюдать за развитием эмбрионов в условиях реального времени, не вынимая их из инкубатора. На основании скорости деления и морфологических характеристик эмбрионов в определенные промежутки времени программа помогает выявить наиболее перспективные эмбрионы для наступления беременности. Однако даже при использовании данной технологии воздействие атмосферной концентрации кислорода на ооциты во время удаления клеток кумулюса перед ИКСИ и самой процедурой оплодотворения, мы избежать не можем.

Решить данную проблему можно с помощью гипоксической (анаэробной) станции. Гипоксическая станция — это закрытая система, позволяющая провести весь эмбриологический этап протокола ЭКО в необходимом атмосферном окружении: имеется возможность

комплектации станции, как бинокулярной лупой, так и инвертированным микроскопом с системой микроманипуляторов и видеорегистрацией (рис.). Применение подобной станции позволяет проводить все манипуляции с эмбрионами при постоянной (гипоксической) концентрации кислорода, как во время манипуляций, так и во время смены среды и морфологического анализа.



Рис. Гипоксическая (анаэробная) станция для культивирования эукариотических клеток, выполненная на основе двух камер VacTrox со шлюзовыми камерами, встроенным инвертированным флуоресцентным и бинокулярным микроскопами (Институт фундаментальной биологии и медицины, Казанский (Приволжский) федеральный университет)

Заключение

Кислород играет важную роль в метаболизме эмбриона. Он используется при окислительном фосфорилировании. В процессе переноса электронов по транспортной цепи возможно образование активных форм кислорода [52, 53]. Среди них ионы кислорода, свободные радикалы и перекиси. Свободные радикалы повреждают митохондрии и митохондриальную ДНК. Количество митохондриальной ДНК в эмбриональных клетках млекопитающих невелико [54]. Некоторые ключевые ферменты окислительного фосфорилирования закодированы в ДНК митохондрий. Следовательно, при повреждении ДНК их синтез нарушается. С точки зрения клинической эмбриологии, эмбрионы, пострадавшие от окислительных нарушений, выявляются не сразу, а на более поздних этапах развития. Активные формы кислорода вызывают повреждение клеточной мембраны, приводят к ДНК-фрагментации, а также участвуют в процессах апоптоза. Кроме того,

уровень кислорода играет важную роль в регуляции экспрессии многих генов.

В отличие от ранее опубликованных обзоров по данной теме, в этот обзор включены работы по изучению влияния гипоксии не только на «свежие» эмбрионы, но и на эмбрионы после криоконсервации.

В некоторых из рассмотренных нами исследований сделан вывод о недоказанной эффективности культивирования эмбрионов до 3 сут. в условиях пониженной концентрации кислорода [26, 27, 30, 31]. Однако при использовании методики длительного культивирования (5 сут.) в условиях гипоксии большинство авторов отмечают положительный эффект (увеличение процента формирования бластоцист, процента имплантации и/или процента наступления беременностей) [28, 29, 32–38, 41, 45, 48, 49].

Важным событием преимплантационного развития является переход управления развитием эмбриона от материнского генома (генома ооцита) к геному зародыша. Активация эмбриогенома человека инициируется на 4–8-клеточной стадии (2–3 сут. развития) [55]. Это может быть возможным объяснением благоприятного влияния пониженной концентрации кислорода на эмбриональное развитие, начиная с 3 сут.

Положительное влияние гипоксических условий культивирования, вероятно, связано с активацией гипоксия-индуцибельных факторов (HIFs) [56]. Эффекты HIFs выражаются в активации экспрессии большого количества генов, участвующих в гликолизе, ангиогенезе, пролиферации и эритропоэзе [29, 57, 58].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Assisted reproductive technology in Europe, 2012: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction* 2016; 31(8): 1638–52.
2. Leite R.F., Annes K., Ispada J. et al. Oxidative stress alters the profile of transcription factors related to early development on *in vitro* produced embryos. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017; 2017: 1502489.
3. Guerin P., Mouatassim S., Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update* 2001; 7: 175–89.
4. Gupta S., Sekhon L., Agarwal A. The role of oxidative stress and antioxidants in assisted reproduction. *Current Women's Health Reviews* 2010; 6: 227–38.
5. Martin-Romero F.J., Miguel-Lasobras E.M., Dominguez-Arroyo J.A. et al. Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* 2008; 17: 652–61.
6. Fujitani Y., Kasai K., Ohtani S. et al. Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro*-produced bovine embryos. *Journal of Animal Science* 1997; 75: 483–9.
7. Karja N.W., Wongsrikeao P., Murakami M. et al. Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine *in vitro* fertilized embryos. *Theriogenology*. 2004; 62: 1585–95. 10.1016/j.theriogenology.2004.03.012.
8. Agarwal A., Said T.M., Bedaiwy M.A. et al. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertility and Sterility* 2006; 86: 503–12.
9. Burroughs C.A., Williamson G.L., Golding M.C. et al. Oxidative stress induced changes in epigenetic modifying gene mRNA in pre-implantation *in vitro* bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development* 2012; 25: 149.
10. Жиряева Е.А., Киясова Е.В., Ризванов А.А. Омиксные технологии в репродуктивной медицине: оценка качества ооцитов и эмбрионов. *Гены и клетки*. 2018; 13(1): 35–41.
11. Thannickal V.J., Fanburg B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000; 279(6): 1005–28.
12. Johnson M.H., Nasr-Esfahani M.H. Radical solutions and cultural problems: could free radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *Bioessays* 1994; 16: 31–8.
13. Хиггинс К. Расшифровка клинических лабораторных анализов. пер. с англ., Эмануэль В.Л., редактор. 5 изд. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2011.
14. Abe H., Semba H., Takeda N. The roles of hypoxia signaling in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *J. Atheroscler. Thromb.* 2017; 24(9): 884–94.
15. Hu C.J., Wang L.Y., Chodosh L.A. et al. Differential roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation. *Mol. Cell Biol.* 2003; 23: 9361–74.
16. Thomson J., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145–7.
17. Ezashi T., Das P., Roberts R. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *PNAS USA* 2005; 102(13): 4783–8.
18. Ying Q.L., Wray J., Nichols J. et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 2008; 453: 519–23.
19. Yoshida Y., Takahashi K., Okita K. et al. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 237–41.
20. Ramirez M.A., Pericuesta E., Yanez-Mo M. et al. Effect of long-term culture of mouse embryonic stem cells under low oxygen concentration as well as on glycosaminoglycan hyaluronan on cell proliferation and differentiation. *Cell Prolif.* 2011; 44(1): 75–85.
21. Lee W.H., Chen W., Shao N.Y. et al. Comparison of Non-Coding RNAs in Exosomes and Functional Efficacy of Human Embryonic Stem Cell-versus Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells* 2017; 35(10): 2138–49.
22. Shin J.M., Kim J., Kim H.E. et al. Enhancement of differentiation efficiency of hESCs into vascular lineage cells in hypoxia via a paracrine mechanism. *Stem Cell Research* 2011; 7: 173–85.
23. Tsang K.M., Hyun J.S., Cheng K.T. et al. Embryonic Stem Cell Differentiation to Functional Arterial Endothelial Cells through Sequential Activation of ETV2 and NOTCH1 Signaling by HIF1. *Stem Cell Reports* 2017; 9(3): 796–806.
24. Fischer B., Bavister B. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 99: 673–9.
25. Kovacic B. Culture systems: low-oxygen culture. *Methods Molecular Biology* 2012; 912: 249–72.
26. Dumoulin J.C., Meijers C.J., Bras M. et al. Effect of oxygen concentration on human *in-vitro* fertilization and embryo culture. *Human Reproduction* 1999; 14: 465–9.
27. Bahceci M., Ciray H., Karagenc L. et al. Effect of oxygen concentration during the incubation of embryos of women undergoing ICSI and embryo transfer: a prospective randomized study. *Reproductive BioMedicine Online* 2005; 11: 438–43.
28. Petersen A., Mikkelsen A.L., Lindenberg S. The impact of oxygen tension on developmental competence of post-thaw human embryos. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scand.* 2005; 84: 1181–4.
29. Rinaudo P., Giritharan G., Talbi S. et al. Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertility and Sterility* 2006; 86 Suppl 3: 1252–65.
30. Kea B., Gebhardt J., Watt J. et al. Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility* 2007; 87: 213–6.
31. Cieslak Janzen J.M., Graff D., Anderson S. et al. Comparison of atmospheric oxygen versus low oxygen on human sibling embryo development. *Fertil. Steril.* 2008; 90: 431.

На основании рассмотренных работ и, исходя из собственного опыта, для рутинного применения в клинической практике мы можем рекомендовать планшетный мультигазовый инкубатор со следующими концентрациями газов: 6% CO₂, 5% O₂.

Эксперименты, включенные в данный обзор, имеют некоторые недостатки. Основным из них, на наш взгляд, является использование инкубаторов различного типа в каждой из изучаемых групп (отличались объемом инкубаторов, система нагрева и поддержания температуры). То есть, сравнивались не только концентрация кислорода, но и условия культивирования. Это могло повлиять на результат анализа [59].

Необходимы дальнейшие исследования с применением инкубаторов одного типа для всех рассматриваемых групп, а также оценка влияния культивирования эмбрионов при пониженной концентрации кислорода на исход беременностей и здоровье рожденных детей.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Благодарности

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (20.5175.2017/6.7).

32. Kovacic B., Vlaisavljevic V. Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. *Reproductive Biomedicine Online* 2008; 17: 229–36.
33. Waldenstrom U., Engstrom A., Hellberg D. et al. Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertility and Sterility* 2009; 91: 2461–5.
34. Ciray H., Aksoy T., Yaramanci K. et al. In vitro culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes. *Fertility and Sterility* 2009; 91: 1459–61.
35. Meintjes M., Chantilis S., Douglas J. et al. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Human Reproduction* 2009; 24: 300–7.
36. Graham J., Richter K., Siques J. et al. Improved preimplantation development and higher pregnancy rates associated with 6% versus ambient oxygen concentration during in vitro embryo culture. *Hum. Reprod.* 2010; 25: i59.
37. Kovacic B., Sajko M., Vlaisavljevic V. A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility* 2010; 94: 511–9.
38. Mitsoli A., Kolibianakis E.M., Loutradi K. et al. Low oxygen embryo culture is associated with improved day 3 embryo quality: a prospective randomized controlled trial. *Hum. Reprod.* 2011; 26: i2.
39. Sobrinho D.G., Oliveira J.B., Petersen C.G. et al. IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2011; 9: 143–54.
40. Bontekoe S., Mantikou E., van Wely M. et al. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012; 7. doi:10.1002/14651858.CD008950.pub2.
41. Wale P., Gardner D. Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development. *Biology of Reproduction* 2012; 87(1): 1–8.
42. Houghton F., Hawkhead J., Humpherson P. et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Human Reproduction* 2002; 17: 999–1005.
43. Gardner D., Wale P., Collins R. et al. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Human Reproduction* 2011; 26: 1981–6.
44. Harlow G.M., Quinn P. Foetal and placenta growth in the mouse after preimplantation development in vitro under oxygen concentrations of 5 and 20%. *Australian journal of biological sciences* 1979; 32: 363–9.
45. Kasterstein E., Strassburger D., Komarovskiy D. et al. The effect of two distinct levels of oxygen concentration on embryo development in a sibling oocyte study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2013; 30: 1073–9.
46. Mantikou E., Bontekoe S., Wely V. et al. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Human Reproduction Update* 2013; 19(3): 209.
47. Paternot G., Debrock S., D'Hooghe T.M. et al. Can embryo quality be improved by in vitro exposure to low oxygen concentration or by using a mini-incubator? Two randomized controlled trials. *Fertil. Steril.* 2013; 100: 247–8.
48. Guo N., Li Y., Ai J. et al. Two different concentrations of oxygen for culturing precompaction stage embryos on human embryo development competence: a prospective randomized sibling-oocyte study. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2014; 7(9): 6191–8.
49. Peng Z., Shi S., Jin H. et al. Impact of oxygen concentrations on fertilization, cleavage, implantation, and pregnancy rates of in vitro generated human embryos. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2015; 8(4): 6179–85.
50. Nastri C.O., Nobrega B.N., Teixeira D.M. et al. Low versus atmospheric oxygen tension for embryo culture in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.* 2016; 106(1): 95–104.
51. Yang Y., Xu Y., Ding C. et al. Comparison of 2, 5, and 20% O₂ on the development of post-thaw human embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016; 33: 919–27.
52. Ali I., Shah S.Z., Jin Y. et al. Reactive oxygen species-mediated unfolded protein response pathways in preimplantation embryos. *Journal of Veterinary Science* 2017; 18(1): 1–9.
53. Garcia-Martinez S., Sanchez-Hurtado M.A., Gutierrez H. et al. Mimicking physiological O₂ tension in the female reproductive tract improves Assisted Reproduction outcomes in pig. *Mol. Hum. Reprod.* 2018. doi: 10.1093/molehr/gay008.
54. Piko L., Taylor K. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Developmental Biology* 1987; 123: 354–74.
55. Galan A., Montaner D., Poo M.E. et al. Functional genomics of 5- to 8-cell stage human embryos by blastomere single-cell cDNA analysis. *PLoS One* 2010; 5: e13615.
56. Ma Y.Y., Chen H.W., Chii-Ruey Tzeng C.R. Low oxygen tension increases mitochondrial membrane potential and enhances expression of antioxidant genes and implantation protein of mouse blastocyst cultured in vitro. *J. Ovarian Res.* 2017; 10: 47.
57. Greijer A.E., van der Groep P., Kemming D. et al. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J. Pathol.* 2005; 206(3): 291–304.
58. Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. The pVHL-hIF-1 system. A key mediator of oxygen homeostasis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001; 502: 365–76.
59. Fujiwara M., Takahashi K., Izuno M. et al. Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after in-vitro fertilization: comparison of top-load mini incubator and conventional front-load incubator. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2007; 24(1): 5–9.

Поступила: 25.12.2017

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНИЦИАЦИИ И РАЗВИТИЯ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ В МОДЕЛИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО СТРЕССОВОГО РАССТРОЙСТВА

О.П. Тучина, М.В. Сидорова, А.В. Туркин, Д.А. Швайко, И.Г. Шалагинова, И.А. Ваколюк

Институт Живых Систем Балтийского Федерального Университета им. И. Канта, Калининград, Россия

MOLECULAR MECHANISMS OF NEUROINFLAMMATION INITIATION AND DEVELOPMENT IN A MODEL OF POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER

O.P. Tuchina, M.V. Sidorova, A.V. Turkin, D.A. Shvaiko, I.G. Shalaginova, I.A. Vakolyuk

School of Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

e-mail: otuchina@kantiana.ru

Нейровоспаление как морфофункциональное изменение нервной ткани может возникать под воздействием различного рода стрессовых факторов. Развитие нейровоспаления на фоне посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) связано с изменением морфологии нейронов и клеток глии, а также активацией микроглиальных клеток, однако конкретные молекулярные механизмы этих изменений до сих пор неизвестны. В данном обзоре рассматриваются связи между эндокринной, иммунной и лимбической системами при стрессе, их вклад в формирование ПТСР, роль гематоэнцефалического барьера, а также современные методические подходы к исследованию нейровоспаления.

Ключевые слова: стресс, цитокины, астроциты, микроглия, нейро-иммунные взаимодействия.

Хронический стресс и феномен нейровоспаления

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) — тяжелая психическая патология, механизмы развития которой все еще остаются неясны. По МКБ-10, эта психопатология относится к группе реакций на тяжелый стресс и нарушения адаптации (F43) [1]. ПТСР возникает как отсроченный или затянувшийся ответ на стрессовое событие (краткое или продолжительное) исключительно угрожающего или катастрофического характера. При ПТСР группа характерных симптомов, среди которых отмечают высокий уровень тревожности, сохраняется на протяжении более месяца после психологической травмы. Тревога как психическое состояние характеризуется ожиданием потенциальной угрозы, в отличие от страха, который является эмоциональной реакцией на непосредственное воздействие конкретного угрожающего раздражителя [2]. Тревога эволюционно консервативна и, будучи частью универсального механизма адаптации к неблагоприятным условиям, сопровождается как поведенческими, так и физиологическими реакциями, включая избегание, чрезмерную бдительность, возбуждение и сопутствующие вегетативные проявления [3].

Имеется множество доказательств тому, что центральные механизмы, лежащие в основе страха и тревожных состояний, у людей и животных похожи [2], в связи с чем открываются широкие перспективы для исследований патофизиологии тревожных расстройств на модельных объектах. Из всего многообразия поведенческих моделей ПТСР на грызунах две считаются наиболее валидными: модель повторного социального поражения (Repeated Social Defeat, RSD) и модель стресса, вызванного хищником (Predator Stress Model), где животное в течение определенного времени находится в непосредственной близости с кошкой, либо ему предьявляется запах хищника. На данных моделях показаны изменения, происходящие на клеточном уровне, а также изменения в поведении у грызунов, схожие с характеристиками ПТСР у человека [4]. При моделировании

Neuroinflammation causes morphological and functional changes in the nervous tissue and it can be triggered by different kind of stressors. Progress of neuroinflammation as a result of post-traumatic stress disorder (PTSD) is associated with morphological changes in neurons and glial cells, as well as activation of microglia, however the exact molecular mechanisms of these changes are still unknown. In this review we discuss the connections between endocrine, immune and limbic systems during stress, the contributions of each system, the role of blood-brain barrier, as well as current methods and approaches in studying neuroinflammation.

Keywords: stress, cytokines, astrocytes, microglia, neuro-immune interactions.

хронического стресса, когда мышь помещают в клетку с агрессивным сородичем на 6 ночей (RSD), обнаружено увеличение уровня моноцитов в крови, активация микроглиальных клеток в мозге, а также усиление тревожного поведения по истечении 8 дней после последнего стрессового воздействия. Через 24 дня после RSD также наблюдаются симптомы социального избегания и высокие уровни мРНК провоспалительных цитокинов: интерлейкинов 1 β и 6 (ИЛ-1 β и ИЛ-6) и фактора некроза опухолей (ФНО- α) в микроглиальных клетках [5].

Есть убедительные данные наличия признаков нейровоспаления при ПТСР у человека и у животных на моделях данного расстройства. В большинстве исследований оценивают уровни провоспалительных цитокинов в крови пациентов с ПТСР. Обнаружено, что в крови у пациентов с ПТСР по сравнению с контролем и с лицами, перенесшими травму без развития ПТСР, значимо повышены уровни таких провоспалительных цитокинов, как ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α , а также компонентов системы комплемента (причем уровни последних позитивно коррелируют с тяжестью симптомов ПТСР) [6].

Эти данные говорят о том, что периферическое воспаление присутствует при ПТСР, но не свидетельствуют о его роли в патогенезе заболевания. Тем не менее, более высокие уровни цитокинов, выявленные в плазме крови военных перед их участием в боевых действиях, связаны с повышенным риском развития ПТСР после их возвращения из горячих точек [7]. Кроме того, более высокий уровень глюкокортикоид-зависимой продукции цитокинов и Т-клеточной пролиферации в плазме крови перед военными действиями, связан с повышенной выраженностью симптомов ПТСР у солдат после возвращения из зоны боевых действий [8]. Однако отсутствие убедительных данных о признаках нейровоспаления в мозге пациентов, перенесших ПТСР, не позволяет однозначно ответить на вопрос о том, насколько уровень периферических цитокинов отражает вовлеченность нейроиммунных процессов в патогенез ПТСР.

Использование моделей ПТСР на животных дает возможность прояснить данный вопрос. У мышей на 8 день после стрессового воздействия было выявлено увеличение уровня циркулирующих в крови моноцитов и повышение тревожности в поведенческих тестах. На 24 день после стрессового воздействия тревожное поведение и повышенный уровень мРНК провоспалительных цитокинов в микроглиальных клетках (ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α) все еще наблюдались, при этом периферические признаки воспаления отсутствовали [5]. Также есть данные о повышенной экспрессии ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α в гиппокампе крыс при моделировании ПТСР, причем данный эффект сохранялся через 2 недели после воздействия стресса [6].

Эксперименты на грызунах показали, что гиппокампальные проекции нейронов из основания и СА1 поля в префронтальную кору задействованы в регуляции когнитивных функций и эмоций [7]. В то же время у пациентов, страдающих ПТСР (а также у пациентов с шизофренией и депрессией), обнаружены структурные и функциональные изменения в нейронных связях между гиппокампом и префронтальной корой [8]. Установлено, что в генерации и поддержании патологической тревоги [2, 5], а также патогенезе депрессии [9] участвуют префронтальная кора, гиппокамп, миндалина, голубое пятно и некоторые другие структуры мозга.

Морфологические изменения ткани мозга затрагивают все типы нервных клеток. В последние годы все больше клинических исследований и работ на модельных объектах свидетельствуют о вовлечении глиальных клеток в патофизиологию тревоги. Например, изучение постмортальных образцов человеческого мозга, а также иммуногистохимические и гистологические данные показывают снижение плотности глиальных клеток в специфических областях коры и лимбической системы у пациентов с данными психопатологиями [10]. Морфологические изменения нейронов и глиальных клеток рассматривают как одну из причин снижения объема гиппокампа при тревожных и депрессивных расстройствах. При использовании различных моделей хронического стресса наблюдаются морфологические изменения нейронов в гиппокампе и миндалине у крыс. Хронический иммобилизационный стресс приводит к атрофии дендритов и нарушению ветвления пирамидных нейронов в зоне СА3 гиппокампа. При этом пирамидные и звездчатые нейроны в базолатеральном комплексе миндалины демонстрируют, наоборот, увеличение дендритного ветвления в ответ на иммобилизационный стресс. Хронический стресс непредсказуемости, однако, оказывает незначительное влияние на СА3 пирамидные нейроны гиппокампа и индуцирует атрофию только биполярных нейронов базолатеральной миндалины. Стоит отметить, что различия имеют место и на уровне поведения экспериментальных животных: при хроническом иммобилизационном стрессе у крыс наблюдается тревожное поведение (снижается активность в открытом рукаве лабиринта), в то время как при хроническом стрессе непредсказуемости подобных поведенческих паттернов не выявлено [11]. Эти результаты демонстрируют, что некоторые формы хронического стресса, воздействуя на нервные клетки в миндалине и гиппокампе, могут привести к поведенческим проявлениям повышенной тревожности. Таким образом, индуцированная стрессом нейрональная пластичность указанных структур мозга может рассматриваться как биологическая основа тревожных расстройств, вызванных хроническим стрессом. Исследования с применением магнитно-резонансной томографии, проведенные на людях, также

указывают на существенный вклад морфологических изменений нервной ткани в патофизиологию тревожных расстройств, вызванных стрессом. При изучении связи между изменениями уровня стресса и изменениями плотности серого вещества было показано, что снижение субъективно ощущаемого уровня стресса позитивно коррелирует со снижением плотности серого вещества в правой базолатеральной миндалине. Было также продемонстрировано, что нейропластические изменения связаны с улучшением психологического состояния [12].

Активно изучается также роль микроглиальных клеток как резидентных макрофагов в патофизиологии стресса. Известно, что клетки микроглии способны изменять фенотип (поляризоваться, активироваться) в ответ на определенные воздействия. М.А. Calcia с соавт. (2016) в обзоре о влиянии стресса на микроглиальную активность в гиппокампе, рассмотрели 11 научных работ, включающих 13 различных протоколов формирования стресса у животных [13]. Во всех 11 исследованиях сообщается о значительном увеличении Iba-1-иммунореактивности в гиппокампе (Iba-1 часто используется как маркер микроглиальных клеток, в том числе реактивных), хотя данные варьировались при использовании различных протоколов.

Несмотря на очевидные изменения морфологии клеток нервной ткани, конкретные молекулярные механизмы этих изменений остаются неизвестными. Эксперименты на животных показывают, что в ответ на психологический стресс, а также при различных психопатологиях в нервной ткани происходят воспалительные процессы, сходные с иммунными реакциями в ответ на повреждение ткани или проникновение инфекционных агентов — нейровоспаление. Нейровоспаление может носить как адаптивный, защитный характер (например, в случае острого стресса), так и маладаптивный, приводящий к изменению морфологии клеток, их атрофии и даже гибели (хронический стресс) [14]. Воспалительные процессы в нервной ткани наблюдаются при различных психологических расстройствах, в том числе ПТСР, и сопровождаются повышенной реактивностью иммунной системы в целом и изменением фенотипа микроглиальных клеток — активированием микроглии [15]. Было показано, что тревожным расстройствам сопутствуют нарушения иммунной регуляции и активация воспалительной системы реагирования [16–19]. Иммунная активация у тревожных пациентов выражалась в увеличении количества циркулирующих в крови лимфоцитов и фагоцитов, повышалась уровни активированных иммунных клеток, и соответственно, увеличивалась выработка ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α через активирование макрофагов [17, 20–22]. На экспериментальных моделях у животных продемонстрирована корреляция между числом периферических моноцитов и симптоматикой ПТСР [23]. Замечено, что у крыс с удаленной селезенкой наблюдается меньшее повреждение нервной ткани после стресса [23, 24]. Исследование, проведенное G.M. Lewitus с соавт. (2008), показало, что Т-лимфоциты проникают через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) после эпизодов стресса [25]. В то же время цитокины и их рецепторы повсеместно распространены в мозге, и их продуцирование происходит не только лейкоцитами, проникающими через ГЭБ, но также и глиальными клетками, эндотелиальными клетками мозга и нейронами [26].

В связи с этим возникает вопрос, возможно ли, что изменения в морфологии клеток мозга, происходящие при хроническом стрессе, обусловлены повышенной реактивностью иммунной системы в целом и проникновением лимфоцитов и (или) провоспалительных цитокинов из крови в нервную ткань?

В ходе развития воспаления провоспалительные цитокины могут получить доступ к центральной нервной системе и взаимодействовать с цитокиновой сетью мозга [27], влияя на баланс между M1 и M2 фенотипами микроглиальных клеток. Цитокины воздействуют на нейромедиаторные системы и, таким образом, на нейросети мозга, в частности, в дорсальной области передней части поясной извилины коры головного мозга, что приводит к значительным изменениям в уровнях тревожности и возбуждения [17, 22, 27]. С другой стороны, провоспалительные цитокины являются одним из факторов снижения пролиферативной активности нервных клеток в гиппокампе, а также активации гипоталамо-гипофизарно-адреналовой (ГГА) оси [16, 26, 28]. Показано, что у пациентов с нейропсихическими расстройствами, вызванными стрессом, ИЛ-6 может через гипоталамические нейроны стимулировать выход кортикопролина и, как следствие, приводить к выбросу кортизола в кровь надпочечниками. С другой стороны, повышение уровня этого провоспалительного фактора в нервной ткани сопровождается атрофией дендритов и гибелью нейронов в пределах гипоталамуса [18]. ПТСР вызывает изменения не только в нервной ткани отделов лимбической системы, но также сопровождается повышением уровня глюкокортикоидов в плазме [29], что, в свою очередь, приводит к сдвигу в балансе иммунной системы в сторону доминирования Th2 лимфоцитов. С другой стороны, проходя через гематоэнцефалический барьер, глюкокортикоиды получают доступ к нервной ткани. Гиппокамп является одним из регионов мозга с наиболее высокой плотностью глюкокортикоидных рецепторов, что указывает на важную роль этой структуры в регуляции взаимодействия между периферией (висцеральными системами) и центром (головной мозг) при развитии стрессовой реакции [30]. Однако роль глюкокортикоидных и минералкортикоидных рецепторов гиппокампа в поддержании активности ГГА оси, вероятно, различна. Активация глюкокортикоидных рецепторов гиппокампа приводит к подавлению выброса кортизола в кровь, в то время как минералкортикоидные рецепторы гиппокампа, обладающие высокой афинностью и также связывающие глюкокортикоиды даже в период базальной секреции, видимо, опосредуют поддержание исходного уровня активности ГГА оси [30, 31]. Тот факт, что паравентрикулярные ядра гипоталамуса, непосредственно регулирующие активность адреналового звена, имеют прямые нейрональные проекции как от гиппокампа, так и от миндалины и префронтальной коры, свидетельствует о значительном регуляторном эффекте лимбической системы на состояние системы гуморального контроля стресса [29, 32].

Таким образом, сложность связей между эндокринной, иммунной и лимбической системами оставляет открытым вопрос о последовательности процессов в развитии и поддержании ПТСР. Взаимодействие многочисленных гуморальных факторов, таких как цитокины и гормоны, с нервной тканью осуществляется через ГЭБ, поэтому его проницаемость, вероятно, играет существенную роль в развитии нейровоспаления.

Роль состояния гематоэнцефалического барьера в развитии нейровоспаления

Центральная нервная система долгое время считалась «привилегированной в иммунологическом отношении» благодаря наличию ГЭБ, роль которого состоит не только в защите нервной ткани от проникновения токсинов, ксенобиотиков и флуктуаций в составе плазмы, но также в ограничении доступа в нервную ткань

иммунных клеток, цитокинов, что делает невозможным развитие иммунных реакций, подобных тем, которые мы наблюдаем на периферии. Однако как показывают последние данные, ГЭБ представляет собой динамичную структуру, через которую происходит сложное взаимодействие между кровью и нервной тканью, и результатом этого взаимодействия могут быть как дегенеративные (способствующие развитию болезни), так и, вероятно, адаптивные изменения.

ГЭБ состоит из трех основных типов клеток: эндотелиальных клеток, соединенных плотными и адгезивными контактами, а также перицитов и астроцитарных отростков. Плотные контакты «сшивают» клетки эндотелия между собой, обеспечивая барьерную функцию. При определенных условиях в ГЭБ происходят изменения, которые можно наблюдать на гистологическом уровне (нарушение целостности плотных контактов, изменение морфологии клеток, апоптоз клеток эндотелия) и (или) молекулярном уровне (изменение экспрессии транспортеров без нарушения целостности барьера). В регуляции экспрессии плотных контактов играют роль перициты, микроглиальные клетки, астроциты и нейроны, поэтому проницаемость ГЭБ может существенно изменяться. Повышение проницаемости может произойти вследствие механической травмы мозга [33] или ишемического инсульта [34], в этом случае происходит нарушение целостности контактов, деградация гликокаликса и дегенеративные изменения в клетках глии. Медиаторы воспаления также влияют на проницаемость, хотя результаты исследований неоднозначны и зависят от экспериментальной модели, типа медиатора, его дозы и времени экспозиции. Известно, что воспаление, возникающее на периферии, изменяет уровень экспрессии плотных контактов: снижение экспрессии окклюдина и повышение экспрессии белков ZO-1 [35], однако нарушения целостности барьера может и не наблюдаться [36]. При хроническом воспалении происходит снижение экспрессии монокарбоксилатных транспортеров, переносчиков аминокислот, лептина, простагландинов и амилоида, в то время, как экспрессия транспортеров инсулина, ФНО- α и моноаминов увеличивается [37]. Клетки эндотелия экспрессируют рецепторы к ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α и способны активироваться под воздействием этих цитокинов [38]. Возможны три варианта передачи сигнала цитокинами из периферической крови в мозг: 1) посредством активирования рецепторов эндотелия и образования вторичных мессенджеров, таких, как простагландины; 2) через специфические транспортеры цитокинов; 3) при непосредственном проникновении цитокинов через ГЭБ в областях, где его проницаемость повышена в нормальном состоянии (циркумвентрикулярные органы, сосудистое сплетение желудочков мозга) [14, 39]. Предполагают, что в случае периферического воспаления проникновение цитокинового сигнала в центральную нервную систему активирует микроглиальные клетки (что сопровождается увеличением уровня экспрессии Iba-1 и изменением морфологии клеток) и способствует *de novo* синтезу цитокинов в мозге (преимущественно ИЛ-1 и ФНО- α) и развитию нейровоспаления [39, 40]. При этом моноциты крови во время стресса могут проникать через ГЭБ в нервную ткань, где они принимают микроглиальный фенотип. Интересно, что в этом случае наблюдается региональная гетерогенность: путь входа моноцитов в центральную нервную систему влияет на их дальнейшую специализацию и фенотип. Проникновение через оболочку мозга инициирует фенотип по типу M1 микроглии, тогда как вход через сосудистое сплетение приводит

к M2-поляризации моноцитов. Сам процесс миграции моноцитов крови может привести к дополнительным повреждениям ГЭБ, что, в свою очередь, облегчает дальнейшую миграцию, в том числе лимфоцитов и нейтрофилов [23, 41, 42]. Процесс проникновения клеток через ГЭБ носит название диапедеза и происходит в два этапа: преодоление эндотелиального и глиального барьеров [37]. ИЛ-1 β , ФНО- α и липополисахарид способны активировать эндотелиальные клетки, которые начинают экспрессировать Р- и Е-селектины и молекулы клеточной адгезии ICAM-1 и VCAM-1, облегчающие миграцию иммунных клеток через ГЭБ. Дальнейшее проникновение иммунных клеток в нервную ткань обеспечивается разрушением базальной мембраны металлопротеиназами MPP2 и MPP9, источниками которых являются перicyты и глиальные клетки [43]. Однако есть данные о том, что реактивные астроциты препятствуют миграции иммунных клеток в нервную ткань, подавляя, таким образом, развитие нейровоспаления [44].

Данные о влиянии стресса на состояние ГЭБ противоречивы. В частности, P. Esposito с соав. (2001) продемонстрировали, что у крыс, подвергшихся острому иммобилизационному стрессу, происходит увеличение проницаемости ГЭБ в промежуточном мозге и мозжечке (но не в церебральной коре) [45], в то время как M. Roszkowski с соав. (2016), протестировав на мышах несколько протоколов острого и хронического стресса, не обнаружили увеличения проницаемости [46]. Возможно, что имеет место избирательное изменение проницаемости ГЭБ, происходящее за счет изменения уровней экспрессии определенных транспортеров под воздействием провоспалительных цитокинов.

Резюмируя вышесказанное, нужно отметить, что ГЭБ является сложно организованной и динамичной структурой, через которую происходит взаимодействие иммунной и нервной систем. Периферическое воспаление изменяет состояние ГЭБ через сигнализацию цитокинами, что может привести к нарушению целостности барьера, миграции иммунных клеток и дальнейшему развитию воспалительных процессов в нервной ткани. Медиаторы воспаления — цитокины — синтезируются как клетками крови, так и активированными глиальными клетками *de novo*. Возможно, что синтез провоспалительных цитокинов *de novo* клетками мозга способствует поддержанию нейровоспалительных процессов, которые наблюдаются при хроническом стрессе. Однако на сегодняшний день до сих пор неизвестно, что является первичным сигналом, запускающим нейровоспаление: активация клеток глии периферическими провоспалительными цитокинами, уровень которых в крови зависит от степени активации ГГА оси (периферическая активация), или же существуют центральные механизмы, запускающие синтез провоспалительных цитокинов в мозге (центральная активация), а ГГА ось стресса играет роль в поддержании уже начавшихся процессов нейровоспаления в мозге.

Цитокины и нервный контроль иммунных функций

Стресс активирует симпатно-адренало-медуллярную (быструю, нервную) и гипоталамо-гипофизарно-адреналовую (медленную, гуморальную) оси стресса, что приводит к выделению в кровь катехоламинов мозгового вещества надпочечников — адреналина и норадреналина, а также кортикостероидных гормонов (кортизола у человека и кортикостерона у грызунов), в совокупности обеспечивающих общую мобилизацию организма, известную как реакция «бей или беги» [14]. Адреналин увеличивает частоту сердечных сокращений, повышает

кровеное давление и концентрацию глюкозы в крови, подготавливая организм к устранению угрозы или ее избеганию, в то время как кортикостероиды, наряду с другими функциями, угнетают определенные компоненты иммунного ответа, снижая концентрацию провоспалительных интерлейкинов ИЛ-1 и ИЛ-6 и ФНО- α и, в то же время, способствуя повышению уровня противовоспалительных интерлейкинов ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13 в крови [47]. Предполагается, что подавление определенных иммунных реакций в данном случае способствует сохранению энергии, необходимой для общей мобилизации организма [14]. В крови глюкокортикостероиды связаны с транскортином, или кортикоид-связывающим глобулином, и это единственное, что препятствует их прямому прохождению через ГЭБ [48]. Количество кортикоид-связывающего глобулина в крови относительно стабильно (однако, уменьшается с возрастом), но в случае резкого увеличения уровня глюкокортикостероидов (например, при стрессе), можно ожидать, что их уровень в нервной ткани может резко возрасти. Однако динамика изменения уровня гормонов при остром и хроническом стрессе различается: при остром стрессе наблюдается резкое, но недлительное повышение уровня глюкокортикостероидов и вазопрессина, в то время как при хроническом стрессе уровень глюкокортикостероидов со временем понижается, а вазопрессина — компенсаторно повышается [48, 49].

В мозге экспрессируются рецепторы к глюко- и минералкортикоидам [50]. Существует предположение, что первоначальное стрессирование и/или экспозиция глюкокортикостероидов создают эффект «иммунологического прайминга», то есть увеличивают вероятность развития хронического нейровоспаления в ответ на последующий стресс [15]. В то же время F.R. Walker с соавт. (2016) в своем обзоре сообщают, что лабильность уровня кортизола в ответ на стресс притуплена у испытуемых с малоустойчивой психикой (присутствует ПТСР-подобная симптоматика) [51]. Также соотношение уровней кортизола/дегидроэпиандростерона ниже у пациентов с ПТСР, чем у здоровых людей. Так как дегидроэпиандростерон обладает антиглюкокортикоидным действием, повышение его уровня может обуславливать завышенную реакцию на стресс.

Глюкокортикоиды изменяют уровень интерлейкинов и других цитокинов в крови, и цитокины подают сигнал в мозг посредством медленного (гуморального) и быстрого (нервного) путей. Гуморальный путь сигнализации заключается в том, что цитокины проходят через ГЭБ или же активируют вторичные посредники, например, простагландины, которые, в свою очередь, передают цитокиновый сигнал в мозг. Кроме того, противовоспалительные нестероиды, проникая в мозг, блокируют внутриклеточную циклооксигеназу, что приводит к снижению выработки простагландинов клетками нервной ткани и препятствует развитию воспаления. Нервный путь сигнализации включает активацию нервных волокон в ответ на повышение концентрации цитокинов. Например, повышенный уровень цитокинов, в частности ИЛ-1, в селезенке и лимфатических узлах стимулирует активацию блуждающего нерва и передачу цитокинового сигнала в мозг [14, 51]. Предполагается, что передача сигнала происходит следующим образом: повышенный уровень цитокинов, ИЛ-1 β в частности, в селезенке и лимфатических узлах активирует интерлейкиновые рецепторы на хемочувствительных клетках параганглиев и афферентных окончаниях блуждающего нерва, что приводит к электрической активации волокон блуждающего нерва; афферентные нейроны, тела которых находятся в узелотом

и яремном ганглиях, посылают отростки в ядро одиночного пути в продолговатом мозге, откуда информация о содержании провоспалительных цитокинов передается далее в гипоталамус и конечный мозг [52]. Возможна также активация волокон блуждающего нерва посредством образования вторичных мессенджеров — простагландинов [53]. Более того, в клетках узлового ганглия экспрессируются Toll-рецепторы (TLR4) [54] и, таким образом, активация блуждающего нерва возможна и в ответ на непосредственное воздействие типичного воспалительного агента — липополисахарида. При сильно повышенном уровне цитокинов на периферии основным путем сигнализации в мозг считается гуморальный, в то время как активация блуждающего нерва происходит в ответ на сравнительно небольшое повышение локального уровня интерлейкинов [52]. Локальная стимуляция блуждающего нерва в то же время снижает уровень провоспалительных цитокинов, а ацетилхолин — нейротрансмиттер, высвобождающийся из терминалей блуждающего нерва, ингибирует продукцию провоспалительных интерлейкинов ИЛ-1 β , ИЛ-18 и ФНО- α макрофагами, которые были предварительно стимулированы липополисахаридом [55]. Нервный контроль иммунных функций посредством чувствительности блуждающего нерва к интерлейкинам и эфферентного холинэргического противовоспалительного действия волокон блуждающего нерва называют также воспалительным рефлексом [52]. Эфферентная дуга воспалительного рефлекса, предположительно, модулируется, однако, конкретные механизмы неизвестны. На периферии никотиновый ацетилхолиновый рецептор $\alpha 7nAChR$ обеспечивает противовоспалительное действие эфферентных волокон блуждающего нерва [56]. $\alpha 7nAChR$ экспрессируется в макрофагах, моноцитах, дендритных клетках, Т-лимфоцитах, эндотелии и других клетках [57]. Антивоспалительное действие, вызванное действием агонистов $\alpha 7nAChR$ или стимуляцией блуждающего нерва, связывают со снижением экспрессии CD14 и TLR4 на иммунных клетках [58]. Холинэргическое ингибирование продукции провоспалительных интерлейкинов обеспечивается ингибированием транслокации NF- κ B в ядро [51]. При противовоспалительном действии, которое оказывает стимуляция блуждающего нерва, наблюдается также активация адренэргического селезеночного нерва [59], который берет начало в висцеральном ганглии, иннервируемом эфферентными волокнами блуждающего нерва. Субпопуляция Т-лимфоцитов, которые экспрессируют адренорецепторы, продуцирует ацетилхолин в селезенке, что является важным условием для осуществления воспалительного рефлекса, как показывают эксперименты на мышцах, у которых нет данной субпопуляции ацетилхолин-продуцирующих Т-лимфоцитов [59].

Из приведенных данных следует, что не только продукция и собственно уровень цитокинов — медиаторов воспаления — находится под контролем гуморальных и нервных воздействий, но и цитокины по механизму обратной связи сигнализируют в мозг о степени развития воспаления на периферии. Наличие чувствительности блуждающего нерва к интерлейкинам обеспечивает нервный механизм регуляции иммунных функций.

Стресс и серотонинергическая система

Известно, что глиальные клетки, например, астроциты способны модулировать синаптическую активность, опосредованную нейротрансмиттерами, и, более того, сами выделяют ряд так называемых глитрансмиттеров, таких, как АТФ, глутамат, D-серин и лактат [60]. Участие астроцитов является обязательной частью нормального

функционирования глутаматергических синапсов [61]. Микроглиальные клетки, в свою очередь, проводят постоянное сканирование окружающего пространства, охватывая своими отростками пре- и постсинаптические контакты [62]. Микроглиальные отростки взаимодействуют и выборочно устраняют неактивные синапсы и шипики близлежащих нейронов, что указывает на их способность модулировать активность мозга и нейрональную пластичность [63]. Способность глиальных клеток модулировать нейрональную активность и пластичность подразумевает наличие рецепторов к нейротрансмиттерам. Существуют данные, что острый и хронический стресс влияют на серотонинергическую систему мозга, в частности, на выброс, обратный захват и уровень внеклеточного серотонина, а также на количество пре- и постсинаптических серотониновых рецепторов в регионах мозга, ответственных за формирование страха и тревоги: фронтальной коре, гиппокампе, миндалине и ядрах шва [64]. Показано, что у млекопитающих стрессовые воздействия увеличивают уровень триптофана в центральной нервной системе [65–67]. Это может влиять на активность серотонинергических нейронов, так как триптофан является ключевой аминокислотой в синтезе важнейшего нейромедиатора — серотонина [68]. Уровень серотонина тесно связан с контролем страха и тревоги. Нарушения в работе серотонинергической системы приводят к различным психическим и неврологическим заболеваниям [69, 70]. Регуляция уровня серотонина является одним из наиболее популярных методов лечения депрессий и стрессовых расстройств.

Согласно А. Dahlstrom и К. Fuxe (1964), основным источником серотонина в мозге являются нейроны ядер шва, расположенные в стволе головного мозга: от передней части среднего мозга до нижних отделов продолговатого мозга. Ядра шва в зависимости от своего анатомического нахождения классифицируются авторами с В1 по В9 [71] и подразделяются на ростральный отдел, включающий ядра среднего мозга и моста (В4–В9), и каудальный отдел, расположенный в продолговатом мозге (В1–В3). Нейроны рострального отдела посылают аксоны в передний мозг, а каудального отдела — к структурам ствола и спинного мозга [72]. Среди всех ядер шва наибольшее внимание получили дорсальное и среднее, их проекции отходят к ряду регионов, ответственных за формирование страха и тревоги [73], включая миндалину, гиппокамп, гипоталамус и префронтальную кору [74]. Кроме того, ядра шва получают информацию от афферентных волокон из различных регионов мозга, формируя стрессовую сеть [74, 75].

Помимо классической синаптической передачи, серотонин может высвобождаться из расширений, которые присутствуют на аксонах серотонинергических нейронов, диффундировать на расстояние в несколько микрометров и активировать удаленные рецепторы (объемная передача сигнала) [76–78]. Существуют различные типы рецепторов серотонина (НTR), обеспечивающие многообразие его регуляторных механизмов и эффектов. Известно, что культивируемые микроглиальные клетки, полученные из мозга крыс, экспрессируют пять подтипов серотониновых рецепторов: 5-НТ2А, 5-НТ2В, 5-НТ2С, 5-НТ5А, 5-НТ7, а также некоторое количество подтипов 5-НТ1А и 5-НТ1F. Экспрессии рецепторов 5-НТ1В, 5-НТ3А, 5-НТ5В, 5-НТ6, серотонинового транспортера (SERT) и ферментов синтеза серотонина — триптофангидроксилазы 1 или 2 обнаружено не было. Функции микроглиальных серотониновых рецепторов неизвестны. В мозге человека на данный момент идентифицирована экспрессия лишь одного

подтипа серотонинового рецептора — 5-HT₇ и установлена его роль как модулятора внутриклеточного уровня цАМФ [79]. С помощью метода конфокальной микроскопии было показано, что микроглиальные клетки находятся в непосредственной близости (менее 1 мкм) от аксонов серотонинергических нейронов [80]. Возможно, что увеличение активности серотонинергических нейронов, вызванное стрессом, способствует активации близлежащих микроглиальных клеток по механизму объемной нейротрансдачи. Следует отметить, что активированный статус микроглии не всегда приводит к выделению провоспалительных агентов (цитокины, оксиды азота, активные формы кислорода), всё больше исследований указывают на неоднородность микроглиальной популяции и одновременное наличие микроглии с про- и противовоспалительной активностью. В ответ на стимуляцию серотином увеличивается подвижность микроглиальных клеток, чувствительность к АТФ, но фагоцитарная активность в таких клетках не наблюдается [81]. С другой стороны, активация серотониновых рецепторов микроглии может стимулировать выброс цитокинов, таких как ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-1 α , ИЛ-6 [82].

Было отмечено, что ингибирование SERT и следующее за ним понижение уровня серотонина в межклеточном пространстве, индуцирует активацию микроглии, последующий выброс оксида азота, и как следствие гибель нейронов, в особенности, допаминергических [83]. Предполагается, что микроглия подобно моноцитам крови, способна существовать в двух поляризованных формах — M1 и M2, и недавнее исследование продемонстрировало, что человеческие макрофаги в зависимости от их поляризации экспрессируют разные уровни рецепторов к серотонину. Было установлено, что рецепторы 5-HT_{2B} и 5-HT₇ предпочтительно экспрессируются противовоспалительными M2-подобными клетками, что указывает на роль серотонина в поляризации человеческих макрофагов. Действительно, стимуляция серотином этих клеток вызывала увеличение экспрессии генов, связанных с поляризацией M2, и уменьшение экспрессии маркеров M1. Кроме того было доказано, что действие серотонина опосредуется 5-HT_{2B} и 5-HT₇ рецепторами, а фармакологический анализ показал, что серотонин через эти рецепторы также способствует цитокинозависимой поляризации моноцитов человека [84].

Важно отметить, что существование в анксиогенных структурах мозга серотонинергических проекционных связей, наряду с данными о наличии у микроглии серотониновых рецепторов, дают основание говорить об участии серотонина в развитии и поддержании патологических тревожных состояний не только в роли нейромедиатора, но также и как модулятора процесса нейровоспаления.

Современные методические подходы к исследованию нейровоспаления

Для изучения механизмов развития нейровоспаления и его возможной роли в патогенезе нейродегенеративных и психических расстройств активно используются в качестве объектов исследований как модели на животных, так и пациенты, страдающие тем или иным заболеванием. Преимущества моделей на животных заключаются в возможности применения инвазивных методов, позволяющих получить важную информацию о процессах нейровоспаления, как на молекулярно-клеточном уровне, так и на уровне целого мозга.

В подавляющем большинстве работ эксперименты проводят на крысах и мышах. Широко распространенный метод моделирования нейровоспаления у лабораторных

животных — стереотаксическое введение липополисахарида в мозг [85]. Липополисахарид — компонент клеточной стенки грамм-отрицательных бактерий и мощный индуктор воспалительных процессов, воздействующий на клетки иммунной системы через Toll-подобные рецепторы 4 (TLR4) [86, 87]. Интрацеребральное введение крысам липополисахарида активирует глиальные клетки *in vivo* [88], а также вызывает экспрессию цитокинов: ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-1 β , ИЛ-10 в плазме крови; ФНО- α , ИЛ-6 и ИЛ-1 β в префронтальной коре, гиппокампе и миндалине мозга крысы [87]. Кроме того, что липополисахарид является активатором периферической и центральной иммунной систем, его введение также вызывает у животных поведенческие изменения, схожие с симптомами ПТСР [89, 90].

Для выяснения роли в патогенезе ПТСР конкретных сигнальных путей, связанных с нейровоспалением, активно используются генно-модифицированные животные. Например, показано, что трансгенные линии мышей с нокаутом ИЛ-1 β , ФНО- α и рецептора к ИЛ-1 демонстрируют снижение симптомов тревоги в поведенческих тестах по сравнению с животными дикого типа [91–93].

Анализ транскриптома позволяет установить молекулярные индикаторы стресс-индуцированного нейровоспаления в моделях ПТСР. С помощью таких методов выявлено, что сигнальные пути, связанные с синаптической пластичностью и нейрогенезом, активируются в раннем посттравматическом периоде и ингибируются на более поздних временных этапах. При этом воспалительные сигнальные пути активны на протяжении всего периода наблюдения, за исключением миндалины, где в более позднем посттравматическом периоде они угнетаются [94].

В последние десятилетия эпигенетическая регуляция экспрессии генов рассматривается как механизм взаимодействия среды и генома. Вполне вероятно, что травматическое событие вызывает долговременные эпигенетические модификации в локусах, связанных с иммунной дисрегуляцией, и повышает риск развития ПТСР. Для проверки данной гипотезы широко применяются методы анализа эпигенетических модификаций участков генома, связанных с нейровоспалением. На сегодняшний день есть данные о значимом снижении уровня метилирования ДНК в промоторах генов провоспалительных цитокинов у мышей с моделированным ПТСР [94]. Перспективным способом *in vivo* визуализации нейровоспаления в мозге является молекулярный имиджинг. За последнее десятилетие были разработаны и протестированы на животных ряд агентов для молекулярной визуализации, некоторые из них уже проходят клинические испытания на людях. Наиболее многообещающими считают такие техники визуализации, как ПЭТ, СПЭКТ и оптическая визуализация, которые позволяют получить изображение молекул адгезии для визуализации активации эндотелиальных и микроглиальных клеток, инфильтрации моноцитов, а также процессов демиелинизации и гибели нейронов [95]. С помощью иммуногистохимии удалось установить, что хронический психосоциальный стресс ассоциирован с морфологическими изменениями в микроглиальных клетках, свидетельствующими о развитии нейровоспаления. Так, в моделях ПТСР показано значимое увеличение экспрессии микроглиального маркера Iba-1 во многих регионах мозга, и эти данные хорошо воспроизводимы [13]. В последнее десятилетие активно развиваются методы оптогенетики, которые используют генетически модифицированные светочувствительные ионные каналы для неинвазивного и целенаправленного контроля нейронной активности *in vivo*. Однако новейшие исследования показывают, что методом оптогенетики можно также

контролировать активность глиальных клеток, в частности, астроцитов [95]. Несмотря на то, что пока нет данных об успешной оптогенетической манипуляции микроглиальными клетками, активный поиск новых светочувствительных каналов и сигнальных молекул позволяет рассчитывать на успешное применение данного метода для изучения микроглии в ближайшие годы. Наиболее перспективными в этом отношении считают светозависимый рецептор opto-XR и светочувствительный активатор кальциевого сигналинга optoSTIM1 [96]. Поскольку данные, полученные на животных при моделировании ряда заболеваний, трудно прямо экстраполировать на человека, изучение роли нейровоспаления в патогенезе ПТСР активно проводится на популяциях пациентов, имеющих соответствующий диагноз. В большинстве подобных исследований оценивают уровни провоспалительных цитокинов в периферической крови пациентов с ПТСР с помощью иммуноферментного анализа. Обнаружено, что в крови у пациентов с ПТСР по сравнению с контролем и с лицами, перенесшими травму без развития ПТСР, значимо повышены уровни таких провоспалительных цитокинов как ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α , а также С-реактивного белка. При этом уровни цитокинов в крови позитивно коррелируют с тяжестью симптомов ПТСР [87]. Подобные работы в перспективе позволят выявить биологические маркеры ПТСР и повышенного риска развития данного расстройства.

Для выяснения молекулярно-генетических механизмов ПТСР успешно используется полногеномный поиск ассоциаций — GWAS [97]. Анализ взвешенной сети коэкспрессии генов (WGCNA) применяют для идентификации уровней коэкспрессии генов, ассоциированных с иммунным ответом у пациентов с ПТСР [98]. Все больше работ посвящено анализу эпигенетических модификаций, в том числе промоторов конкретных генов, связанных с нейровоспалением. Уже есть данные о более низком уровне метилирования генов, связанных с иммунным ответом, в том числе с выработкой провоспалительных ИЛ-1 β , ИЛ-8 у пациентов с ПТСР по сравнению с контролем [99, 100].

С целью диагностики, разработки новых методов лечения и контроля лечения в последние 15 лет активно развиваются методы визуализации нейровоспаления. На сегодняшний день доступен широкий спектр неинвазивных или минимально инвазивных методов для характеристики воспалительных процессов в мозге. Так, для изучения процесса активации микроглии в центральной нервной системе человека *in vivo* применяют ПЭТ трэйсер 11C-PP2B, который специфичен к транслокаторному белку TSPO. Нарушение гематоэнцефалического

барьера визуализируют с помощью МРТ, используя гадолиний в качестве контраста. МРТ с наночастицами оксида железа дает возможность визуализировать инфильтрацию моноцитов в нервную ткань [101].

Хотя методы визуализации нейровоспаления в мозге предоставляют важную информацию для понимания ПТСР, эти стратегии не позволяют детально изучить молекулярные и клеточные изменения, происходящие в мозге пациентов. Посмертные патологоанатомические исследования срезов головного мозга являются важнейшим направлением изучения патогенеза ПТСР. К сожалению, во всем мире отмечается серьезная нехватка тканей мозга человека с ПТСР. В литературе имеются единичные работы, посвященные изучению срезов мозга пациентов с данным расстройством, показывающие снижение числа нейронов в голубом пятне и митохондриальную дисфункцию в нейронах дорсолатеральной префронтальной коры [102].

Таким образом, с помощью уже существующих методов нейровизуализации и разработки новых подходов станет возможным всесторонне проанализировать воспалительные процессы, протекающие в нервной ткани при ПТСР, сложность которых и наличие большого количества регуляторных механизмов, однако, представляет собой большую проблему для целостного понимания картины развития данной патологии. Вопреки мнению, что активированное нейровоспаление связано с ингибированием нейрогенеза и снижением синаптической пластичности, приводящими к развитию и сохранению поведенческих проявлений ПТСР, в то время как периферическое воспаление непосредственно участвует в повреждении ткани, вызывая и поддерживая соматические сопутствующие патологии, наш комбинированный анализ событий, происходящих в организме при развитии ПТСР, указывает на активное участие периферии в процессах регуляции нейровоспаления. Нервная, эндокринная и иммунная системы тесно переплетены друг с другом, оказывая сильное взаимное влияние и обеспечивая поддержание гомеостаза в системе на каждом этапе развития патологической тревоги, и, видимо, не только данной патологии.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Благодарности

Статья написана при поддержке ФЦП № 14.575.21.0074 (RFMEFI57514X0074). Авторы выражают признательность редактору журнала и рецензенту за проделанную работу и справедливые замечания.

ЛИТЕРАТУРА:

1. The National Center for Health Statistics [US] International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10), 2010, <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>.
2. Tovote P., Fadok J.P., Lüthi A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015; 16: 317–31.
3. Domingos da Silveira da Luz A.C., Dias G.P., Nascimento Bevilacqua M.C. et al. Translational findings on brain-derived neurotrophic factor and anxiety: contributions from basic research to clinical practice. *Neuropsychobiology* 2013; 68: 129–38.
4. Matar M.A., Zohar J., Cohen H. Translationally relevant modeling of PTSD in rodents. *Cell Tissue Res.* 2013; 354: 127–39.
5. Wohleb E.S., McKim D.B., Shea D.T. et al. Re-establishment of anxiety in stress-sensitized mice is caused by monocyte trafficking from the spleen to the brain. *Biol. Psychiatry* 2014; 75: 970–81.
6. Deslauriers J., Powell S., Risbrough V.B. Immune signaling mechanisms of PTSD risk and symptom development: insights from animal models. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 2017; 14: 123–32.
7. Eraly S.A., Nievergelt C.M., Maihofer A.X. et al. Assessment of plasma C-reactive protein as a biomarker of posttraumatic stress disorder risk. *JAMA Psychiatry* 2014; 71: 423.
8. van Zuiden M., Heijnen C.J., Maas M. et al. Glucocorticoid sensitivity of leukocytes predicts PTSD, depressive and fatigue symptoms after military deployment: a prospective study. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37: 1822–36.
9. Jin J., Maren S. Fear renewal preferentially activates ventral hippocampal neurons projecting to both amygdala and prefrontal cortex in rats. *Sci. Rep.* 2015; 5: 8388.
10. Godsil B.P., Kiss J.P., Spedding M. et al. The hippocampal-prefrontal pathway: the weak link in psychiatric disorders? *Eur. J. Psychotraumatol.* 2013; 23: 1165–81.
11. Adhikari A., Topiwala M.A., Gordon J.A. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. *Neuron* 2009; 65: 257–69.
12. Mendez-Davida I., Hen R., Gardiera A.M. et al. Adult hippocampal neurogenesis: An actor in the antidepressant-like action. *Ann. Pharm. Fr.* 2013; 71: 143–9.
13. Calcia M.A., Bonsall D.R., Bloomfield P.S. et al. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology* 2016; 233: 1637–50.
14. Maier S.F. Bi-directional immune-brain communication: Implications for understanding stress, pain, and cognition. *Brain, Behav. Immun.* 2003; 17: 69–85.

15. Jones K.A., Thomsen C. The role of the innate immune system in psychiatric disorders. *Mol. Cell. Neurosci.* 2013; 53: 52–62.
16. Hou R., Baldwin D.S. A neuroimmunological perspective on anxiety disorders. *Hum. Psychopharmacol.* 2012; 27: 6–14.
17. Miller A.H., Haroon E., Raison C.L. et al. Cytokine targets in the brain: impact on neurotransmitters and neurocircuits. *Depress. Anxiety* 2013; 30(4): 297–306.
18. Erta M., Quintana A., Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int. J. Biol. Sci.* 2012; 8: 1254–66.
19. Müller N., Manfred A. Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 1998; 22: 1–33.
20. Garay P.A., McAllister A.K. Novel roles for immune molecules in neural development: implications for neurodevelopmental disorders. *Front. Synaptic Neurosci.* 2010; 2: 136.
21. Gola H., Engler H., Sommershof A. et al. Posttraumatic stress disorder is associated with an enhanced spontaneous production of pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells. *BMC Psychiatry* 2013; 13: 40.
22. Simen B.B., Duman C.H., Simen A.A. et al. TNF α signaling in depression and anxiety: behavioral consequences of individual receptor targeting. *Biol. Psychiatry* 2006; 59: 775–85.
23. Andrews J.A., Neises K.D. Cells, biomarkers, and post-traumatic stress disorder: evidence for peripheral involvement in a central disease. *J. Neurochem.* 2012; 120: 26–36.
24. Ajmo C.T. Jr., Vernon D.O., Collier L. et al. The spleen contributes to stroke-induced neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* 2008; 86: 2227–34.
25. Lewitus G.M., Cohen H., Schwartz M. Reducing posttraumatic anxiety by immunization. *Brain, Behav. Immun.* 2008; 22: 1108–14.
26. Haas H.S., Schauenstein K. Neuroimmunomodulation via limbic structures — the neuroanatomy of psychoimmunology. *Prog. Neurobiol.* 1997; 51: 195–222.
27. Capuron L., Miller A.H. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol. Ther.* 2011; 130: 226–38.
28. Kheirbek M.A., Klemenhagen K.C., Sahay A. et al. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nat. Neurosci.* 2012; 15: 1613–20.
29. Griffin G.D., Charron D., Al-Daccak R. Post-traumatic stress disorder: revisiting adrenergics, glucocorticoids, immune system effects and homeostasis. *Clin. Transl. Immunology* 2014; 3(11): e27.
30. Умрюхин А.Е. Нейромедиаторные гиппокампальные механизмы стрессорного поведения и реакций избегания. *Вестник новых медицинских технологий* 2013; 1.
31. Herman J.P. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2005; 29: 1201–13.
32. Fanselow M.S. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 2010; 65: 7–19.
33. Nicholson L.B. The immune system. *Essays Biochem.* 2016; 60: 275–301.
34. Morganti-Kossmann M.C., Rancan M., Stahel P.F. et al. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr. Opin. Crit. Care* 2002; 8: 101–5.
35. Izecka J. The structure and function of blood-brain barrier in ischaemic brain stroke process. *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska Med.* 1996; Section D: *Medicina*; 51: 123–7.
36. Papadopoulos M.C., Lamb F.J., Moss R.F. et al. Faecal peritonitis causes oedema and neuronal injury in pig cerebral cortex. *Clin. Sci.* 1999; 96(5): 461–6.
37. Varatharaj A., Galea I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, Behav. Immun.* 2017; 60: 1–12.
38. Ericsson A., Liu C., Hart R.P. et al. Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *J. Comp. Neurol.* 1995; 361(4): 681–98.
39. Chaouloff F. Serotonin, stress and corticoids. *J. Psychopharmacol.* 2000; 14: 139–51.
40. Ganong W.F. Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2000; 27: 422–7.
41. Cottrell G.T., Ferguson A.V. Sensory circumventricular organs: Central roles in integrated autonomic regulation. *Regul. Pept.* 2004; 117: 11–23.
42. Joly J.S., Osório J., Alunni A. et al. Windows of the brain: towards a developmental biology of circumventricular and other neurohemal organs. *Seminars in cell & developmental biology* 2007; 18(4): 512–24.
43. Agrawal S., Anderson P., Durbej M. et al. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 2006; 203(4): 1007–19.
44. Bush T.G., Puvanachandra N., Horner C.H. et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 1999; 23(2): 297–308.
45. Esposito P., Gheorghie D., Kandere K. et al. Acute stress increases permeability of the blood-brain-barrier through activation of brain mast cells. *Brain Res.* 2001; 888(1): 117–27.
46. Roszkowski M., Bohacek J. Stress does not increase blood-brain barrier permeability in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2016; 36(7): 1304–15.
47. Frank M., Weber M.D., Watkins L.R. et al. Stress-induced neuroinflammatory priming: A liability factor in the etiology of psychiatric disorders. *Neurobiol. Stress* 2016; 4: 62–70.
48. Wohleb E.S., Mckim D.B., Sheridan J.F. et al. Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. *Front. Neurosci.* 2015; 8: 447.
49. Herbert J., Goodyer I.M., Grossman A.B. et al. Do corticosteroids damage the brain? *J. Neuroendocrinol.* 2006; 18: 393–411.
50. Heegde F., De Rijk R.H., Vinkers C. The brain mineralocorticoid receptor and stress resilience. *Psychoneuroendocrinology* 2015; 52: 92–110.
51. Walker F.R., Yirmiya R. Microglia, Physiology and Behavior: A Brief Commentary. *Brain Behav. Immun.* 2016; 55: 1–5.
52. Pavlov V., Tracey K. The vagus nerve and the inflammatory reflex-linking immunity and metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2012; 8: 743–54.
53. Olshansky B. Vagus nerve modulation of inflammation: Cardiovascular implications. *Trends Cardiovasc. Med.* 2016; 26: 1–11.
54. Ek M., Kurosawa M., Lundeberg T. et al. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1 β : role of endogenous prostaglandins. *J. Neurosci.* 1998; 18: 9471–9.
55. Hosoi T., Okuma Y., Matsuda T. et al. Novel pathway for LPS-induced afferent vagus nerve activation: possible role of nodose ganglion. *Auton. Neurosci.* 2005; 120: 104–7.
56. Borovikova L.V., Ivanova S., Zhang M. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458–62.
57. Wang H., Yu M., Ochani M. et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; 421: 384–8.
58. Gallowitsch-Puerta M., Pavlov V.A. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Life Sciences* 2007; 80: 2325–9.
59. Hamano R., Takahashi H.K., Iwagaki H. et al. Stimulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor inhibits CD14 and the toll-like receptor 4 expression in human monocytes. *Shock* 2006; 26: 358–64.
60. Rosas-Ballina M., Ochani M., Parrish W.R. et al. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *PNAS USA* 2008; 105: 11008–13.
61. Hamilton N.B., Attwell D. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat. Rev. Neurosci.* 2010; 11: 227–38.
62. Hertz L., Zielke H.R. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci.* 2004; 27: 735–43.
63. Kettenmann H., Hanisch U.K., Noda M. et al. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 2011; 91: 461–553.
64. Wake H., Moorhouse A.J., Jinno S. et al. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J. Neurosci.* 2009; 29: 3974–80.
65. Chaouloff F. Serotonin, stress and corticoids. *J. Psychopharmacol.* 2000; 14: 139–51.
66. Curzon G., Joseph M.H., Knott P.J. Effects of immobilization and food deprivation on rat brain tryptophan metabolism. *J. Neurochem.* 1972; 19: 1967–74.
67. Neckers L., Sze P.Y. Regulation of 5-hydroxytryptamine metabolism in mouse brain by adrenal glucocorticoids. *Brain Res.* 1975; 93: 123–32.
68. Dunn A.J., Welch J. Stress and endotoxin induced increases in brain tryptophan and serotonin metabolism depend on sympathetic nervous system activity. *J. Neurochem.* 1991; 57: 1615–22.
69. Boadle-Biber M.C. Biosynthesis of serotonin. In: Osborne N.N., editor. *Biology of Serotonergic Transmission*. Chichester: John Wiley & Sons; 1982. p. 63–87.
70. Green R.A. Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine. *Br. J. Pharmacol.* 2006; 147: 145–52.
71. Dahlström A., Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 1964; 20: 398–9.
72. Törk I. Anatomy of the serotonergic system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990; 600: 9–34.
73. Risch S.C., Nemeroff C.B. Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. *J. Clin. Psychiatry* 1992; 53: 3–7.
74. Temel Y., Boothman L.J., Blokland A. et al. Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *PNAS USA* 2007; 43: 17087–92.
75. Graeff F.G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. *Rev. Neurosci.* 1993; 4: 181–212.
76. Umbriaco D., Garcia S., Beaulieu C. et al. Relational features of acetylcholine, noradrenaline, serotonin and GABA axon terminals in the stratum radiatum of adult rat hippocampus (CA1). *Hippocampus* 1995; 5(6): 605–20.
77. Bunin M.A., Wightman R.M. Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission. *J. Neurosci.* 1998; 18(13): 4854–60.
78. Zoli M., Jansson A., Syková E. et al. Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 1999; 20(4): 142–50.
79. Jacobs B.L., Azmitia E.C. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* 1992; 72(1): 165–229.

80. Peyron C., Petit J.M., Rampon C. et al. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neurosci.* 1997; 82: 443–68.
81. Mahe C., Loetscher E., Dev K.K. et al. Serotonin 5-HT₇ receptors coupled to induction of interleukin-6 in human microglial MC-3 cells. *Neuropharmacology* 2005; 49: 40–7.
82. Kolodzieczak M., Béchade C., Gervasi N. et al. Serotonin modulates developmental microglia via 5-HT_{2B} receptors: potential implication during synaptic refinement of retinogeniculate projections. *ACS Chem. Neurosci.* 2015; 6: 1219–30.
83. MacGillivray L., Reynolds K.B., Sickand M. et al. Inhibition of the serotonin transporter induces microglial activation and downregulation of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Synapse* 2011; 65(11): 1166–72.
84. de las Casas-Engel M., Dominguez-Soto A., Sierra-Filardi E. et al. Serotonin skews human macrophage polarization through HTR_{2B} and HTR₇. *J. Immunol.* 2013; 190(5): 2301–10.
85. Hayley S., Merali Z., Anisman H. Stress and cytokine-elicited neuroendocrine and neurotransmitter sensitization: implications for depressive illness. *Stress* 2003; 6: 19–32.
86. Bertrand J., José L.V., editors. *Microglia: Methods and Protocols*. New York: Humana Press Inc; 2013. p. 3–8.
87. Burrell R. Immunomodulation by bacterial endotoxin. *Crit. Rev. Microbiol.* 1990; 17: 189–208.
88. Montero-Menei C.N., Sindji L., Garcion E. et al. Early events of the inflammatory reaction induced in rat brain by lipopolysaccharide intracerebral injection: relative contribution of peripheral monocytes and activated microglia. *Brain Res.* 1996; 724: 55–66.
89. Pugh C.R., Kumagawa K., Fleshner M. et al. Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning. *Brain, Behav. Immun.* 1998; 12: 212–29.
90. Swiergiel A.H., Dunn A.J. Effects of interleukin-1 β and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2007; 86: 651–9.
91. Silverman M.N., Macdougall M.G., Hu F. et al. Endogenous glucocorticoids protect against TNF- α -induced increases in anxiety-like behavior in virally infected mice. *Mol. Psychiatry* 2007; 12: 408–17.
92. Koo J.W., Duman R.S. Interleukin-1 receptor null mutant mice show decreased anxiety-like behavior and enhanced fear memory. *Neurosci. Lett.* 2009; 456: 39–43.
93. Murray C.L., Obiang P., Bannerman D. et al. Endogenous IL-1 in Cognitive Function and Anxiety: A Study in IL-1R1^{2/2} Mice. *PLoS One* 2013; 8: 10.
94. Muhie S., Gautam A., Chakraborty N. et al. Molecular indicators of stress-induced neuroinflammation in a mouse model simulating features of post-traumatic stress disorder. *Transl. Psychiatry* 2017; 7: 5.
95. Pulli B., Chen J.W. Imaging Neuroinflammation — from Bench to Bedside. *J. Clin. Cell. Immunol.* 2014; 5: 226.
96. Cho W., Barcelon E., Lee S. Optogenetic Glia Manipulation: Possibilities and Future Prospects. *Exp. Neurobiol.* 2016; 25: 197–204.
97. Almlil L.M., Fani N., Smith A.K. et al. Genetic approaches to understanding post-traumatic stress disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2014; 17(2): 355–70.
98. Breen M., Maihofer A., Glatt S. et al. Gene networks specific for innate immunity define post-traumatic stress disorder. *Mol. Psychiatr.* 2015; 20: 1538–45.
99. Uddin M., Aiello A.E., Wildman D.E. et al. Epigenetic and immune function profiles associated with posttraumatic stress disorder. *PNAS USA* 2010; 107: 9470–5.
100. Rusiecki J., Byrne C., Galdzicki Z. et al. PTSD and DNA methylation in select immune function gene promoter regions: a repeated measures case-control study of U.S. military service members. *Front. in Psychiatry* 2013; 4: 56.
101. Albrecht D., Granziera C., Hooker J. et al. In vivo imaging of human neuroinflammation. *ACS Chem. Neurosci.* 2016; 7: 470–83.
102. De Lange G.M. Understanding the cellular and molecular alterations in PTSD brains: The necessity of post-mortem brain tissue. *Eur. J. Psychotraumatol.* 2017; 8: 1.

Поступила: 05.02.2018

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

DOI: 10.23868/201808020

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАКРОФАГОВ ЭМБРИОНАЛЬНОГО И МОНОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯА.В. Лохонина^{1,3}, А.В. Ельчанинов^{1,3}, И.В. Арутюнян^{1,2}, А.С. Покусаев², А.В. Макаров^{1,4}, И.З. Еремина³, В.В. Суровцев³, Г.Б. Большакова², Д.В. Гольдштейн⁵, Т.Х. Фатхудинов^{1,3}¹ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, Москва, Россия² Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия³ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия⁵ Медико-генетический научный центр, Москва, Россия**MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF MACROPHAGES OF EMBRYONIC AND MONOCYTIC ORIGIN**A.V. Lokhonina^{1,3}, A.V. Elchaninov^{1,3}, I.V. Arutyunyan^{1,2}, A.S. Pokusaev², A.V. Makarov^{1,4}, I.Z. Eremina³, V.V. Survtsev³, G.B. Bolshakova², D.V. Goldshtein⁵, T.Kh. Fatkhudinov^{1,3}¹ V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia² Scientific Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia³ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia⁴ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia⁵ Research Centre of Medical Genetics, Moscow, Russia

e-mail: fatkhudinov@gmail.com

Макрофаги млекопитающих представляют собой гетерогенную популяцию клеток, различия касаются как источников их происхождения, так и функциональных показателей. В работе проведена сравнительная характеристика макрофагов эмбрионального происхождения на примере клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения на примере макрофагов — производных моноцитов.

Из печени крыс была получена культура клеток Купфера, из крови крыс — макрофаги моноцитарного происхождения. Оценивали фенотип и профиль экспрессии генов нативных и активированных в направлении M1- и M2-макрофагов. Фенотип выделенных культур был охарактеризован с помощью методов иммуноцитохимии и проточной цитофлуориметрии. Экспрессию генов изучали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Под влиянием индуцирующих факторов фенотип двух популяций макрофагов изменяется сходным образом: под влиянием M1 факторов в клетках активизируется синтез CD86 и iNOs, под влиянием M2 — CD163 и Arg1. В клетках Купфера более выражена экспрессия генов противовоспалительных цитокинов — *il4*, *il13*, а в макрофагах моноцитарного происхождения экспрессия генов провоспалительных цитокинов — *il1b*, *tnfa*, *il12a*. Индукция генов провоспалительных цитокинов в клетках Купфера происходит медленнее по сравнению с макрофагами моноцитарного происхождения.

Ключевые слова: макрофаги, моноциты, клетки Купфера, активация.

Введение

Макрофаги являются ключевыми участниками, регулируемыми разнообразными морфогенетические процессы в организме млекопитающих, в том числе воспаление и регенерацию тканей [1–4].

В ходе онтогенеза макрофаги млекопитающих образуются из гемопоэтических клеток трех локализаций: желточного мешка, печени зародыша и красного костного мозга. В постнатальном периоде макрофаги большинства органов представляют собой гетерогенную популяцию, состоящую из потомков гемопоэтических клеток печени зародыша и красного костного мозга. Однако существуют исключения: печень содержит макрофаги,

Macrophages of mammals are a heterogeneous population of cells. This applies both to the functional parameters of macrophages and to the sources of their development. The comparative characteristics of macrophages of embryonic origin on the example of Kupffer cells and macrophages of bone marrow origin on the example of macrophages of monocyte derivatives were carried out.

Cultures of Kupffer cells and macrophages of monocytic origin were obtained. The phenotype, profile of gene expression of native macrophages activated in direction M1 and M2 was studied. The phenotype of isolated cultures is characterized by methods of immunocytochemistry, flow cytometry. Gene expression was studied by real-time polymerase chain reaction.

Under the influence of inducing factors, the phenotype of two populations of macrophages changes in a similar way: under the influence of M1-factors, the synthesis of CD86 and iNOs is activated in cells, under the influence of M2 — CD163 and Arg1. In Kupffer cells, expression of anti-inflammatory cytokines — *il4*, *il13*, is more pronounced, and in macrophages of monocytic origin of pro-inflammatory cytokines — *il1b*, *tnfa*, *il12a*. The induction of the genes of proinflammatory cytokines in Kupffer cells is slower compared to macrophages of monocytic origin.

Keywords: macrophages, monocytes, Kupffer cells, activation.

ведущие свое происхождение из гемопоэтических клеток печени зародыша, а макрофаги дермы кожи и слизистой оболочки кишечника представлены в основном клетками костномозгового происхождения [3].

Более 95% всех макрофагов организма локализовано в печени; другое название этих макрофагов — клетки Купфера, по имени Карла Вильгельма Купфера, впервые описавшего их в 1876 г. [5]. Существует две гипотезы о механизмах самоподдержания такого огромного пула клеток. В соответствии с одним представлением, высказанным в 80-х годах прошлого века, популяция макрофагов печени постоянно пополняется за счет мигрирующих гемопоэтических клеток красного

костного мозга [6], согласно другому, более позднему, клетки Купфера способны к самообновлению за счет пролиферации зрелых клеток или предшественников, локализованных также в печени [7].

Источник происхождения органных макрофагов, вероятно, отражается на их свойствах, а также на закономерностях протекания физиологических и патологических процессов. На существующие различия в физиологии двух типов макрофагов указывает тот факт, что после острого повреждения парацетамолом или CCl_4 в печень активно мигрируют моноциты [8, 9]. Однако заселившие печень макрофаги костномозгового происхождения остаются доминирующей популяцией только в течение 72 ч. и уже через 96 ч. полностью исчезают, а их место занимают клетки Купфера, восстановившие свою численность за счет пролиферации [10]. Искусственное истощение популяции резидентных макрофагов, как и предотвращение миграции в печень моноцитов крови, вызывает замедление регенераторного процесса [10, 11]. Очевидно, что оба типа макрофагов: и резидентные макрофаги печени, имеющие эмбриональное происхождение, и мигрировавшие из крови макрофаги костномозгового происхождения — участвуют в восстановлении печени, при этом моноцитарные макрофаги являются, своего рода, «скорой помощью», призванной запустить процесс репарации до момента восстановления популяции клеток Купфера. Таким образом, макрофаги моноцитарного происхождения и клетки Купфера отличаются не только по своему происхождению, но и по функциональной нагрузке.

Цель работы — сравнить фенотип и профиль экспрессии генов цитокинов нативных и активированных макрофагов костномозгового и эмбрионального происхождения на примере производных моноцитов крови и клеток Купфера.

Материал и методы

Самцы крыс аутиредного стока Вистар массой тела 250–300 г были получены из питомника «Столовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Содержание и уход за лабораторными животными осуществляли в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985 г.), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.) и законом «О защите животных от жестокого обращения» гл. V, ст. 10, 4679-ГД от 01.12.1999 г.

Выделение моноцитов из периферической крови крысы

У самцов крыс производили забор периферической крови. Полученную кровь в соотношении 1:1 смешивали с раствором Хенкса, содержащим 1000 МЕ/мл гепарина (Синтез, Россия). Методом градиентного центрифугирования (400g, 30 мин., 20 °C) на препарате Фиколл (ПанЭко, Россия) получали фракцию мононуклеарных клеток. Клетки дважды отмывали раствором Хенкса, после каждой промывки клетки центрифугировали (300g, 20 мин., 20 °C). Количество и жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализатора TC20 (Bio-Rad, США).

Выделение клеток Купфера из печени крысы

Крысам под эфирным наркозом проводили перфузию печени раствором фосфатно-солевого буфера (40–50 мл) через воротную вену. Печень извлекали, дважды промывали раствором Хенкса, удаляли

оболочки и крупные сосуды, измельчали и инкубировали в 0,05% растворе коллагеназ 1 и 4 типов (ПанЭко, Россия) 20 мин. при 37 °C на орбитальном шейкере. Полученную суспензию клеток пропускали через 100 мкм нейлоновый фильтр (SPL LifeScience, Южная Корея) и дважды отмывали от ферментов в растворе Хенкса (центрифугирование при 300g, 10 мин., 20 °C). Осадок ресуспендировали в 30 мл фосфатно-солевого буфера, осаждали паренхиматозные клетки печени (центрифугирование при 50g, 3 мин., 20 °C) и отбирали непаренхиматозные клетки, оставшиеся в супернатанте. После градиентного центрифугирования (400g, 30 мин., 20 °C) на препарате Фиколл (ПанЭко, Россия) получали фракцию клеток Купфера [12, 13]. Количество и жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализатора TC20 (Bio-Rad, США).

Культивирование макрофагов

Клетки Купфера и моноциты из периферической крови крысы переносили в ростовую среду RPMI (ПанЭко, Россия), содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки (PAA Lab., Австрия) и 1% пенициллина-стрептомицина (ПанЭко, Россия). На 2 сут. культивирования удаляли не прикрепившиеся к пластику клетки. Замену половины объема культуральной среды на свежую производили на 4 и 7 сут.

Активация макрофагов в направлении M1-фенотипа

Клетки Купфера и макрофаги из периферической крови крысы культивировали в ростовой среде с добавлением 50 нг/мл GM-CSF (Cloud-Clone, КНР). На 2 сут. культивирования удаляли не прикрепившиеся к пластику клетки. Замену половины объема культуральной среды на свежую производили на 4 и 7 сут. Для активации M1-макрофагов на 7 сут. в среду вносили LPS (Sigma, США) и IFN- γ (Cloud-Clone, КНР) до конечной концентрации 10 нг/мл и 40 нг/мл соответственно (M1 среда).

Активация макрофагов в направлении M2-фенотипа

Клетки Купфера и макрофаги из периферической крови крысы культивировали в ростовой среде с добавлением 100 нг/мл M-CSF (Cloud-Clone, КНР). На 2 сут. культивирования удаляли не прикрепившиеся к пластику клетки. Замену половины объема культуральной среды на свежую производили на 4 и 7 сут. Для активации M2-макрофагов на 7 сут. в среду вносили IL4, IL10 и IL13 (Cloud-Clone, КНР) до конечной концентрации 20 нг/мл (M2 среда).

Иммуноцитохимическое исследование

Исследование проводили через 24 ч. после активации макрофагов. Для оценки экспрессии маркеров активированных макрофагов использовали антитела к CD68 (1:100, Abcam, Великобритания), iNOs (1:100, Abcam, Великобритания), Arg1 (1:100, Abcam, Великобритания), CD206 (1:100, Santa Cruz, США). Вторые антитела были конъюгированы с FITC (1:200, Abcam, Великобритания). Ядра клеток окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США). Окрашенные макрофаги изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000 B (Германия) и программного обеспечения LAS AF v.3.1.0 build 8587 (Leica Microsystems, Германия).

Проточная цитофлуориметрия

Через 24 ч. после активации макрофаги открепляли от подложки раствором трипсина-Версена и дважды

отмывали от культуральной среды в растворе Хенкса. Пермеабиллизацию и фиксацию клеток для последующего окрашивания на внутриклеточные маркеры осуществляли с помощью набора InsideStainKit (Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки для окрашивания на поверхностные маркеры ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере до концентрации 1×10^5 клеток в 100 мкл. Использовали антитела к CD45-PerCPVio700, CD68-PEVio770, CD11b-PE, CD86-VioBright FITC (Miltenyi Biotec, Германия) и CD163-PE (Thermo Fisher, США). Анализ проводили на цитофлуориметре Cytomics FC 500 (BeckmanCoulter, США) с помощью программы CXP (Beckman Coulter, США).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Экспрессию генов изучали через 24 и 72 ч. после активации макрофагов. Суспензию клеток помещали в РНК-лейтер (QIAGEN, Германия), инкубировали в течение 1 сут. при $+4^\circ\text{C}$, переносили в низкотемпературный

морозильник и хранили при -80°C . Из полученных образцов выделяли тотальную РНК с помощью набора RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Германия). Синтез кДНК с матрицы полученной тотальной РНК осуществляли с использованием готового набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия). С полученными кДНК ставили ПЦР с помощью готовых наборов реактивов qPCRmix-HS SYBR, содержащих флуоресцентный интеркалирующий краситель Sybr Green I (Евроген, Россия). Праймеры для ПЦР подбирали с применением программы Primer-BLAST в соответствии с общепринятыми требованиями. Выбранные праймеры (табл.) были синтезированы фирмой Евроген (Россия). Для анализа экспрессии генов использовали метод определения порогового цикла (Ct) и вычисления относительной экспрессии гена по методу M. Pfaffl (2001) [14] с учетом рекомендаций J. Vandesompele (2002) [15]. В качестве эндогенного контроля был выбран ген домашнего хозяйства *gapdh*. Уровень экспрессии гена в активированных макрофагах нормировали на соответствующий показатель в неактивированных клетках.

Таблица. Праймеры для проведения ПЦР

Ген	Последовательность	Ген	Последовательность
<i>il1b</i>	CTG TCT GAC CCA TGT GAG CT ACT CCA CTT TGG TCT TGA CTT	<i>il18</i>	GAC AAA AGA AAC CCG CCT G ACA TCC TTC CAT CCT TCA CAG
<i>il4</i>	ATG TAA CGA CAG CCC TCT GA AGC ACG GAG GTA CAT CAC G	<i>tnfa</i>	CCA CCA CGC TCT TCT GTC TA GCT ACG GGC TTG TCA CTC G
<i>il6</i>	TAC ATA TGT TCT CAG GGA GAT GGT AGA AAC GGA ACT CCA G	<i>iNOs</i>	CGC TGG TTT GAA ACT TCT CAG GGC AAG CCA TGT CTG TGA C
<i>il10</i>	GCC CAG AAA TCA AGG AGC AT TGA GTG TCA CGT AGG CTT CTA	<i>arg1</i>	GGA TGA GCA TGA GCT CCA AG GCC AGC TGT TCA TTG GCT T
<i>il12a</i>	CTG CCA AGT GTC TTA ACC AGT GCA GGC CTC CAG TGT GCT	<i>gapdh</i>	GCGAGATCCCGCTAACATCA CCCTTCCACGATGCCAAAGT
<i>il13</i>	CCA GAA GAC TTC CCT GTG CA CCC TCA GTG GCC ATA GCG		

Статистический анализ

Полученные данные анализировали с помощью программы SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc, США), относительные экспрессии сравнивали с использованием рангового однофакторного дисперсионного анализа ANOVA on Ranks. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Фенотип макрофагов моноцитарного происхождения и клеток Купфера

Полученные культуры макрофагов моноцитарного происхождения и клеток Купфера содержали примерно одинаковое количество CD68⁺-клеток, около 90%, что свидетельствует о высокой чистоте выделения. Более 90% моноцитарных макрофагов экспрессировали интегрин CD11b, в то время как на поверхности клеток Купфера данный маркер отсутствовал. Макрофаги моноцитарного происхождения не экспрессировали маркер M1-макрофагов CD86, но около 40% клеток несли маркер M2-макрофагов CD163. В культуре неактивированных клеток Купфера доли CD86⁺ и CD163⁺-клеток составили приблизительно 30 и 70% соответственно (рис. 1).

Под влиянием M1 среды в макрофагах обоих типов изменялась экспрессия CD86: в культуре клеток Купфера доля CD86⁺-клеток возрастала приблизительно в 2 раза, в то время как в культуре макрофагов моноцитарного происхождения увеличение было более выраженным, с 0 до 73,1% (рис. 1)

При воздействии M2 среды макрофаги обоих типов также реагировали сходным образом, доля CD163⁺-клеток была выше, чем CD86⁺-клеток, в 2,0–2,2 раза (рис. 1).

При изучении фенотипа макрофагов моноцитарного происхождения и клеток Купфера методом иммуноцитохимии было обнаружено, что оба вида макрофагов реагируют на активацию одинаково. При воздействии факторов M1 среды макрофаги моноцитарного происхождения и клетки Купфера становились отростчатыми, неравномерно экспрессировали индуцируемую NO-синтазу (*iNOs*), не экспрессировали CD206 и аргиназу. Влияние факторов, индуцирующих M2-фенотип, приводило к тому, что макрофаги оставались округлыми, экспрессировали CD206 и аргиназу, не экспрессировали индуцируемую NO-синтазу (рис. 2), что согласуется с полученными в данной работе результатами по экспрессии соответствующих генов (рис. 3). Воздействие

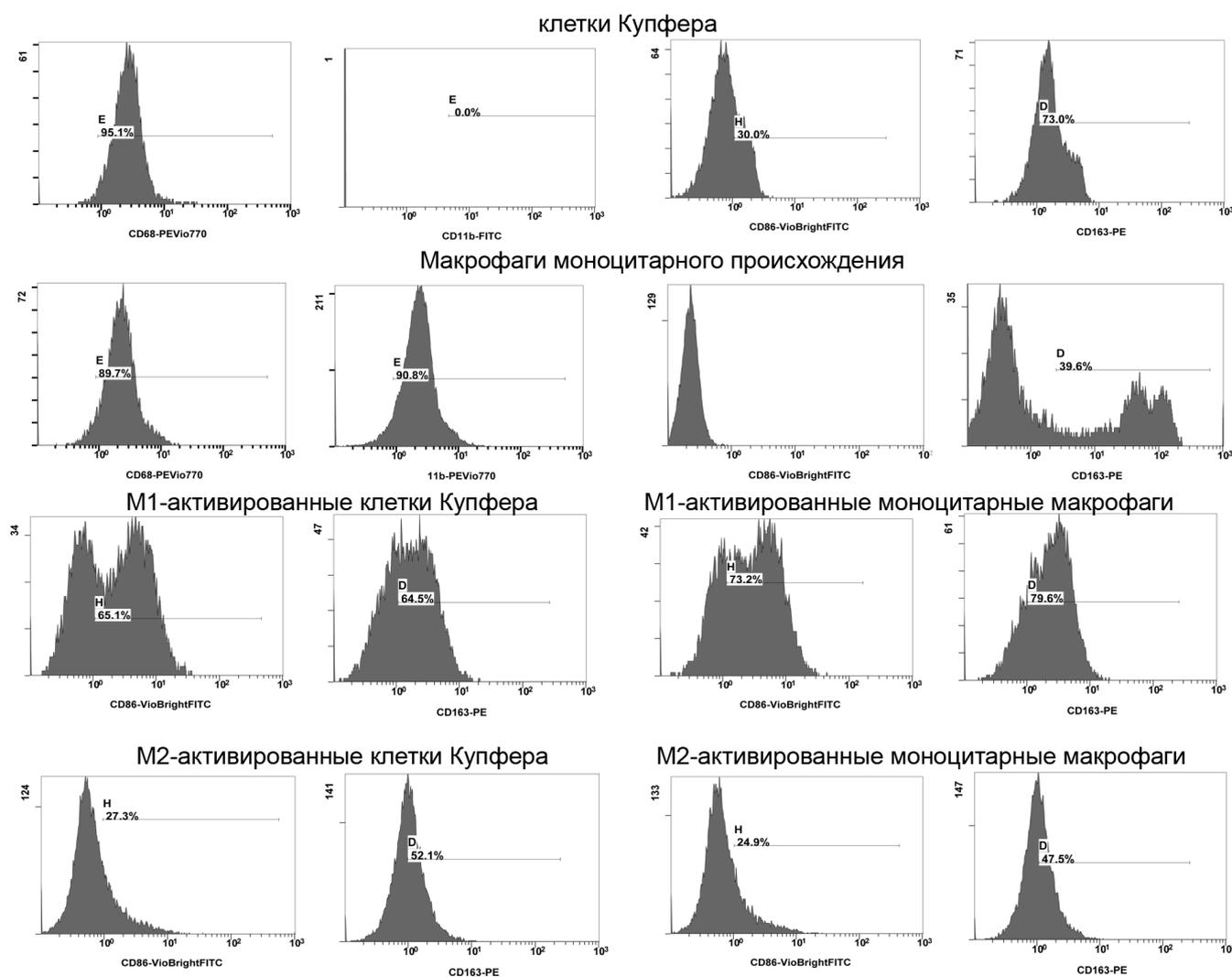


Рис. 1. Фенотип неактивированных и активированных в направлении M1- и M2-фенотипов клеток Купфера и макрофагов моноцитарного происхождения. Проточная цитофлуориметрия.

M1 и M2 сред не приводило к изменению уровня экспрессии общего маркера макрофагов CD68 (рис. 2).

Экспрессия генов

Анализ профиля экспрессии изучаемых генов в культурах клеток (рис. 3) позволил выявить отличия в ответе моноцитарных макрофагов и клеток Купфера на действие M1 и M2 индукторов.

В макрофагах моноцитарного происхождения отмечалась более быстрая и длительная индукция генов провоспалительных цитокинов по сравнению с клетками Купфера. Так, для моноцитарных макрофагов индукция генов *il1b* и *tnfa* наблюдалась как в культуре с M1, так и M2 средой, хотя в случае M1 активации высокий уровень экспрессии сохранялся дольше, чем при использовании M2 среды. Экспрессия *tnfa* в клетках Купфера возрастала только на 3 сут. под действием M1 среды, при этом значимого изменения уровня *il1b* обнаружено не было ни через 1 сут., ни через 3 сут.

Экспрессия гена *il6* в макрофагах моноцитарного происхождения и клетках Купфера имела сходную динамику: уровень экспрессии возрастал уже через 1 сут. после M1 или M2 активации, однако оставался повышенным в течение 3 сут. только при воздействии M1 среды. Экспрессия гена *il12a* в моноцитарных макрофагах возрастала при индукции как в M1,

так и в M2 направлениях уже через 1 сут., а в клетках Купфера только через 3 сут. в условиях M1 среды. Стоит отметить, что неактивированные макрофаги моноцитарного происхождения отличались достоверно более высокой экспрессией генов *il6* и *il12a* по сравнению с неактивированными клетками Купфера.

Экспрессия гена *il18* в моноцитарных макрофагах повышалась достоверно только под влиянием M1 среды, в то время как в клетках Купфера экспрессию гена стимулировали оба типа индуцирующих сред.

При рассмотрении экспрессии генов противовоспалительных цитокинов было обнаружено, что в клетках Купфера повышение экспрессии происходило быстрее и на более продолжительный период, чем в макрофагах моноцитарного происхождения. Так, статистически значимое повышение экспрессии гена противовоспалительного цитокина *il4* было выявлено только в клетках Купфера. Экспрессия гена *il4* через 1 сут. активации повышалась при воздействии M1 среды, через 3 сут. — в M1 и M2 средах. Экспрессия гена *il13* в клетках Купфера была повышена и через 1, и через 3 сут. после индуцирующего влияния в направлении как M1-, так и M2-фенотипов, в макрофагах моноцитарного происхождения экспрессия гена *il13* краткосрочно возрастала только под влиянием M2 индуцирующих факторов.

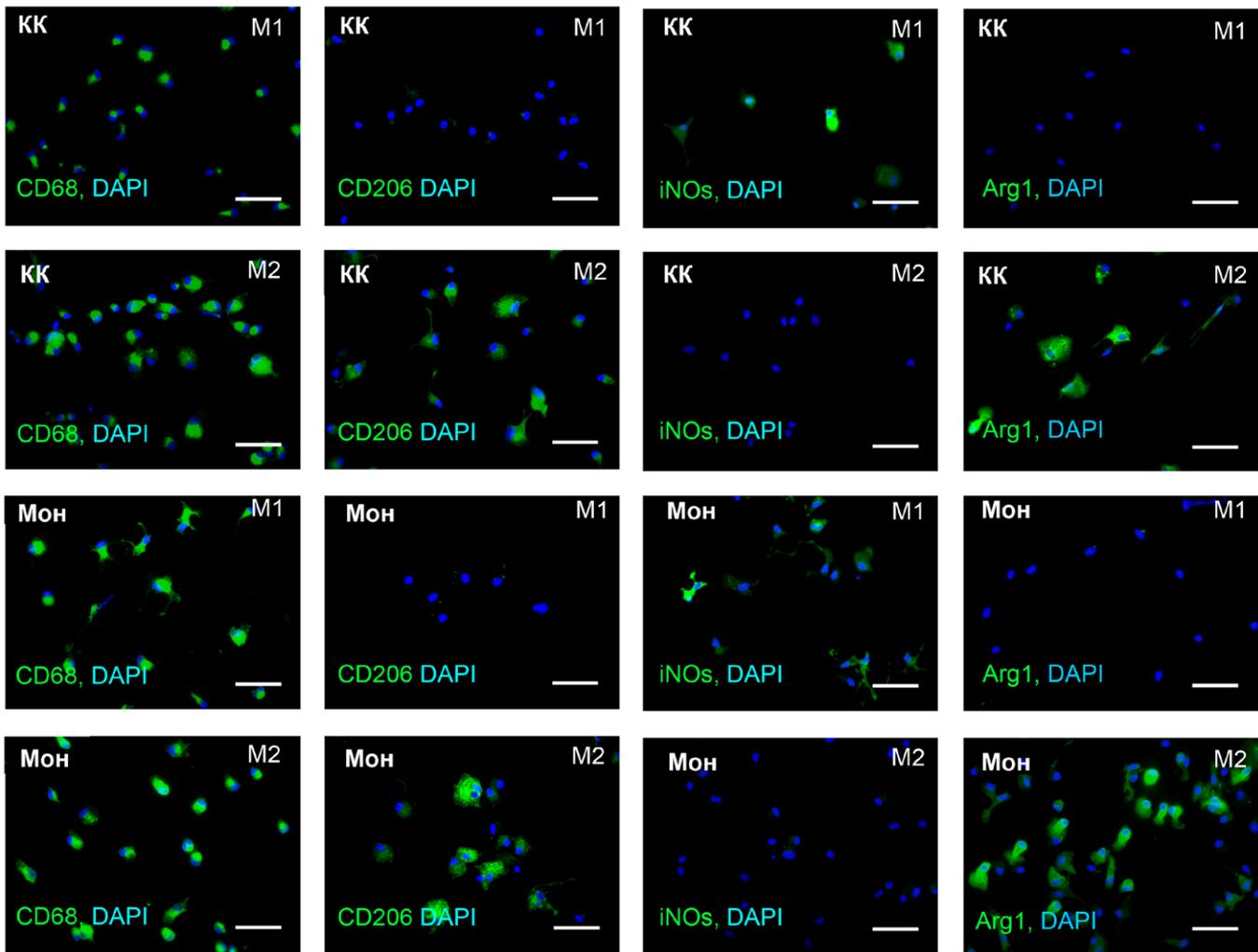


Рис. 2. Клетки Купфера (KK) и макрофаги моноцитарного происхождения (Мон) под влиянием индукторов: M1 — M1-фенотипа, M2 — M2-фенотипа; флуоресцентная микроскопия, масштабный отрезок — 50 мкм.

Воздействие индуцирующих сред приводило к повышению экспрессии гена *i10* в макрофагах обоих типов. При этом в клетках Купфера достоверное повышение экспрессии гена *i10* отмечалось через 1 сут. при культивировании в M2 среде, а через 3 сут. — в M1 среде. В макрофагах моноцитарного происхождения повышение экспрессии гена *i10* было выявлено только через 1 сут. после инкубации в M1 среде.

Влияние индуцирующих сред вызывало более длительную повышенную экспрессию *iNOs* в макрофагах моноцитарного происхождения (через 1 и 3 сут. после активации), при этом ген экспрессировался только при культивировании в M1 среде. В клетках Купфера возрастание уровня экспрессии гена *iNOs* выявляли только через 3 сут. после воздействия активирующей среды, при этом статистически значимое повышение экспрессии отмечалось как в M1, так и в M2 среде.

Уровень экспрессии *arg* был статистически значительно выше в неактивированной культуре клеток Купфера по сравнению с моноцитарными макрофагами. Через 1 сут. экспрессия *arg* в культуре клеток Купфера с M2 средой была достоверно выше, чем в культуре с M1 средой.

Обсуждение

Макрофагам отводится значительная роль в регуляции репаративных процессов, а также в развитии патологических состояний различных органов, в том числе

печени [5, 8]. Однако крайне редко отмечается особенность резидентных макрофагов печени — их эмбриональное происхождение [3, 8]. Вероятно, источник происхождения макрофагов печени определяет особенности функционирования данных клеток, как при физиологических, так и при патологических состояниях. В настоящее время остается непонятным, чем, помимо поверхностных маркеров, различаются макрофаги эмбрионального и костномозгового происхождения [2, 3].

Проведя сравнительный анализ свойств макрофагов эмбрионального происхождения на примере клеток Купфера и макрофагов моноцитарного происхождения, мы выявили ряд особенностей.

Выделенные из печени макрофаги не экспрессировали интегрин CD11b, а большая часть неактивированных макрофагов моноцитарного происхождения имела фенотип CD11b⁺ (рис. 1). CD11b некоторыми авторами рассматривается как маркер макрофагов моноцитарного происхождения, в соответствии с литературными данными доля таких клеток в печени колеблется от 5 до 30% [16]. При этом есть сообщения, что резидентные макрофаги центральной нервной системы, происходящие из гемопоэтических клеток желточного мешка, также экспрессируют CD11b [3].

В ходе изучения влияния факторов активации на экспрессию фенотипических маркеров было обнаружено, что макрофаги моноцитарного и эмбрионального

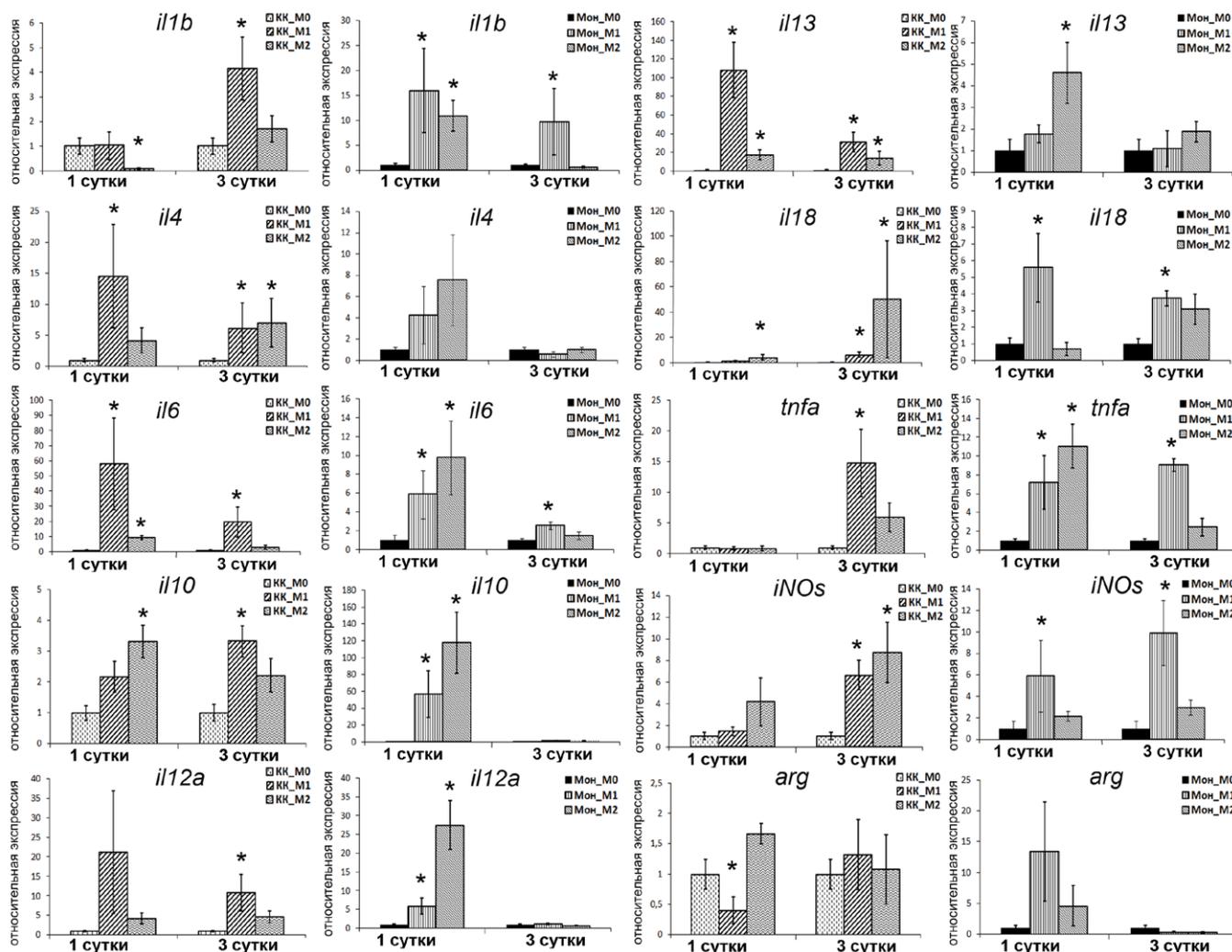


Рис. 3. Профиль экспрессируемых генов клетками Купфера и макрофагами моноцитарного происхождения: в нативных и индуцированных в направлении M1- и M2-фенотипов через 1 сут. и 3 сут. после индукции.
* различия статистически значимы по сравнению с нативными макрофагами, $p < 0,05$.

происхождения реагируют сходным образом. Наиболее заметным было изменение экспрессии рецепторного белка CD86, который необходим для активации, пролиферации, продукции цитокинов, дифференциации Т-лимфоцитов [17]. Наибольшее увеличение количества CD86⁺-клеток происходило под влиянием факторов M2 активации.

Выделенные резидентные макрофаги печени имели ряд особенностей в наборе экспрессируемых генов цитокинов. Установлено, что под влиянием факторов активации (как M1, так и M2 индукторов) в резидентных макрофагах печени увеличивалась экспрессия генов в основном противовоспалительных цитокинов, таких как *il4*, *il10*, *il13*. Экспрессия провоспалительных цитокинов либо отсутствовала (например, *il1b*), либо возрастала значительно позже (*tnfa*, *il12a*) по сравнению с макрофагами моноцитарного происхождения. Эти данные согласуются с результатами фенотипирования нативных макрофагов печени, большинство которых экспрессировали на своей поверхности CD163, маркер противовоспалительных макрофагов. Ранее нами также было выявлено, что в ходе репаративной регенерации печени после субтотальной резекции у крыс популяция макрофагов регенерирующей печени представлена в основном клетками, несущими маркер M2-макрофагов CD206 [18].

В настоящее время роль IL4 и IL13 в регенерации печени мало изучена. Имеются единичные сообщения, что

IL4 играет ключевую роль в инициации пролиферации гепатоцитов в регенерирующей печени [19], в то время как IL13 регулирует пролиферацию холангиоцитов и активность фибробластов в печени [20].

Позднее начало экспрессии гена *tnfa* возможно лежит в основе сниженного содержания TNF α в печени крыс после субтотальной резекции, что приводит к нарушению пролиферации гепатоцитов [21, 22]. При остром токсическом повреждении в печени наблюдается выраженная фаза альтерации воспалительной реакции, для течения которой необходимы провоспалительные цитокины IL1, TNF α [9, 10]. Отсутствие или позднее начало экспрессии генов *il1*, *tnfa* резидентными макрофагами в условиях острого токсического повреждения печени, вероятно, приводит к миграции в печень макрофагов костномозгового происхождения.

Результаты нашего исследования согласуются с гипотезой о существовании фенотипического континуума (спектра) макрофагов, крайними точками которого являются «идеальные» M1- и M2-макрофаги. Однако важно отметить, что даже в условиях *in vitro* при воздействии специфических индукторов невозможно получить гомогенную популяцию M1- или M2-макрофагов, поскольку клетки взаимодействуют с ксеногенными белками культуральной среды и полимерным материалом подложки [23, 24]. Мы можем говорить только о сдвиге основного пула макрофагов в направлении классической или

альтернативной активации. Наш эксперимент показал, что макрофаги костномозгового происхождения быстрее и интенсивнее реагируют на классическую активацию, изменяя фенотип в M1 направлении, в то время как клетки Купфера, имеющие эмбриональное происхождение, коммитированы в M2 направлении.

Заключение

При изучении фенотипа и профиля экспрессируемых генов мы обнаружили ряд особенностей клеток Купфера по сравнению с макрофагами костномозгового происхождения. Резидентные макрофаги печени и моноцитарные макрофаги имели сходный фенотип, за исключением экспрессии CD11b, которая отсутствовала у клеток Купфера. После активации

M1 и M2 индукторами у резидентных макрофагов печени повышалась экспрессия в основном противовоспалительных цитокинов, а у моноцитарных — провоспалительных цитокинов. Макрофаги костномозгового происхождения быстрее и интенсивнее реагировали на классическую активацию, а клетки Купфера — на альтернативную активацию.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского Научного Фонда (Соглашение № 17-15-01419).

ЛИТЕРАТУРА:

- Arutyunyan I., Elchaninov A., Fatkhudinov T. et al. Elimination of allogeneic multipotent stromal cells by host macrophages in different models of regeneration. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015; 8(5): 4469–80.
- Chazaud B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology* 2014; 219(3): 172–8.
- Epelman S., Lavine K.J., Randolph G.J. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 2014; 41(1): 21–35.
- Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014; 6: 1–13.
- Bilzer M., Roggel F., Gerbes A.L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver International*. 2006; 26: 1175–86.
- van Furth R. Monocyte origin of Kupffer cells. *Blood Cells* 1980; 6(1): 87–92.
- Nguyen-Lefebvre A.T., Horuzsko A. Kupffer Cell Metabolism and Function. *J. Enzymol. Metab.* 2015; 1(1): 101–27.
- Li P., He K., Li J. et al. The role of Kupffer cells in hepatic diseases. *Mol. Immunol.* 2017; 85: 222–9.
- Michalopoulos G.K. Advances in liver regeneration. *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014; 8(8): 897–907.
- You Q., Holt M., Yin H. et al. Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury. *Biochem. Pharmacol.* 2013; 86(6): 836–43.
- Zigmond E., Samia-Grinberg S., Pasmanik-Chor M. et al. Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident Kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. *J. Immunol.* 2014; 193(1): 344–53.
- Zeng W.Q., Zhang J.Q., Li Y. et al. A new method to isolate and culture rat Kupffer cells. *PLoS One* 2013; 8(8): 1–10.
- Zhang Q., Qu Y., Li Z. et al. Isolation and Culture of Single Cell Types from Rat Liver. *Cells Tissues Organs* 2016; 201(4): 253–67.
- Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(9): e45.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3(7): research0034.1-research0034.11.
- Nishiyama K., Nakashima H., Ikarashi M. et al. Mouse CD11b+Kupffer Cells Recruited from Bone Marrow Accelerate Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *PLoS One* 2015; 10(9): e0136774.
- Chen L., Flies D.B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13(4): 227–42.
- Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х., Усман Н.Ю. и соавт. Динамика количества M2-макрофагов при регенерации печени крыс. *Молекулярная медицина* 2017; 1: 45–50.
- Goh Y.P., Henderson N.C., Heredia J.E. et al. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. *PNAS USA* 2013; 110(24): 9914–9.
- Gieseck R.L. 3rd, Ramalingam T.R., Hart K.M. et al. Interleukin-13 Activates Distinct Cellular Pathways Leading to Ductular Reaction, Steatosis, and Fibrosis. *Immunity* 2016; 45(1): 145–58.
- Elchaninov A., Fatkhudinov T., Usman N. et al. Molecular Survey of Cell Source Usage during Subtotal Hepatectomy-Induced Liver Regeneration in Rats. *PLoS One* 2016; 11(9): e0162613.
- Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х., Арутюнян И.В. и др. Пролиферация и клеточная гибель гепатоцитов после субтотальной резекции печени крыс. *Клиническая и экспериментальная морфология* 2016; 3: 22–30.
- Jablonski K.A., Amici S.A., Webb L.M. et al. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One* 2015; 10(12): e0145342.
- Сарбаева Н.Н., Пономарева Ю.В., Милякова М.Н. Макрофаги. Разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами. *Гены и Клетки* 2016; 11(1): 9–17

Поступила: 30.01.2018

РАСТВОРИМЫЕ ФАКТОРЫ, ОБРАЗУЕМЫЕ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ ЭНДОМЕТРИЯ, ПОДАВЛЯЮТ ЕГО «ФИБРОЗИРОВАНИЕ» IN VITRO

Р.Ю. Еремичев, О.А. Григорьева, К.Ю. Кулебякин, А.Ю. Ефименко, П.И. Макаревич

Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

SOLUBLE FACTORS FORMED DURING THE HEALING OF THE ENDOMETRIUM SUPPRESS ITS "FIBROSIS" IN VITRO

R.Y. Eremichev, O.A. Grigorieva, K.Y. Kulebyakin, A.Yu. Efimenko, P.I. Makarevich

Institute of Regenerative Medicine, Medical Research Centre of M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

e-mail: pavel.makarevich@gmail.com

Во время каждой менструации слизистая оболочка матки женщин репродуктивного возраста заживает без фиброзирования. Ранее мы показали, что выделяющиеся при этом растворимые факторы оказывают противofiброзное действие на культуру мезенхимных стромальных клеток эндометрия человека. Задачей данной работы являлась оценка противofiброзных свойств этих факторов на модели фиброза эндометрия in vitro.

От здорового донора в один день были получены сыворотки менструальной и периферической крови. Из менструальной крови также были выделены мезенхимные стромальные клетки эндометрия. Моделирование фиброза эндометрия in vitro проводилось путем трансдифференцировки мезенхимальных стромальных клеток эндометрия в миофибробласты под действием TGF- β 1 (5 нг/мл). Оценку эффективности противofiброзного действия сыворотки менструальной крови на мезенхимальные стромальные клетки эндометрия и полученные из них миофибробласты осуществляли путем подсчета нормированной на количество ядер общей площади флуоресцентного сигнала, отраженного на изображениях культуры мезенхимных стромальных клеток эндометрия, полученных при детекции α -гладкомышечного актина методом иммуноцитофлуоресценции. В качестве контроля использовали сыворотку периферической крови с равной концентрацией белка.

Мы показали, что сыворотка менструальной крови уменьшает количество стресс-фибрилл, позитивных на α -гладкомышечный актин (маркер миофибробластов), как в культуре мезенхимальных стромальных клеток эндометрия, так и при in vitro моделировании фиброза эндометрия с применением TGF- β 1.

Полученные нами результаты свидетельствуют о содержании в сыворотке менструальной крови растворимых факторов, обладающих противofiброзными свойствами. Возможно, их идентификация позволит объяснить механизмы заживления эндометрия, не сопровождаемого фиброзированием, а также выявить причины фиброза слизистой оболочки матки при гинекологических заболеваниях и разработать эффективные методы их лечения.

Ключевые слова: эндометрий, фиброзирование, менструальная кровь, мезенхимные стромальные клетки эндометрия.

Введение

Эндометрий здоровых женщин репродуктивного возраста регулярно повреждается во время менструации и заживает путем полной регенерации без фиброзирования [1]. Быстрое восстановление нормальной структуры ткани делает возможной эффективную подготовку слизистой оболочки матки к беременности в последующих фазах менструального цикла.

Однако при некоторых гинекологических заболеваниях, таких как синдром Ашермана, аденомиоз и др. [2–4], которые, как правило, протекают хронически и плохо поддаются лечению, развивается фиброз эндометрия. В подобных случаях при заживлении слизистой оболочки матки происходит трансдифференцировка¹ ча-

During each period, the uterine mucosa of women of reproductive age heals without fibrosis. Previously, we established that the soluble factors that are released in this way have an antifibrotic effect on the culture of the human endometrial mesenchymal stromal cells. The objective of this work was to evaluate the antifibrotic properties of these factors on the in vitro endometrial fibrosis model.

Serum menstrual and peripheral blood were obtained from a healthy donor in one day. Mesenchymal stromal cells of the endometrium were also isolated from menstrual blood. Simulation of endometrial fibrosis in vitro was carried out by differentiation of endometrial mesenchymal stromal cells into myofibroblasts under the action of TGF- β 1 (5 ng/ml). Evaluation of the effectiveness of the menstrual blood serum antifibrotic effect on the endometrial mesenchymal stromal cells and myofibroblasts derived from them was carried out by analyzing the expression of α -smooth muscle actin by immunofluorescence. Serum of peripheral blood with equal protein concentration was used as a control.

Menstrual blood serum reduces the number of stress-fibrils positive for α -smooth muscle actin (a marker of myofibroblasts), both in the culture of endometrial mesenchymal stromal cells, and in in vitro modeling of endometrial fibrosis using TGF- β 1.

These results indicate the presence of soluble factors in the serum of menstrual blood with antifibrotic properties. Perhaps their identification will explain the mechanisms of endometrial healing not accompanied by fibrosis. In addition, it can help to identify the causes of fibrosis of the uterine lining in gynecological diseases and develop effective methods for their treatment.

Keywords: endometrium, fibrosis, menstrual blood, endometrial mesenchymal stromal cells.

сти мезенхимальных стромальных клеток эндометрия (ЭМСК) в миофибробласты. Данные клетки приобретают способность к контракции, начиная экспрессировать α -гладкомышечный актин (α -SMA), а также продуцируют большое количество белков межклеточного матрикса (коллаген I, ED-A фибронектин и др.), ремоделируя ткани и приводя к их фиброзированию [5–7]. Это общее для большинства органов человеческого организма и ключевой эффекторное звено в механизмах фиброзирования тканей [8–11].

У здоровых женщин во время заживления эндометрия не происходит трансдифференцировки ЭМСК в миофибробласты, что может быть связано со специфическим микроокружением, которое возникает в ходе данного процесса. Помимо компонентов межклеточного матрикса и клеточных элементов оно содержит растворимые факторы. Вероятно, это микроокружение способно не только стимулировать заживление, но и подавлять фиброзирование эндометрия.

¹ примечание от редактора: использован термин в интерпретации авторов; с позиции классической гистологической школы, в данном случае более корректен термин «дифференцировка»

Ранее мы показали, что культивирование эМСК в присутствии сыворотки менструальной крови (СМК) здоровых женщин приводит к значительному снижению содержания α -гладкомышечного актина (α -SMA, маркера миофибробластов) по сравнению с культивированием в присутствии сыворотки периферической крови (СПК) тех же доноров [12].

Более специфичным с позиции механизма развития фиброза является изучение индуцированного процесса в модели *in vitro*. TGF- β 1 — один из основных растворимых факторов, запускающих трансдифференцировку эМСК в миофибробласты как *in vivo*, так и *in vitro*, что позволяет использовать его в качестве профиброгенного стимула в различных моделях фиброза [13, 14]. Задачей данной работы стала проверка влияния СМК здоровых женщин на миофибробласты, полученные из эМСК путем индуцированной TGF- β 1 трансдифференцировки, с целью оценки противофиброзного потенциала содержащихся в ней растворимых факторов.

Материал и методы

Выделение эМСК и образцов сывороток

В один день от одного здорового донора после получения информированного согласия были собраны образцы менструальной и периферической (из кубитальной вены) крови. Образцы хранили при +4 °C в течение 12 ч. и затем центрифугировали при 300 g в течение 20 мин. Супернатанты (СМК и СПК) собирали, пропускали через фильтр 0,22 мкм и хранили при -20 °C до дальнейшего использования. Осадок клеток менструальной крови ресуспендировали в 5-ти объемах раствора Хенкса, содержащего 2% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, Life Technologies Corporation, США) и 1% 0,5 М ЭДТА. После фильтрации через 100 мкм фильтр взвесь аккуратно наслаивали на 15 мл 15% раствора йодиксанола (Life Technologies Corporation, США) и центрифугировали при 500 g в течение 40 мин. Слой клеток, оставшийся на поверхности раствора йодиксанола собирали, ресуспендировали в 10 мл раствора Хенкса и центрифугировали при 100 g в течение 10 мин. Полученный осадок клеток ресуспендировали в ростовой среде DMEM/F12 (Life Technologies Corporation, США), содержащей 10% ФБС и 1% пенициллина и стрептомицина, затем переносили на адгезивные чашки Петри на 24 ч. Прикрепившиеся клетки культивировали в той же ростовой среде. Смену среды проводили каждые 3–4 сут.

Оценка противофиброзной активности СМК на культуре эМСК

СМК и СПК размораживали, разводили средой DMEM/F12, выравнивая по концентрации белка, и культивировали эМСК 4 пассажа в подготовленных растворах в течение 2 сут., после чего проводили иммуноцитофлуоресцентный анализ α -SMA.

Моделирование фиброза эндометрия *in vitro*

эМСК 4 пассажа высаживали в лунки 48-луночного планшета в ростовой среде DMEM/F12 без ФБС. Через 1 сут. среду заменяли на аналогичную среду, содержащую 5 нг/мл TGF- β 1 (R&D Systems, США), культивировали в течение 4 сут. и затем проводили иммуноцитофлуоресцентный анализ α -SMA в эМСК.

Оценка противофиброзной активности СМК на модели фиброза эндометрия *in vitro*

СМК и СПК размораживали и разводили средой DMEM/F12, выравнивая по концентрации белка. Миофибробласты, полученные при моделировании

фиброза эндометрия, культивировали в подготовленных растворах в течение 2 сут., после чего проводили иммуноцитофлуоресцентный анализ α -SMA.

Иммуноцитофлуоресцентный анализ

По завершении эксперимента клетки фиксировали 4% формалином в течение 10 мин., 3 раза отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) инкубировали с 10% козьей сывороткой и снова отмывали ФСБ 3 раза. Для выявления целевого белка клетки инкубировали в течение ночи при температуре +4 °C с моноклональными мышинными антителами против α -SMA человека (DAKO, США), отмывали ФСБ 3 раза и инкубировали с вторыми антителами, реактивными к IgG мыши и конъюгированными с AlexaFluor594 (Invitrogen, США). Ядра клеток метили флуоресцентным красителем DAPI (DAKO, США). Изображения получали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM6000B, снабженного камерой Leica DFC 360FX (Leica Microsystems GmbH, Германия). Подсчет ядер и площади флуоресцентного сигнала на полученных изображениях проводили в программе Fiji.

Статистический анализ

Эксперимент был выполнен в дубликатах. При иммуноцитофлуоресцентном анализе использовали объектив с минимальным увеличением для захвата наибольшей площади поверхности препаратов и получали не менее 2 изображений с каждого из них. Общую площадь α -SMA-позитивных стресс-фибрилл нормировали на количество ядер и по полученному показателю сравнивали группы изображений, применяя критерий Манна-Уитни.

Результаты

Исследование противофиброзного действия СМК на культуру эМСК

СМК, выделенные из различных источников, при культивировании в содержащих ФБС средах медленно трансдифференцируются в миофибробласты, в результате чего клеточная популяция становится гетерогенной по содержанию α -SMA, локализованного в стресс-фибриллах [15]. Наличие и степень выраженности данного феномена может зависеть от множества факторов: источника клеток, характеристик сыворотки, протокола культивирования клеток и др. В наших экспериментах при культивировании эМСК в среде DMEM/F12 с 10% ФБС значительная часть клеток на 4 пассаже содержала стресс-фибриллы, положительные на α -SMA (рис. 1а), что свидетельствовало об их трансдифференцировке в миофибробласты. Важно отметить, что культивирование эМСК 4 пассажа в присутствии СПК не влияло на количество α -SMA-позитивных стресс-фибрилл в клетках (рис. 1в), в то время как культивирование в присутствии СМК — уменьшало их количество (рис. 1б). На основании приведенных, а также полученных нами ранее данных [12], можно предположить противофиброзное действие СМК на культуру эМСК.

Оценка влияния СМК на фиброз эндометрия, смоделированный *in vitro*

После 4 сут. культивирования с TGF- β 1 (5 нг/мл) большинство эМСК в культуре приобретали характерную для миофибробластов морфологию с четко выраженными α -SMA-позитивными стресс-фибриллами (рис. 2), что коррелирует с результатами других авторов, использовавших данную методику [7]. Последующее культивирование полученных миофибробластов, в присутствии СПК не приводило к выраженным изменениям, в то время как СМК значимо ($p=0,03$) уменьшала общую площадь α -SMA-позитивных стресс-фибрилл (рис. 3). Полученные

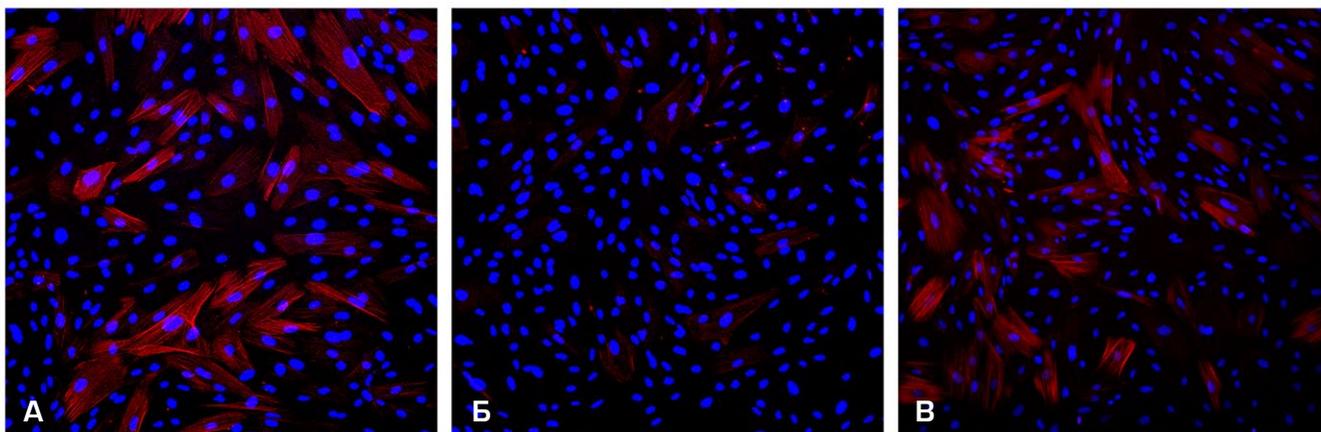


Рис. 1. Культура мезенхимальных стромальных клеток эндометрия (эМСК): А — эМСК при культивировании с фетальной бычьей сывороткой; Б — эМСК при культивировании с сывороткой менструальной крови (2 сут.); В — эМСК при культивировании с сывороткой периферической крови (2 сут.). Иммуноцитохимическая реакция с антителами к α -гладкомышечному актину (красный цвет). Окраска ядер — дапи. Масштабный отрезок — 100 мкм

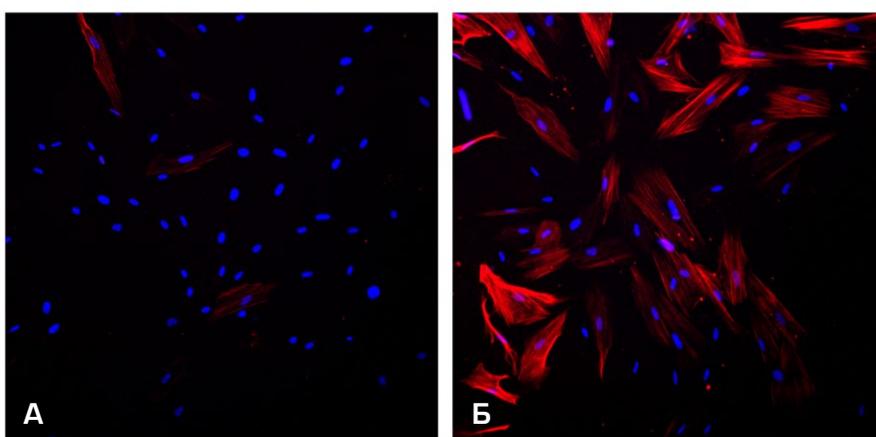


Рис. 2. Миофибробласты в культуре мезенхимальных стромальных клеток эндометрия (эМСК) после моделирования «фиброза» эндометрия *in vitro*: А — эМСК при культивировании в DMEM/F12; Б — миофибробласты, полученные из эМСК при культивировании в DMEM/F12 с TGF- β 1. Иммуноцитохимическая реакция с антителами к α -гладкомышечному актину (красный цвет). Окраска ядер — дапи. Масштабный отрезок — 100 мкм

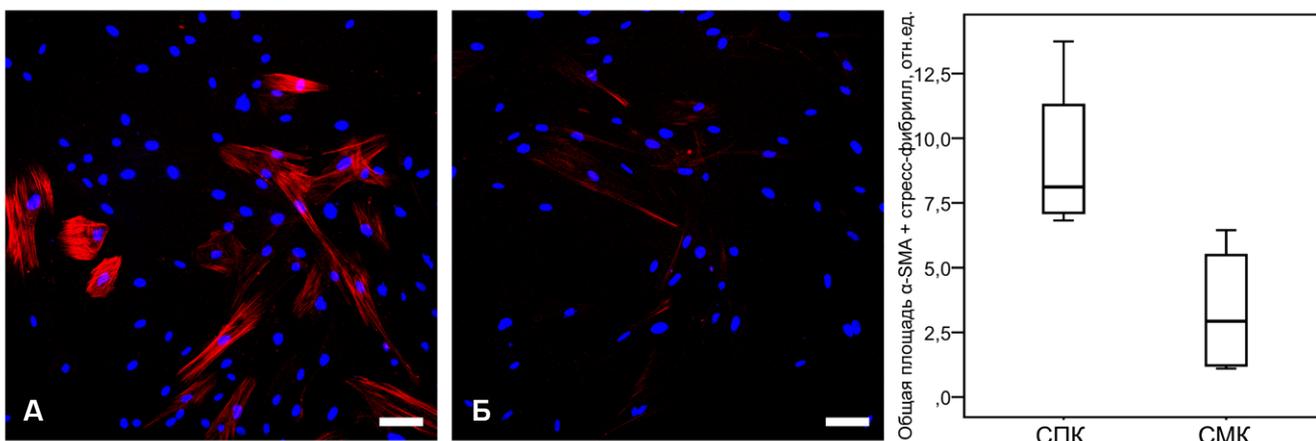


Рис. 3. Культура мезенхимальных стромальных клеток эндометрия (эМСК) после воздействия сыворотки менструальной крови: А — миофибробласты после 2 сут. культивирования с сывороткой периферической крови (СПК); Б — миофибробласты через 2 сут. культивирования с сывороткой менструальной крови; в — диаграмма размаха, отражающая различия в общей площади α -SMA-позитивных (α -SMA⁺) стресс-фибрилл (медиана, верхний и нижний квартили, минимум и максимум). Иммуноцитохимическая реакция с антителами к α -гладкомышечному актину (красный цвет). Окраска ядер — дапи. Масштабный отрезок — 100 мкм

результаты свидетельствуют о наличии в составе СМК растворимых факторов, обладающих противомышечным действием *in vitro*.

Обсуждение

Повреждение слизистой оболочки матки (эндометрия) регулярно происходит при менструации, а также при ряде хирургических вмешательств, рутинно

выполняемых у женщин репродуктивного возраста в акушерско-гинекологической практике [1]. Несмотря на то, что происходящая при этом гибель клеток сопровождается выбросом целого спектра биологически активных компонентов, которые создают мощный про-фиброгенный стимул [16], заживление эндометрия не сопровождается фиброзированием. Мы предполагаем, что это может быть обусловлено продукцией

противофиброзных факторов в тканях слизистой оболочки матки во время заживления.

В нашей предыдущей работе мы использовали СМК в качестве модельного объекта, содержащего растворимые факторы, регулирующие заживление эндометрия, и показали, что СМК поддерживает пролиферацию эМСК, а также снижает содержание в культуре этих клеток α -SMA.

В настоящей работе при помощи иммуноцитофлуоресцентного анализа мы обнаружили, что под влиянием СМК количество α -SMA-позитивных стресс-фибрилл в эМСК снижается по сравнению с воздействием СПК или ФБС (рис. 1). Вместе с полученными ранее результатами Вестерн-блот-анализа [12] это свидетельствовало о способности содержащихся в составе СМК растворимых компонентов оказывать противофиброзное действие на культуру эМСК.

Следующим этапом стала оценка противофиброзного действия СМК на *in vitro* модели фиброза эндометрия. Наши эксперименты показали, что после смены профиброгенного микроокружения, смоделированного при помощи TGF- β 1, на СМК происходило уменьшение количества α -SMA-позитивных стресс-фибрилл (рис. 3). Вероятнее всего, добавление СМК позволяет до определенной степени повернуть вспять процесс трансдифференцировки эМСК в миофибробласты. Обратимый характер сборки α -SMA-позитивных стресс-фибрилл в МСК под действием профиброгенных и противофиброзных стимулов описан в литературе [17, 18].

ЛИТЕРАТУРА

1. R., Hart R., Karthigasu K.A. et al. A re-appraisal of the morphological changes within the endometrium during menstruation: A hysteroscopic, histological and scanning electron microscopic study. *Hum Reprod.* 2009; 24(6): 1393–401.
2. Zhou Q., Wu X., Dai X. et al. The different dosages of estrogen affect endometrial fibrosis and receptivity, but not sdf-1/cxcr4 axis in the treatment of intrauterine adhesions. *Gynecol Endocrinol.* 2018; 34(1): 49–55.
3. Zhu H.Y., Ge T.X., Pan Y.B. et al. Advanced role of hippo signaling in endometrial fibrosis: Implications for intrauterine adhesion. *Chin Med J (Engl).* 2017; 130(22): 2732–7.
4. Shen M., Liu X., Zhang H. et al. Transforming growth factor beta1 signaling coincides with epithelial-mesenchymal transition and fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation in the development of adenomyosis in mice. *Hum Reprod.* 2016; 31(2): 355–69.
5. Ibrahim M.G., Sillem M., Plendl J. et al. Myofibroblasts are evidence of chronic tissue microtrauma at the endometrial-myometrial junctional zone in uteri with adenomyosis. *Reprod Sci.* 2017; 24(10): 1410–1418.
6. Li J., Du S., Sheng X. et al. MicroRNA-29b inhibits endometrial fibrosis by regulating the sp1-tgf-beta1/smad-ctgf axis in a rat model. *Reprod Sci.* 2016; 23(3): 386–94.
7. Li J., Cen B., Chen S. et al. MicroRNA-29b inhibits tgfbeta1-induced fibrosis via regulation of the tgfbeta1/smad pathway in primary human endometrial stromal cells. *Mol Med Rep.* 2016; 13(5): 4229–37.
8. Falke L.L., Gholizadeh S., Goldschmeding R. et al. Diverse origins of the myofibroblast-implications for kidney fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2015; 11(4): 233–44.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о продукции в слизистой оболочке матки растворимых факторов, способных подавлять фиброзирование при её заживлении. Для объяснения этого феномена необходимо идентифицировать содержащиеся в СМК регуляторные молекулы, обладающие противофиброзным действием. В дальнейшем это позволит установить не только механизмы заживления эндометрия, но и причины его фиброирования при неинфекционных гинекологических заболеваниях, что может стать основой для разработки новых методов предотвращения их неблагоприятных исходов.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Финансирование исследования

Работа выполнена с использованием биоматериала человека, собранного и сохраняемого в рамках научной программы Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем (соглашение РНФ № 14-50-00029). Работы по созданию модели фиброза поддержаны грантом РФФИ (грант № 18-015-00525), эксперименты по оценке противофиброзного действия сыворотки менструальной крови выполнены в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова.

9. Pellicoro A., Ramachandran P., Iredale J.P. et al. Liver fibrosis and repair: Immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14(3): 181–94.
10. Kong P., Christia P., Frangogiannis N.G. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71(4): 549–74.
11. Wynn T.A., Ramalingam T.R. Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012; 18(7): 1028–40.
12. Еремичев Р.Ю., М.О.А., Александрюшкина Н.А., Кулебякин К.Ю., Дыйканов Д.Т., Макаревич П.И. Сыворотка менструальной крови оказывает противофиброзное действие на мезенхимные стромальные клетки эндометрия человека. *Цитология* 2018; 60(2): 96–103.
13. Ferguson M.W., O’Kane S. Scar-free healing: From embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004; 359(1445): 839–50.
14. Chen C.Z., Peng Y.X., Wang Z.B. et al. The scar-in-a-jar: Studying potential antifibrotic compounds from the epigenetic to extracellular level in a single well. *Br J Pharmacol.* 2009; 158(5): 1196–209.
15. Talele N.P., Fradette J., Davies J.E. et al. Expression of alpha-smooth muscle actin determines the fate of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Reports.* 2015; 4(6): 1016–30.
16. Anders H.J., Schaefer L. Beyond tissue injury-damage-associated molecular patterns, toll-like receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25(7): 1387–400.
17. Desai V.D., Hsia H.C., Schwarzbauer J.E. Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 2014; 9(1): e86865.
18. Yang X., Chen B., Liu T. et al. Reversal of myofibroblast differentiation: A review. *Eur J Pharmacol.* 2014; 734: 83–90.

Поступила 02.02.2018

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ МОРФОГЕНЕЗА ТКАНЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС НАКАНУНЕ И В ПЕРИОД РОДОВ

Ю.В. Григорьева¹, Г.Н. Суворова¹, С.Н. Юхимец², О.Н. Павлова³,
А.А. Девяткин⁴, О.Н. Тулаева¹, О.В. Кулакова¹

¹ Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

² Университет Св. Иосифа Танзании, Дар Эс Салаам, Танзания

³ Медицинский университет «Реавиз», Самара, Россия

⁴ Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, Казань, Россия

TISSUE MORPHOGENESIS FEATURES OF THE LABORATORY RATS CERVIX A DAY BEFORE AND IN LABOR

Y.V. Grigoryeva¹, G.N. Suvorova¹, S.N. Iukhimets², O.N. Pavlova³, A.A. Devyatkin⁴, O.N. Tulayeva¹,
O.V. Kulakova¹

¹ Samara State Medical University, Samara, Russia

² St. Joseph University in Tanzania, Dar es Salaam, Tanzania

³ Medical University "Reaviz", Samara, Russia

⁴ N.E. Bauman Kazan State Academy of Veterinary Medicine, Kazan, Russia

e-mail: histology@bk.ru

В шейке матки крыс накануне родов и в процессе родов наблюдается ряд морфологических изменений, позволяющих обеспечить своевременное раскрытие цервикального канала для беспрепятственного изгнания плода. Знание процессов морфогенеза шейки матки во время родов, благодаря которым реализуются все механизмы функционирования данного органа, важно для разработки максимально эффективных методов управления родовым процессом. Цель исследования: изучение структурных преобразований, происходящих в шейке матки накануне родов и в период родов, на примере биологической модели — белой беспородной крысы. В работе были использованы общегистологические методы (окраска гематоксилином и эозином по Массону), иммуногистохимия с набором антител к коллагену III типа, а также электронная трансмиссионная микроскопия. В результате исследования было установлено, что коллаген III типа, будучи одним из составных структурных компонентов в шейке матки крыс, определяет ее механические особенности и играет ведущую роль в процессах морфогенеза, и, вероятно, способствует сохранению структуры цервикса при раскрытии маточного зева в родах, т.е. препятствует возникновению разрывов. Секретция компонентов внеклеточного матрикса, в том числе и коллагена, осуществляется лейомиоцитами цервикса путем класмацитоза.

Ключевые слова: цервикс, гладкие миоциты (лейомиоциты), класмацитоз, коллаген, III тип коллагена, «созревание» шейки матки.

Среди разрабатываемых в современной морфологии многочисленных направлений фундаментального и прикладного характера значительное место отводится изучению адаптации и реактивности тканей, наблюдаемых в органах при беременности, во время родов и в ходе послеродовой инволюции [1–3].

Наиболее ярко процессы физиологической адаптации проявляются в матке при беременности и родах. Известно, что механизмы адаптационно-приспособительного характера в миометрии при беременности реализуются посредством гипертрофии и гиперплазии миоцитов [1–3]. Однако в шейке матки накануне родов и в родах наблюдается ряд морфологических преобразований, позволяющих ей обеспечить раскрытие цервикального канала для беспрепятственного изгнания плода из полости матки. Эти изменения в практическом акушерстве принято называть

The series of the morphological changes allowing providing timely disclosure of the cervical channel for a free foetus expulsion from the uterus cavity are observed in cervix a day before and during labour. The processes of morphogenesis in the cervix during delivery, with all realised functioning mechanisms in this organ, is essential for the development of the most effective methods of patrimonial process management. Therefore, the purpose of our research was studying of structural transformations in cervix a day before and in labour. We used the laboratory rat as a biological model. We applied several histological methods: light microscopy (stained with hematoxylin and eosin, by Masson), immunohistochemistry with a set of antibodies to type III collagen, and an electron transmission microscopy. We established that the basic supporting protein in the cervix is collagen III type; this type defines its mechanical features and leads key role in morphogenesis processes. The particular role in the cervix during parturition assigned to the type III collagen, which probably promotes to preserve cervix structures during parturition and prevents the emergence of disrptures. Intercellular substance components secretion, including collagen, is carried out by clasmacytosis in cervix leyomyocytes.

Keywords: cervix, smooth myocytes (leyomyocytes), clasmacytosis, collagen, III type of collagen, "maturing" cervix.

«созреванием» шейки матки, где степень ее зрелости отражает готовность организма к родам [4, 5]. Отсутствие на момент начала родовой деятельности ряда морфологических признаков «зрелости» шейки матки (размягчения, укорачивания и сглаживания губ, раскрытия маточного зева) достоверно напрямую коррелируют с частотой развития аномалий родовой деятельности [2, 4–6].

Однако накопленные к настоящему времени сведения не позволяют однозначно ответить на многие вопросы, касающиеся не только динамики раскрытия шейки матки и течения родов, но и особенностей адаптационного морфогенеза специализированных структур шейки матки. В этой связи, считаем актуальным проведение морфологического исследования шейки матки накануне родов и в ходе родов, белой беспородной крысы.

Материал и методы

Дизайн исследования

Модельным объектом исследования являлись белые беспородные лабораторные крысы в возрасте 6–7 мес., весом 190–210 г., ранее нерожавшие ($n=12$). Крыс с датированным сроком беременности получали по стандартной методике, описанной ранее Э. Зуссманом (1977) [7]. Первым днем беременности животных считали день обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках. Материал для исследования (шейка матки крыс), получали после вскрытия беременных самок накануне родов (20 и 21 сут. беременности) и в период родов (после рождения 1–2 крысят). Контролем служила шейка матки белых беспородных крыс в возрасте 6–7 мес., ранее нерожавших. Крыс умерщвляли смертельной дозой эфирного наркоза. Экспериментальных животных делили на 4 группы ($n=3$ в каждой группе) в зависимости от срока беременности: контроль (группа А), 20 сут. беременности (группа В), 21 сут. беременности (группа С) и период родов (группа D).

Исследование выполнено в соответствии с правилами лабораторной практики в Российской Федерации: приказ Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.; приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.; закон «О защите животных от жестокого обращения» гл. V, ст. 104679-ГД от 01.12.1999 г. На проведение исследования получено разрешение комитета по биоэтике при СамГМУ (протокол № 176 от 03.08.2016 г.).

Гистохимический анализ

Материал фиксировали в забуференном формалине, проводку осуществляли в гистологическом процессоре замкнутого типа с вакуумом Leica ASP 300 (Германия). Материал заливали в парафин "Histomix" фирмы BioOptica (Россия). Фронтальные, сагиттальные и поперечные срезы толщиной 4 мкм готовили на роторном микротоме. Готовые срезы помещали на предметные стекла только со специальным фабричным адгезивным покрытием (poly-L-lyzin), ООО ТД JLS Chemical (Россия) и окрашивали гематоксилином и эозином по Массону. Срезы просматривали под световым микроскопом Leica (Германия).

Иммуногистохимический анализ

Коллаген III типа на гистологических препаратах выявляли методом иммуногистохимии с помощью мышиных антител Anti-Collagen III, Clone HWD1.1, AM167-5M (BioGenex, США). Для иммуногистохимической реакции обязательно проводили тепловую демаскировку антигенных детерминант на водяной бане в течение 40 мин. с использованием раствора Dako TRS (Target Retrieval Solution, 10x концентрат, лот 10119736, Дания). При постановке пероксидазного блока применяли раствор Peroxidase-Blocking Solution, Dako REALTM (Дания). Иммуногистохимическую реакцию выполняли с одношаговой системой визуализации BioGenex (QD 630-XAK) Super Sensitive one-step Polymer — HRP Kit/DAB (США). Результаты оценивали после постановки положительно и отрицательного контролей.

Метод щелочной диссоциации тканей

Для получения изолированных клеток-лейомиоцитов (миоцитов) использовали метод щелочной диссоциации тканей по В.Я. Бродскому (1983) [8]. Кусочки шейки матки фиксировали в холодном 10% нейтральном формалине на фосфатном буфере (pH=7,0), промывали проточной водой, измельчали и переносили в 50% раствор КОН на 12 ч. Далее материал

помещали в холодную дистиллированную воду и выдерживали 1 сут. при температуре +4 °С. После 2 ч. экспозиции при комнатной температуре, воду меняли на свежую, с помощью магнитной мешалки получали взвесь изолированных клеток, готовили мазки и окрашивали их гематоксилином и эозином.

Гистоморфометрия

Структуру внеклеточного матрикса соединительной ткани на гистологических срезах шейки матки анализировали морфометрическим методом с помощью наложения открытой точечной тестовой системы по рекомендациям А.А. Глаголева (1941) [9].

Измерение линейных размеров лейомиоцитов проводили в двух взаимно перпендикулярных направлениях на изолированных клетках и вычисляли объем гладких миоцитов, используя метод, предложенный Я.Е. Хесиным (1967) [10].

Трансмиссионная электронная микроскопия

Материал фиксировали в глutarовом альдегиде (BASF, Германия), заливали в эпон-аралдитовую смесь и контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца (EMS, США). Для определения прицельного участка исследования сначала готовили полутонкие срезы толщиной 1–2 мкм, а затем ультратонкие срезы толщиной 200–500 нм. Срезы просматривали на электронном микроскопе JEOL JEM-1400 PLUS (Япония).

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили в программе IBM SPSS Statistics v24, осуществляли проверку данных на соответствие закону нормального распределения. Для описания выборочной совокупности данных использовали медиану и 5, 25, 75, 95 процентиля. Для определения статистической значимости различий между значениями показателей в группах данных применяли U-критерий Манна-Уитни при уровне статистической значимости $p < 0,05$. Для преодоления ошибки множественных значений применяли поправку Бонферрони.

Результаты и обсуждение

Согласно классическому представлению о строении средней оболочки шейки матки плацентарных животных, она состоит из гладкой мышечной ткани, которая обладает определенной специфичностью, высокой пластичностью и характеризуется гормональной зависимостью. Помимо гладкой мышечной ткани, в средней оболочке шейки матки имеется волокнистая соединительная ткань, окружающая лейомиоциты (миоциты).

В нашем исследовании показано, что накануне родов и в момент родов в строении всех тканей средней оболочки цервикса происходят изменения.

Лейомиоциты шейки матки при беременности подвергаются гипертрофии: объем клеток увеличивается с 1862,87 мкм³ в контрольной группе до 7870,34 мкм³ к 21 сут. беременности. На электронной микроскопии видно, что гипертрофия клеток происходит за счет увеличения в них сократительных миофиламентов, которые к 20 сут. беременности занимают практически весь объем цитоплазмы клетки (рис. 1). В литературе имеются данные о том, что при самопроизвольных родах, по сравнению со стимулированными родами, между гипертрофированными миоцитами увеличивается количество контактов [11]. Увеличение числа контактов отражает тоническое напряжение миометрии и его готовность к интенсивной сократительной деятельности [12]. Однако эти изменения характерны в большей

степени не для шейки матки, а для других ее отделов, в которых процесса «созревания» не наблюдается [11, 12].

В шейке матки, накануне родов и в родах, несмотря на наличие гипертрофии лейомиоцитов, наблюдается разъединение межклеточных контактов (рис 2). Это сопровождается изменениями в строении периферической части цитоплазмы клеток, где сократительные миофиламенты разрушаются, а на их месте развиваются цистерны гранулярной ЭПС и накапливаются рибосомы (рис. 3). Кроме этого, в ядрах преобладает эухроматин и появляются ядрышки, что говорит о повышении функциональной активности клеток. Чем ближе к родам, тем больше становится извилистость мембраны лейомиоцитов, появляются различной величины выпячивания плазмолеммы.

В базовой литературе такой процесс получил название клазмацитоз, который расценивается как патология проницаемости клеточной мембраны — «минус-мембрана». Однако, он свойственен и нормальным клеткам: классический пример — образование тромбоцитов, описанное J.G. Wright (1906) [13].

Установлено, что клазмацитоз встречается в миоцитах матки в ходе послеродовой инволюции, но здесь он рассматривается как один из вероятных механизмов элиминации структур миометрия, обеспечивающих уменьшение его массы без ущерба для численности гладких миоцитов и угрозы развития воспаления [3].

В ряде научных работ авторы ассоциируют с клазмацитозом транспорт веществ, считая его одним из путей секреции коллагена у активно синтезирующих фибробластов [14, 15]. Данный путь секреции реализуется в условиях экстренного синтеза, где из цистерн гранулярной ЭПС синтезированный материал, минуя пластинчатый комплекс, через транспортные вакуоли, поступает в межклеточную среду. Таким образом, клазмацитоз предлагается рассматривать с точки зрения физиологического процесса, происходящего в железах с апокринным типом секреции.

Мы полагаем, что формирование множественных цитоплазматических выпячиваний у миоцитов (как темных, так и светлых) во время родов, есть не что иное, как один из механизмов секреции компонентов внеклеточного матрикса. Несмотря на то, что размеры выпячиваний значительно варьируют, содержимое преимущественно представлено гранулированным материалом и участками расширенных цистерн грЭПС (рис. 3).

Также во время беременности происходят изменения со стороны соединительной ткани. Объем внеклеточного матрикса становится больше, о чем свидетельствует увеличение расстояния между миоцитами, что на световом уровне дает картину развития интерстициального отека.

В связи с тем, что при электронной микроскопии было выявлено большое количество коллагеновых фибрилл с выраженной поперечной исчерченностью, мы провели иммуногистохимическое типирование гистологических срезов с применением моноклональных антител к коллагену III типа, и показали, что количество коллагена III типа значительно увеличивается на момент родов (рис. 4, 5). Статистический анализ данных, полученных в результате морфометрических исследований объемной доли структур внеклеточного матрикса с положительной окраской DAB к коллагену III типа (рис. 6), дает нам основание говорить о положительной корреляции между синтезом коллагена III типа и сроком беременности. Стоит отметить, что во всех экспериментальных группах результаты достоверно отличаются друг от друга (табл.). Таким образом, коллаген III типа, по-видимому, играет важную роль в морфогенезе «созревания» шейки матки в родах.

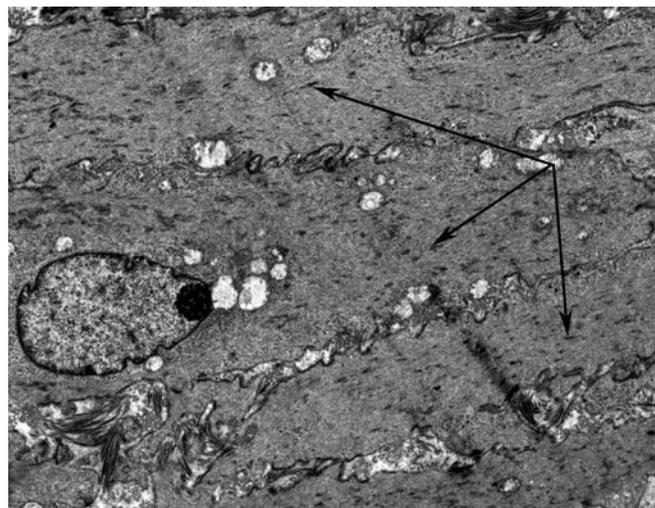


Рис. 1. Гладкие миоциты шейки матки крысы на 20 сут. беременности. Сократительные миофиламенты (указаны стрелками) занимают весь объем цитоплазмы. ТЭМ. Ув. $\times 4000$

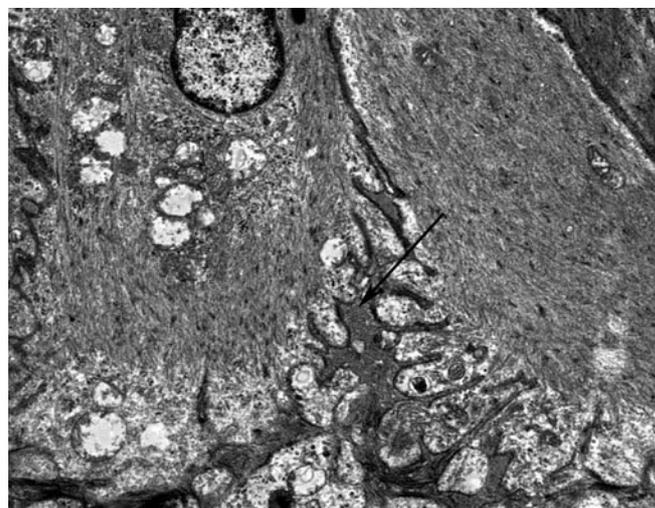


Рис. 2. Гладкие миоциты шейки матки крысы на 21 сут. беременности. Разрушение межклеточных контактов из-за появления клазмацитоза (указано стрелкой). Центральная часть цитоплазмы клеток заполнена миофиламентами. ТЭМ. Ув. $\times 5000$

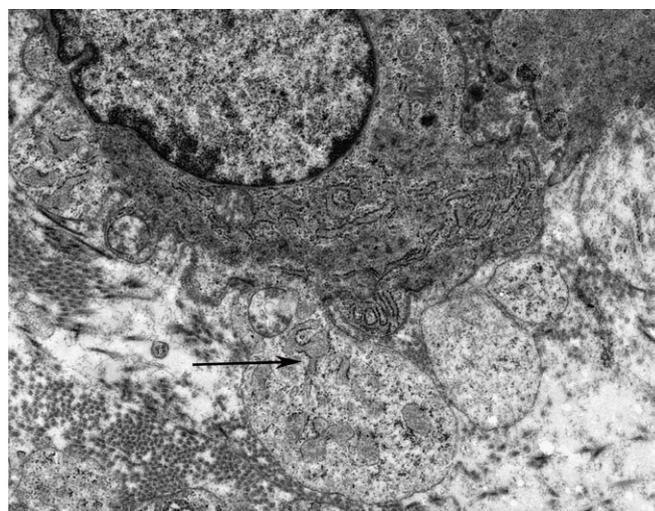


Рис. 3. Гладкий миоцит шейки матки крысы в родах. В просвете цитоплазматических выпячиваний определяются цистерны грЭПС (указано стрелкой). ТЭМ. Ув. $\times 20000$

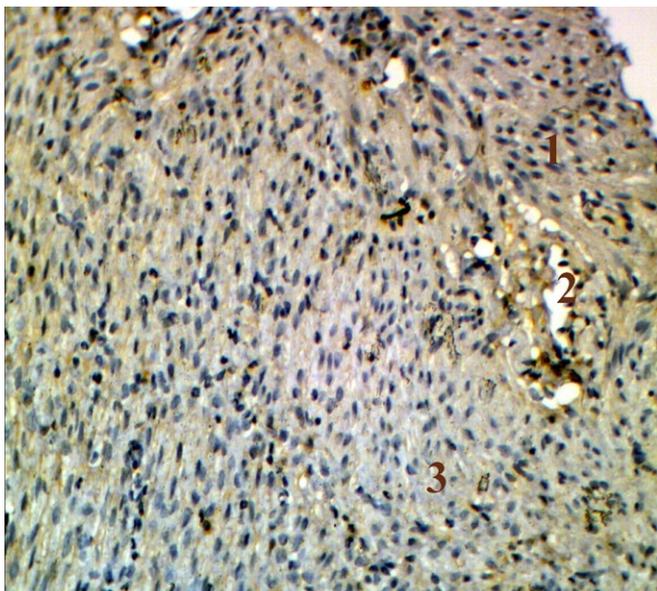


Рис. 4. Участок шейки матки половозрелой крысы контрольной группы. 3 слоя миометрия: 1 — надсосудистый, 2 — сосудистый, 3 — подслизистый. Иммуногистохимическая реакция с антителами к коллагену III типа. Световая микроскопия. Ув. $\times 100$

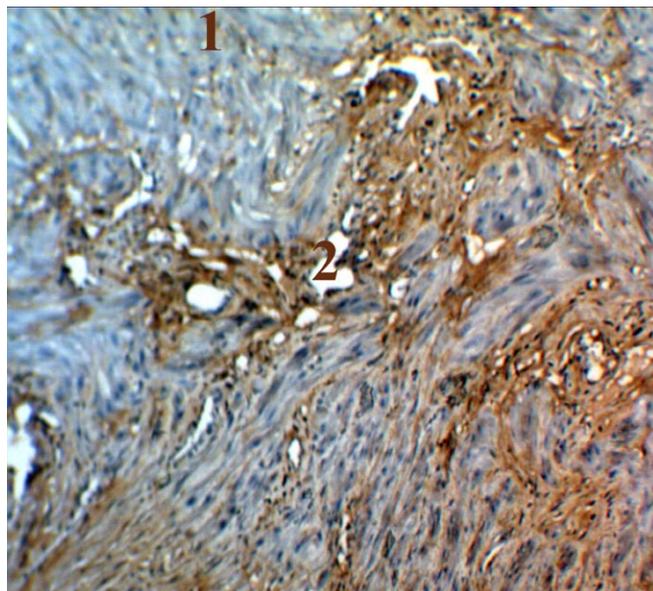


Рис. 5. Участок шейки матки крысы в родах. Увеличение экспрессии коллагена III типа в миометрии. 1 — надсосудистый слой, 2 — сосудистый слой, 3 — подслизистый слой. Иммуногистохимическая реакция с антителами к коллагену III типа. Световая микроскопия. Ув. $\times 100$

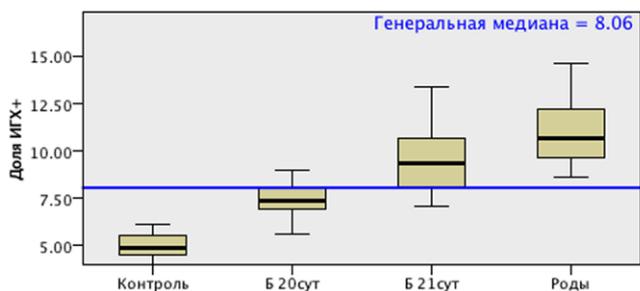


Рис. 6. Объемные доли структур шейки матки на гистологических срезах с положительным окрашиванием DAB к коллагену III типа, накануне и в ходе родов. Иммуногистохимическая реакция

Результаты основаны на парном критерии Манна-Уитни и двусторонних критериях в предположении равенства дисперсий. Для каждой значимой пары ключ меньшей категории появляется в категории с большим средним. Уровень значимости p для групп А, В, С: менее 0,05.

Известно, что коллаген III типа отличается более высокой степенью гидроксирования пролина, чем другие фибриллообразующие типы коллагена, а также он содержит цистеин, благодаря чему способен образовывать дополнительные дисульфидные связи и является центром агрегации молекул в фибриллы [16]. На наш взгляд, это свойство коллагена в цервиксе матки способствует сохранению ее структуры при раскрытии маточного зева в родах, т.е. препятствует возникновению разрывов тканей.

Таблица. Результаты сравнения данных объемной доли структур шейки матки на гистологических срезах с положительным окрашиванием DAB к коллагену III типа, полученных методом ИГХ, накануне и в ходе родов, по U-критерию Манна-Уитни

	Группа			
	Контроль (А)	Б. 20сут. (В)	Б. 21сут. (С)	Роды (D)
Среднее	5,00	7,47 А	9,65 АВ	11,01 АВС
Стандартная ошибка невзвешенной частоты	5	5 А	5 АВ	5 АВС
Медиана	4,89	7,39 А	9,34 АВ	10,66 АВС
Доля ИГХ+ Процентиль 25	4,55	6,90 А	8,13 АВ	9,68 АВС
Процентиль 75	5,56	8,00 А	10,66 АВ	12,24 АВС
Процентиль 05	4,10	5,98 А	7,10 АВ	8,80 АВС
Процентиль 95	6,08	8,90 А	12,77 АВ	14,52 АВС

Стоит отметить, что на сегодняшний день процесс «созревания» шейки матки расценивается как сложный каскад ферментативных реакций, направленных на разрушение коллагеновых волокон, присутствующих в шейке матки. Доказано, что темп раскрытия шейки матки в родах тем больше, чем меньше в ней коллагена, который обуславливает величину жесткости тканей [17–19]. Руководствуясь сведениями о функциональной значимости коллагенов [16], можно сказать, что величину жесткости тканей обычно определяет коллаген I типа, который в шейке матки присутствует в большем количестве, чем коллаген III типа, и именно коллаген I типа разрушается в процессе «созревания» шейки матки. Полученные нами результаты об увеличении количества коллагена III типа на момент родов, позволяют задуматься о функциональной роли различных типов коллагенов и возможной смене одного типа на другой к концу беременности.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Бахмач В.О., Чехонацкая М.Л., Яннаева Н.Е. и др. Изменения матки и шейки матки во время беременности и накануне родов (обзор). Саратовский научно-медицинский журнал 2011; 2(7): 396–400.
2. Созыкин А.А. Морфологические аспекты нормального гистогенеза и реактивных изменений гладкой мышечной ткани миометрия крыс [диссертация]. Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет»: Волгоград; 2004.
3. Shkurupiy V.A., Obedinskaya K.S., Nadeev A.P. Morphological study of the main mechanisms of myometrium involution after repeated pregnancies in mice. Bull. Exp. Biol. Med. 2011; 150(3): 378–82.
4. Савицкий А.Г., Гуляева А.О., Кузьмина Д.Н. и др. «Шеечный фактор» в патогенезе гипертонических дисфункций матки. Детская медицина Северо-Запада 2012; 3(2): 35–42.
5. Подтетнев А.Д., Братчикова Т.В., Котайш Г.А. Регуляция родовой деятельности. М.: Изд-во Российского университета дружбы народов; 2004.
6. Козонов Г.Р., Кузьминых Т.У., Толибова Г.Х. и др. Клиническое течение родов и патоморфологические особенности миометрия при дискоординации родовой деятельности. Журнал акушерства и женских болезней 2015; 4(64): 39–48.
7. Зуссман Э. Биология развития; пер. с англ. М.: Мир; 1977.
8. Бродский В.Я., Цирекидзе Н.Н., Коган М.Е. Изменение абсолютного числа клеток в сердце и печени. Количественное сохранение белков и ДНК в изолированных клетках. Цитология 1983; 3: 260–5.
9. Глаголев А.А. Геометрические методы количественного анализа агрегатов под микроскопом. Львов: Госгеоиздат; 1941.
10. Хесин Я.Е. Размеры ядер и функциональное состояние клеток. М.: Медицина; 1967.
11. Ciray H.N., Güner H., Håkansson H. et al. Morphometric analysis of gap junctions in nonpregnant and term pregnant human myometrium. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 1995; 74(7): 497–504.
12. MacKenzie L.W., Cole W.C., Garfield R.E. Structural and functional studies of myometrial gap junctions. Acta Physiol. Hung. 1985; 65(4): 461–72.
13. Wright J.G. The origin and nature of the blood platelets. Boston Med. Surg. J. 1906; 154: 643–5.
14. Petkov R. Ultrastructure of the collagen fibril. I. Some features of the structure of the collagen fibril. Anat. Anz. 1978; 144(4): 301–18.
15. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). М.: Медицина; 1981.
16. Омеляненко Н.П., Слуцкий Л.И. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). Том I. М.: Известия; 2009.
17. Савицкий Г.А. Биомеханика раскрытия шейки матки в родах. СПб: ЭЛБИ; 1999.
18. Uldberg N., Ekman G., Malmström A. et al. Ripening of the human cervix related to changes in collagen, glycosaminoglycans and collagenolytic activity. Amer. J. Obstet. Gynec. 1983; 147(6): 662–6.
19. Oxlund B.S., Ørtoft G., Brühl A. et al. Cervical collagen and biomechanical strength in non-pregnant women with a history of cervical insufficiency. Reprod. Biol. Endocrinol. 2010; 8: 92.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила 21.05.2018

ИНДУКЦИЯ КАПАЦИТАЦИИ БЫЧИХ СПЕРМАТОЗОИДОВ ДО КРИОКОНСЕРВАЦИИ ПОВЫШАЕТ ИХ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ПОСЛЕ РАЗМОРАЖИВАНИЯ

В.Ю. Денисенко, Т.И. Кузьмина, Е.Н. Бойцева

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального научного центра животноводства-ВИЖ имени акад. Л.К. Эрнста, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

INDUCTION OF CAPACITATION OF BOVINE SPERMATOZOA BEFORE CRYOPRESERVATION INCREASES THEIR VIABILITY AFTER THAWING

V.Yu. Denisenko, T.I. Kuzmina, E.N. Boytseva

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Saint-Petersburg, Pushkin, Russia

e-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Криоконсервация спермы — важный инструмент репродуктивной биотехнологии в решении проблем бесплодия и воспроизводства животных. Несмотря на имеющиеся достижения в этой области, механизмы, детерминирующие криорезистентность мужских гамет, требуют дальнейшего изучения. Повреждающее действие сверхнизких температур при криоконсервации, прежде всего, направлено на плазматическую мембрану сперматозоидов. Цель настоящего исследования — проанализировать показатели жизнеспособности размороженных сперматозоидов быков после превентивно индуцированной капацитации с последующей криоконсервацией.

В исследовании использовали эякулят от трех неинбредных быков айрширской и черно-пестрой пород. Функциональный статус сперматозоидов анализировали с помощью хлортетрациклинового теста (ХТЦ). Гаметы ранжировали в соответствии с одним из трех типов флуоресценции комплекса ХТЦ-кальций-мембрана: равномерная флуоресценция по всей головке (некапацитированные клетки); свободная от флуоресценции полоса в постакросомальном районе (капацитированные клетки); низкая флуоресценция по всей головке, за исключением тонкой яркой полосы флуоресценции в экваториальном сегменте (акросома-реактивные клетки). Жизнеспособность сперматозоидов оценивали с использованием красителя пропидиума йодид (5 мкг/мл). Капацитацию индуцировали гепарином (5 мкг/мл) или теофиллином/dbcAMP (250/100 мкМ).

При индукции капацитации сперматозоидов быков гепарином, а также теофиллином/dbcAMP перед криоконсервацией было показано, что после размораживания количество жизнеспособных клеток увеличивается, так же, как количество клеток на стадии акросомной реакции, а количество капацитированных клеток снижается. В интактных (без криоконсервации) сперматозоидах при индукции капацитации количество жизнеспособных клеток оставалось неизменным, а количество капацитированных клеток увеличивалось.

Полученные данные расширяют представления об эффектах сверхнизких температур на мужские гаметы и могут быть использованы для модернизации технологии криоконсервации сперматозоидов быков с целью увеличения их выживаемости после размораживания.

Ключевые слова: криоконсервация, капацитация, сперматозоиды, бык, жизнеспособность.

Введение

Криоконсервация спермы является важным инструментом репродуктивной биотехнологии, но процессы замораживания-размораживания оказывают на сперматозоиды негативное влияние, которое изучено в недостаточной степени [1]. Было показано, что процедуры, производимые при криоконсервации (разбавление спермы, охлаждение, замораживание-размораживание) индуцируют в сперме процессы, аналогичные тем, которые происходят в ней при капацитации, в частности, можно отметить реорганизацию плазматической и акросомной

мембран, вход кальция в сперматозоиды [2, 3]. Также было обнаружено, что в основном изменение функционального статуса криоконсервированных сперматозоидов аналогично изменению функционального статуса сперматозоидов при капацитации: они способны подвергаться акросомной реакции или оплодотворять ооциты *in vitro* [4, 5]. Несмотря на то, что молекулярные механизмы капацитации выяснены не полностью, в многочисленных исследованиях выявлено, что при капацитации происходят изменения в составе и текучести мембран сперматозоидов [6]; увеличивается концентрация

Cryopreservation of sperm is an important tool of reproductive biotechnology in the solving of the problems in infertility and reproduction of animals. In despite of the achievements in this field, the mechanisms that determine the cryoresistance of male gametes require further study. The damaging effect of ultralow temperatures during cryopreservation is primarily directed to the plasma membrane of spermatozoa. The purpose of this study is to analyze the viability of thawed bull spermatozoa after preventively induced capacitation with the further cryopreservation. Ejaculates of three noninbred bulls of Ayrshire and black-and-white breeds were used in the experiments. The functional state of spermatozoa was evaluated with a chlortetracycline test. Gametes were ranked in accordance with one of the three types of fluorescence of CTC-calcium-membrane complex: uniform fluorescence throughout the head (uncapacitated cells); fluorescence-free band in the post-acrosome region (capacitated cells); low fluorescence in the entire head, except for a thin bright fluorescence band in the equatorial segment (acrosome-reactive cells). The viability of spermatozoa was assessed with propidium iodide (5 µg / ml). Capacitation was induced by heparin (5 µg / ml) or theophylline / dbcAMP (250/100 µM).

It was shown that the induction of the capacitation of bull sperm by heparin, as well as theophylline / dbcAMP before cryopreservation enhances the number of viable sperm, reduces the number of capacitated cells and increases the number of sperm with acrosome reaction after thawing. In intact (without freezing) spermatozoa after induction of capacitation such effect is not revealed, the number of viable cells remained unchanged, the induction of capacitation caused an increase number of capacitated spermatozoa.

The findings expand knowledge concerning the effects of extremely low temperatures on male gametes and can be used for modernization of the cryopreservation technology for increase their survival rate after thawing.

Keywords: cryopreservation, capacitation, spermatozoa, bull, viability.

мембран, вход кальция в сперматозоиды [2, 3]. Также было обнаружено, что в основном изменение функционального статуса криоконсервированных сперматозоидов аналогично изменению функционального статуса сперматозоидов при капацитации: они способны подвергаться акросомной реакции или оплодотворять ооциты *in vitro* [4, 5]. Несмотря на то, что молекулярные механизмы капацитации выяснены не полностью, в многочисленных исследованиях выявлено, что при капацитации происходят изменения в составе и текучести мембран сперматозоидов [6]; увеличивается концентрация

цитоплазматического кальция [7]; возрастают цитоплазматический pH [8] и концентрация cAMP [9]. Также капацитация зависит от уровня содержания внеклеточного кальция и подъем уровня внутриклеточного Ca^{2+} является необходимым условием для ее успешного протекания [5].

В настоящее время основным направлением в совершенствовании методов криоконсервации мужских гамет, которые могут повысить выход жизнеспособных сперматозоидов после замораживания-размораживания, является улучшение качества криосред путем подбора криопротекторов для снижения губительного влияния сверхнизких температур. Однако, результаты, получаемые при этом, достаточно скромные.

Известно, что подвижность спермы крупного рогатого скота сразу же после размораживания зачастую не коррелирует с фертильностью гамет [10]. Несмотря на сохранение адекватной подвижности, криоконсервированная сперма имеет значительные нарушения мембраны [1]. Повышение уровня внутриклеточного кальция в криоконсервированной сперме и её пониженная способность поддерживать нормальную концентрацию этого катиона может являться одним из объяснений снижения оплодотворяющей способности спермы после размораживания [11].

Небольшое количество (~6%) холестерина стабилизировано в цитоплазматической мембране спермиев в виде сульфатов. В процессе движения гамет по женскому репродуктивному тракту стеролсульфатазы инициируют гидролиз сульфатных групп, увеличивая пул холестерина, доступного для этерификации. Таким образом в процессе капацитации осуществляется перестройка липидного состава цитоплазматической мембраны сперматозоидов путем выхода из ее состава определенного количества холестерина, являющегося мощным фактором, стабилизирующим мембрану. Связываясь с мембранными фосфолипидами, холестерин увеличивает плотность упаковки мембраны и, тем самым, снижает ее текучесть и проницаемость. В процессе криоконсервации происходит повреждение мембран спермиев кристаллами льда, что приводит к неконтролируемым изменениям проницаемости для различных ионов. Как следствие, затрудняется нормальный ход капацитации после размораживания, что демонстрирует появление «ложной» капацитации в размороженных образцах сперматозоидов [12]. В соответствии с вышесказанным, можно предположить, что индукция капацитации, осуществляемая перед криоконсервацией, позволяет избежать этих процессов.

Целью исследования являлся анализ показателей жизнеспособности размороженных сперматозоидов быков после индуцированной капацитации с последующей криоконсервацией.

Материал и методы

Дизайн эксперимента

Эякулят от неинбредных быков айрширской ($n=1$) и черно-пестрой пород ($n=2$) получали в день эксперимента. При проведении исследований соблюдались правила гуманного обращения с экспериментальными животными, регламентированные «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ РФ № 267 от 19.03.2003 г.). После обработки образцов спермы и капацитации производили криоконсервацию с последующей оценкой функционального состояния и жизнеспособности сперматозоидов. Для оценки влияния капацитации на функциональный статус сперматозоидов и их жизнеспособность было поставлено 2 серии экспериментов в 4 группах:

1 группа — инкубация в среде для спермы быков в течение 4 ч.;

2 группа — инкубация в среде для спермы быков в течение 4 ч., в которую добавляли гепарин (5 мкг/мл);

3 группа — инкубация в среде для спермы быков в течение 4 ч., в которую добавляли теофиллин/dbcAMP (250/100 мкМ);

4 группа — контроль — клетки без инкубации.

Первая серия экспериментов была проведена на клетках, которые не замораживали, вторая серия — на клетках, которые криоконсервировали после процедуры капацитации и через 1 сут. размораживали.

В работе использовали реактивы компании Sigma-Aldrich (США): инкубационную среду TALP, поливинил-алкоголь, хлортетрациклин (ХТЦ), бычий сывороточный альбумин, глутаральдегид, L-цистеин, 1,4-дiazобидцикло [2.2.2]-октан, глицерол, гепарин, теофиллин, dbcAMP

Приготовление образцов спермы

От каждого быка было получено 5 образцов спермы. Для освобождения от семенной плазмы сперму два раза отмывали средой SP-TALP, состоящей из: 100 мМ NaCl, 3,1 мМ KCl, 25 мМ $NaHCO_3$, 0,3 мМ NaH_2PO_4 , 21,6 мМ лактата натрия, 0,4 мМ $MgCl_2$, 10 мМ HEPES, 1 мМ пирувата и 0,1% поливинилалкоголя (молекулярной массой 30000–70000 Да), pH 7,4, с последующим центрифугированием при 300 g в течение 10 мин.

Процедура капацитации

Для капацитации использовали среду Sp-TALP, в которую было добавлено 6 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и 0,5 мМ $CaCl_2$ (среда для спермы быков). Активацию капацитации в клетках проводили с помощью гепарина (5 мкг/мл) или смесью теофиллина и dbcAMP (250 и 100 мкМ, соответственно). Продолжительность капацитации сперматозоидов составляла 4 ч. при 38,5 °C, 95% влажности и 5% CO_2 .

Криоконсервация сперматозоидов

Для криоконсервации сперматозоидов образцы семенной разбавляли в два раза средой для спермы быков, не содержащей яичного белка (Andromed, Minitube, Германия), доводили температуру семени до 20–22 °C, фасовали в пайеты и выдерживали в течение 3–4 ч. в холодильнике при температуре 4 °C. Далее образцы семени охлаждали в течение 7,5 мин. до температуры –145 °C в программном замораживателе, а затем помещали в жидкий азот, где они хранились при температуре –196 °C. Размораживание образцов биологического материала проводили на водяной бане при 38,5 °C в течение 1 мин. Объем биологического материала составлял 200 мкл на пробу.

Оценка влияния капацитации на функциональное состояние сперматозоидов

После капацитации 20 мкл суспензии сперматозоидов смешивали с 20 мкл раствора ХТЦ и инкубировали при 38,5 °C в течение 10 мин. Раствор ХТЦ (750 мкМ) готовили в буфере, который содержал 130 мМ NaCl, 5 мМ L-цистеина, 20 мМ Трис (pH 7,8). Для фиксации добавляли 10 мкл 25% глутаральдегида в 1 мМ Трис. (pH 7,4) до конечной концентрации 0,1%. При этой концентрации глутаральдегида флуоресценция оставалась стабильной в течение 2 ч. и не оказывала дополнительного влияния на клетки [13]. После этого при комнатной температуре каплю суспензии сперматозоидов (10 мкл) размещали на предметном стекле, смешивали с 10 мкл 0,22 М 1,4-diazобидцикло[2.2.2]октана, растворенного в глицерол/PBS (9:1, v/v), накрывали покровным стеклом и хранили в темноте при 4 °C. С помощью окуляра Levenhuk 10x/18 с сеткой (Levenhuk, Китай)

в поле зрения отсчитывали 200 сперматозоидов и анализировали под люминесцентным микроскопом Zeiss Axio Imager (Германия) с фазовым контрастом и эпифлуоресцентной оптикой (возбуждение при 400–440 нм и излучение при 470 нм) [12]. Сперматозоиды оценивали в соответствии с одним из трех типов флуоресцентного окрашивания ХТЦ [14]: равномерная флуоресценция по всей головке (некапацитированные клетки, образцы F), свободная от флуоресценции полоса в постакросомальном районе (капацитированные клетки, образцы B), низкая флуоресценция по всей головке, за исключением тонкой яркой полосы флуоресценции в экваториальном сегменте (акросома-реактивные клетки, образцы AR).

Оценка жизнеспособности сперматозоидов

Жизнеспособность сперматозоидов оценивали с использованием красителя пропидиума йодида (PI). Клетки отмывали от криопротектора дважды средой Sp-TALP с последующим центрифугированием при 600 g в течение 10 мин., окрашивали раствором PI (5 мкг/мл) и анализировали сразу под люминесцентным микроскопом Zeiss Axio Imager (возбуждение при 540 нм, излучение при 625 нм; Германия). Живые сперматозоиды имели слабо флуоресцирующую головку, мертвые — яркую флуоресценцию по всей головке.

Статистический анализ

В связи с параметрическим распределением количественных показателей сравнение групп осуществляли с помощью *t*-критерия Стьюдента с использованием программного пакета SigmaStat.

Результаты

В экспериментах на сперматозоидах быков изучали влияние капацитации на структурные изменения в мембране клеток с использованием флуоресцентного зонда ХТЦ, который образует комплексы в присутствии кальция (ХТЦ-кальций-мембрана), что позволяет сделать видимым перераспределение кальция в мембране сперматозоидов [14]. В 1 серии экспериментов после проведения капацитации сперматозоиды не замораживали (рис. 1). В образцах, инкубированных в среде без добавок по сравнению с образцами без инкубации (контроль) отмечали снижение процентного содержания (на 30%) некапацитированных клеток (образцы F). Аналогичный эффект наблюдали при капацитации сперматозоидов в присутствии гепарина, а также теофиллина/dbcAMP. В то же время инкубация образцов спермы в среде без добавок приводила к увеличению количества капацитированных клеток в 3 раза ($P < 0,001$, образцы B), наибольшее количество капацитированных сперматозоидов (увеличение в 4 раза, $P < 0,001$) отмечали тогда, когда при инкубации добавляли в среду гепарин или теофиллин совместно с dbcAMP.

Во 2 серии экспериментов изучали влияние предварительной капацитации сперматозоидов перед замораживанием на структурные изменения в мембране сперматозоидов быков после размораживания (рис. 2). В отличие от сперматозоидов, которые не замораживали, после замораживания-размораживания процентное содержание некапацитированных клеток (образцы F) осталось одинаковым (20–24%) во всех опытных группах. Наибольший процент (54±2,36, $P < 0,001$) капацитированных клеток (образцы B) отмечали в контрольных образцах, которые перед замораживанием не инкубировали. Предварительная инкубация сперматозоидов перед замораживанием приводила к снижению процента капацитированных клеток (в 2 раза) (образцы B) и к повышению

процентного содержания акросома-реактивных клеток (образцы AR) в размороженных сперматозоидах во всех опытных группах. Полученные данные свидетельствуют, что предварительная капацитация сперматозоидов быков перед замораживанием стимулирует в размороженных клетках снижение количества капацитированных и повышение числа акросома-реактивных клеток.

При оценке влияния процесса капацитации на жизнеспособность интактных сперматозоидов быков были обнаружены сходные показатели соотношения живых и мертвых клеток (3:1) в контроле и в образцах, инкубированных в среде без добавок (рис. 3). Активация капацитации гепарином, а также теофиллином и dbcAMP, не приводила к изменению количества жизнеспособных клеток по сравнению с контролем и образцами, инкубированными в среде без добавок. Таким образом, активация процессов капацитации не оказывала влияния на жизнеспособность интактных сперматозоидов быков.

Результаты экспериментов по влиянию предварительной капацитации (до замораживания) на жизнеспособность замороженных/размороженных сперматозоидов быков, представлены на рис. 4. В контрольных образцах (без инкубации) после размораживания сперматозоидов соотношение живых/мертвых клеток составляло примерно 1:1. Инкубация образцов в среде без добавок до замораживания не приводила к значительным изменениям в соотношении живых/мертвых клеток по сравнению с контролем. В то же время инкубация до замораживания сперматозоидов в присутствии гепарина, а также теофиллина и dbcAMP, увеличивала количество жизнеспособных сперматозоидов после размораживания в 2 раза.

Обсуждение

Криоконсервация спермы широко используется в промышленном разведении крупного рогатого скота, однако половина из замороженных сперматозоидов не выживает, а в большинстве из тех, которые выживают, происходят функциональные изменения, влияющие на их способность к оплодотворению. Было обнаружено, что в криоконсервированной сперме быков сразу после размораживания и отмывания почти 50% сперматозоидов завершили капацитацию и более 20% находились на стадии акросомной реакции [15]. Исходя из этих данных, для достижения эквивалентной степени оплодотворения количество криоконсервированных сперматозоидов крупного рогатого скота должно быть в 8 раз больше по сравнению со свежей спермой [16]. Оплодотворяющая способность после размораживания значительно снижается из-за преждевременной капацитации. После разморозки сперматозоидов быков отмечается высокий процент клеток на стадии капацитации, и чем их больше, тем хуже качество образца [12]. Существует гипотеза, согласно которой криоконсервированные сперматозоиды преждевременно «капацитируют» сразу после размораживания в результате эффекта сверхнизких температур: повреждения, полученные клеткой во время криоконсервации, достаточны для «облегчения» и/или стимуляции функциональной капацитации сперматозоидов.

Повреждающее действие сверхнизких температур при криоконсервации, прежде всего, направлено на плазматическую мембрану сперматозоидов [17]. Было показано, что воздействие на сперму кабана сверхнизких температур с последующим размораживанием клеток вызывало деструкцию плазматических мембран средней части и головки сперматозоидов [18]. После криоконсервации размороженная сперма человека и быков содержала большее количество внутриклеточного кальция,

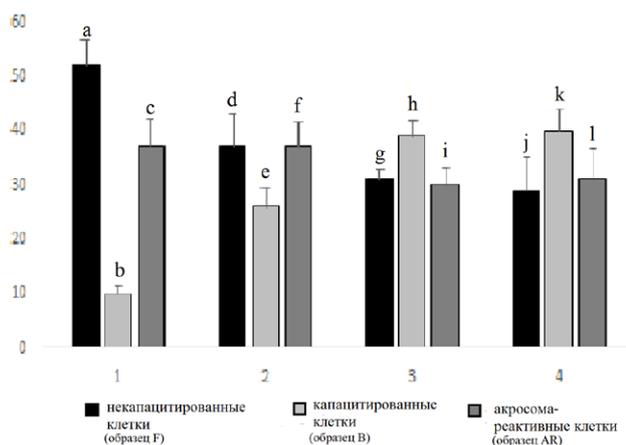


Рис. 1. Влияние капацитации на функциональный статус незамороженных сперматозоидов быков: 1 — клетки без инкубации (контроль); 2 — клетки, инкубированные 4 ч. в среде без добавок; 3 — клетки, инкубированные 4 ч. в присутствии гепарина; 4 — клетки, инкубированные 4 ч. в присутствии теофиллина и dbcAMP. По оси ординат — процентное содержание клеток с разным функциональным статусом: некапацитированные клетки (образцы F); капацитированные клетки (образцы B); акросома-реактивные клетки (образцы AR). Статистическая значимость различий: a:b; b:c; a;j; b:h; e:h; b:k — $P < 0,001$; a:g; b:h — $P < 0,005$; a:c; a;d; e:k — $P < 0,05$

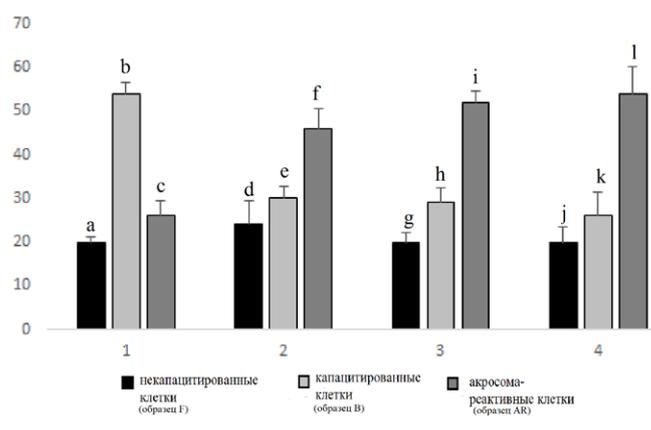


Рис. 2. Влияние предварительной капацитации сперматозоидов быков перед заморозкой на капацитацию клеток после криоконсервации: 1 — клетки без инкубации (контроль); 2 — клетки, инкубированные 4 ч. в среде без добавок; 3 — клетки, инкубированные 4 ч. в присутствии гепарина; 4 — клетки, инкубированные 4 ч. в присутствии теофиллина и dbcAMP. По оси ординат — процентное содержание клеток с разным функциональным статусом: некапацитированные клетки (образцы F); капацитированные клетки (образцы B); акросома-реактивные клетки (образцы AR). Статистическая значимость различий: a:b; b:c; g;i; h;j; j;l; k;l; b:c; b:h; b;k; c;i; c;l — $P < 0,001$; d:f; c:f — $P < 0,005$; e:f — $P < 0,05$

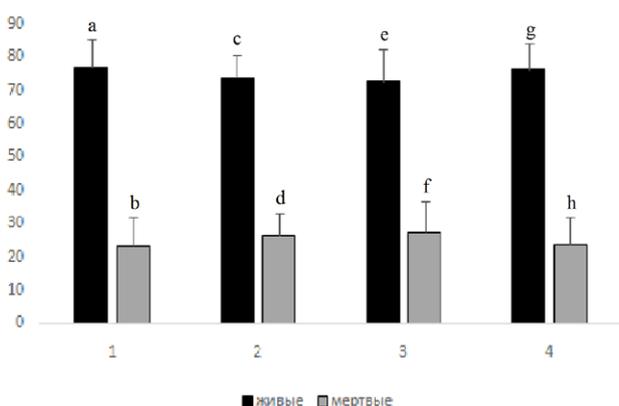


Рис. 3. Влияние капацитации на жизнеспособность незамороженных сперматозоидов быков: 1 — клетки без инкубации (контроль); 2 — клетки, инкубированные 4 ч. в среде без добавок; 3 — клетки, инкубированные 4 ч. в присутствии гепарина; 4 — клетки, инкубированные 4 ч. в присутствии теофиллина и dbcAMP. По оси ординат — процентное содержание клеток. Статистическая значимость различий: a:b; c:d; e:f; g:h — $P < 0,001$

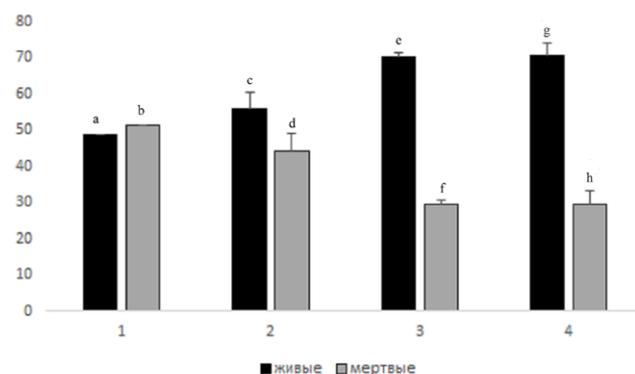


Рис. 4. Влияние предварительной капацитации сперматозоидов быков перед заморозкой на жизнеспособность клеток после криоконсервации: 1 — клетки без инкубации (контроль); 2 — клетки, инкубированные 4 ч. в среде без добавок; 3 — клетки, инкубированные 4 ч. в присутствии гепарина; 4 — клетки, инкубированные 4 ч. в присутствии теофиллина и dbcAMP. По оси ординат — процентное содержание клеток. Статистическая значимость различий: e:f; g:h — $P < 0,001$; a:e; b:f; a:g; b:h — $P < 0,005$; c:e; d:f; c:g; d:h — $P < 0,05$

что свидетельствует о нарушении мембранных механизмов избирательной проницаемости [11, 19].

Таким образом, если плохое качество материала связано с большим количеством капацитированных клеток после размораживания, можно предположить, что уменьшение количества капацитированных клеток после размораживания сперматозоидов позволит улучшить их качество.

Ранее было выявлено, что обработка сперматозоидов быков высокодисперсным кремнеземом перед замораживанием приводила после размораживания клеток к повышению подвижности спермы, увеличению показателей выживаемости клеток и стабилизации их мембран [20]. При инкубации сперматозоидов быков в течение 4 ч. в присутствии 0,001%

высокодисперсного кремнезема без последующего замораживания отмечали увеличение количества капацитированных клеток [21]. Было сделано предположение, что одним из факторов, способствующих лучшему переживанию сперматозоидами замораживания, является активация высокодисперсным кремнеземом процессов капацитации в сперматозоидах.

Для проверки этого предположения было изучено влияние гепарина на сохранность сперматозоидов после замораживания-размораживания. Было обнаружено, что инкубация перед криоконсервацией сперматозоидов быков в течение 4 ч. в присутствии гепарина приводила к снижению количества капацитированных клеток после их размораживания. В то же время инкубация

сперматозоидов, которые не подвергались последующему замораживанию, в присутствии гепарина стимулировала увеличение количества капацитированных клеток [22]. Следовательно, предварительная капацитация сперматозоидов быков перед замораживанием позволяет уменьшить процент капацитированных клеток после размораживания, что, по-видимому, может способствовать улучшению качества мужских гамет.

Известно, что при связывании с рецепторами сперматозоидов гепарин стимулирует подъем концентрации внутриклеточного кальция, рН и сАМР [23]. Влияние сАМР на капацитацию сперматозоидов быков было изучено с использованием теофиллина и dbcАМР, которые в этих клетках стимулируют увеличение внутриклеточной концентрации сАМР. Оказалось, что предварительная капацитация сперматозоидов перед замораживанием с помощью теофиллина и dbcАМР, так же, как и при действии гепарина, приводила к уменьшению процента капацитированных клеток после размораживания. Из вышесказанного следует, что стимулированная гепарином предварительная капацитация сперматозоидов перед замораживанием, приводящая впоследствии к снижению количества капацитированных клеток после размораживания, связана с повышением концентрации внутриклеточного сАМР во время капацитации.

В предыдущем исследовании нами было установлено, что после размораживания в сперматозоидах быков

повышается количество капацитированных клеток и понижается число жизнеспособных сперматозоидов. Если же перед замораживанием провести процедуру капацитации сперматозоидов, то после размораживания количество капацитированных клеток снижается [24]. Можно было ожидать, что предварительная капацитация перед заморозкой также приведет к повышению числа жизнеспособных сперматозоидов после размораживания. Полученные в данной работе результаты показали, что после предварительной капацитации в присутствии гепарина, а также теофиллина и dbcАМР после замораживания/размораживания происходило значительное ($P < 0,001$) увеличение количества жизнеспособных сперматозоидов.

Выявленный эффект индуцирования капацитации в сперматозоидах быков до их криоконсервации на повышение количества жизнеспособных клеток после размораживания может быть использован при модернизации этапов технологии криоконсервации мужских гамет.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО (Госзадание № АААА-А18-118021590132-9).

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА:

- Paoli D., Lombardo F., Lenzi A. et al. Sperm cryopreservation: effects on chromatin structure. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014; 791: 137–50.
- Shan N., Singh V., Yadav H.P. et al. Effect of reduced glutathione supplementation in semen extender on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Harijana bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2017; 182: 111–22.
- Ahmad M., Nasrullah R., Riaz H. et al. Changes in motility, morphology, plasma membrane and acrosome integrity during stages of cryopreservation of buck sperm. *J.S. Afr. Vet. Assoc.* 2014; 85: 972.
- O'Flaherty C., Rodriguez P., Srivastava S. L-arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1674: 215–21.
- Rodriguez P.C., Satorre M.M., Beconi M.T. Effect of two intracellular calcium modulators on sperm motility and heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2012; 131(3–4): 135–42.
- Gadella B.M., Boerke A. An update on post-ejaculatory remodeling of the sperm surface before mammalian fertilization. *Theriogen.* 2016; 85: 113–24.
- Battistone M.A., Da Ros V.G., Salicioni A.M. et al. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. *Mol. Hum. Reprod.* 2013; 19: 570–80.
- Chen W.Y., Xu W.M., Chen Z.H. et al. Cl⁻ is required for HCO₃⁻ entry necessary for sperm capacitation in guinea pig: involvement of a Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger (SLC26A3) and CFTR. *Biol. Reprod.* 2009; 80: 115–23.
- Harayama H. Roles of intracellular cyclic AMP signal transduction in the capacitation and subsequent hyperactivation of mouse and boar spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* 2013; 59: 421–30.
- Yoon S.J., Kwon W.S., Rahman M.S. et al. A novel approach to identifying physical markers of cryo-damage in bull spermatozoa. *Plos One* 2015; 4: 10–5.
- Albrizio M., Moramarco A.M., Nicassio M. et al. Localization and functional modification of L-type voltage-gated calcium channels in equine spermatozoa from fresh and frozen semen. *Theriogen.* 2014; 83: 421–9.
- Cormier N., Bailey J.L. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 2003; 69: 177–85.
- Ward C.R., Storey B.T. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev. Biol.* 1984; 104: 287–96.
- Ricart M.C., Breininger E., Rodriguez P.C. et al. Participation of membrane adenylyl cyclase in heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia* 2015; 47: 30–6.
- Pons-Rejraji H., Bailey J.L., Leclerc P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. *Reprod. Fertil. Dev.* 2009; 21: 525–37.
- Shannon P., Vishwanath R. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Anim. Reprod. Sci.* 1995; 39: 1–10.
- Forero-Gonzalez R.A., Celeghini E.C., Raphael C.F. et al. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia* 2012; 1: 154–9.
- Garcia J.C., Dominguez J.C., Pena F.J. et al. Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 119: 160–5.
- Rajamanickam G.D., Kroetsch T., Kastelic J.P. et al. Testis-specific isoform of Na⁺/K⁺-ATPase (ATP1A4) regulates sperm function and fertility in dairy bulls through potential mechanisms involving reactive oxygen species, calcium and actin polymerization. *Andrologia* 2017; 5: 814–23.
- Чуйко А.А. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. Киев: Наукова думка; 2003.
- Бойцева Е.Н., Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И. Оценка показателей постэякуляционного созревания сперматозоидов *Bos Taurus* хлортетрациклиновым методом. *Онтогенез* 2015; 46(6): 1–7.
- Parrish J.J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogen.* 2014; 81: 67–73.
- Marguez B., Suarez S.S. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biol. Reprod.* 2004; 70: 1626–33.
- Денисенко В.Ю., Бойцева Е.Н., Кузьмина Т.И. и др. Способ повышения выживаемости сперматозоидов быков при криоконсервации. Патент РФ на изобретение. № RUS2620004. 21 марта 2016.

Поступила: 26.03.2018

ДИНАМИКА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ХУМАНИНА И ПОТРЕБЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИМИСЯ C2C12 МИОБЛАСТАМИ

А.А. Жлоба¹, Т.Ф. Субботина¹, Н.А. Смолина², А.А. Костарева²

¹ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

DYNAMICS OF HUMANIN RELEASE AND CONSUMPTION OF AMINO ACIDS BY DIFFERENTIATING C2C12 MYOBLASTS

A.A. Zhloba¹, T.F. Subbotina¹, N.A. Smolina², A.A. Kostareva²

¹ I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia

² V.A. Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

e-mail: zhloba@mail.spbnit.ru

В дифференцирующей культуре миобластов образование миофибрилл сопровождается потреблением аминокислот и высвобождением их производных в среду. Усиление митохондриального метаболизма предшествует образованию миофибрилл. Целью работы являлась оценка высвобождения в культуральную среду хуманиноподобного пептида (ХНПП, mt-RNR-пептид) и производных аминокислот при дифференцировке C2C12 миобластов.

Клетки линии C2C12 культивировали по стандартной методике в планшетах, контролируя образование миофибрилл и отбирая для анализа пробы культуральной среды на 0 (индукция), 2, 4, 7, 9 и 11 сут. дифференцировки. Уровень ХНПП определяли иммуноферментным методом, аминокислот и их метаболитов — жидкостной хроматографией.

Из незаменимых аминокислот интенсивнее всех потребляются аминокислоты с разветвленной цепью — Вал, Лей, Иле вплоть до 7 сут. дифференцировки. Отмечается взаимная корреляция суточной продукции производных заменимой аминокислоты аргинина — гомоаргинина (гАрг) и орнитина ($r=0,53$; $p=0,008$) с максимумом на 2 сут., значительным снижением секреции гАрг на 4 сут. и следовой секрецией после 7 сут. дифференцировки. Высвобождение в среду ХНПП, в отличие от гАрг, продолжается до 4 сут.

Начало дифференцировки клеточной культуры более четко прослеживалось не по уровню потребления незаменимых аминокислот, присутствующих в культуральной среде в высоких концентрациях, а по образованию аминокислот-продуктов специализированных метаболических путей, к числу которых относятся гАрг и орнитин. Метаболическая активность митохондрий подтверждается секрецией ХНПП. Секреция ХНПП дифференцирующимися миобластами является ранним маркером становления митохондриального метаболизма. Ее понижение к 7 сут. происходит на фоне дегградации уже дифференцированных миоцитов. Специфическая функциональная активность миоцитов зависит от метаболической активности митохондрий, которую можно оценивать по уровню секретируемого ХНПП.

Ключевые слова: хуманин, миобласты, дифференцировка, аминокислоты, гомоаргинин, митохондрии, хуманиноподобный пептид, mt-RNR-пептиды.

Введение

В культурах миобластов, как и в культурах большинства других эукариотических клеток, развитию саркомеров предшествует формирование митохондрия, обеспечивающего достаточный уровень АТФ для поддержания жизнеспособности и функциональной активности клеток. [1, 2]. Оценка динамики потребления и выделения метаболитов культурой клеток может использоваться в технологиях по производству рекомбинантных белков, при подготовке клеток к трансплантации, при разработке протоколов культивирования и дифференцировки и при создании новых питательных сред [3, 4]. В изучении метаболизма на культурах клеток безусловное преимущество имеют методы, не нарушающие нативность культуры,

In the differentiating culture of myoblasts, the formation of myofibrils is accompanied by the consumption of amino acids and the release of their derivatives into the medium. The enhancement of mitochondrial metabolism precedes the formation of myofibrils. In this work, the release of a humanin-like peptide (HNLP, mt-RNR-peptide) and amino acid derivatives into the medium was studied in the differentiation of C2C12 myoblasts.

Cells of the C2C12 line were cultured using standard techniques in plates with control of myofibril formation and samples selection for analysis at 0 (induction), 2, 4, 7, 9 and 11 days of differentiation. HNLP was determined by enzyme immunoassay, and amino acids and their metabolites by liquid chromatography.

From the essential amino acids, branched chain — Val, Leu, Ile were most intensively consumed up to day 7 of differentiation. There was observed a mutual correlation between the daily production of arginine derivatives — homoarginine (hArg) and ornithine ($r = 0.53$, $p = 0.008$) with a maximum on day 2, a significant decrease of hArg production on day 4 and trace secretion after day 7. The release of HNLP, unlike hArg, lasts up to 4 days.

Secretion of HNLP in course differentiating myoblasts is an early marker of the mitochondrial metabolism development. Its decrease by day 7 is associated to inhibition of the further existence of already differentiated myocytes. The early stage of cell culture differentiation is more clearly checked not by the level of essential amino acids intake, which presented in the cultivation medium at high concentrations, but by the formation of amino acid products of specialized metabolic pathways, including hArg and ornithine. The metabolic activity of mitochondria is confirmed by the secretion of HNLP. The specific functional activity of myocytes depends on the metabolic activity of the mitochondria, which can be checked without violating the integrity of the culture, according to the level of secreted HNLP.

Keywords: humanin, myoblasts, differentiation, amino acids, homoarginine, mitochondria, humanin-like peptide, mt-RNR-peptides.

например, анализ состава культуральных сред на различных этапах роста и дифференцировки клеток [3–5]. Однако определение потребления аминокислот *in vitro* растущими и дифференцирующимися клетками характеризует их утилизацию из культуральной среды, но не становление митохондриального метаболизма в культуре эукариотических клеток, в том числе миобластов. Кроме того, аминокислотный состав питательных сред всегда предусматривает большие избытки незаменимых и условно заменимых аминокислот, поэтому их потребление клетками может составлять лишь несколько процентов от общего количества, а значит, точная оценка потребления весьма затруднительна. В связи с этим более обоснованным является определение в культуральных

средах метаболических маркеров, которые отсутствуют в формуляре среды, но продуцируются клетками. Таким маркером может предположительно выступать пептид хуманин (ХН), синтезирующийся в ходе генерации митохондрий и в основном на матрице митохондриальной ДНК [6]. В организме образование ХН прямо коррелирует с увеличением числа митохондрий [7]. Пептид ХН описан как митохондриальный фактор mt-RNR, регулирующий окислительное фосфорилирование и, тем самым, продукцию АТФ [8]. В литературе есть данные о том, что хуманиновая митохондриальная ДНК переносится в ядерный геном, и существуют различные ядерные ДНК-последовательности митохондриального происхождения — явление, известное как NUMT (nuclear mitochondrial DNA) [6]. Таким образом, в ядерном геноме имеются вырожденные ХН-подобные открытые рамки считывания — последовательности нуклеотидов в составе ДНК, способные кодировать этот пептид. В итоге в организме и, соответственно, в крови обнаруживаются аналоги ХН с биологической активностью [9]. Известно, что ХН у человека интенсивно образуется не только в тканях печени и почек, но и в других богатых митохондриями тканях, включая сердечную мышцу и поперечнополосатую мышечную ткань, а также клетки нервной системы [10].

Для изучения продукции ХН в качестве экспериментальной модели мы использовали мышечные миобласты C2C12, т.к., во-первых, на них получают хорошо воспроизводимые результаты при исследовании развития мышечной ткани *in vitro* [11], и, во-вторых, к настоящему времени помимо человеческого доказано существование мышечного аналога хуманина — хуманиноподобного пептида (ХНПП, mt-RNR) [12, 13].

Цель работы: изучение высвобождения в культуральную среду хуманиноподобного пептида (ХНПП, mt-RNR-пептид) и производных аминокислот при дифференцировке C2C12 миобластов. Задачами исследования являлось определение: 1) стадии дифференцировки миобластов, на которой начинает синтезироваться ХНПП; 2) динамики его образования в сопоставлении с потреблением аминокислот и образованием их производных в ходе дифференцировки в интактной культуре клеток; 3) роли ХНПП в качестве маркера, позволяющего проследить начало и наивысшую активность клеток по образованию митохондрий.

Материал и методы

Культивирование клеток линии C2C12

Клетки линии C2C12 (мышечные миобласты) были любезно предоставлены нашими коллегами из Каролинского Института (Prof. Thomas Sejersen, Group of myopathy research, Karolinska Institutet, Stockholm, Швеция). Клетки высевали в лунки 6-луночного планшета (2×10^5 клеток на лунку в 2 мл среды) и культивировали в ростовой среде DMEM, содержащей 10% инактивированной фетальной бычьей сыворотки (FCS), 1% L-глутамин и 1% пенициллина/стрептомицина (все реагенты Invitrogen, США) в CO_2 -инкубаторе (37 °C, 5% CO_2 , 99% влажность) в течение 72 ч. К окончанию инкубации степень слияния клеток достигала 80% при хорошей адгезии.

Миогенная дифференцировка

Миогенную дифференцировку клеток проводили по методике, описанной в работе P. Keige и соавт. (2013) [14]. После 72 ч. инкубации клеток в ростовой среде ее отсасывали и брали для анализа. Клетки промывали подогретым фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и заливали 2 мл дифференцировочной

среды, состоящей из питательной среды DMEM, содержащей 2% лошадиной сыворотки (horse serum, HS) (Gibco, США), 1% L-глутамин и 1% пенициллина/стрептомицина. Забор для анализа дифференцировочной среды и полную ее смену после промывания PBS производили через каждые 48 ч. (один раз через 72 ч.). Таким образом, были получены образцы культуральной среды на 0 (индукция), 2, 4, 7, 9 и 11 сут. дифференцировки, состав которых сравнивали с составом соответствующих исходных сред — ростовой (0 сут.), либо дифференцировочной (остальные сут.). Образцы сред сразу замораживали и хранили до анализа при -80 °C. Контроль миогенной дифференцировки клеток проводили с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания тяжелых цепей миозина. Дизайн эксперимента представлен на рис. 1А.

Количественное определение аминокислот

Спектр из 22 аминокислот, 15 из которых являются компонентами среды DMEM, а 7 других (аланин, гомоаргинин (γArg), цитруллин, орнитин, аспартат, глутамат, аспарагин) образуются в ходе метаболизма клеток, количественно определяли в культуральной среде методом обращенно-фазного ВЭЖХ-анализа на хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США) по разработанной нами технологии, подробно описанной в патенте [15]. Были использованы колонка Zorbax Eclipse AAA C18 (150×4,6 мм, диаметр зерен 3,5 мкм) и ортофталевый альдегид (Agilent Technologies, США) для предколоночной дериватизации. Концентрации аминокислот рассчитывали, используя норвалин в качестве внутреннего стандарта.

Иммунофлуоресцентный анализ

Для проведения иммуноцитохимического исследования клетки фиксировали 4% параформальдегидом при +4 °C в течение 10 мин., затем в течение 5 мин. инкубировали с 0,2% раствором Тритона X-100 для повышения проницаемости мембран, а далее блокировали неспецифическое связывание путем 30-мин. инкубации в 15% растворе FCS в PBS. Инкубацию с моноклональными первичными антителами к тяжелым цепям миозина MAB4470 (R&D, США) проводили в течение 1 ч. при комнатной температуре, после чего в течение 45 мин. инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 546 (Molecular probes, США). Ядра окрашивали 4',6-диамидино-2'-фенилиндолом (DAPI; Molecular probes, США). Промежуточную отмывку клеток между этапами окраски осуществляли PBS.

Определение мышечного ХНПП

Уровень мышечного ХНПП в культуральной среде определяли с помощью коммерческих наборов реактивов для иммуноферментного анализа производства CLOUD-CLONE CORP, США, поставщик НПО «Иммунотэкс», <http://belkiantitela.rf/>, Россия. Производство наборов, поставляемых НПО «Иммунотэкс», сертифицировано по ISO-13485 и ISO-9001. Все использованные нами наборы были поставлены в теплоизолирующих контейнерах с хладагентами, сохранившими требуемое охлаждение вплоть до вскрытия контейнеров в лаборатории.

Статистический анализ

Высвобождение (+) аминокислот в культуральную среду или их потребление (–) из среды рассчитывали по формуле:

$$(C_{\text{обп.}} - C_{\text{ср.}}) * 2 / t,$$

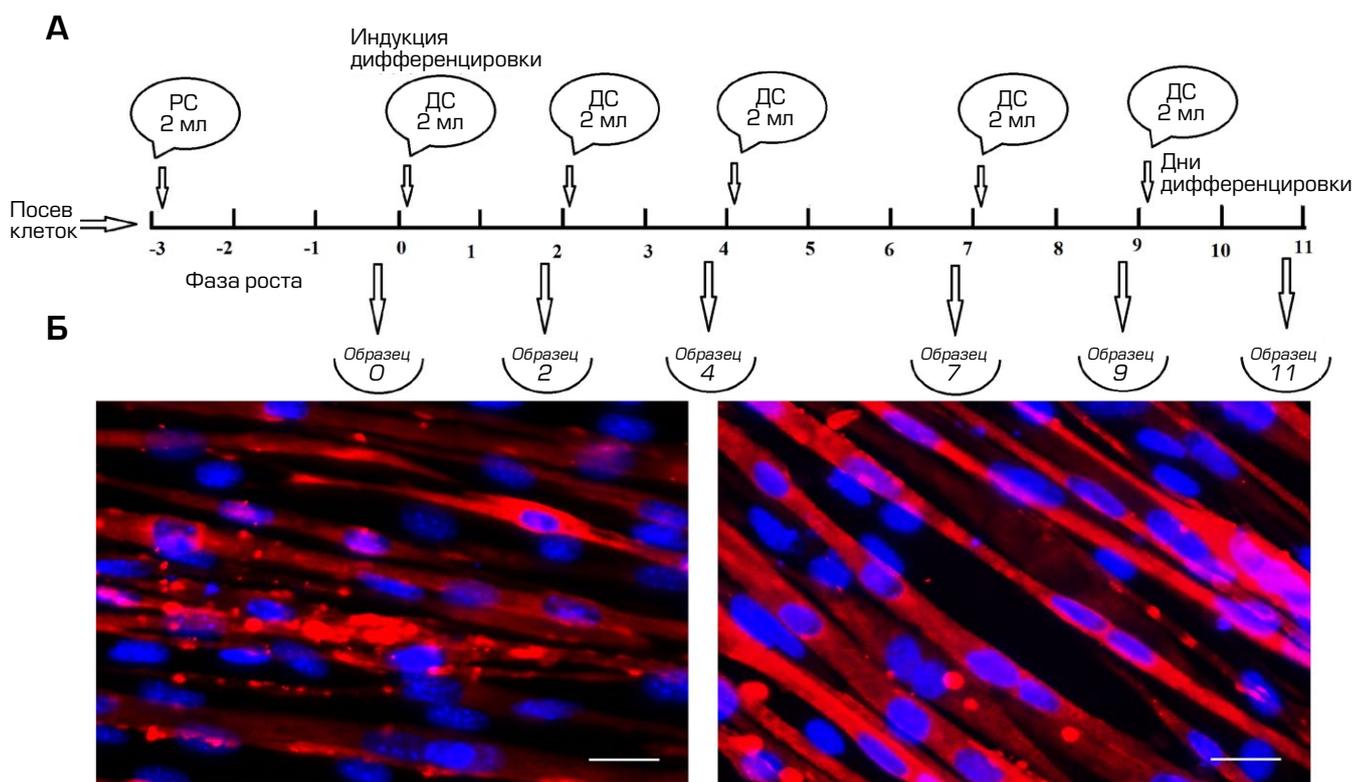


Рис. 1. Дизайн эксперимента (А) и миотубы в C2C12 клетках через 72 ч. (слева) и 7 сут. (справа) дифференцировки (Б). РС — ростовая среда, ДС — дифференцировочная среда. Иммунофлуоресцентная реакция с антителами к тяжелым цепям миозина, доокраска ядер — DAPI. Масштабный отрезок — 25 мкм.

где $C_{обр.}$ — концентрация аминокислоты в опытном образце (нмоль/мл), $C_{ср.}$ — концентрация аминокислоты в соответствующей исходной среде (нмоль/мл), t — время инкубации (сут.), 2 — объем среды (мл). Скорость продукции/потребления аминокислот выражали в нмоль/сут. на 2×10^5 первично посеянных клеток. Данные представлены как среднее значение \pm ошибка среднего значения из двух независимых экспериментов, каждый с тремя параллельными ($n=6$). Соответствие данных нормальному распределению проверяли с помощью теста Шапиро-Уилка. Достоверность различий оценивали с помощью t -критерия, поскольку все данные имели нормальное распределение. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Statistica 10.

Результаты

Культуральные среды на основе DMEM, согласно формуляру, содержат избыточные количества всех незаменимых и нескольких заменимых (глутамин, серин, глицин, тирозин, цистеин) аминокислот. Тем не менее, аминокислотные составы ростовой и дифференцировочной сред несколько различаются (табл.), прежде всего, за счет различного количества сывороточных добавок и их источника (10% FCS в ростовой среде и 2% HS в дифференцировочной). Заменимые аминокислоты, за исключением перечисленных выше, содержатся в средах в небольших количествах, производные аргинина — цитруллин, гомоаргинин (гArg) и орнитин, — обнаруживаются в ростовой среде в минимальных количествах, а в дифференцировочной среде не выявляются.

Таблица. Возрастные концентрации аминокислот (АК) в среде (+) или потребление из среды (–) в сравнении с концентрациями АК в исходных средах. Показатель на сроке 0 сут. (индукция дифференцировки) сравнивали с составом ростовой среды (РС), а данные остальных сроков наблюдения — с составом дифференцировочной среды (ДС).

АК	Концентрации АК (μM)		Сдвиг концентраций АК (μM), M(m)					
	РС	ДС	Суток дифференцировки					
			0	2	4	7	9	11
Ала	116 (4)	8 (2)	217 (51) $p_{4,9,11} < 0,008$	411 (59) $p_9 = 0,001$	504 (42) $p_9 = 0,01$	390 (80) $p_9 = 0,037$	820 (114)	560 (28)
Арг	412 (12)	406 (17)	29 (68) $p_{all} > 0,05$	-63 (25) $p_{11} < 0,05$	-12 (28)	-35 (47)	53 (61)	33 (27)
Глн	3753 (82)	4011 (101)	-713 (293) $p_{2,4,7} < 0,001$	-2334 (70) $p_{9,11} < 0,01$	-2449 (91) $p_{9,11} < 0,003$	-2642 (195) $p_{11} < 0,02$	-1400 (406)	-1729 (152)
Гли	453 (17)	395 (15)	93 (114) $p_{all} > 0,05$	175 (73)	153 (51) $p_9 = 0,037$	105 (48)	408 (100)	247 (39)

АК	Концентрации АК (μM)		Сдвиг концентраций АК (μM), $M(m)$					
	РС	ДС	Суток дифференцировки					
			0	2	4	7	9	11
Иле	640 (21)	668 (27)	138 (103) $p_{2,4} < 0,01$	-133 (29) $p_{9,11} < 0,02$	-106 (23) $p_{9,11} < 0,03$	-149 (85)	134 (117)	9 (37)
Лей	900 (25)	770 (30)	79 (150) $p_{\text{all}} > 0,05$	-99 (28) $p_{9,11} < 0,007$	-53 (46) $p_{9,11} < 0,04$	-74 (88)	296 (150)	140 (57)
Лиз	800 (31)	829 (40)	301 (172) $p_2 < 0,03$	-39 (40) $p_{9,11} < 0,02$	-11 (67) $p_9 = 0,03$	-87 (103)	343 (140)	170 (64)
Сер	483 (23)	436 (17)	22 (76) $p_{2,4} < 0,02$	-170 (20) $p_{9,11} < 0,004$	-167 (23) $p_{9,11} < 0,007$	-168 (33) $p_{9,11} < 0,04$	43 (59)	-20 (28)
Вал	721 (21)	777 (20)	236 (124) $p_{2,4} < 0,02$	-102 (34) $p_{9,11} < 0,007$	-39 (30) $p_{9,11} < 0,02$	-108 (122)	347 (168)	143 (47)

Результаты, представленные в таблице, показывают, что из незаменимых аминокислот интенсивнее всех потребляются аминокислоты с разветвленной цепью — Вал, Лей, Иле вплоть до 7 сут. дифференцировки, а далее наблюдается их высвобождение в среду. На 9 сут. дифференцировки концентрации незаменимых аминокислот превышают их содержание в исходной дифференцировочной среде приблизительно в 1,3 раза (табл.). Динамика изменения их уровня в процессе дифференцировки однотипна. Использование этих аминокислот в биосинтетических процессах подтверждается морфологическими данными: образование значительных количеств миозина отмечается через 72 ч. после индукции дифференцировки, а к 7 сут. он принимает более упорядоченный характер в составе миофибрилл (рис. 1Б).

Динамика изменения уровня заменимых аминокислот, которые участвуют в энергетическом метаболизме, в ходе миогенной дифференцировки C2C12 миобластов выглядит иначе. Высокая исходная концентрация глутамина (Глн, 4000 μM) падает примерно в 2 раза после каждой смены среды, включая 9 и 11 сут. дифференцировки (табл.). Аланин же, присутствующий в дифференцировочной среде в минимальных количествах, постоянно высвобождается в среду в высоких концентрациях на протяжении всего эксперимента.

Динамика изменения содержания в среде производных аргинина (гАрг и орнитина) в течение первых двух сут. дифференцировки имеет сходный характер, их максимальное количество зафиксировано на вторые сут. (рис. 2). Следует отметить, что динамика изменений уровня гАрг в среде выявляется с большей достоверностью, чем орнитина или любых исходных аминокислот в составе питательных сред (табл.). На четвертые сут. дифференцировки количество гАрг в среде значительно снижается по сравнению с его содержанием на вторые сут. дифференцировки и далее его накопление поддерживается на очень низком уровне. Отмечается взаимная корреляция суточной продукции гАрг и орнитина ($r=0,53$; $p=0,008$).

Обращает на себя внимание необычно высокий уровень высвобождения большинства аминокислот (за исключением Глн) на 9–11 сут. эксперимента, что указывает на протеолиз белков и деградацию культуры. Таким образом, по данным изучения динамики уровней аминокислот миогенная дифференцировка в условиях использования культуральной среды DMEM продолжается до 7 сут., а затем наблюдаются признаки деградации миоцитов.

Динамика высвобождения ХНПП в культуральную среду быстро нарастая, в отличие от гАрг, продолжается до 4 сут., достоверно не отличаясь от его высвобождения

на вторые сут. (рис. 2) Уровень секреции этого пептида до индукции дифференцировки (0 сут.) составляет 84 ± 21 пг/сут. на 2×10^5 высаженных клеток, повышается ко вторым сут. после индукции дифференцировки почти в 3 раза (244 ± 27 пг/сут., $p=0,0082$) и сохраняется до 4 сут. эксперимента. Начиная с 7 сут. наблюдается достоверное снижение его выделения в среду (ниже 50 пг/сут.), что свидетельствует о торможении образования и функционирования митохондрий в период между 4 и 7 сут. эксперимента.

Обсуждение

Мониторинг дифференцировки клеточных культур требует информативных маркеров состояния метаболизма клеток. Предложены различные методы контроля, предусматривающие определение убыли компонентов сред, в том числе аминокислот [4, 5]. Наибольшее значение в мониторинге дифференцировки клеточных культур отводится динамике потребления глутамина и высвобождения отсутствующего в исходной среде аланина [5]. Высвобождение в среду аланина, начиная с 2 сут. дифференцировки, остается стабильно высоким, благодаря его образованию в ходе реакций трансаминирования из пировиноградной кислоты, которая присутствует в среде в высокой концентрации (1000 μM).

Потребление незаменимых аминокислот по полученным нами данным, регистрируемое вплоть до 7 сут. дифференцировки, закономерно объясняется их участием в синтезе специфических мышечных белков, например, миозина. Пик их потребления приходится на 2 сут. дифференцировки, что соответствует максимальному количеству миозина по данным иммуноцитохимии (рис. 1Б). Однако использовать оценку уровня потребления незаменимых аминокислот (например, с разветвленной цепью) для мониторинга дифференцировки клеточных культур неудобно, поскольку существует значительная вариабельность данных, связанная с большими количествами этих аминокислот в формуляре среды [5]. Высвобождение в среду больших количеств как заменимых, так и незаменимых аминокислот (за исключением Глн), отмеченное нами на 9–11 сут. дифференцировки, может быть расценено как признак активации апоптоза, что является характерным для высокодифференцированных C2C12 миобластов [16].

Динамика потребления аргинина, которая относится к заменимым аминокислотам у мышей, на модели миогенной дифференцировки C2C12 миобластов сходна с динамикой потребления незаменимых аминокислот с разветвленной цепью (табл.).

В ходе экспериментов показано, что высвобождение производных аргинина в культуральную среду может

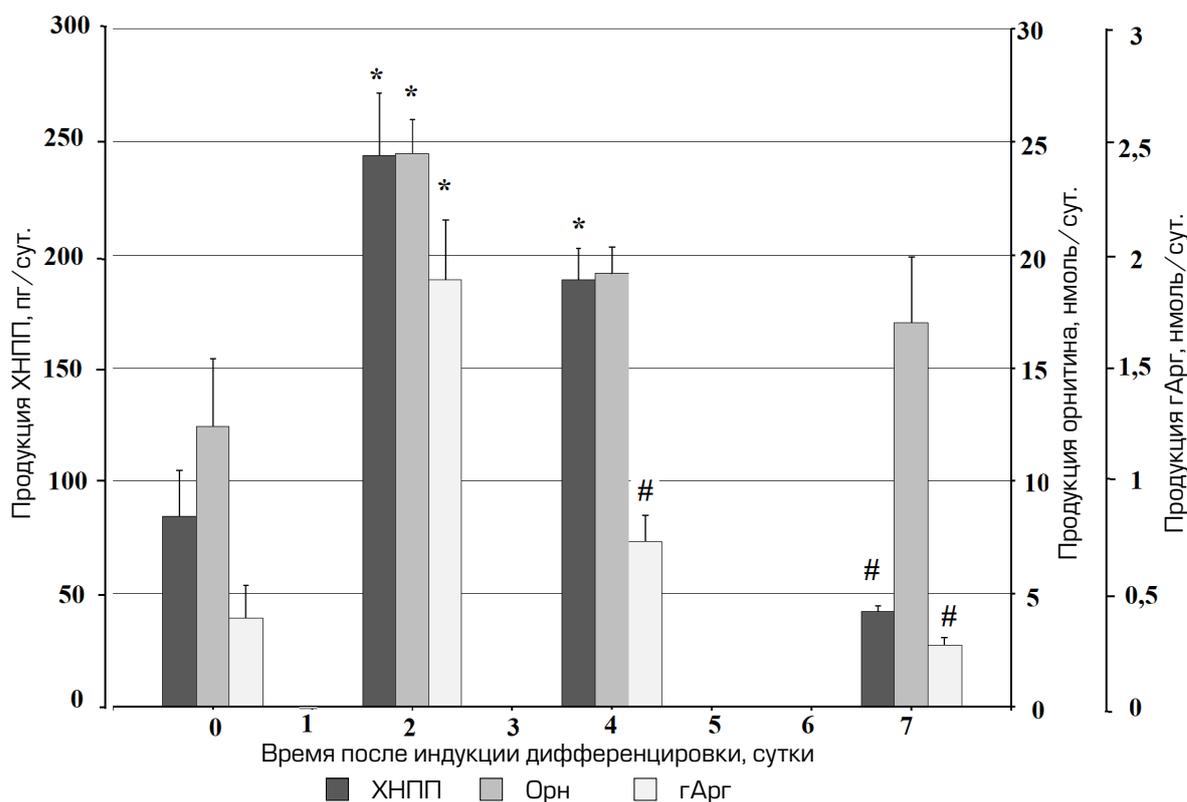


Рис. 2. Скорость высвобождения гомоаргинаина (гАрг), орнитина (Орн) и ХНПП в среду в процессе дифференцировки С2С12 миобластов. * различия статистически значимы по сравнению с показателями на сроке 0 сут.; # различия статистически значимы по сравнению с показателями на сроке 2 сут.

быть определено с большей достоверностью, чем потребление исходных аминокислот из среды, в том числе глутамина. Из образующихся производных аргинина наиболее достоверные сдвиги обнаружены в отношении гАрг по сравнению с орнитином и цитруллином. При этом значительно более высокую достоверность прироста гАрг можно, вероятно, объяснить тем, что его участие в метаболизме клеток весьма невелико, в отличие от орнитина или цитруллина [17]. Обнаруженная корреляция между уровнями гАрг и орнитина, но не цитруллина, возможно, объясняется тем, что гАрг и орнитин могут образовываться в одной и той же реакции, катализируемой ферментом аргинин:глицинамидинотрансферазой (АГАТ, КФ 2.1.4.1), который необходим для биосинтеза креатина. Максимум продукции гАрг на 2 сут. дифференцировки соответствует по времени синтезу максимального количества миозина (рис. 1Б и 2). В дальнейшем, с 7 по 11 сут., синтез гАрг резко замедляется в связи с гибелью клеток. Таким образом, образование гАрг, происходящее на ранних стадиях дифференцировки, является информативным маркером этого процесса, а динамика изменения уровня гАрг позволяет проследить процесс дифференцировки в культуре клеток, не затрагивая клеточный материал. Образование гАрг и его накопление в культуральной среде в процессе миогенной дифференцировки миобластов вплоть до 4 сут. дифференцировки, предположительно в результате экспрессии гена *Gatm* и синтеза фермента АГАТ, начинается в ранний период после индукции дифференцировки и предшествует образованию миофибрилл. Имеются данные о том, что синтез АГАТ может происходить в эмбриональной мышечной ткани [18, 19], но не в высокодифференцированных миоцитах. В связи с этим уже к 4 сут. в нашем эксперименте наблюдается снижение высвобождения гАрг в культуральную среду. Важно отметить, что уровень ХНПП существенно понижается значительно позднее начала образования миофибрилл, то есть после

образования миоцитов. Как известно, снижение функциональной активности митохондрии клеток сопровождается снижением секреции этого пептида [20, 21], что ведет к снижению митохондриального аэробного пути пополнения энергоресурсов клетки. В настоящем исследовании показано, что к 7 сут. развития культуры миобластов наблюдается примерно двукратное снижение суточного накопления ХНПП в культуральной среде (рис. 2).

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы:

1) появление в среде ХНПП со вторых сут. дифференцировки является ранним маркером метаболической активности дифференцирующихся миобластов;

2) понижение уровня ХНПП в среде к 7 сут. происходит на фоне деградации уже дифференцированных миоцитов. Мы считаем целесообразным проводить оценку начала дифференцировки в клеточной культуре не по уровню потребления незаменимых аминокислот, присутствующих в культуральной среде в высоких концентрациях, а по образованию аминокислот-продуктов специализированных метаболических путей, к числу которых относятся гАрг и орнитин;

3) после завершения дифференцировки специфическая функциональная активность миоцитов зависит, прежде всего, от состояния метаболизма митохондрий, что представляется возможным оценивать по уровню выделяемого в среду ХНПП.

Благодарности

Авторы выражают благодарность менеджменту ПСПбГМУ им. И.П. Павлова. Исследование выполнено в рамках выполнения государственного задания и при поддержке гранта РФФ 14-15-745П.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Lewis M.R., Lewis W.H. Mitochondria in tissue culture. *Science. New Series* 1914; 39(1000): 330–3.
2. Fujioka H., Tandler B., Consolo M.C. et al. Division of mitochondria in cultured human fibroblasts. *Microscopy research and technique* 2013; 76: 1213–6.
3. Carrillo-Cocom L.M., Genel-Rey T., Araíz-Hernández D. et al. Amino acid consumption in naïve and recombinant CHO cell cultures: producers of a monoclonal antibody. *Cytotechnology* 2015; 67(5): 809–20.
4. Salazar A., Keusgen M., von Hagen J. Amino acids in the cultivation of mammalian cells. *Amino Acids* 2016; 48: 1161–71.
5. Hong P., Wheat T.E., Mazzeo J.R. et al. Monitoring cell culture media with the Waters amino acid analysis solution. *Waters Applications Notebook*; 2007, <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002381en.pdf>.
6. Lee C., Yen K., Cohen P. Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides? *Trends Endocrinol. Metab.* 2013; 24(5): 222–8.
7. Luciano F., Zhai D., Zhu X. et al. Cytoprotective peptide humanin binds and inhibits proapoptotic bcl-2/bax family protein bimEL. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 15825–35.
8. Remor A.P., de Matos F.J., Ghisoni K. et al. Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: involvement of advanced glycosylated end products. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011; 1812(11): 1460–71.
9. Bodzioch M., Lapicka-Bodzioch K., Zapala B. et al. Evidence for potential functionality of nuclearly-encoded humanin isoforms. *Genomics* 2009; 94(4): 247–56.
10. Биоинформационная база данных Uniprot [Электронный ресурс]. Available at: <http://www.uniprot.org/uniprot/G81VG9> (accessed 23 may 2018).
11. Yaffe D., Saxel O. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation a myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation* 1977; 7(3): 159–66.
12. Niikura T., Sidahmed E., Hirata-Fukae C. et al. A humanin derivative reduces amyloid beta accumulation and ameliorates memory deficit in triple transgenic mice. *PLoS ONE.* 2011; 6(1): e16259.
13. Oh Y.K., Bachar A.R., Zacharias D.G. et al. Humanin preserves endothelial function and prevents atherosclerotic plaque progression in hypercholesterolemic ApoE deficient mice. *Atherosclerosis* 2011; 219(1): 65–73.
14. Keire P., Shearer A., Shefer G. et al. Isolation and culture of skeletal muscle myofibers as a means to analyze satellite cells. *Meth. Mol. Biol.* 2013; 946: 431–68.
15. Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Шипаева К.А. Способ определения содержания гомоаргина в плазме крови и других биологических жидкостях человека. Патент РФ на изобр. № 2609873. 06 февраля 2017.
16. Burattini S., Ferri P., Battistelli M. et al. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *Eur. J. Histochem.* 2004; 48(3): 223–33.
17. Hou Y., Hu S., Jia S. et al. Whole-body synthesis of L-homoarginine in pigs and rats supplemented with L-arginine. *Amino Acids* 2016; 48: 993–1001.
18. Braissant O., Henry H., Villard A.M. et al. Creatine synthesis and transport during rat embryogenesis: spatiotemporal expression of AGAT, GAMT and CT1. *BMC developmental biology.* 2005; 5: 9.
19. Sandell L.L., Guan X.J., Ingram R., Tilghman S.M. Gatm, a creatine synthesis enzyme, is imprinted in mouse placenta. *PNAS USA* 2003; 100(8): 4622–7.
20. Nashine S., Cohen P., Chwa M. et al. Humanin G (HNG) protects age-related macular degeneration (AMD) transmitochondrial ARPE-19 cybrids from mitochondrial and cellular damage. *Cell Death Dis.* 2017; 8(7): e2951.
21. Herst P.M., Rowe M.R., Carson G.M. et al. Functional mitochondria in health and disease. *Front. Endocrinol.* 2017; 8: 296.

Поступила: 10.04.2018

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ОБШИРНОЙ РЕЗЕКЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В.С. Рудаков¹, Р.В. Деев², К.К. Губарев¹, Т.А. Астрелина¹, И.И. Еремин³,
Ю.А. Жгутув¹, Е.И. Онницев⁴, М.О. Мавликеев⁵, А.А. Титова⁵, С.Э. Восканян¹

¹ Государственный научный центр «Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России, Москва, Россия

² Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова Минздрава России, Рязань, Россия

³ Центральная клиническая больница с поликлиникой управления делами президента, Москва, Россия

⁴ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

EFFECT OF TRANSPLANTATION OF ALLOGENEIC MULTIPOTENT MESENCHYMAL BONE MARROW STROMAL CELLS ON REGENERATION OF LIVER AFTER EXTENDED HEPATECTOMY (EXPERIMENTAL STUDY)

V.S. Rudakov¹, R.V. Deev², K.K. Gubarev¹, T.A. Astrelina¹, I.I. Eremin³, Yu.A. Zhgutov¹, E.I. Onnitsev⁴,
M.O. Mavlikeyev⁵, A.A. Titova⁵, S.E. Voskanyan¹

¹ A.A. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² N.I. Pavlov Ryazan Medical University, Ryazan, Russia

³ Central Clinical Hospital with Polyclinics of Administration of President of the Russian Federation, Moscow, Russia

⁴ S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg, Russia

⁵ Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

e-mail: Rudakov_VC@list.ru

Мультipotентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) могут быть рассмотрены как основа биомедицинского клеточного продукта для лечения острой печеночной недостаточности. Цель исследования заключалась в оценке влияния ММСК, введенных в нижнюю полую вену, на пролиферативную активность гепатоцитов и морфометрические критерии регенерации печени после резекции 68 % её объема у крыс. В работе оценивали количество митозов, долю PCNA-позитивных клеток, диаметр ядра гепатоцитов, площадь гепатоцитов, ядерно-цитоплазматическое соотношение (ЯЦС), размер печеночных долек на 1, 2, 4, 14 сутки после операции. Результаты исследования показали, что внутривенное введение 2,5 млн аллогенных ММСК костного мозга (КМ) в нижнюю полую вену после расширенной резекции печени увеличивает количество пролиферирующих гепатоцитов (PCNA-позитивных клеток), но не влияет на количество фигур митозов, диаметр ядра, площадь гепатоцитов, ЯЦС и печеночной дольки, что, вероятно свидетельствует в пользу регенерации, протекающей в изученные сроки на внутриклеточном уровне.

Ключевые слова: обширная резекция печени, трансплантация, мультipotентные мезенхимальные стромальные клетки, нижняя полая вена.

Введение

Известно, что острая печеночная недостаточность (ОПН) в большинстве случаев возникает вследствие токсического и вирусного повреждения печени, а также развивается после обширной резекции этого органа и проявляется острой утратой функций печени, которая приводит к желтухе, коагулопатии и печеночной энцефалопатии. Без лечения ОПН может привести к полиорганной недостаточности, коме и смерти [1]. Ортопическая трансплантация печени является операцией выбора при тяжелой ОПН, однако нехватка органов ограничивает возможность применения этой операции [2]. Кроме этого, пожизненное применение иммуносупрессантов после трансплантации печени сопряжено с высоким риском развития побочных эффектов (артериальной гипертензии, почечной недостаточности, опухоли,

Multipotent mesenchymal stromal cells can be a drug for treatment of acute liver failure. The purpose of this study was to assess the effect of multipotent mesenchymal stromal cells on the proliferative, mitotic activity of hepatocytes and morphometric criteria for the regeneration of liver parenchyma after 68 % partial hepatectomy in rats. The number of mitosis, PCNA positive cells, diameter of nucleus of hepatocytes, size of hepatocytes, nuclear-cytoplasmic ratio (NCR), the area of hepatic lobules were evaluated on 1, 2, 4, 14 days after surgery. The results of the study showed that intravenous administration of allogeneic mesenchymal multipotent stromal cells from bone marrow after extended hepatectomy increase the number of proliferating hepatocytes (PCNA positive cells), but does not affect the number of mitoses, the diameter of the nucleus, the area of hepatocytes, NCR and hepatic lobules. Probably, at this time, regeneration proceeds primarily through an intracellular mechanism.

Keywords: extended hepatectomy, transplantation, multipotent mesenchymal stromal cells, inferior vena cava.

инфекции и т. д.) [3]. Указанные обстоятельства и высокие затраты на трансплантацию и лечение в послеоперационном периоде привели к поиску дополнительных методов лечения ОПН.

Количество экспериментальных методик применения стромальных клеток (включая ММСК, полученных из костного мозга (КМ)) за последние годы существенно возросло. Их эффективность была показана при хронической и острой печеночной недостаточности как в экспериментах, так и в инициативных клинических исследованиях [4]. В отличие от гепатоцитов, они легкодоступны и могут быть успешно культивированы *in vitro* [4]. Кроме того, при применении аутогенных клеток нет потребности в применении иммуносупрессантов [4]. Механизмы, с помощью которых ММСК оказывают положительное влияние на регенерацию печени, полностью не изучены.

Предполагается, что они могут участвовать в клеточной регенерации печени, слиянии с гепатоцитами и (или) секреции паракринных факторов, которые стимулируют деление клеток, ингибируют апоптоз или модулируют местные и системные воспалительные реакции [5].

В настоящем исследовании мы оценивали влияние аллогенных ММСК КМ на пролиферативную активность гепатоцитов и регенерацию печени после обширной резекции.

Материал и методы

Дизайн исследования

Исследование выполнено на 63 крысах — самцах породы Вистар массой 155–185 г. Медиана массы крыс составила 173 г. Животных содержали в виварии ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России в одинаковых условиях при постоянной температуре окружающей среды, кормление производили стандартным лабораторным кормом. Помещение, в котором находились животные, вентилировалось с постоянным контролированием давления воздуха и температуры, соблюдали суточный цикл (12 часов день/ночь). Накануне операции крыс не кормили, все манипуляции выполняли в период с 7.30 до 10.30. Крыс выводили из эксперимента декапитацией под в/м наркозом раствором Золетила из расчета 15 мг/кг массы тела животного. Эксперимент проводили и завершали в соответствии с требованиями Хельсинской конвенции о гуманном обращении с экспериментальными животными (1975). Эксперимент одобрен этическим комитетом ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России (протокол № 1 от 20 июня 2012).

Животные подразделены на 2 группы: 1 — контрольная (n=28), крысам которой выполняли резекцию 70% печени без трансплантации аллогенных ММСК КМ в нижнюю полую вену (НПВ); 2 — экспериментальная группа (n=28), выполняли резекцию 70% печени с трансплантацией 2,5 млн аллогенных ММСК КМ в НПВ. 7 крыс из 1 и 2 групп были использованы для определения морфометрических показателей печени в норме (на 0 сутки, до резекции 70% печени), им выполнена лапаротомия, взятие фрагмента органа на исследование, а также бедренной кости для получения ММСК КМ.

Животным в обеих группах выполнена резекция 70% печени по стандартной методике [6], в НПВ введено 0,5 мл 0,9% раствора NaCl (BBraun, Германия), в экспериментальной группе с данным раствором вводили 2,5 млн аллогенных ММСК КМ в НПВ. В последующем по 7 крыс выводили из эксперимента на 1, 2, 4, 14 сут. эксперимента, оценивали количество митозов, PCNA-позитивных клеток, диаметр ядра гепатоцитов, площадь гепатоцитов, ЯЦС, размер печеночных долек. Выбор сроков выведения из эксперимента был выполнен с учетом пиков синтеза ДНК в клетках печени [8].

Получение ММСК КМ

ММСК получены из КМ бедренных костей крыс по стандартной методике [7]. Центрифугирование выполняли в течение 7 мин. при 300 g. Состав культуральной среды — DMEMF12 + 10% FBS (BioInd, Индия) + пенициллин 100 ед/мл + стрептомицин 100 мг/мл + L-глутамин 2 мл. В эксперименте использованы клетки третьего пассажа. Фенотип ММСК подтвержден при помощи проточной цитометрии при использовании стандартной (для ММСК) панели антител.

Протокол операции

Резекция 68% печени у крыс выполнена по методике G.M. Higgins, R.M. Anderson [6]. Под в/м анестезией

раствором Золетила из расчета 15 мг/кг веса выполняли верхнюю срединную лапаротомию (разрез длиной 3–4 см). Срединную и левую латеральную доли печени выводили в рану, долевые сосуды перевязывали у основания и доли удаляли. Удаленная часть составляла 2/3 (67–70%) от общей массы печени. Лапаротомный разрез ушивали наглухо непрерывным швом.

Определение количества митозов

Материал фиксировали в 4% забуференном формальдегиде в течение 24 часов, затем заливали в парафин по стандартной методике, парафиновые срезы толщиной 4–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Определяли суммарное количество фигур митоза в 5 полях зрения при увеличении $\times 400$. Все измерения производили в программе AxioVision 4.8 (Carl Zeiss AG, Германия).

Определение диаметра ядра гепатоцитов

Диаметр ядра измеряли полуавтоматическим методом после окраски препаратов гематоксилином и эозином в 5 полях зрения при увеличении $\times 400$.

Определение площади гепатоцитов

Площадь гепатоцитов определяли полуавтоматическим методом после окраски препаратов гематоксилином и эозином в 5 полях зрения при увеличении $\times 400$.

Определение ядерно-цитоплазматического соотношения (ЯЦС)

ЯЦС в % высчитывали по формуле $S_{\text{я}}/S_{\text{ц}} \times 100$. Где $S_{\text{я}}$ — площадь ядра клетки, $S_{\text{ц}}$ — площадь цитоплазмы (гепатоцита). $S_{\text{я}} = 1/4 \times \pi \times d^2$. Где d — диаметр ядра. Значение $\pi = 3,1415926$.

Определение площади печеночных долек

Классическую печеночную дольку представили в виде правильного шестиугольника, в центре которого располагается центральная вена, а по углам — портальные тракты. Площадь правильного шестиугольника вычисляли по формуле: $S = 3 \times l^2 \times \sqrt{3} / 2$, где S — площадь шестиугольника, l — длина одной из сторон шестиугольника (измеряли расстояние между двумя близлежащими портальными трактами). Проводили измерение не менее 25 портопортальных расстояний.

Определение доли PCNA-позитивных клеток

Парафиновые срезы печени крысы окрашивали иммуногистохимически с антителами к ядерному антигену пролиферирующих клеток (Proliferating cell nuclear antigen — PCNA) (клон PC10, DAKO, Denmark; разведение 1:100). Детекцию результатов иммуногистологической реакции проводили стрептавидин-биотиновым методом (LSAB), визуализацию производили с помощью 3-аминоэтил-9-карбазола (АЭК), ядра докрашивали гематоксилином. Высчитывали среднее процентное соотношение количества PCNA-позитивных ядер к общему количеству ядер в 5 полях зрения при увеличении $\times 400$.

Статистический анализ

Статистическая обработка полученных данных выполнена с помощью программного обеспечения SPSS 22 для Windows. Количественные данные представляли в виде медианы и межквартильного размаха. Для сравнения значений количественных признаков в независимых группах использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия признавали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

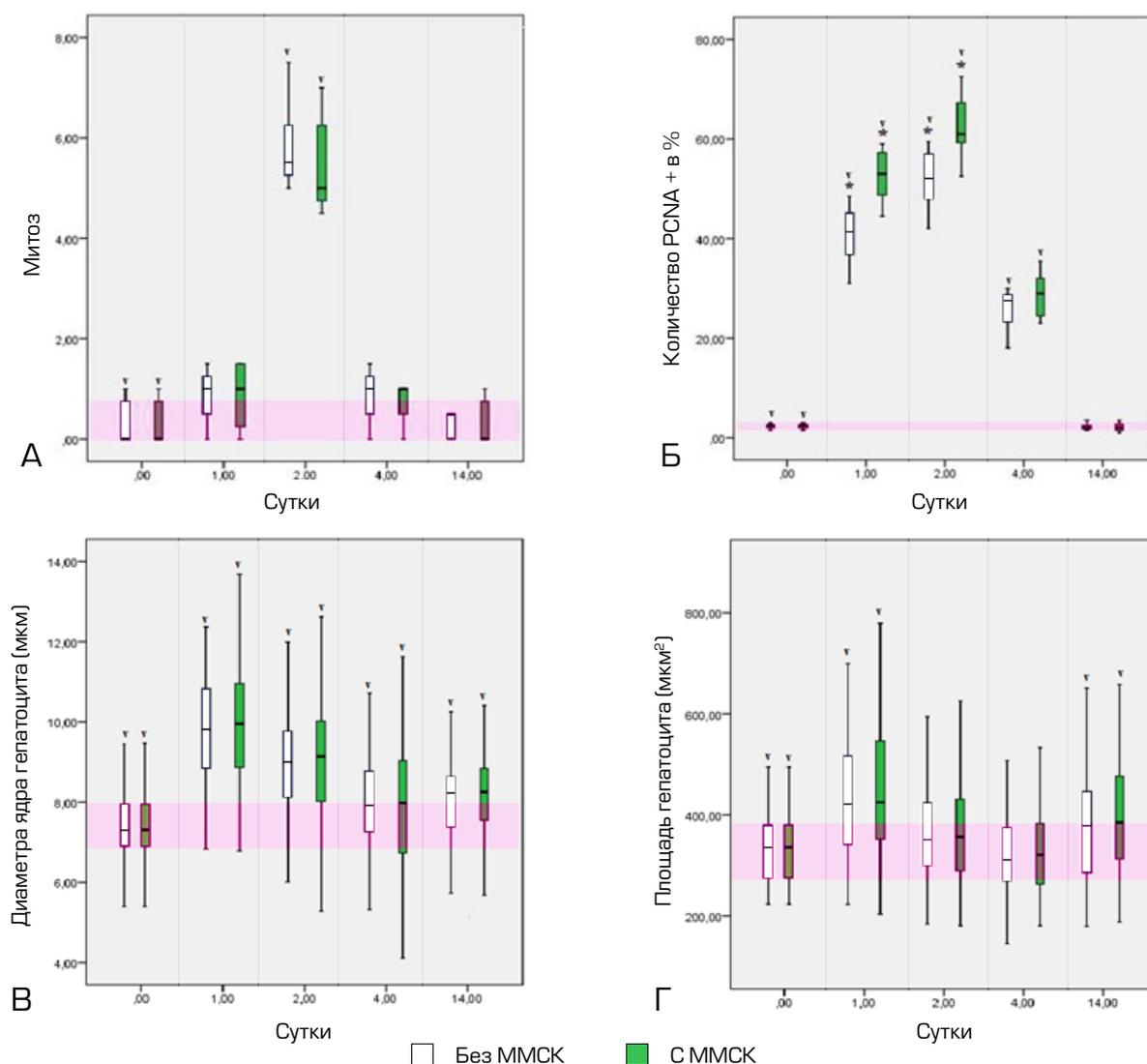


Рис. 1. Количество фигур митозов (А), доля PCNA-позитивных (%) гепатоцитов (Б), диаметр ядра (В), площадь гепатоцитов (Г) на разные сроки после операции с применением аллогенных ММСК КМ (зеленый цвет) и без применения ММСК КМ (белый цвет). * — статистически значимый результат между группами ($P < 0,05$); v — статистически значимый результат внутри группы при сравнении с нормой ($P < 0,05$). Розовым цветом отмечен коридор средних нормальных значений (нативный контроль)

Результаты

В ходе эксперимента все крысы перенесли операции удовлетворительно, осложнений и нежелательных реакций не отмечено.

Количество фигур митозов

Пик митозов приходился на 2 сутки как в контрольной, так и в экспериментальной группе, однако статистически достоверных различий при сравнении двух групп не выявлено (рис. 1А, 2). Следовательно трансплантация аллогенных ММСК КМ не влияет на количество митозов после 68% резекции печени.

Количество PCNA-позитивных гепатоцитов

При постановке реакций с антителами к PCNA до выполнения резекции печени была отмечена минимальная пролиферативная активность. В дольках печени наблюдали лишь единичные позитивно окрашенные гепатоциты (рис. 1Б). Однако уже через сутки после операции мы наблюдали резкое нарастание числа делящихся гепатоцитов, максимум их пролиферативной активности приходился на 2 сутки, к 14 суткам отмечали нормализацию внутри каждой группы (см. рис. 1Б, 3). При анализе

между группами выявили статистически достоверное их увеличение в экспериментальной группе на 1 и 2 сутки (на 8–18%) после операции (рис. 1Б, 3).

Таким образом, трансплантация аллогенных ММСК КМ увеличивает количество пролиферирующих гепатоцитов после 70% резекции печени.

Диаметр ядер гепатоцитов

Наибольший диаметр ядра отмечен на 1 сутки в обеих группах. Повышение диаметра ядра внутри групп отмечено на всех сроках после операции. Однако при сравнении между группами статистически значимых различий не было выявлено (рис. 1В), что свидетельствует в пользу того, что трансплантация ММСК КМ не влияет на диаметр ядра гепатоцитов после резекции 68% печени.

Площадь гепатоцитов

Наибольшая площадь гепатоцитов отмечена на 1 и 14 сутки в двух группах. Статистические различия между группами не отмечены на всех сроках после операции (рис. 1Г). Таким образом, трансплантация аллогенных ММСК КМ не влияет на площадь гепатоцитов после резекции 68% печени.

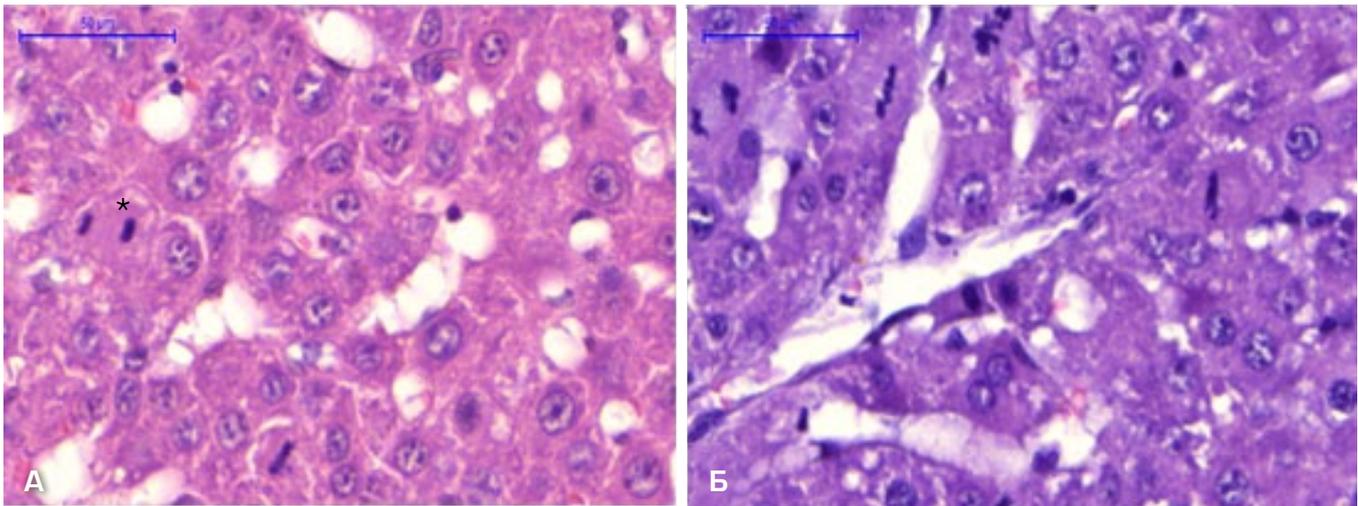


Рис. 2. Срез печени крысы на 2 сутки после резекции 70% печени: А — без применения аллогенных ММСК КМ; Б — с применением аллогенных ММСК КМ. * — фигуры митоза. Окраска гематоксилин и эозин. Ув.: $\times 400$

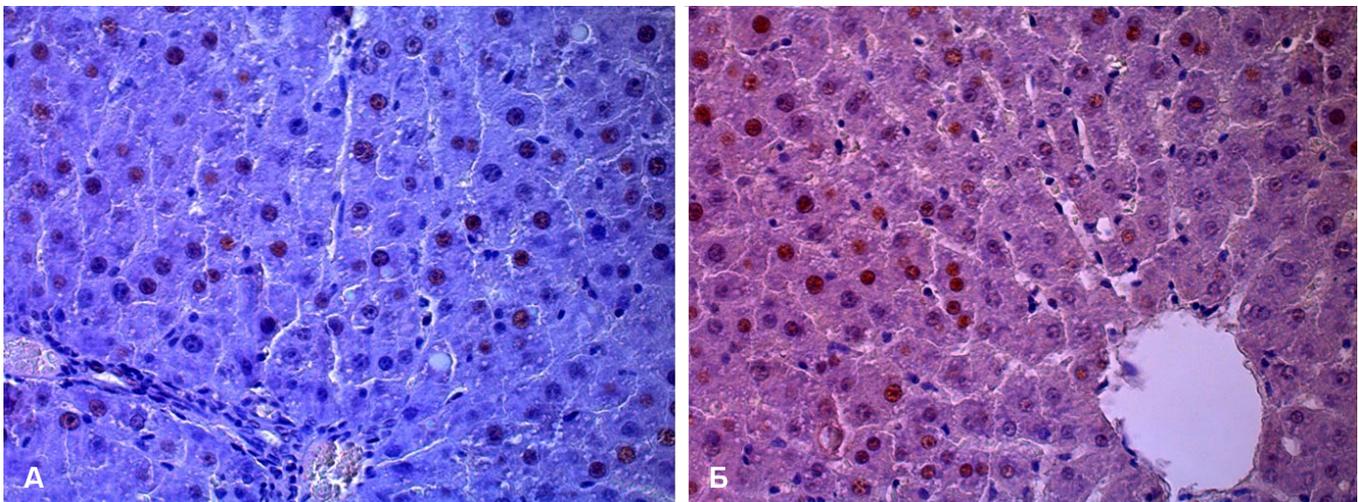


Рис. 3. Срез печени крысы на 2 сутки после резекции 70% печени: А — без применения аллогенных ММСК КМ; Б — с применением аллогенных ММСК КМ. Иммуногистохимическая реакция с антителами к PCNA, докраска — гематоксилин и эозин. Ув.: $\times 200$

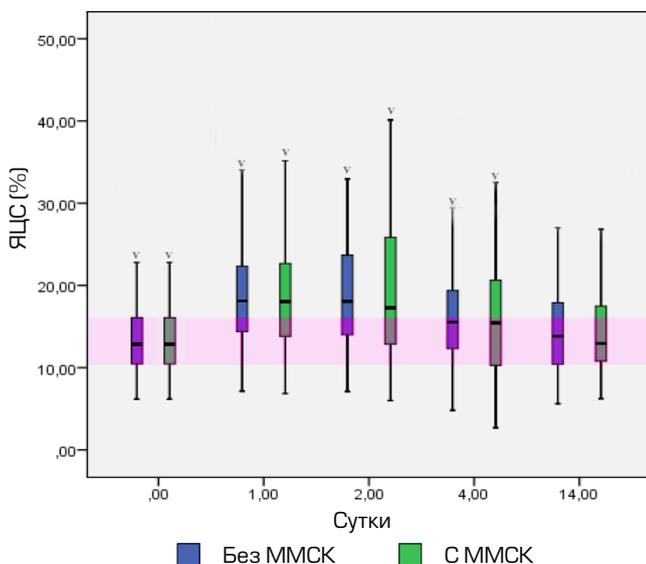


Рис. 4. ЯЦС (%) в сравниваемых группах. v — статистически значимый результат внутри группы при сравнении с нормой ($P < 0,05$). Розовым цветом отмечен коридор средних нормальных значений (нативный контроль)

ЯЦС

Пик ЯЦС отмечен на вторые сутки после операции. Внутри обеих исследуемых групп наблюдали увеличение ЯЦС на 1, 2, 4 сутки после операции (табл. 1, рис. 4). Статистически значимых различий между группами не выявлено.

Площадь печеночных долек

Площадь печеночных долек была больше нормы в 1,5–2 раза на 2 и 4 сутки после операции. Наибольший размер печеночных долек отмечен на 4 сутки после операции внутри двух исследуемых групп, с последующим восстановлением их размеров к 14 суткам (табл. 1). Статистически значимых различий между группами не было выявлено на всех сроках после операции.

Таким образом, трансплантация аллогенных ММСК КМ не влияет на площадь печеночной дольки после резекции 68% печени.

Обсуждение

Биохимические признаки регенерации печени после обширной резекции в эксперименте были показаны ранее [5]. Полученные данные сложно трактовать без морфологического объяснения феноменов, развивающихся в печени после резекции и трансплантации аллогенных

Таблица 1. Оценка площади долики и ЯЦС

Оценка	Сутки	Контрольная группа		Экспериментальная группа		P
		Медиана	Процентили (25%–75%)	Медиана	Процентили (25%–75%)	
Площадь долики (%)*	Норма	100 ^v	60,13–151,86 ^v	100 ^v	60,13–151,86 ^v	—
	1	121,50	79,05–159,77	110,35	65,40–253,07	0,80
	2	177,30 ^v	101,06–322,70 ^v	173,02 ^v	107,95–245,44 ^v	0,66
	4	221,12 ^v	129,11–430,14 ^v	223,07 ^v	131,32–489,79 ^v	0,50
	14	119,79	80,44–239,82	131,79	58,76–225,85	0,50
ЯЦС (%)	Норма	12,84 ^v	10,44–16,07 ^v	12,84 ^v	10,44–16,07 ^v	—
	1	18,12 ^v	14,31–22,33 ^v	18,04 ^v	13,72–22,77 ^v	0,83
	2	18,05 ^v	13,98–23,73 ^v	17,28 ^v	12,83–25,88 ^v	0,84
	4	15,53 ^v	12,31–19,52 ^v	15,44 ^v	10,22–20,63 ^v	0,64
	14	13,81	10,33–18,02	12,94	10,79–17,53	0,540

Примечания: * % от площади долики нормальной печени; v — статистически значимый результат внутри группы (между нормой и выбранными сутками) (P<0,05).

ММСК. Считается, что ММСК могут влиять на восстановление печени 3 основными путями: 1) замена поврежденных и недостающих клеток путем трансдифференцировки в гепатоциты и (или) слияния с гепатоцитами; 2) синтез ростовых факторов и цитокинов; 3) прямое и опосредованное воздействие на Т- и В-лимфоциты, что уменьшает степень активности воспалительного ответа в поврежденной печени [9].

Остается не изученным в какой мере конкретный механизм действия ММСК влияет на полученный результат. Данные, касающиеся выживаемости ММСК после их трансплантации, разнятся и зависят от пути введения клеток, экспериментальной модели и используемого метода маркировки клеток [10]. При использовании модели, аналогичной нашей (резекция 70% печени и внутривенное введение ММСК крысам), меченые ММСК обнаруживали в печени на 3 сутки после операции, они составляли 8% от всех клеток печени [11].

При анализе морфометрических показателей не выявлено статистически значимых отличий между группами при определении количества митозов, диаметра ядра, площади гепатоцитов, ЯЦС и печеночных долек, но выявлены статистические отличия при анализе количества PCNA-позитивных гепатоцитов.

Увеличение размеров печеночных долек внутри группы на 2–3 сутки с последующей нормализацией их размера отмечали и другие авторы [12]. Увеличение печеночных долек связывали с гипертрофией печеночных долек, в то время как уменьшение в первую очередь с разделением гипертрофированных долек [12]. Пролиферацию гепатоцитов рассматривали в качестве единственного механизма увеличения размеров печеночной долики. На наш взгляд, это может также происходить за счет

гипертрофии гепатоцитов (что подтверждается проведенным исследованием, в котором обнаружено увеличение диаметра ядер гепатоцитов и площади гепатоцитов), отека стромы и расширения синусоидов как результата увеличения объемного кровотока в условиях снижения объема органа, набухания гепатоцитов в результате дистрофических изменений. В качестве механизма уменьшения размеров печеночной долики возможен апоптоз.

При этом следует отметить, что снижение размеров гепатоцитов после их увеличения на 1 сутки происходит достаточно быстро, ко 2–4-м суткам — это скорее говорит о дистрофических процессах в гепатоцитах с их последующим разрушением, затем к 14-м суткам происходит повторное увеличение площади гепатоцитов, что скорее можно трактовать как результат гипертрофии гепатоцитов.

Полученные данные наводят на мысль, что аллогенные ММСК КМ посредством синтеза ростовых факторов и цитокинов способствуют пролиферации гепатоцитов и ингибируют апоптоз, первое подтверждается в в нашей работе при анализе количества PCNA — позитивных клеток. Однако, действия данных факторов не достаточно для статистически значимого увеличения числа митозов, диаметра ядра, площади гепатоцитов, ЯЦС или печеночной долики. Необходимо иметь в виду, что при измерении площади гепатоцитов, ЯЦС, площади долек оценивали изменение микроструктуры печени после ОРП в двухмерном пространстве. При этом необходимо учитывать, что изменения в трехмерном пространстве будут отличаться, так как при вычислении данных показателей необходима еще одна переменная — высота гепатоцита и печеночной долики, определение которых на плоскостных препаратах весьма затруднительно.

Увеличение количества PCNA-позитивных клеток на фоне трансплантации ММСК отмечали и другие

авторы [13, 14]. Как известно, PCNA выполняет роль кофактора ДНК-полимеразы в S-фазе клеточного цикла, несмотря на устоявшуюся традицию отождествления выявления этого маркера в ядре с митозом, в большей степени его наличие свидетельствует об активации репарации и синтезе ДНК, т.е. процессах, не тождественных митозу.

В доступных источниках не было найдено работ, касающихся влияния ММСК при ОПН на такие показатели как: число фигур митозов, диаметр ядра, площадь гепатоцита, ЯЦС и печеночной дольки. Однако, в других работах при оценке регенерации печени данные показатели учитывали [5, 15–17]. Редкое применение данных показателей связано с трудоемкостью морфометрического исследования.

Таким образом, трансплантация аллогенных ММСК КМ не влияет на количество митозов, диаметр ядра, площадь гепатоцитов, ЯЦС и размер печеночных долек, но увеличивает количество PCNA-положительных гепатоцитов после резекции 68% печени.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Putignano A., Figorilli F., Alabsawy E. et al. Long-term outcome in patients with acute liver failure. *Liver Int.* 2018; 10.1111/liv.13914.
2. O'Grady J. Timing and benefit of liver transplantation in acute liver failure. *J Hepatol.* 2014; 60(3): 663–70.
3. Watt K.D., Pedersen R.A., Kremers W.K. et al. Evolution of Causes and Risk Factors for Mortality Post Liver Transplant: Results of the NIDDK Long Term Follow-up Study. *American Journal transplantation* 2010; 10(6): 1420–7.
4. Котенко К.В., Восканян С.Э., Еремин И.И. и др. Перспективы применения клеточных продуктов в хирургической гепатологии. *Гепатогastroэнтерология* 2011; 5–6: 208–16.
5. Рудаков В.С., Восканян С.Э., Еремин И.И. и др. Применение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в лечении острой печеночной недостаточности после обширной резекции печени в эксперименте. *Гены и Клетки* 2016; 11(4): 70–4.
6. Рудаков В.С., Восканян С.Э., Еремин И.И. и др. Экспериментальные модели острой печеночной недостаточности. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова* 2015; 4: 138–44.
7. Sun X.E., Zhang X.Q., Liu M.M. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on the TGF- β 1/Smad signaling pathway of hepatic stellate. *Genetic and Molecular Research* 2015; 14: 8744–54.
8. Michalopoulos G.K., Marie C. Liver Regeneration. *DeFrances Science* 1997; 276: 60–6.
9. Liu W., Song F., Ren L.N. et al. The multiple functional roles of mesenchymal stem cells in participating in treating liver diseases. *Cell. Mol. Med.* 2015; 3: 511–20.

Заключение

Трансплантация ММСК КМ после обширной резекции печени посредством синтеза ростовых факторов и цитокинов способствуют пролиферации гепатоцитов (PCNA позитивных клеток), но не влияет на количество митозов, диаметр ядра, гепатоцитов, ЯЦС, площадь печеночной дольки, что говорит об активации молекулярных внутриядерных репаративных процессов, которые допустимо рассматривать как реактивные изменения в ответ на повреждение и трансплантацию, протекающие по сценарию внутриклеточной репаративной регенерации. Для более полного понимания механизмов терапевтического действия ММСК при ОПН необходимо проведение дополнительных исследований.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов. Финансирование осуществлено за счет средств ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна.

10. Cen P., Chen J., Hu C. et al. Noninvasive in-vivo tracing and imaging of transplanted stem cells for liver regeneration. *Stem Cell Research & Therapy* 2016; 7: 1–11.

11. Akhan E., Tuncel D., Akcali K.C. Nanoparticle Labeling of Bone Marrow-Derived Rat Mesenchymal Stem Cells: Their Use in Differentiation and Tracking. *Biomed. Res. Int.* 2015; 19: 511–20.

12. Газизов И.М., Калигин М.С., Андреева Д.И. и др. Изменения микроструктуры печени после частичной гепатэктомии у крыс. *Гены и Клетки* 2013; 8(3): 101–5.

13. Liu T., Mu H., Shen Z. et al. Autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are involved in rat liver regeneration following repeat partial hepatectomy. *Mol. Med. Rep.* 2016; 13(3): 2053–9.

14. Yu J., Yin S., Zhang W. et al. Hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells promote liver regeneration in a rat massive hepatectomy model. *Stem Cell Research & Therapy* 2013; 4: 1–9.

15. Baretta G.A., Gama Filho O., Toderke E.L. et al. Effect of cyclosporine on liver regeneration in partial hepatectomized rats. *Acta Cir. Bras.* 2015; 30(1): 54–9.

16. Biondo-Simões M.L.P., Matias J.E.F., Montibeller G.R. et al. Effect of aging on liver regeneration in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2006; 1(4): 197–202.

17. D'Espressailles A., Dossi C., Intriago G. et al. Hormonal pretreatment preserves liver regenerative capacity and minimizes inflammation after partial hepatectomy. *Annals of hepatology* 2013; 12(6): 981–91.

Поступила: 10.05.2018

ДИСКУССИОННЫЕ И ОБЩЕТЕОРЕТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

DOI: 10.23868/201808026

**МЕСТО ДИСЦИПЛИНЫ «АНАТОМИЯ ЧЕЛОВЕКА»
В МЕДИЦИНСКОМ ОБРАЗОВАНИИ XXI ВЕКА**

А.В. Павлов

*Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Рязань, Россия***PLACE OF THE DISCIPLINE "HUMAN ANATOMY" IN MEDICAL EDUCATION OF THE 21ST CENTURY**

A.V. Pavlov

I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

e-mail: vitrea@yandex.ru

Отечественное высшее медицинское образование переживает сложный период реформ программ обучения, направленных на интеграцию своих специалистов в глобальное профессиональное сообщество. Вместе с тем преподавание базовых морфологических дисциплин, таких как анатомия человека и топографическая анатомия с оперативной хирургией, в большинстве вузов не соответствует основным векторам данного процесса.

В представленной статье рассматриваются основные проблемы преподавания этих дисциплин и предложены пути их решения. Для поддержания фонового уровня знаний по анатомии человека предложено выделить два блока: «Общая анатомия» для первого курса и «Частная анатомия» для четвертого курса. Такое разделение комплекса знаний с точки зрения автора облегчит освоение основ строения тела студентами младших курсов и мотивирует старшекурсников к более детальному изучению анатомии в тесной интеграции с клиникой. Преподавание топографической анатомии и оперативной хирургии предлагается проводить не только на 3–4 курсах, но и на постдипломном этапе обучения, что значительно повысит уровень подготовки специалистов отечественной медицины.

Ключевые слова: медицинское образование, анатомия, топографическая анатомия и оперативная хирургия.

Отечественное медицинское образование встретило XXI век, преисполненное надежд на интеграцию с западными школами, что обеспечило бы высокую мобильность специалистов и знаний. Для достижения этих целей были внесены значительные изменения в Федеральные образовательные стандарты и учебные планы, проведена соответствующая работа на местах. Кафедральным коллективам было предписано заняться ежегодной разработкой рабочих программ по своим дисциплинам, чтобы к выпуску из вуза подготовить высококвалифицированного специалиста с глубокими знаниями по всем пройденным предметам. Постулируемый компетентно-ориентированный подход был призван систематизировать знания студентов и расширить возможности для их самообразования как на этапе обучения в вузе, так и на рабочих местах после его окончания. Чуда не произошло. В итоге преподаватели оказались погружены в бумажную работу, а знания студентов едва соответствуют удовлетворительному уровню. Особенно ярко это отразилось на освоении студентами анатомии человека — дисциплины, являющейся базовой в любом медицинском вузе [1]. Без знания этого предмета невозможно освоить никакие клинические дисциплины, сколько бы часов на практические занятия для них не отводилось. Данное утверждение вроде бы ни у кого не вызывает протеста, но при этом мы видим ежегодное сокращение количества аудиторных часов на изучение анатомии [2]. Вместе с тем возрастает объем внеаудиторной, самостоятельной работы студентов. Следует понимать, что студент первого курса медицинского вуза еще не обладает необходимым уровнем таких способностей, как самооценка процессов

Domestic higher medical education is going through a difficult period of reform of its training programs. These reforms are aimed at integrating Russian specialists into the global professional community. At the same time, the teaching of basic morphological disciplines, such as human anatomy and topographic anatomy with operative surgery, in most universities does not correspond to the main vectors of this process.

In the presented article the main problems of teaching these disciplines are examined and ways of their solution are suggested. To maintain the background level of knowledge on human anatomy, two blocks are proposed: "General Anatomy" for the first year and "Special Anatomy" for the fourth year. This from the author's point of view makes it easier to learn the basics of body structure by undergraduate students and motivates undergraduates to more detailed study of anatomy in close integration with the clinic. Teaching of topographic anatomy and operative surgery is suggested to be carried out not only on 3–4 courses, but also on the postgraduate stage of training, then the level of training of specialists in domestic medicine will be higher.

Keywords: medical education, anatomy, topographical anatomy and operative surgery.

и результатов учебной деятельности, осознание ценности теоретических знаний по базовым дисциплинам в последующей практической деятельности [3]. Эта система способностей складывается постепенно во время обучения и начинает проявляться только к старшим курсам. Соответственно, опираться на самодисциплину студента-первокурсника ошибочно, и это ведет к неизбежному росту уровня академической задолженности и отчислению. Также снижению уровня знаний студентов во многом способствует излишняя либерализация учебного процесса, проявляющаяся в многократных передачах контрольных занятий, многочисленных отработках. Многие из тех студентов, кто путем «вызубривания» материала проходят через контрольные мероприятия кафедр анатомии, на последующих курсах не могут дать внятного ответа на вопросы преподавателей клинических дисциплин о строении того или иного органа, что вызывает недовольство работой коллег базовых кафедр со стороны клиницистов. Преподавателей-клиницистов можно понять: им приходится пробираться через мрак анатомического невежества студентов, неэффективно используя лимит аудиторных часов своей дисциплины. Как следствие — в клиники приходят малообразованные специалисты. К сожалению, это не фантазии, а свершившийся факт. Следует подчеркнуть, что отставание нашего медицинского образования от западного не в техническом оснащении, но в сложившейся системе мышления. Можно купить любую технику, но специалистов нужно готовить своих. Необходимо помнить, что сегодняшний студент — это будущий преподаватель. В публикациях последних лет можно найти немало статей, авторы которых

обеспокоены общим уровнем подготовки студентов медицинских вузов: отмечается явная тенденция к снижению общекультурного уровня знаний абитуриентов, самодисциплины и способности адаптироваться к освоению большого объема устного материала. Этот сложный и в высшей степени ненадежный «строительный материал» поступает на кафедры анатомии, где за неполные два года он должен обрести форму и содержание, соответствующие требованиям, предъявляемым к современным специалистам медицинского профиля. Следует подчеркнуть, что в сложившейся системе обучения полученных знаний по анатомии студенту должно хватить на все последующие годы. Почему же этого не наблюдается?

Причины

Можно бесконечно жаловаться на неподготовленность современных студентов к обучению, но вряд ли только в этом основная проблема. Скорее всего, причина скрыта в дисбалансе между особенностями современных абитуриентов-студентов и процессом медицинского образования в целом. Безусловно, российской медицинской школе есть чем гордиться. Не будем перечислять всех заслуг отечественных ученых-клиницистов и фундаменталистов — речь не об этом. Сегодня состояние медицинского образования в стране можно охарактеризовать одним словом — застой. И былые заслуги не способствуют движению вперед, если то и дело на них оглядываться. В 1927 г. выдающийся отечественный хирург из Военно-медицинской академии Сергей Петрович Федоров в статье «Хирургия на распутье» выразил свою обеспокоенность состоянием современной хирургической науки: «Вот стоит она, связанная по рукам и ногам, на старых основах, обремененная ложными путями и упрямством идущих по ним, темпераментом и легкомыслием ее молодых адептов, неумением, может быть, зрелого поколения ввести в русло этот молодой поток и сотнями тысяч пудов печатной бумаги. Да, стоит она, как древний русский витязь на перекрестке дорог и оглядывается на свое блестящее прошлое...» [4]. Эта мысль в полной мере может быть применена к любой дисциплине, в том числе и к анатомии. Наша наука в формировании врача занимает особое место: без хороших знаний о строении тела врач не может считаться квалифицированным специалистом. Академик В.Н. Тонков¹ писал: «анатомия вполне может обойтись без хирургии, хирургия не может обойтись без анатомии» [5]. К сожалению, распространено мнение, что анатомия является статичной наукой и ничего нового в ней быть не может: все известно о строении тела и человек не изменяется. То есть анатомия — своеобразный букварь медика, который следует просто вы зубрить. Это устоявшееся заблуждение привело к тому, что сами анатомы остановились в своем развитии, превратившись в своеобразных учителей начальной школы, опирающихся в своей повседневной работе на учебную литературу начала-середины XX столетия. Современные учебные издания по анатомии практически полностью копируют предшествующих авторов, часто повторяя их ошибки и заблуждения. Предвижу, что данное утверждение вызовет много протестов в среде коллег, но считаю его правильным.

Особое место в работе кафедр анатомии занимает работа с биологическим материалом. Не требует доказательств тезис, что никакой другой вариант обучения

врача не может заменить препарирование трупного материала. Знания, которые получает студент в процессе препарирования, самым надежным образом сохраняются в его памяти [3, 6]. В последние десятилетия мы столкнулись с серьезными проблемами в этом направлении. Чтобы компенсировать отсутствие натуральных анатомических препаратов был сделан вынужденный шаг в сторону муляжей, учебных карт, виртуальных демонстраций. Таким образом, знания анатомии человека у современных студентов соответствуют классическим иллюстрациям в атласах, но не реальному телу. Хронические проблемы с обеспечением кафедр трупным материалом соседствуют с кардинальными изменениями в штатном расписании. Были сокращены ставки учебно-вспомогательного персонала в среднем до одной единицы лаборанта на кафедру, полностью уничтожен институт преподавателей. Обязанности преподавателей фактически были возложены на профессорско-преподавательский состав. Все это вкуче с выраженной бюрократизацией учебного процесса во многом способствует снижению качества обучения студентов на кафедрах анатомии, что выражается в регрессе накопления фундаментальных знаний студентами медицинских вузов и факультетов.

Что делать?

Извечный вопрос, заданный русским философом Н.Г. Чернышевским в 1862 году не дает покоя и в среде преподавателей анатомии XXI века. В первую очередь следует прекратить реформирование учебного процесса. Проводимые реформы зачастую носят не более чем декларативный характер и не затрагивают существенные стороны содержания и обеспечения преподавательской деятельности. Базы кафедр морфологического профиля остаются на уровне конца XX столетия, наблюдается рост числа студентов и сокращение штатных единиц преподавателей. В таких условиях движение вперед невозможно. Фундаментальная медицинская анатомия должна сопровождать клинические достижения. Таким образом, морфологическим дисциплинам нужны не реформы, со всеми проявлениями русского катастрофизма, но постепенная эволюция в соответствии с современным состоянием клиники. Сейчас часто можно слышать мнение, что анатомия человека, как дисциплина, должна быть интегрирована в клинику. Это не верно. Студенту первых трех курсов сложно адекватно воспринимать и интерпретировать клиническую информацию без должной теоретической базы. Поэтому более целесообразно интегрировать клинику в анатомию. Как вариант решения проблемы может быть изменение учебного плана в преподавании анатомии человека. В настоящее время изучение анатомии на лечебном факультете проводится в трех первых семестрах. На освоение дисциплины в среднем учебным планом предусмотрено 360 часов, из них 216 часов контактных. Соответственно в каждом из трех семестров выделено 72 часа на аудиторную работу. Можно рассмотреть вариант изменения плана аудиторных занятий на факультете и выделить два блока в преподавании анатомии. Первый блок — «Общая анатомия» будет занимать первый год обучения и составит 144 часа. В процессе выполнения данного блока студенты будут осваивать общие принципы строения тела человека по соответствующим системам от костной до нервной, без излишней детализации. По завершении второго семестра должна быть предусмотрена итоговая аттестация в виде экзамена. Высвободившиеся таким образом 72 часа следует перенести на четвертый курс и представить в виде цикловых занятий по частной анатомии

¹ Профессор кафедры нормальной анатомии Военно-медицинской академии (1915–1950), Президент Военно-медицинской академии (1917–1925), Начальник факультета подготовки старших врачей полков (1942–1947)

(второй блок). В этом случае студенты будут мотивированы к детальному изучению строения отдельных органов, так как у них уже будет накоплен необходимый уровень базовых знаний по клиническим дисциплинам. Учебный план по частной анатомии следует координировать с требованиями клинических дисциплин, таких, как неврология и нейрохирургия, оториноларингология, офтальмология, факультетская терапия и хирургия. Такое распределение позволит не только более полно овладеть знаниями, но и высвободит часы, отводимые на изучение анатомии в соответствующих клинических дисциплинах. Изучение частных моментов анатомии человека требует от студентов значительных усилий, и для того, чтобы противостоять естественному нежеланию обучающихся углублять свои знания о строении тела человека, следует предусмотреть зачет в конце цикла. Без успешной аттестации по частной анатомии студент не должен быть допущен до сдачи экзамена по клинической дисциплине. Такой вариант учебного плана, не изменяя предусмотренного образовательным стандартом количество часов на дисциплину, позволит поддерживать знания анатомии студентами на протяжении четырех курсов обучения в университете и выживаемость базовых знаний определенно повысится. Кроме того, такой вариант обеспечит интеграцию базовых и клинических кафедр, что также благотворно скажется на уровне знаний преподавателей.

Отдельно следует упомянуть о топографической анатомии и оперативной хирургии — дисциплине, представляющей собой своеобразную пропедевтику хирургии. Так как данная дисциплина изначально задумывалась ее создателем профессором Военно-медицинской академии Н.И. Пироговым как база для объяснения морфофункциональных причин возникновения ряда патологических состояний и разработки рациональных хирургических доступов и приемов для их устранения, она не должна отождествляться только с анатомией. С одной стороны, данная дисциплина готовит студентов к клиническим дисциплинам, обобщая и систематизируя сведения об анатомии отдельных органов и систем, с другой — дает необходимые знания для понимания современных способов хирургических вмешательств на отдельных органах человека и диагностических методов прижизненных исследований (магнитно-резонансная и компьютерная томография, ультразвуковое сканирование и проч.). Соответственно, будет целесообразно преподавать эту дисциплину как студентам, так и ординаторам. Для успешного выполнения данной задачи кафедры топографической анатомии и оперативной хирургии должны быть в непрерывном контакте с кафедрами клинических дисциплин, что требует, как

постоянного повышения квалификации профессорско-преподавательского состава, так и оснащения учебного процесса [7, 8]. В настоящее время есть примеры успешной работы преподавателей топографической анатомии и оперативной хирургии на постдипломном этапе. Так, в ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия» Минздрава России успешно проводятся занятия по топографической анатомии и оперативной хирургии с ординаторами по специальности «Офтальмология». Углубленное изучение топографической анатомии области глазницы и отработка основных практических навыков на трупном материале обусловлено сложностью топографии органа зрения. Использование виртуальных тренажеров в данной области практически невозможно [9]. В некоторых случаях фиксированный трупный материал может быть заменен на натуральные препараты соответствующих областей тела. Так, уже существуют методики отработки практических навыков зондирования в оториноларингологии на полимерно-бальзамированных препаратах [10]. Таким образом можно подготовить любую область тела в соответствии с тем или иным направлением подготовки: грудь, живот, таз и т. д.

Применение современных способов преподавания топографической анатомии и оперативной хирургии на постдипломном этапе обучения специалистов (профессиональной подготовки, повышении квалификации и переподготовки) будет способствовать формированию пространственного представления о взаимоотношениях анатомических структур, что значительно повысит уровень подготовки специалистов отечественной медицины. Конечно, на первом этапе оснащение кафедр соответствующими наглядными пособиями и оборудованием будет сопряжено с немалыми материальными вложениями, но последующие текущие затраты будут минимальными, а практическая польза очевидна.

Резюмируя все вышесказанное можно отметить, что базовые морфологические дисциплины в современном медицинском образовании должны находиться в постоянном взаимодействии с клиникой, а не оставаться сугубой преференцией студентов первых курсов медицинских вузов.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Гранта Президента РФ МД-3316.2014.7 для государственной поддержки молодых российских ученых — докторов наук в области знания «Медицина».

ЛИТЕРАТУРА:

1. Сапин М.Р. Анатомия человека — базовая наука в медицинском образовании. Медицинское образование и профессиональное развитие 2011; 2(4): 96–7.
2. Киясов А.П., Деев Р.В., Киясова Е.В. и др. Медицинское образование на переломе дорог. Как шагнуть в будущее медицины и медицину будущего? Гены и Клетки 2017; XIII(2): 91–6.
3. Иваненко Г.А., Кузнецов А.В. Проблемы преподавания анатомии человека в медицинском вузе. Проблемы современной науки и образования 2017; 2(84): 99–102.
4. Федоров С.П. Хирургия на распутье. Москва: изд-во Наркомздрава РСФСР (тип. «Красная Пресня»); 1927.
5. Тонков В.Н. Избранные труды. Ленинград: Медгиз; 1959.
6. Николенко В.Н., Оганесян М.В., Кудряшова В.А. и др. Что может приблизить преподавание анатомии к потребностям практической медицины? Современные проблемы науки и образования, <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26477>.

7. Головнев В.А., Волков А.В., Рынгач Г.М. и др. Качество подготовки врача на кафедре оперативной хирургии и топографической анатомии, проблемы и перспективы. Journal of Siberian Medical Sciences, <https://cyberleninka.ru/article/n/kachestvo-podgotovki-vracha-na-kafedre-operativnoy-hirurgii-i-topograficheskoy-anatomii-problemy-i-perspektivy>.

8. Мартынова Н.А., Кузьмин А.Г., Алиберова М.Н. и соавт. Медицинские тренажеры как базис для отработки хирургических навыков. Здоровье и образование в XXI веке 2018; 20(1): 108–13.

9. Апрельев А.Е., Каган И.И., Ким В.И. Организация практической подготовки по офтальмохирургии на последипломном уровне в Оренбургской государственной медицинской академии. Медицинский вестник Башкортостана 2014; 9(2): 197–9.

10. Гайворонский И.В., Гайворонский А.В., Гайворонский А.И. и др. Инновационные технологии преподавания видеозендоскопической анатомии в ринологии. Вестник Санкт-Петербургского университета 2009; 11(4): 297–301.

Поступила: 03.07.2018

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

СТРУКТУРА ЖУРНАЛА

Журнал состоит из нескольких разделов: «Обзоры», «Оригинальные исследования», «Дискуссионные и общетеоретические работы», «Stem cells business», «От редакции», «История».

ОБЩИЕ ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Правила представления рукописей: Для опубликования принимаются работы по всем рубрикам журнала, оформленные в соответствии с требованиями журнала.

Электронный вариант статьи на диске с полуторными интервалами между строчками, со стандартными полями (слева — 3 см, справа — 1 см, сверху и снизу — 2,5 см) должны быть отправлены по адресу:

1 19333 г. Москва, ул. Губкина, д. 3, стр 2, а/я 373.

Тел.: +7 (495) 646-80-76

Кроме того, все работы могут быть посланы по электронной почте, по адресу: redaktor@celltranspl.ru.

Все страницы, кроме титульного листа, должны быть пронумерованы (вверху в центре). Рукописи, оформление которых не соответствует «Правилам для авторов», могут быть отклонены редакцией. Материалы, уже опубликованные в других изданиях, или находящиеся на рассмотрении в других редакциях, будут отклонены редколлегией журнала.

Титульный лист: На титульном листе должны быть указаны фамилии и инициалы всех авторов, название статьи, место работы (наименование кафедры или лаборатории и учреждения, где выполнена работа), 5–10 ключевых слов. Оригинальные исследования должны быть завизированы руководителем учреждения, где выполнена работа.

Резюме: Все статьи должны содержать резюме на русском и английском языках объемом не более 250 слов (редколлегия имеет право сокращать резюме, превышающие указанный объем). В резюме должны быть изложены цели исследования, основные процедуры (отбор объектов изучения или лабораторных животных, методы наблюдения или аналитические методы), основные результаты (по возможности, конкретные данные и их статистическая значимость) и основные выводы.

Текст: Текст необходимо печатать в редакторе Word на бумаге формата А4, шрифтом Times New Roman, 14 размера, без переносов. Все страницы должны быть пронумерованы вверху в центре. Материал и методы исследования должны быть описаны детально с точным указанием использованных реактивов, фирмы изготовителя и страны. Если в статье имеется описание наблюдений на человеке, не следует использовать фамилии, инициалы больных или номера историй болезни, особенно на рисунках и фотографиях. Кроме того, в таких статьях необходимо указывать, подписывал ли больной информированное согласие, есть ли одобрение этического комитета

и ученого совета учреждения, где данное исследование было выполнено. Статьи, не содержащие этой информации, будут отклонены редакцией.

При изложении экспериментов на животных следует указать, соответствовало ли содержание и использование лабораторных животных правилам, принятым в учреждении, рекомендациям национального совета и национальным законам.

Последняя страница: На последней странице надо поставить подписи всех авторов, указать полностью их фамилии, имена, отчества, ученую степень, а также почтовый адрес, телефон/факс, электронный адрес автора, с которым следует вести переписку.

Иллюстрации: Журнал принимает в качестве иллюстраций оригинальные схемы, фотографии, микрофотографии и графики. Все рисунки и графики должны быть присланы отдельными файлами в формате tiff с первоначальным разрешением 300 dpi, линейным размером по ширине не менее 7 см. Обозначения допускаются только в распечатанном варианте или в копиях рисунков. Графики должны быть выдержаны в серо-зеленой гамме. За качество воспроизведения несоответствующих требованиям иллюстраций редакция ответственности не несет, либо они исключаются.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

Библиографические ссылки в тексте: все ссылки должны быть процитированы в тексте и пронумерованы последовательно, в порядке их первого упоминания в тексте, арабскими цифрами в квадратных скобках, в соответствии со списком литературы, данным в конце статьи.

Список литературы: при цитировании необходимо использовать номенклатуру названий журналов, рекомендованную Index Medicus в формате NLM — список названий может быть получен в NLM (<http://www.nlm.nih.gov>). Цитирование по системе автор-дата не допускается.

Должны быть упомянуты все авторы; в случае, если авторов пять или больше, перечислите первых трех и добавьте «и соавт.» (et al.). Авторский коллектив несет полную ответственность за точность и полноту всех ссылок и за правильность цитирования в тексте.

Примеры цитирования различных литературных источников

Журнальная статья:

Vega K.J., Pina L, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pan-creatobiliary disease. *Ann. Intern. Med.* 1996; 124(II): 980–3.

Если в томе сохраняется последовательная нумерация страниц, номер журнала можно не указывать:

Vega K.J., Pina L., Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann. Intern. Med.* 1996; 124: 980–3.

Организация в качестве автора:

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. Med. J. Aust. 1996; 164: 282–4.

Автор не указан:

Cancer in South Africa [editorial]. S. Afr. Med. J. 1994; 84: 15.

Том с приложением:

Shen H.M., Zhang Q.F. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. Environ Health Perspect. 1994; 102 Suppl 1: 275–82.

Том, разделенный на части:

Ozben T., Nacitarhan S., Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. Ann. Clin. Biochem. 1995; 32(Pt 3): 303–6.

Журнал, номера которого не объединяются в тома:

Turan L., Wredmark T., Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. Clin. Orthop. 1995; (320): 110–4.

Физические лица в качестве авторов книги:

Ringsven M.K., Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Редакторы, составители в качестве авторов книги:

Norman I.J., Redfern S.J., editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

Организация в качестве автора и издателя:

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute; 1992.

Глава в книге:

Phillips S.J., Whisnant J.P. Hypertension and stroke. In: Laragh J.H., Brenner B.M., editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465–78.

Материалы конференции:

Kimura J., Shibasaki H., editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15–19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

Доклад на конференции:

Bengtsson S., Solheim B.G. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun K.C., Degoulet P., Piemme T.E., Rienhoff O., editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6–10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561–5.

Научный или технический отчет:

Smith P., Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No.: HHSI-GOEI69200860.

Диссертация:

Kaplan S.J. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

Патент:

Larsen C.E., Trip R., Johnson C.R., inventors; No-voste Corporation, assignee. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Кодекс Федеральных правил:

Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

Словари и аналогичные издания:

Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p. 119–20.

Классическая литература:

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13–16. The complete works of William Shakespeare. London: Rex; 1973.

Неопубликованные материалы / Материалы в печати:

Leshner A.I. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. In press 1996.

Публикация из Internet:

Poddubny I.V., Vasiliev A.V., Faizullin A.K. et al. Tissue engineering reconstruction of urethra in children suffering severe hyposplodias: experimental and clinical findings. [http://celltranspl.ru/journal/experim/?MESSAGES\[1\]=SHOW_PUBLICATION&PUBLICATION_ID=806](http://celltranspl.ru/journal/experim/?MESSAGES[1]=SHOW_PUBLICATION&PUBLICATION_ID=806).

РАЗМЕР РУКОПИСИ**Обзорные статьи:**

не более 30 страниц машинописного текста.

Оригинальные исследования:

не более 15 страниц машинописного текста.

Исторические статьи:

не более 15 страниц машинописного текста.

ПОДГОТОВКА СТАТЬИ К ПУБЛИКАЦИИ

Редакция имеет право вести переговоры с авторами по уточнению, изменению или сокращению рукописи. Все присланные материалы по усмотрению редколлегии направляются для рецензирования членам редакционного совета или экспертам-консультантам в данной области. Принятые статьи публикуются бесплатно. Рукописи и оттиски статей авторам не высылаются. Редакция оставляет за собой право вносить в текст рукописей, принятых к опубликованию, терминологические, стилистические и грамматические правки, изменять количество и корректировать иллюстрации и таблицы. После опубликования в журнале «Гены & клетки» материалы могут быть размещены на сайте <http://www.celltranspl.ru>.

Редакция журнала в обязательном порядке заключает с авторами договор о передаче авторских прав. Образец договора находится на сайте журнала.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

JOURNAL STRUCTURE

The journal includes several sections such as «Reviews», «Original Research», «Discussion and Theoretical Background», «Stem cells business», «Editorial's», «History».

GENERAL INSTRUCTIONS

Submission: Contributions to any aspect the journal covers that meet the requirements are accepted for publication.

Manuscripts must be sent to 119991 Moscow, Gubkina st. b. 3-2.

Tel. +7 (495) 646-80-76 in two copies and on disc, 1.5 line spaced with 3-cm left, 1-cm right and 2,5-cm top/bottom margins.

Besides, manuscripts except the original research may be submitted by e-mail redaktor@celltranspl.ru.

All pages except the title page should be numbered (at the upper center). Manuscripts could be returned shelved to the authors unless they satisfy the General Instructions requirements. Materials published elsewhere or being under consideration by another journals will be rejected.

Title page: The title page should include the names of all the authors, a short running title, affiliations (names of department[s]/ laboratory[ies] and institution[s] where the work was done), 5 to 10 key words. The name, the highest academic degrees of the institution head should be provided within the brackets. The original investigation reports must be proved by the head of the institution where the study is held.

Abstract: A 250-word abstract should be provided for all articles. [The editorial department will edit abstracts that are too long.] The abstracts should include the aims of investigation, general procedures (selection of objects to be studied or laboratory animals, methods of investigation or analysis), results (specific findings and their statistical significance), and conclusion. Abstract will be translated into Russian by the publisher's editorial department.

Text: The text should be a Word-processed A4 format document in the 14-th Times New Roman font without hyphens. All pages should be numbered in the upper center. Complex formulae and citations should be signed on the margins by authors. Materials and methods of the investigation should be described in details, with the proper names of reagents used, their producers and country. In case reports, patients' names, history identifications especially in pictures or photographs should be omitted. In case of people participation in the clinical research, provide the information if they signed the informed consent as well as is there is the approval of the ethic committee and that of the scientific board of the institution where this investigation was performed. Manuscripts that do not provide this information will be rejected.

In case of reports on experimental animals, indicate if the experiment was held according to the rules of keeping and handling experimental animals accepted in your institution, the national laws and the international regulations.

Last page: The last page should include the signatures of all the authors, their full names, the highest academic degrees and the corresponding author's complete mailing address, telephone/fax and e-mail.

Illustrations: As illustrations original schemes, pictures, micrographics, diagrams are accepted for publication. All the pictures and diagrams should be provided as separate files in a tiff format with the primary resolution of 300 dpi and the linear width of not less than 7 cm. Legends are acceptable only on a printed copy or on picture copies. Diagrams should be grey and green.

The edition does not guarantee a high quality of reproduction of inappropriate illustration(s), and reserves the right not to reproduce an illustration(s) unless its quality meets the editorial requirements.

REFERENCES

Citation in text: All references should be cited in the text and numbered consecutively using Arabic numbers in square brackets in accordance with the list given in the end of the article.

Reference list: Presentation of the references should be based on NLM formats in Index Medicus. The author-date system of citation is not acceptable. Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus. The list of Index Medicus — indexed journals could be obtained at NLM (<http://www.nlm.nih.gov>). All authors should be listed; if there are five authors and more, only the first three should be listed, followed by «et al.». Authors bear total responsibility for the accuracy and completeness of all references and for correct text citation.

SPECIFIC FORMATS

Review articles:

not more than 30 pages of typewritten text.

Original research:

not more than 15 pages of typewritten text.

Historical material:

nor more than 15 pages of typewritten text.

EDITORIAL ASSESSMENT AND PROCESSING

The editorial department reserves the right to consult the authors about refinement, modifying or shortening manuscripts. All contributions to the journal could be peer reviewed by members of the Editorial Board or submitted to expert consultants at the discretion of the editorial department. Accepted materials are published free of charge. Manuscripts and facsimile copies are not returned to the authors. Having been published in «Genes & Cells» materials will be published at <http://www.genescells.com>.



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА



ПАО «ИСКЧ» (Институт Стволовых Клеток Человека) — российская многопрофильная биотехнологическая компания, основанная в 2003 году.

Направления деятельности ИСКЧ — научные исследования, разработка, а также коммерциализация и дальнейшее продвижение на рынке собственных инновационных лекарственных препаратов и высокотехнологичных медицинских услуг.

Компания ставит целью формирование новой культуры медицинской заботы о человеке — развитие здравоохранения в области персонализированной и профилактической медицины.

Проекты ИСКЧ охватывают следующие сегменты современных биомедицинских технологий:



генная терапия



регенеративная медицина (клеточные сервисы и препараты, тканеинженерные продукты)



медицинская генетика, в т. ч. репродуктивная (генетическая диагностика и консультирование)



биострахование



биофармацевтика (в рамках международного проекта «СинБио»)

ИСКЧ принадлежит банк персонального хранения стволовых клеток пуповинной крови Гемабанк® — крупнейший в РФ и СНГ, а также банк репродуктивных клеток человека — Репробанк® (персональное хранение и донация).

Компания вывела на рынок первый российский генотерапевтический препарат для лечения ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза — Неоваскулген®, а также инновационную медицинскую технологию применения дермальных аутофибробластов для восстановления кожи с признаками возрастных и иных структурных изменений — SPRS-терапия®.

ИСКЧ реализует социально-значимый проект по развитию лаборатории и сети медико-генетических центров Genetico® для предоставления

услуг генетической диагностики и консультирования с целью раннего выявления и профилактики наследственных заболеваний, а также патологий с генетической составляющей (включая преимплантационную генетическую диагностику, неинвазивное пренатальное тестирование, а также сервисы в области онкогенетики и биоинформатики на основе NGS /расшифровка генома человека и его интерпретация, диагностические панели на отдельные категории и случаи заболеваний).

Компания развивает свои продукты и услуги как на российском, так и на международном рынке.

ИСКЧ — первая публичная биотехнологическая компания в России, эмитент сектора РИИ Московской Биржи (тикер: ISKJ).



www.hsci.ru



+7 (495) 646-80-76



www.genescells.ru