

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ISSN 0041-3771

ЦИТОЛОГИЯ

TSITOLOGIYA

2023. Том 65

2023. Vol. 65

4



СОДЕРЖАНИЕ

Том 65, номер 4, 2023

Тирамидная амплификация сигнала: новые возможности для <i>in situ</i> гибридизации ДНК <i>Е. О. Воронцова, Д. А. Юрченко, Н. В. Шилова</i>	313
Молекулярные механизмы, лежащие в основе болезней Альцгеймера и Паркинсона, и потенциальная возможность их нейтрализации <i>О. В. Невзглядова, Е. В. Михайлова, Т. Р. Сойдла</i>	323
Нейрогенез в нейрогенных нишах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера на досимптоматической стадии развития нейродегенерации <i>А. С. Аверчук, М. В. Рязанова, Н. А. Розанова, Н. А. Колотьева, А. В. Ставровская, С. В. Новикова, А. Б. Салмина</i>	339
Синаптофизин в супраэпендимных структурах головного мозга крысы <i>В. А. Разенкова, О. В. Кирик</i>	348
Реакция генома эндометриальных мезенхимных стволовых клеток на процедуру длительной криоконсервации <i>Т. М. Гринчук, М. А. Шорохова, Н. А. Пуговкина</i>	354
Исследование регуляторной связи сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE и транскрипционных регуляторов лизосомального биогенеза <i>А. В. Чечушков, Е. Б. Меньщикова</i>	367
Фагоцитоз иммунными клетками полимерных микрочастиц, модифицированных белками <i>Р. Г. Сахабеев, Д. С. Поляков, Н. А. Грудина, О. И. Антимонова, В. А. Коржиков-Влах, Э. Р. Аликпарова, Е. С. Сеницына, М. М. Шавловский</i>	376
Морфологические изменения эритроцитов у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию <i>О. Д. Денисенко, С. А. Перепелица, В. А. Сергунова, С. С. Ляпунова, Л. С. Литвинова</i>	384
Особенности морфологии и морфометрические параметры эозинофилов периферической крови енотовидных собак <i>Nyctereutes procyonoides</i> (Grey, 1834) <i>С. Н. Калинина, А. Г. Кижина, В. А. Илюха</i>	395

ПОТЕРИ НАУКИ

Памяти Алексея Андреевича Веренинова (1932–2022)	402
--	-----

Contents

Vol. 65, No. 4, 2023

Tyramide signal amplification: New opportunities for DNA <i>in situ</i> hybridization <i>E. O. Vorontsova, D. A. Yurchenko, N. V. Shilova</i>	313
Molecular mechanisms underlying Alzheimer's and Parkinson's diseases and the potential possibility of their neutralization <i>O. V. Nevzglyadova, E. V. Mikhailova, T. R. Soidla</i>	323
Neurogenesis in brain neurogenic niches in experimental Alzheimer's disease at the presymptomatic stage of neurodegeneration <i>A. S. Averchuk, M. V. Ryazanova, N. A. Rozanova, N. A. Kolotyeva, A. V. Stavrovskaya, S. V. Novikova, A. B. Salmina</i>	339
Synaptophysin expression by supraependymal structures of the rat brain <i>V. A. Razenkova, O. V. Kirik</i>	348
Response of the endometrial mesenchymal stem cell genome to the procedure of long-term cryopreservation <i>T. M. Grinchuk, M. A. Shorokhova, N. A. Pugovkina</i>	354
Regulatory relationship between the Keap1/Nrf2/ARE signaling system and transcriptional regulators of lysosomal biogenesis <i>A. V. Chechushkov, E. B. Menshchikova</i>	367
Phagocytosis of protein-modified polymer microparticles by immune cells <i>R. G. Sakhabeev, D. S. Polyakov, N. A. Grudinina, O. I. Antimonova, V. A. Korzhikov-Vlakh, E. R. Alikparova, E. S. Sinitsyna, M. M. Shavlovsky</i>	376
Morphological changes of erythrocytes in neonates with perinatal hypoxia <i>O. D. Denisenko, S. A. Perepelitsa, V. A. Sergunova, S. S. Lyapunova, L. S. Litvinova</i>	384
Morphological features and morphometric parameters of peripheral blood eosinophiles in raccoon dogs <i>Nyctereutes procyonoides</i> (Grey, 1834) <i>S. N. Kalinina, A. G. Kizhina, V. A. Ilyukha</i>	395

In Memorium

In memory of Alexey Andreevich Vereninov (1932–2022)	402
--	-----

ТИРАМИДНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ СИГНАЛА: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ *IN SITU* ГИБРИДИЗАЦИИ ДНК

© 2023 г. Е. О. Воронцова^{1, 2, *}, Д. А. Юрченко¹, Н. В. Шилова¹

¹Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова, Москва, 115478 Россия

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения РФ, Москва, 117997 Россия

*E-mail: veo.1998@mail.ru

Поступила в редакцию 10.03.2023 г.

После доработки 17.04.2023 г.

Принята к публикации 20.04.2023 г.

Гибридикация ДНК *in situ* (*in situ* hybridization, ISH) — широко используемый метод молекулярной цитогенетики, который позволяет локализовать конкретные последовательности ДНК в определенных участках хромосом. Для реализации гибридикации ДНК *in situ* необходимо использование ДНК-зондов, которые могут быть коммерческими (серийными), а также несерийными, т.е. могут быть разработаны под конкретные задачи исследования (*homemade*). Одним из существенных недостатков последних является низкая интенсивность гибридикационного сигнала, когда ДНК-зонд имеет небольшие размеры. Поэтому разработка подходов, направленных на получение оптимального соотношения шум/сигнал при использовании таких несерийных ДНК-зондов, является актуальной задачей современной молекулярной цитогенетики. Методом, позволяющим визуализировать небольшие последовательности ДНК непосредственно на хромосоме, является тирамидная амплификация сигнала (*tyramide signal amplification*, TSA). В основе системы TSA лежит образование ковалентной связи между богатыми электронами фрагментами белков образца и молекулами тирамида, связанными с гаптенем (при хромогенной ISH) или флуорофором (при флуоресцентной ISH). Это реализуется за счет превращения молекул тирамида в свободнорадикальные промежуточные соединения под действием пероксидазы хрена (HRP), а затем отложения осажденных молекул вблизи нее. В результате наблюдается усиление сигнала малой интенсивности. Таким образом, TSA является хорошим дополнением метода гибридикации ДНК *in situ* благодаря своей высокой чувствительности и возможности детекции небольших геномных дисбалансов и, соответственно, может стать ценным инструментом для диагностики хромосомных перестроек в клинической практике.

Ключевые слова: тирамид, ДНК, тирамидная амплификация, флуоресцентная гибридикация *in situ*, хромогенная гибридикация *in situ*

DOI: 10.31857/S0041377123040120, **EDN:** ZLKOVG

В настоящее время в клинической практике в качестве дополнительного метода детекции вариаций числа копий участков ДНК (*copy number variations*, CNV) широко используется гибридикация ДНК *in situ* (*in situ* hybridization, ISH) (Liehr, 2018; Veselinyova et al., 2021; Yurchenko et al., 2022). Такой подход позволяет локализовать искомую последовательность в определенной области метафазной хромосомы или интерфазного ядра (Larracuenta, Ferree, 2015). Этот принцип также лежит в основе и других молекулярно-цитогенетических методов: сравни-

тельной геномной гибридикации (*array comparative genomic hybridization*, aCGH) (Cheung, Bi, 2018) и хромосомного микроматричного анализа (Levy, Warner, 2018).

Использование традиционных FISH-технологий с коммерческими ДНК-зондами нашло широкое применение при детекции вариаций числа копий исследуемого фрагмента ДНК значительных размеров. В частности, обнаружение теломерных и центромерных районов является реализуемой задачей, учитывая, что они представлены в геноме в виде большого количества повторов и локально сгруппированы (Hoskins et al., 2002; Dimitri, 2004). В то же время визуализация уникальных эухроматиновых районов хромосом требует использования либо протяженных зондов с высокой специфичностью, либо нескольких, близких по расположению на участке хромосомы меньших по размеру зондов, которые

Принятые сокращения: CISH — хромогенная *in situ* гибридикация (*chromogenic in situ hybridization*); CNV — вариации числа копий участков ДНК (*copy number variation*); dUTP — дезоксиуридинтрифосфат; HRP — пероксидаза хрена (*horseradish peroxidase*); FISH — флуоресцентная *in situ* гибридикация (*fluorescence in situ hybridization*); TSA — тирамидная амплификация сигнала (*tyramide signal amplification*).

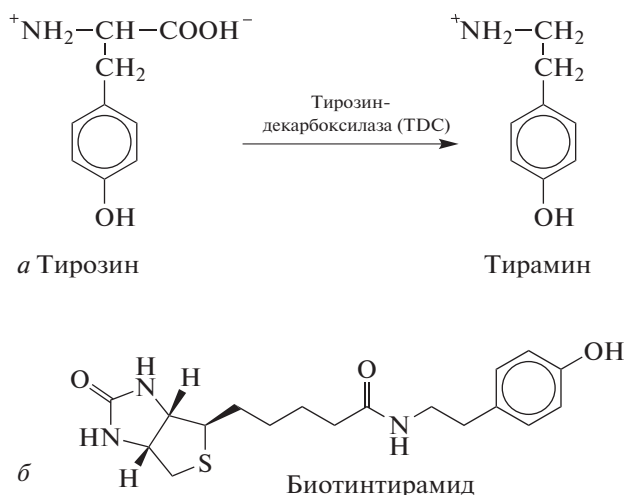


Рис. 1. Синтез тирамина из тирозина. Реакция декарбоксилирования тирозина с образованием тирамина (а) сопровождается каталитической активностью тирозин-декарбоксилазы (TDC). (б) – Биотинилированное производное тирамина – биотинтираминд. Тирамин и биотин соединены посредством амидной связи. Адаптировано из: Cole et al., 2005 (а) и Einarson, Sen, 2017 (б).

суммарно дают более интенсивный сигнал, чем каждый из них по отдельности. Однако такой подход затруднительно использовать при визуализации однокопийных последовательностей, размер которых составляет чуть более 1 тыс. пар нуклеотидов (т. п. н.) (Schriml et al., 1999), поскольку интенсивность гибридационного сигнала будет низка и несопоставима с коммерческими (серийными) ДНК-зондами. В этом случае необходима разработка локус-специфичных несерийных (homemade) ДНК-зондов с последующей амплификацией полученного сигнала.

К таким однокопийным последовательностям можно отнести клинически значимые CNV размером, незначительно превышающим 1 т. п. н. (субмикроскопические CNV), определение происхождения которых является важным этапом для понимания этиологии генных болезней, а также механизма формирования конститутивных хромосомных аномалий. Выявление таких субмикроскопических CNV при молекулярном кариотипировании требует проведения подтверждающей диагностики альтернативными методами (методы валидации/верификации) с целью исключения ложноположительных результатов (Твеленёва, Шилова, 2019). В этих случаях для детекции хромосомных аномалий, включающих в перестройку небольшие по протяженности участки ДНК, возможно применение технологии усиления сигнала, в частности усиление сигнала с использованием тирамида – метода тирамидной амплификации сигнала (tyramide signal amplification – TSA) (Рубцов, 2006). Интенсивность сигнала повышается благодаря активации тирамида, под действием каталитической активности пероксидазы хрена (horseradish peroxidase, HRP) и его связы-

ванию с радикалами аминокислот в цитологическом препарате, что приводит к отложению большого количества молекул тирамида и позволяет локально сконцентрировать сигнал (Stack et al., 2014). В методе TSA чаще всего применяется подход непрямой визуализации сигнала, что подразумевает использование антител к молекуле тирамида, связанной с репортерной молекулой (биотином, дигоксигенином, динитрофенолом), что способствует еще большему накоплению и усилению сигнала, за счет увеличенной локальной концентрации флуоресцентной или хромогенной метки в исследуемых образцах. Таким образом, этот метод позволяет значительно повысить чувствительность визуализации гибридационного сигнала (Perez et al., 2009).

Задачей настоящего обзора является обобщение сведений о методе тирамидной амплификации сигнала, как дополнительного этапа для проведения гибридационной ДНК *in situ*, что позволяет оптимизировать детекцию CNV, размером незначительно превышающим 1 т. п. н. за счет увеличения интенсивности гибридационного сигнала при выполнении молекулярно-цитогенетических исследований.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОСНОВА ТИРАМИДНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

TSA представляет собой метод ферментативной амплификации и используется для повышения чувствительности обнаружения ДНК-мишени при гибридационной *in situ* (Bobrow et al., 1989) и иммуногистохимии (Атякшин и др., 2022). В основе повышения чувствительности лежит реакция превращения тирамида в окисленное высоко реакционноспособное свободнорадикальное промежуточное соединение. Тирамид является биотинилированным производным тирамина, биогенного амина, синтезируемого из тирозина под действием тирозиндекарбоксилазы, который содержит аминогруппу на одном конце и фенол – на другом (рис. 1а). Аминогруппа способствует конъюгации молекулы тирамина с биотином путем образования амидной связи (рис. 1б). Промежуточные продукты реакции ковалентно связываются с нуклеофильными аминокислотными радикалами, такими как тирозин и триптофан, ядерного или цитоплазматического матрицсов (рис. 2).

Усиление сигнала происходит за счет отложения большого количества тирамидов и их связывания с аминокислотными радикалами ядерных и цитоплазматических белков на предметном стекле, в месте связывания пероксидазы или в непосредственной близости (Nielsen et al., 2001). Радикалы, являясь высоко реакционноспособными агентами, взаимодействуют с молекулами воды или другими радикалами и активно распадаются по мере диффузии от активного центра пероксидазы, ограничивая радиус мечения примерно до 200 нм (Rees et al., 2015). Значительное снижение интенсивности сигнала, по мере удаления от активного центра фермента, также мо-

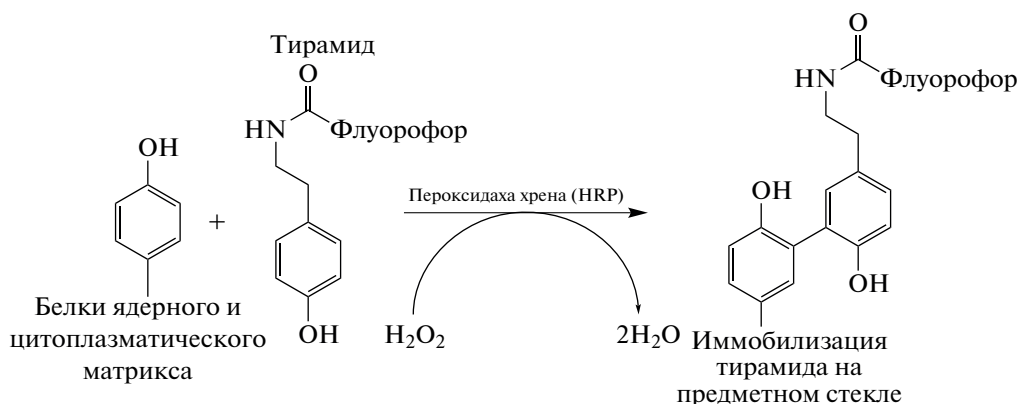


Рис. 2. Пероксидаза хрена (HRP) расщепляет перекись водорода (H₂O₂), обеспечивая окисление фенольного субстрата (тирамида) и образование ковалентных связей с остатками белков ядерного и цитоплазматического матрикса (Kudryavtseva et al., 2021; open access).

жет быть связано с ограниченным количеством реагирующих участков хроматина. Авторы (Chen et al., 2018) утверждают, что коровые гистоны не являются оптимальной мишенью для мечения тирамидом, что связано с низкой реактивностью тирозинов гистонов внутри нуклеосомы, поскольку 13 из 15 нативных нуклеосомных тирозинов недоступны для реакции. Поэтому повторение этапов TSA, в частности активного отложения тирамида на аминокислотных радикалах, может способствовать увеличению интенсивности сигнала. Однако этапы рекомендуется повторять не более двух–трех раз, поскольку это может привести к увеличению неспецифического фонового сигнала.

Важным шагом при проведении TSA является добавление пероксида водорода (H₂O₂). Строение активного центра пероксидазы хрена позволяет использовать его для инактивации фермента. При низких концентрациях в домене трехвалентного гема происходит гетерологичное расщепление H₂O₂ (Nielsen, 2001). При избытке H₂O₂ железо активного центра фермента окисляется до двухвалентного состояния, и в результате активность фермента гасится (Pandey et al., 2017).

Метод тирамидной амплификации сигнала включает несколько основных этапов, показанных на рис. 3. 1) В первую очередь, необходимо провести гибридизацию ДНК *in situ* (CISH или FISH), в результате которой происходит ковалентное связывание ДНК-последовательности с разработанным (несерийным) ДНК-зондом, в который включен модифицированный нуклеотид (М), именно с этой областью будет происходить связывание антител. Модифицированный нуклеотид представляет собой нуклеотид с флуоресцентной или гаптенной меткой для возможности его дальнейшего распознавания. 2) Далее происходит взаимодействие модифицированного нук-

леотида с первичными антителами, специфичными к выбранной мишени. 3) На следующем этапе проводится инкубация с вторичными антителами, конъюгированными с ферментативной меткой. 4) Затем в реакцию добавляется соединение тирамида, которое под действием пероксидазы при добавлении H₂O₂ превращается в высоко реакционное соединение, молекулы которого осаждаются вблизи места связывания пероксидазы хрена, образуя ковалентные связи с нуклеофильными радикалами аминокислот белков ядерного и цитоплазматического матрикса (Gross et al., 2001). После основных стадий TSA следует этап 5 – визуализация.

Существует два подхода к детекции исследуемых молекул: прямой и непрямой. Выбор метода визуализации происходит в зависимости от того, с какой молекулой связан тирамид: флуорофором (Texas Red, FITC или Cy3) или молекулой-гаптенном, например, биотином, дигоксигенином или динитрофенолом (Speel et al., 2006). Если тирамид конъюгирован с флуоресцентной меткой, то визуализация гибрида проводится непосредственно после TSA и контрокрашивания ядер с помощью красителя DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорид) с использованием оборудования для флуоресцентной микроскопии (Ведяйкин и др., 2019). Если тирамид связан с репортерными молекулами, такими как биотин, дигоксигенин или динитрофенол, необходимо использование вторичных антител или соединений, обладающих высоким сродством к этим соединениям: авидин (стрептавидин), антидигоксигенин и антитела к динитрофенолу соответственно с последующей флуоресцентной или хромогенной детекцией (Stack et al., 2014).

На этапе амплификации сигнала возможно использование биотинилированных тирамидов, полученных от фирм-производителей, либо соединений

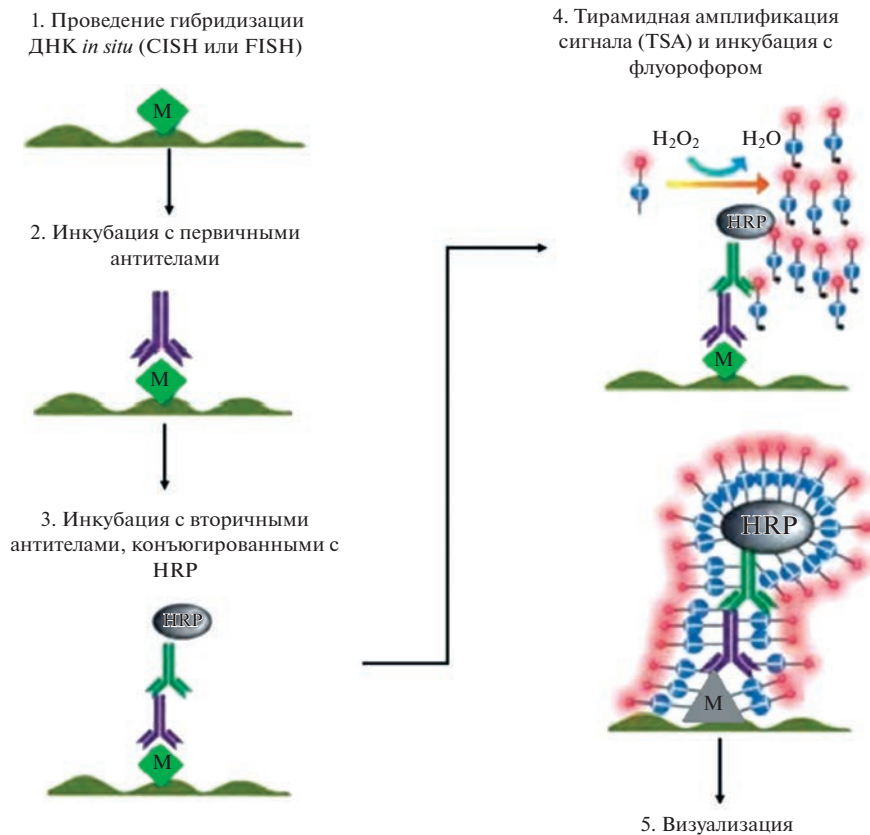


Рис. 3. Основные этапы метода тирамидной амплификации сигнала (TSA). М — модифицированный нуклеотид ДНК-зонда; HRP — пероксидаза хрена (фермент, катализирующий превращение неактивного тирамида в активное соединение в присутствии пероксида водорода). Адаптировано из: Francisco-Cruz et al., 2020.

тирамида, синтезированных в самой лаборатории (Bobrow et al., 1989; Raap et al., 1995). В случае использования только синтезированных биотинилированных тирамидов возникает проблема неспецифичности сигнала из-за высокого содержания эндогенного биотина в тканях, таких как печень и почки. Следовательно, при анализе цитологических препаратов из этих тканей оптимальным является альтернативный подход с использованием тирамидов, меченных дигоксигенином, ди- или тринитрофенолом или флуорофорами (Norman et al., 1998).

Благодаря методу TSA можно обнаруживать однокопийные последовательности ДНК размером около 1 т. п. н. (Raap et al., 1995; Schriml et al., 1999) в связи с тем, что эта система позволяет повышать чувствительность и эффективность гибридизованных сигналов ISH в 100–1000 раз по сравнению с методами без усиления сигнала (Perez et al., 2009). Несмотря на то, что TSA проводится после использования метода гибридизации ДНК *in situ*, специфичность взаимодействия не снижается, что является еще одним преимуществом ее использования (Speel, 1999; Speel et al., 1999).

ТИРАМИДНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ СИГНАЛА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ *IN SITU* ГИБРИДИЗАЦИИ ДНК

Гибридизация ДНК *in situ* является важным инструментом исследований в молекулярной и клеточной патологии (Херрингтон, Макги, 1999; Foster et al., 2010). Широкий спектр хромосомных аномалий, таких как транслокации, инверсии, инсерции, делеции и дупликации, выявляют с помощью флуоресцентной гибридизации ДНК *in situ* (Fluorescence *in situ* hybridization — FISH) (Liehr et al., 2013; Morozkin et al., 2013). Несмотря на высокую специфичность метода FISH, до сих пор не удается рутинно анализировать CNV размером немногим более 1 т. п. н. с помощью традиционных протоколов исследования. В молекулярной онкологии используется модификация метода — хромогенная гибридизация *in situ* (chromogenic *in situ* hybridization — CISH).

FISH и CISH с использованием TSA

Методы FISH и CISH основаны на принципе комплементарного взаимодействия между целевой последовательностью нуклеиновой кислоты (ми-

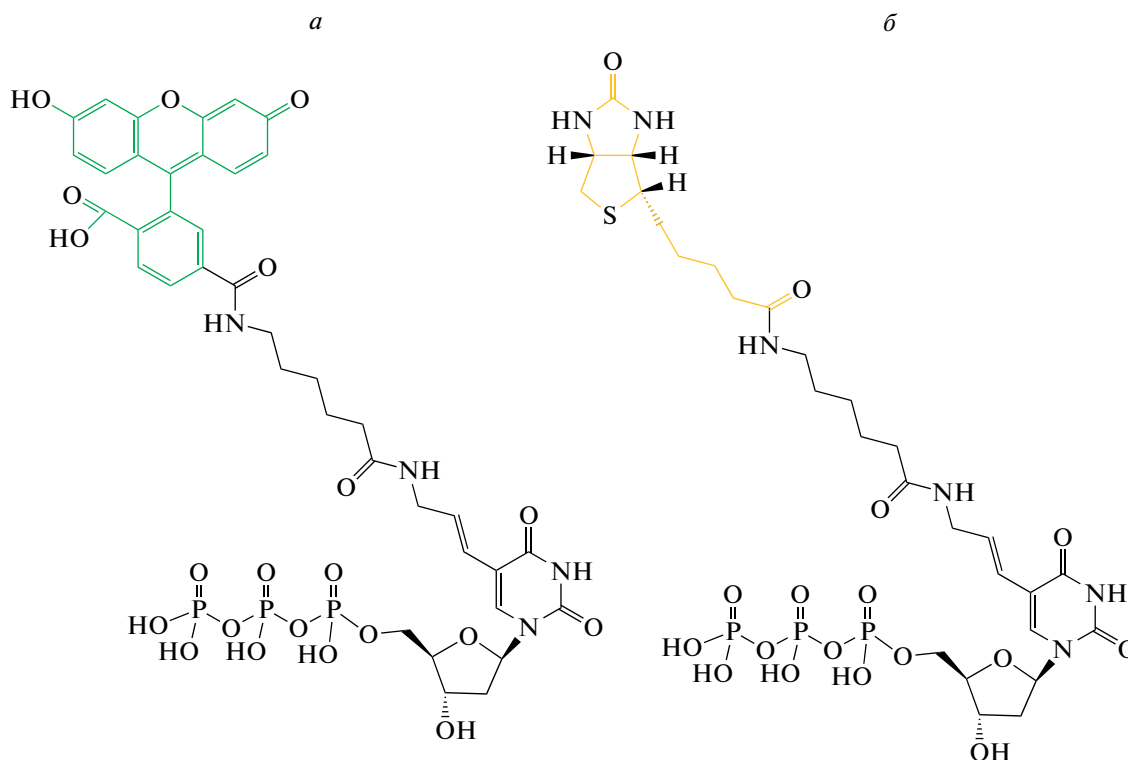


Рис. 4. Флуоресцеин-12-dUTP (*a*) и биотин-11-dUTP (*б*). *a* – Модифицированный нуклеотид, соединенный с флуорофором (зеленый цвет), включается в реакции ник-трансляции при синтезе олигонуклеотидных зондов, с последующей возможностью детекции комплементарного связывания с мишенью с помощью флуоресцентного микроскопа (метод FISH). – Модифицированный нуклеотид, соединенный с биотином (оранжевый цвет), включается в реакции ник-трансляции при синтезе олигонуклеотидных зондов; для детекции необходимо использование специфических антител к биотину (стрептавидин), связанных с хромогенной меткой, фермент и хромогенный субстрат (метод CISH).

шень) и ДНК-зондом с последующей системой детекции в зависимости от способов модификации нуклеотидов в составе ДНК-зонда (рис. 4) (Херрингтон, Макги, 1999; Alamri et al., 2017). Для введения в ДНК модифицированных нуклеотидов могут быть использованы разные подходы. Молекула флуорофора ковалентно соединяется с нуклеотидом (модифицированный нуклеотид) и вносится в последовательность синтезируемых ДНК-зондов в реакциях, катализируемых, в частности, терминальной дезоксирибонуклеотидил-трансферазой (TdT) при концевом мечении (Sarac, Hollenstein, 2019), ДНК-азой I и ДНК-полимеразой I в реакции ник-трансляции (Green, Sambrook, 2020) и ДНК-полимеразой I при включении модифицированных нуклеотидов во вновь синтезируемую цепь при проведении полимеразной цепной реакции (Veselinová et al., 2021) (рис. 4а).

При CISH используемые комплементарные мишени (ДНК-зонды) включают нуклеотиды, ковалентно соединенные с гаптенами (биотином, диоксигенином или динитрофенолом) (рис. 4б). Особенностью CISH является стойкость гибридационных сигналов. Они не ослабевают со временем, в отличие от флуоресцентных сигналов при FISH-методе. Так-

же при CISH имеется возможность использования дополнительных методов окраски для визуализации морфологии клеток и структурных компонентов ткани. Некоторые исследования показывают, что CISH-метод сопоставим с FISH (Sáez et al., 2006). Однако имеются данные о том, что CISH показывает более низкую чувствительность к низкоуровневым амплификациям (малокопийным последовательностям) (Rosa et al., 2013).

В настоящее время FISH является широко используемым методом исследования и анализа нуклеиновых кислот (Liehr, 2018; Veselinoyva et al., 2021; Yurchenko et al., 2022). Для обнаружения протяженных однокопийных последовательностей ДНК широкую распространенность получили библиотеки на основе искусственных бактериальных (bacterial artificial chromosome – BAC) и дрожжевых хромосом (yeast artificial chromosomes – YAC), позволяющие покрыть большую часть генома человека (Рубцов, 2006; Sader et al., 2019). В YAC размер вставки ДНК находится в пределах 100–2000 т. п. н., а значительным недостатком использования такого вектора является его нестабильность и способность к спонтанному удалению фрагментов вставки (Monaco, Larin,

Таблица 1. Модифицированные нуклеотиды в составе ДНК-зондов и система усиления

Размер зонда, п. н.	Способ мечения	Метка	Система усиления сигнала	Источник литературы
319, 608, 855	ПЦР	Биотин-dUTP : dNTPs (1 : 7)	SA-HRP + тирамид-Cy3, SA-HRP + тирамид-биотин + SA-FITC	Schriml et al., 1999
200	ПЦР с внутренними праймерами	Биотин-dUTP : dNTPs (1 : 2)	SA-HRP + тирамид-Cy3	Fominaya et al., 2016
630, 1480	ПЦР	Дигоксигенин-dUTP : dNTPs (1 : 3)	Антидигоксигенин-HRP + тирамид-Alexa Fluor 568	Bagheri et al., 2017
1355, 1420	Случайное праймирование	Дигоксигенин-dUTP : dNTPs (1 : 100)	Анти-дигоксигенин-HRP + тирамид-FITC	Navarro-Domínguez et al., 2019
1000, 1100, 1200	Ник-трансляция	Дигоксигенин-dUTP, биотин-dUTP	Антидигоксигенин-HRP + тирамид-FITC, SA-HRP + тирамид-Cy3	Khrustaleva et al., 2019
395, 420	ПЦР	Дигоксигенин-dUTP : dNTPs (1 : 3)	Анти-дигоксигенин-HRP + тирамид-FITC	Chen et al., 2020

Примечание. Cy3 – Cyanine-3; dUTP – дезоксиуридинтрифосфаты; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; SA-HRP – стрептавидин-пероксидаза хрена.

1994). Фрагменты ДНК, клонированные в ВАС, имеют размер 100–300 т. п. н. (Buckley et al., 2018). Из-за значительной протяженности клонированных участков ДНК такие генетические конструкции не позволяют выявлять клинически значимые CNV меньшего размера. Применение олигонуклеотидов для получения локус-специфических ДНК-зондов встречается реже, ввиду необходимости подбора индивидуальных условий в каждом конкретном случае, что приводит к увеличению времени проведения такого анализа. Значимым преимуществом разработки ДНК-зондов на основе олигонуклеотидов является доступность реактивов и, как следствие, низкая стоимость исследования (Жигалина и др., 2020).

Обнаружение уникальных последовательностей размером около 1 т. п. н. долгое время представляло собой сложную задачу. Например, к группе методов, применяемых в таких случаях, относится fiber-FISH и его модификации. Fiber-FISH представляет собой метод, позволяющий картировать хромосомные области с высоким разрешением до 1 т. п. н. на “фибрилле” ДНК. В основе метода лежит расплетение нитей ДНК, их растяжение и фиксация в таком состоянии на предметном стекле перед гибридизацией хромосомного препарата с ДНК-зондами (Florijn et al., 1995). Однако к недостаткам этого метода можно отнести неоднородное растяжение хромосомных нитей и, как следствие, разное разрешение на участках хромосом, а также длительный протокол приготовления препарата (Ye, Heng, 2017). В настоящее время для обнаружения при гибридизации *in situ* нуклеотидных последовательностей размером около 1 т. п. н. выгодно использовать системы TSA (табл. 1).

Протокол метода TSA-*in situ* гибридизации

Протокол проведения TSA включает несколько основных этапов, которые могут варьировать по времени в небольшом диапазоне в зависимости от выбранного набора реактивов. На первой стадии хромосомный препарат обрабатывают блокирующим буфером (TNB) во влажной камере в течение 30–60 мин. Затем его инкубируют в 100 мкл раствора первичных антител в зависимости от меченых нуклеотидов в составе ДНК-зонда. В случае с биотинилированными нуклеотидами в качестве первичных антител используют стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (SA-HRP), обычно разведенный в соотношении 1 : 100 в буфере TNB, в течение 1 ч во влажной камере. Затем идет этап промывки в специальном буфере (TNT), обычно 3 раза по 5 мин при осторожном встряхивании. После этого производят инкубацию с 100 мкл биотинилтирамида, разбавленным (1 : 50) амплифицирующим буфером, в течение 5–10 мин во влажной камере. Следующим этапом удаляют раствор тирамида, как правило, путем трех промывок по 5 мин в специальном TNT-буфере. Детекцию биотинилтирамида осуществляют инкубацией хромосомных препаратов с флуоресцентно-меченым стрептавидином в течение 1 ч во влажной камере. Затем после трех промывок в промывочном буфере препарат окрашивают красителем DAPI и проводят визуализацию (Perez et al., 2009). Протокол не является универсальным, поэтому необходим индивидуальный подбор условий в каждом конкретном исследовании.

Как было сказано выше, в результате каталитической активности пероксидазы образуется высоко реакционноспособное промежуточное соединение тирамида, которое связывается с аминокислотными

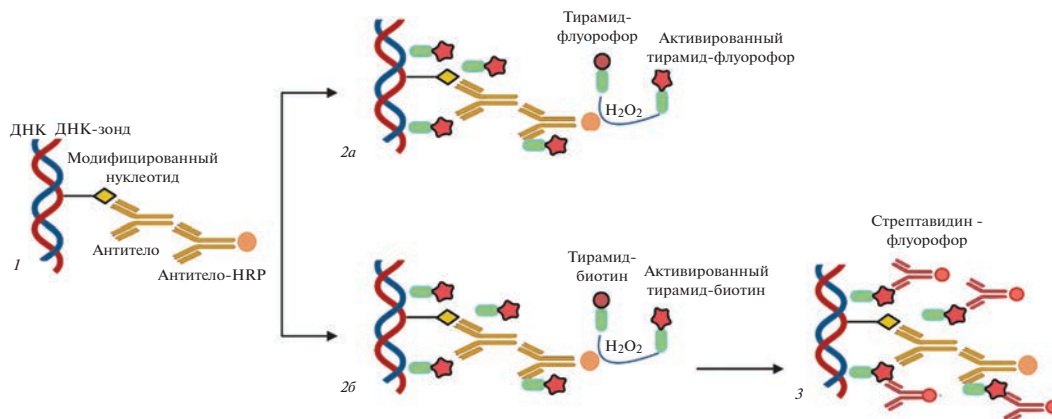


Рис. 5. Схема прямого и непрямого подхода к детекции комплементарного взаимодействия между несерийным ДНК-зондом и целевой последовательностью ДНК. 1 – Взаимодействие между модифицированным нуклеотидом (флуоресцентно-меченым/связанным с гаптеном) и специфическим первичным антителом (антитело) при дальнейшем добавлении вторичного антитела, конъюгированного с ферментативной меткой (антитело-HRP). 2a – Добавление в систему тирамида, меченного флуорофором, с дальнейшим получением высоко реакционноспособного соединения тирамида, которое образует ковалентные связи с аминокислотными нуклеофильными радикалами белков на предметном стекле; анализ взаимодействия проводят на флуоресцентном микроскопе. 2б – Добавление в систему тирамида, меченного гаптеном (биотин), с дальнейшим образованием высоко реакционноспособного соединения тирамида, которое образует ковалентные связи с аминокислотными нуклеофильными радикалами белков на предметном стекле. 3 – Добавление специфических к гаптену антител, связанных с флуоресцентной меткой (стрептавидин-флуорофор, не прямой способ); анализируют взаимодействия с помощью флуоресцентного микроскопа. Использование непрямого метода детекции позволяет повысить интенсивность сигнала в 100–1000 раз за счет увеличения локальной концентрации флуоресцентной метки.

остатками белков в непосредственной близости от каталитического центра пероксидазы хрена (рис. 5). Визуализация отложившихся тирамидов может проводиться либо непосредственно после реакции TSA с помощью флуоресцентной микроскопии, если используются меченные флуорофором тирамиды (Texas Red, FITC, Cy3), либо косвенно при добавлении специфических антител, если в качестве гаптена используется производное биотина или дигоксигенина.

В целом, TSA имеет достаточно преимуществ и в некоторых исследованиях является методом выбора, однако наряду с этим он имеет и недостатки (табл. 2). Усиление сигнала и, как следствие, высокая чувствительность метода возможны благодаря отложению активированного тирамида, которое позволяет обнаружить небольшие участки ДНК (субмикроскопические CNV). К преимуществам TSA также можно отнести совместимость метода с объектами разных типов: клетками, тканями, целыми организмами. Еще одним преимуществом TSA является ее способность обнаруживать несколько целевых участков (мультиплексирование) за счет использования вторичных антител, флуоресцентные или хромогенные метки которых испускают свет в разных волновых диапазонах (Speel et al., 2006).

Несмотря на преимущества метода TSA, можно выделить ряд недостатков, ограничивающих его применение в ряде исследований. Одним из наиболее существенных недостатков метода является, например, чувствительность к высокому фону из-за неспецифического связывания соединения тирамида

или наличия эндогенных пероксидаз (Schriml et al., 1999). Кроме того, избыточное использование тирамида в реакции может привести к гашению флуоресцентного или хромогенного сигнала, что снижает его количественную оценку. Еще одним недостатком является сложность оптимизации протокола TSA, поскольку необходимо учитывать множество параметров, таких как концентрация антител и блокирующих реагентов, время и температура инкубации, что может занимать достаточно продолжительное время. И при выборе различных первичных и вторичных антител для разных целей, а также длительном подборе условий, TSA может оказаться дорогим исследованием. Поэтому, хотя TSA является мощным методом повышения интенсивности сигнала, важно учитывать эти недостатки при планировании экспериментов и интерпретации результатов.

Таблица 2. Преимущества и недостатки использования метода TSA

Преимущества	Недостатки
Усиление сигнала	Высокий неспецифический сигнал (фон)
Высокая чувствительность	Гашение флуоресцентного сигнала
Совместимость с объектами разных типов	Сложность оптимизации
Мультиплексирование	Высокая стоимость

ПРИМЕНЕНИЕ TSA-FISH В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЦИТОГЕНЕТИКЕ

Чаще всего метод TSA используют для визуализации сигналов ДНК-зондов, размер которых находится в пределах 1–2 т. п. н. Очевидно, что использование для таких целей коммерческих ДНК-зондов затруднено в связи с размером и с конкретной геномной локализацией ДНК-зонда. В таком случае необходимо использование несерийных локус-специфических ДНК-зондов с TSA, поскольку сигнал может быть сопоставим с сигналом, получаемым при детекции CNV с помощью коммерческих ДНК-зондов. Так, например, картировали два гена АТФ-связывающей кассеты (ABC) человека с использованием системы TSA-FISH и биотинилированных ДНК-зондов (Schriml et al., 1999). В этой работе было показано, что при обычной FISH не удалось обнаружить сигнал, в то время как TSA-FISH приводила к яркому усиленному сигналу (Schriml et al., 1999). В другой работе предположили использование TSA при идентификации гомологичных участков хромосом растений. Было произведено картирование путем TSA-FISH 12S-глобулина на метафазных пластинках диплоидных и полиплоидных организмов с целью установления родства между хромосомами, несущими сигналы гибридизации (Fominaya et al., 2016). Позднее сверхчувствительная FISH с усилением тирамидного сигнала позволила визуализировать мультигенное семейство аллииназ у филогенетически близких и отдаленных видов (Khrustaleva et al., 2019). Метод TSA-FISH был применен для исследования плоидности красной водоросли *Gracilariopsis lemaneiformis* (Chen et al., 2020). Несмотря на то, что большинство данных по TSA-FISH получены на различных биологических объектах (растениях, бактериях), эти результаты вполне могут быть экстраполированы на диагностические исследования у человека (Bagheri et al., 2017; Khrustaleva et al., 2019).

Таким образом, применение технологии усиления сигнала с использованием тирамида имеет большое практическое значение. Полученные знания о локализации ДНК-последовательностей на хромосоме позволяют проводить диагностику конститутивных хромосомных аномалий при использовании метода FISH. Перспективной областью применения гибридизации ДНК *in situ* с последующим усилением сигнала тирамидом является идентификация субмикроскопических CNV, поскольку их обнаружение ограничено размером коммерческих ДНК-зондов. В зависимости от использованного модифицированного нуклеотида в составе ДНК-зонда, возможно еще большее усиление сигнала за счет повышенной локальной концентрации флуоресцентной или хромогенной метки в исследуемых образцах в случаях непрямого детекции взаимодействия зонда с ДНК-мишенью.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет бюджетных средств в рамках темы НИР № 122032300370-1 “Изучение структурно-функциональных особенностей и механизмов формирования хромосомных аномалий и геномного дисбаланса”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Атякшин Д.А., Костин А.А., Шишкина В.В., Бухвалов И.Б., Тиманн М. 2022. Особенности распределения фермента CD38 в триптаза-позитивных тучных клетках: цитофизиологические и гистопатологические аспекты. Журнал анатомии и гистопатологии. Т. 11. № 1. С. 9. (Atjakshin D.A., Kostin A.A., Shishkina V.V., Buhvalov I.B., Timann M. 2022. Features of CD38 enzyme distribution in tryptase-positive mast cells: cytophysiological and histopathological aspects. J. Anat. Histopathol. V. 11. № 1. P. 9.)
- Ведяйкин А.Д., Ходорковский М.А., Вишняков И.Е. 2019. Методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения и их использование для визуализации различных клеточных структур. Цитология. Т. 61. № 5. С. 343. (Vedyaykin A.D., Khodorkovskii M.A., Vishnyakov I.E. 2019. Super-resolution microscopy methods and their use for visualization of various cell structures. Tsitologiya. V. 61. № 5. P. 343.)
- Жигалина Д.И., Скрябин Н.А., Васильева О.Ю., Лопаткина М.Е., Васильев С.А., Сивоха В.М., Беляева Е.О., Савченко Р.Р., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н. 2020. FISH-диагностика хромосомной транслокации с использованием технологии синтеза локус-специфических ДНК-зондов на основе ПЦР длинных фрагментов. Генетика. Т. 56. № 6. С. 704. (Zhigalina D.I., Skryabin N.A., Vasilieva O.Yu., Lopatkina M.E.I., Vasiliev S.A., Sivokha V.M., Belyaeva E.O., Savchenko R.R., Nazarenko L.P., Lebedev I.N. 2020. FISH diagnostics of chromosomal translocation with the technology of synthesis of locus-specific dna probes based on long-range PCR. Russian J. Gen. V. 56. № 6. P. 704.)
- Рубцов Н.Б. 2006. Методы работы с хромосомами млекопитающих: учебное пособие. Новосибирский гос. ун-т. Новосибирск. 152 с. (Rubtsov N.B. 2006. Metody raboty s hromosomami mlekopitayushchih: ucheb. posobie. Novosib. gos. un-t. Novosibirsk. 152 p.)
- Твеленёва А.А., Шилова Н.В. 2019. Методы верификации субмикроскопических клинически значимых вариаций числа копий участков ДНК. Медицинская генетика. Т. 18. № 3. С. 26. (Tveleneva A.A., Shilova N.V. 2019. Methods for verification of submicroscopic pathogeni copy number variations. Medicinskaya genetika [Medical genetics]. V. 18. № 3. С. 26.)
- Херрингтон С., МакГи Дж. (Под. ред.) 1999. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М. Мир. 558 с. (Herrington C., McGee J. (Eds.) 1999. Diagnostic molecu-

- lar pathology. A practical approach. Oxford University Press. 558 p.)
- Alamri A., Nam J.Y., Blancato J.K. 2017. Fluorescence in situ hybridization of cells, chromosomes, and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Methods Mol. Biol.* V. 1606. P. 265.
- Bagheri G., Lehner J.D., Zhong J. 2017. Enhanced detection of *Rickettsia* species in *Ixodes pacificus* using highly sensitive fluorescence in situ hybridization coupled with tyramide signal amplification. *Ticks Tick Borne Dis.* V. 8. P. 915.
- Bobrow M.N., Harris T.D., Shaughnessy K.J., Litt G.J. 1989. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J. Immunol. Methods.* V. 125. P. 279.
- Buckley K.M., Dong P., Cameron R.A., Rast J.P. 2018. Bacterial artificial chromosomes as recombinant reporter constructs to investigate gene expression and regulation in echinoderms. *Brief Funct. Genomics.* V. 17. P. 362.
- Chen H., Feng X., Jiang M., Xiao B., Zhang J., Zhang W., Hu Y., Sui Z. 2020. Estimating the ploidy of *Gracilariopsis lemaneiformis* at both the cellular and genomic level. *J. Phycol.* V. 56. P. 1339.
- Chen Y., Zhang Y., Wang Y., Zhang L., Brinkman E.K., Adam S.A., Goldman R., van Steensel B., Ma J., Belmont A.S. 2018. Mapping 3D genome organization relative to nuclear compartments using TSA-Seq as a cytological ruler. *J. Cell Biol.* V. 217. P. 4025.
- Cheung S.W., Bi W. 2018. Novel applications of array comparative genomic hybridization in molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* V. 18. P. 531.
- Cole S.H., Carney G.E., McClung C.A., Willard S.S., Taylor B.J., Hirsh J. 2005. Two functional but noncomplementing *Drosophila* tyrosine decarboxylase genes: distinct roles for neural tyramine and octopamine in female fertility. *J. Biol. Chem.* V. 280. P. 14948.
- Dimitri P. 2004. Fluorescent in situ hybridization with transposable element probes to mitotic chromosomal heterochromatin of *Drosophila*. *Methods Mol. Biol.* V. 260. P. 29.
- Einarson O.J., Sen D. 2017. Self-biotinylation of DNA G-quadruplexes via intrinsic peroxidase activity. *Nucleic Acids Res.* V. 45. P. 9813.
- Florijn R.J., Bonden L.A., Vrolijk H., Wiegant J., Vaandrager J.W., Baas F., den Dunnen J.T., Tanke H.J., van Ommen G.J., Raap A.K. 1995. High-resolution DNA Fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar-coding of large genes. *Hum. Mol. Genet.* V. 4. P. 831.
- Fominaya A., Loarce Y., González J.M., Ferrer E. 2016. Tyramide signal amplification: fluorescence in situ hybridization for identifying homoeologous chromosomes. *Methods Mol. Biol.* V. 1429. P. 35.
- Francisco-Cruz A., Parra R., Tetzlaff M.T., Wistuba II. 2020. Multiplex immunofluorescence assays. *Methods Mol. Biol.* V. 2055. P. 467.
- Foster H.A., Sturmey R.G., Stokes P.J., Leese H.J., Bridger J.M., Griffin D.K. 2010. Fluorescence in situ hybridization on early porcine embryos. *Methods Mol. Biol.* V. 659. P. 427.
- Green M.R., Sambrook J. 2020. Labeling of DNA probes by nick translation. *Cold Spring Harb Protoc.* V. 7. P. 100602.
- Gross R.A., Kumar A., Kalra B. 2001. Polymer synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Chem. Rev.* V. 101. P. 2097.
- Hopman A.H.N., Ramaekers F.C.S., Speel E.J.M. 1998. Rapid synthesis of biotin-, digoxigenin-, trinitrophenyl-, and fluorochrome-labeled tyramides and their application for *in situ* hybridization using CARD-amplification. *J. Histochem. Cytochem.* V. 46. P. 771.
- Hoskins R.A., Smith C.D., Carlson J.W., Carvalho A.B., Halpern A., Kaminker J.S., Kennedy C., Mungall C.J., Sullivan B.A., Sutton G.G., Yasuhara J.C., Wakimoto B.T., Myers E.W., Celniker S.E., Rubin G.M., Karpen G.H. 2002. Heterochromatic sequences in a *Drosophila* whole-genome shotgun assembly. *Genome Biol.* V. 3. P. RESEARCH0085.
- Khrustaleva L., Kudryavtseva N., Romanov D., Ermolaev A., Kirov I. 2019. Comparative Tyramide-FISH mapping of the genes controlling flavor and bulb color in *Allium* species revealed an altered gene order. *Sci. Rep.* V. 9. P. 12007.
- Kudryavtseva N., Ermolaev A., Karlov G., Kirov I., Shigyo M., Sato S., Khrustaleva L. 2021. A dual-color Tyr-FISH method for visualizing genes/markers on plant chromosomes to create integrated genetic and cytogenetic maps. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 5860.
- Larracuent A.M., Ferree P.M. 2015. Simple method for fluorescence DNA *in situ* hybridization to squashed chromosomes. *J. Vis. Exp.* V. 95. P. 52288.
- Levy B., Wapner R. 2018. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis. *Fertil. Steril.* V. 109. P. 201.
- Liehr T., Weise A., Hamid A.B., Fan X., Klein E., Aust N., Othman M.A., Mrasek K., Kosyakova N. 2013. Multicolor FISH methods in current clinical diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* V. 13. P. 251.
- Liehr T. 2018. Chromothrips detectable in small supernumerary marker chromosomes (sSMC) using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Methods Mol. Biol.* V. 1769. P. 79.
- Monaco A.P., Larin Z. 1994. ACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *Trends Biotechnol.* V. 12. P. 280.
- Morozkin E.S., Karamysheva T.V., Laktionov P.P., Vlassov V.V., Rubtsov N.B. 2013. DNA probes for FISH analysis of C-negative regions in human chromosomes. *Methods Mol. Biol.* V. 1039. P. 233.
- Navarro-Domínguez B., Ruiz-Ruano F.J., Camacho J.P.M., Cabrero J., López-León M.D. 2017. Transcription of a B chromosome CAP-G pseudogene does not influence normal condensin complex genes in a grasshopper. *Sci. Rep.* V. 7. P. 17650.
- Nielsen K.L., Indiani C., Henriksen A., Feis A., Becucci M., Gajhede M., Smulevich G., Welinder K.G. 2001. Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic, and enzymatic analyses of lignifying *Arabidopsis thaliana* peroxidase A2 and horseradish peroxidase A2. *Biochem. J.* V. 40. P. 11013.
- Pandey V.P., Awasthi M., Singh S., Tiwari S., Dwivedi U.N. 2017. A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochem. Anal. Biochem.* V. 6. P. 308.
- Pérez R., de Bustos A., Jouve N., Cuadrado A. 2009. Localization of Rad50, a single-copy gene, on group 5 chromosomes of wheat, using a FISH protocol employing tyramide for signal amplification (Tyr-FISH). *Cytogenet. Genome Res.* V. 125. P. 321.
- Raap A.K., van de Corput M.P., Vervenne R.A., van Gijlswijk R.P., Tanke H.J., Wiegant J. 1995. Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Hum. Mol. Genet.* V. 4. P. 529.

- Rees J.S., Li X.W., Perrett S., Lilley K.S., Jackson A.P. 2015. Selective proteomic proximity labeling assay using tyramide (SPPLAT): a quantitative method for the proteomic analysis of localized membrane-bound protein clusters. *Curr. Protoc. Protein Sci.* V. 80. P. 19.27.1.
- Rosa F.E., Santos R.M., Rogatto S.R., Domingues M.A. 2013. Chromogenic *in situ* hybridization compared with other approaches to evaluate HER2/neu status in breast carcinomas. *Braz. J. Med. Biol. Res.* V. 46. P. 207.
- Sader M.A., Dias Y., Costa Z.P., Munhoz C., Penha H., Bergès H., Vieira M.L.C., Pedrosa-Harand A. 2019. Identification of passion fruit (*Passiflora edulis*) chromosomes using BAC-FISH. *Chromosome Res.* V. 27. P. 299.
- Sáez A., Andreu F.J., Seguí M.A., Baré M.L., Fernández S., Dinarés C., Rey M. 2006. HER-2 gene amplification by chromogenic *in situ* hybridisation (CISH) compared with fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) in breast cancer-A study of two hundred cases. *Breast.* V. 15. P. 519.
- Sarac I., Hollenstein M. 2019. Terminal deoxynucleotidyl transferase in the synthesis and modification of nucleic acids. *ChemBiochem.* V. 20. P. 860.
- Schriml L.M., Padilla-Nash H.M., Coleman A., Moen P., Nash W.G., Menninger J., Jones G., Ried T., Dean M. 1999. Tyramide signal amplification (TSA)-FISH applied to mapping PCR-labeled probes less than 1 kb in size. *Biotechniques.* V. 27. P. 608.
- Speel E.J., Hopman A.H., Komminoth P. 2006. Tyramide signal amplification for DNA and mRNA *in situ* hybridization. *Methods Mol. Biol.* V. 326. P. 33.
- Speel E. 1999. Detection and amplification systems for sensitive, multiple-target DNA and RNA *in situ* hybridization: looking inside cells with a spectrum of colors. *Histochem.* V. 112. P. 89.
- Speel E.J., Hopman A.H., Komminoth P. 1999. Amplification methods to increase the sensitivity of *in situ* hybridization: play card(s). *J. Histochem. Cytochem.* V. 47. P. 281.
- Stack E.C., Wang C., Roman K.A., Hoyt C.C. 2014. Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: a review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods.* V. 70. P. 46.
- Veselinová D., Mašlanková J., Kalinová K., Mičková H., Marešková M., Rabajdová M. 2021. Selected *in situ* hybridization methods: principles and application. *Molecules.* V. 26. P. 3874.
- Ye C.J., Heng H.H. 2017. High resolution fiber-fluorescence *in situ* hybridization. *Methods Mol. Biol.* V. 1541. P. 151.
- Yurchenko D.A., Minzhenkova M.E., Dadali E.L., Markova Z.G., Rudenskaya G.E., Matyushchenko G.N., Kanivets I.V., Shilova N.V. 2022. Clinical manifestations of various molecular cytogenetic variants of eight cases of “8p inverted duplication/deletion syndrome”. *Biomedicines.* V. 10. P. 567.

Tyramide Signal Amplification: New Opportunities for DNA *In Situ* Hybridization

E. O. Vorontsova^{a, b, *}, D. A. Yurchenko^a, and N. V. Shilova^a

^aResearch Centre for Medical Genetics, Moscow, 115478 Russia

^bPirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: veo.1998@mail.ru

DNA *in situ* hybridization (DNA-ISH) is a widely used method in molecular cytogenetics that allows the localization of specific DNA sequences in particular regions of chromosomes. Implementation of DNA-ISH requires the use of DNA probes, which can be commercial or developed for specific research purposes as non-commercial (homemade) DNA probes. One of the significant drawbacks of non-commercial probes is the difficulty in obtaining a high signal intensity with a small DNA probe size. Therefore, developing approaches to enhance non-commercial DNA probes is an important task in modern molecular cytogenetics. To directly visualize small DNA sequences on a chromosome, the tyramide signal amplification (TSA) method is used. The TSA system is based on the formation of a covalent bond between electron-rich protein fragments in the sample and tyramide molecules linked to a hapten (in chromogenic *in situ* hybridization) or a fluorophore (in fluorescent *in situ* hybridization). This is achieved by converting tyramide molecules into free-radical intermediate compounds under the action of horseradish peroxidase (HRP), followed by deposition of precipitated molecules nearby. As a result, a low-intensity signal is amplified. Thus, TSA is a good complement to the DNA-ISH method, thanks to its high sensitivity and ability to detect small genomic imbalances, and can therefore become a valuable tool for diagnosing chromosomal rearrangements in clinical practice.

Keywords: tyramide, DNA, tyramide amplification, fluorescent *in situ* hybridization, chromogenic *in situ* hybridization

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ БОЛЕЗНЕЙ АЛЬЦГЕЙМЕРА И ПАРКИНСОНА, И ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ВОЗМОЖНОСТЬ ИХ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ

© 2023 г. О. В. Невзглядова¹, *, Е. В. Михайлова¹, Т. Р. Сойдла¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: oneva43@yahoo.com

Поступила в редакцию 12.12.2022 г.

После доработки 25.01.2023 г.

Принята к публикации 08.02.2023 г.

Под действием внешних и внутренних факторов в клетках неизбежно возникают разные измененные белковые формы. С возрастом активность шаперонов и других компонентов клеточного контроля за качеством белка снижается. Это сопровождается накоплением неправильно уложенных белков с измененной конформацией. Наиболее драматично для клетки превращение активного растворимого белка в амилоидное нерастворимое и неактивное состояние. Считается, что такое изменение конформации белка лежит в основе процесса нейродегенерации. Хотя этот процесс интенсивно изучается, многие детали нейродегенерации остаются непроясненными. В настоящем обзоре мы приводим наиболее принятые в настоящее время молекулярные механизмы патогенеза самых распространенных нейродегенеративных заболеваний – Альцгеймера и Паркинсона. Они включают в себя последовательные реакции бета-амилоида и альфа-синуклеина с мембранными рецепторами и модулируются фазовым разделением и кросс-сидингом с другими клеточными прионами. Особое внимание уделяется натуральным полифункциональным соединениям, как наиболее терапевтически перспективным.

Ключевые слова: амилоид, антиамилоидные соединения, немембранные органеллы, кросс-сидинг

DOI: 10.31857/S0041377123040090, **EDN:** ZKSHFP

Нейродегенерация, вызванная конформационным изменением белка, несмотря на многолетнее интенсивное изучение, остается одной из самых актуальных проблем молекулярной клеточной биологии и медицины. В настоящем обзоре мы постарались представить общепринятые концепции патогенеза самых распространенных нейродегенеративных заболеваний – болезней Альцгеймера (БА) и Паркинсона (БП), а также современные подходы к поиску веществ для борьбы с ними.

ГЕНЕРАЦИЯ БЕЛКОВЫХ ИЗОФОРМ

Под действием внешних и внутренних факторов на уровне транскрипции, трансляции или посттрансляционных модификаций в клетке неизбежно возникают разные белковые формы, или протеоформы. Самые кардинальные из них представляют собой конверсию активного растворимого состоя-

ния в амилоидное, нерастворимое и неактивное. Распространено мнение, что способность формировать амилоидные фибриллы изначально присуща всем полипептидным цепям. Иными словами, даже типично не амилоидные белки в определенных обстоятельствах трансформируются либо в амилоидное, либо в амилоидоподобное состояние (Stefani, Dobson, 2003). Причиной обычно служит нарушение баланса между нативным фолдингом и агрегацией белка. Основные компоненты контролирующей системы, протеостаза, обеспечивают либо исправление нефункциональной формы белка, либо его протеолиз (Francic et al., 2021). К дисбалансу чаще всего приводит понижение активности либо лизосомного (Desplats et al., 2009; Hamano et al., 2018), либо динеин-динактинового (dynein–dynactin) комплекса, доставляющего дефектный белок к аутофагосоме (Kieran et al., 2005). Убиквитин-протеасомной деградации обычно подвергаются короткоживущие белки, вовлеченные в регуляцию клеточных сигнальных систем. Долгоживущие клеточные компоненты, органеллы и белковые агрегаты, клетка разрушает с помощью лизосомной системы. Доставка этих компонентов к лизосомам осуществляется в процессе аутофагии, в том числе шаперон-опосредованной.

Принятые сокращения: βА – бета-амилоид; АS – альфа-синуклеин; АФК – активные формы кислорода; БА – болезнь Альцгеймера; БП – болезнь Паркинсона; КП – красный пигмент дрожжей; НМО – немембранные органеллы; ТАГ – триацилглицерол; ЭС – эфиры стероидов; EGCG – галлат эпигаллокатехина; кальцеин-АМ – кальцеин ацетоксиметил.

При старении организма активность шаперонов и белков клеточного контроля снижается, результатом чего становится накопление неправильно уложенных белков с измененной вторичной и третичной структурой.

ПАТОГЕНЕЗ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Конформационные нейродегенеративные заболевания (хронические и прогрессирующие формы протеинопатий) имеют общие черты: гибель нейронов в специфических областях мозга, повреждение синапсов и накопление неправильно уложенных белковых агрегатов, приводящие к нарушению когнитивных и ряда других нейрональных функций. Общая причина этих заболеваний в том, что растворимые правильно уложенные белки, выполняющие регуляторные функции в нервных клетках и синапсах, претерпевают амилоидизацию, превращаясь в нефункциональные нерастворимые агрегаты или полимеры, мономерами которых выступают сами белки с измененной конформацией. В основе амилоидной агрегации лежит способность белков к самосборке, в результате которой возникают бета-складчатые вторичные структуры, стабилизируемые межмолекулярными водородными связями. Короткие полимеры, содержащие бета-слои, называют “затравками” (seeds) или пропонами, т.к. они значительно ускоряют процесс самосборки.

Огромный клинический и экспериментальный материал, полученный на клеточном и организменном уровнях, интенсивно изучали в течение последних десятилетий (более 3-х). Самое распространенное нейродегенеративное заболевание – БА, связано с повреждением синапсов и нейронов, в основном холинэргических, относящихся к гиппокампу и коре головного мозга (Braak et al., 2006). Симптоматически оно проявляется спутанностью сознания и потерей памяти. В головном мозге больных в межклеточном пространстве находят отложения (бляшки), состоящие из фибрилл бета-амилоида (β A) и сети нейрофибрилярных тяжей тау-белка. Отложения этих белков служат основным диагностическим маркером БА. Хотя β A образуется вне клетки, а тау-белок внутри, агрегация этих белков имеет взаимозависимый характер (Bennett et al., 2017; Jacobs et al., 2018).

Функционально-активный β A возникает в результате расщепления растворимого белка-предшественника APP тремя секретазы: альфа, бета и гамма. Главный путь протеолиза начинается с действия альфа-секретазы и приводит к образованию растворимого белка sAPP-альфа и неамилоидогенного белка, состоящего из 83 аминокислот. Минорный амилоидогенный протеолиз на первом этапе осуществляет бета-секретазы. Он приводит к растворимому белку sAPP-бета, из которого альфа-секретазы выселяет белок β A, содержащий от 37 до 42 аминокислот. Функциональные белки, включая белок-предшественник APP, играют роль позитивных регу-

ляторов в нормальном развитии мозга и активности синапсов, а также осуществляют нейропротекцию (Hillen, 2019; Penke et al., 2019). В частности, β A не только обеспечивает нормальную работу синапсов, но также нужен нервным клеткам для регенерации и для поддержания гемато-энцефалического барьера. Показано также его антимикробное и противовирусное действие. Однако структура белка β A обеспечивает его способность сначала собираться в растворимые интермедиаты, а затем переходить в нерастворимые фибриллы.

На пути образования зрелых амилоидных фибрилл возникают интермедиаты, которые принято делить на три основные группы: олигомеры, протофибриллы и фибриллы, отличающиеся основными параметрами. Так, формирующиеся на ранних этапах фибрилляции олигомеры имеют структуру с антипараллельными бета-слоями и не окрашиваются специфическими для амилоидов красителями (тиофлавином и Конго красным). Они растворимы, сильно варьируют по своей морфологии и реагируют с антителами к олигомерам.

Класс протофибрилл отличается параллельным расположением бета-слоев и связыванием со специфическими для амилоидов красителями, а также реакцией на антитела против амилоидных фибрилл. Однако, подобно олигомерам, они остаются растворимыми и сохраняют большое морфологическое разнообразие. Класс фибрилл характеризуется параллельным направлением бета-слоев, типичным для амилоидов связыванием с красителями, реагирует на фибриллярные антитела, но в отличие от двух предшествующих интермедиатов, состоит из линейных нерастворимых филаментов, по мере созревания скручивающихся в тяжи (рис. 1) (Penke et al., 2020). Зрелые фибриллы обычно мало токсичны, а при определенных условиях могут даже выполнять определенную функцию, чаще всего защитную.

О том, что олигомеры, а не зрелые фибриллы, являются наиболее токсичными интермедиатами, получены многочисленные свидетельства (см. обзор: Dujardin et al., 2014). Считается, что первичным выраженным токсическим влиянием обладают малые по размеру олигомеры, возникающие на самых ранних этапах агрегации (Chernova et al., 2019). При этом концы полимера, внедряясь в мембрану нервной клетки и разрушая ее, служат одной из главных причин токсичности β A (Wells et al., 2021). Поэтому олигомеры, как более мелкие полимеры, оказываются для клетки опаснее, чем фибриллы. На модельных опытах с выращиванием разных амилоидов четко показано, что чем длиннее фибриллы, тем меньше их токсичность (Xue et al., 2010).

Исследования недавних лет обнаружили интересный факт, важный для поиска эффективной терапии БА. Оказалось, что не все олигомеры оказывают патологическое действие *in vitro* и *in vivo*. В целом ряде работ олигомеры подразделяют на токсичную и нетоксич-

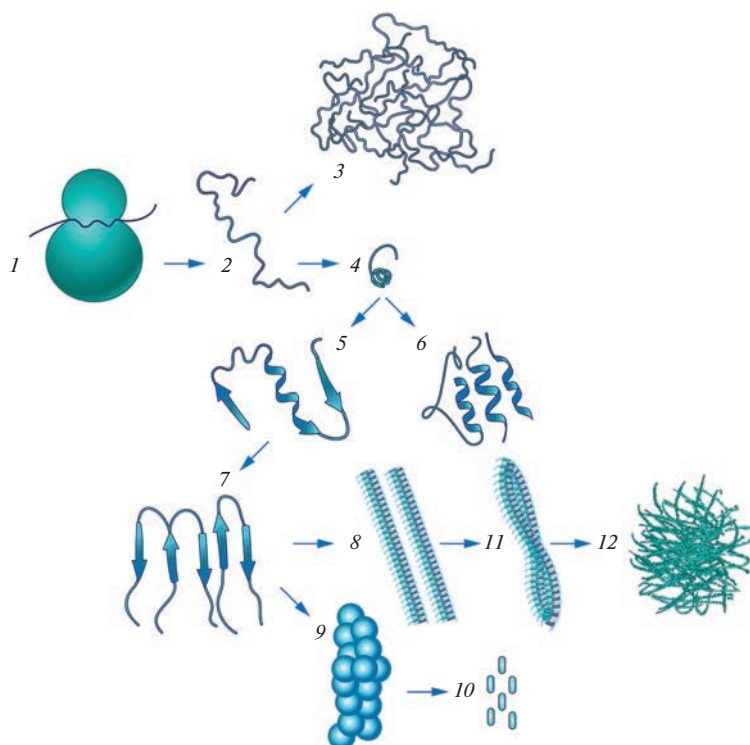


Рис. 1. Сборка агрегатов бета-амилоида (β А) и их возможные преобразования. 1 – Рибосома; 2 – неуложенный нативный мономер; 3 – неупорядоченные агрегаты; 4 – шапероны; 5 – уложенный белок, содержащий альфа-спирали и бета-слои; 6 – олигомер с альфа-спиральной структурой; 7 – олигомер, состоящий из бета-слоев; 8 – растворимые протофибриллы с параллельными бета-слоями; 9 – протеасома, в которой агрегаты подвергаются гидролизу; 10 – аминокислоты; 11 – нерастворимые фибриллы, 12 – отложения, состоящие из крупных амилоидных агрегатов и сети тяжей из тау-белка (бляшки).

ную субпопуляции (Lorenzen et al., 2014; Paslavski et al., 2014; Alam et al., 2019; Penke et al., 2020). Токсичные олигомеры первого типа обладают относительно высокой мол. массой (больше 50 кДа), богаты бета-слоями, не связываются с бляшками, не реагируют с антителами к фибриллам и нарушают память при введении мышам. Олигомеры второго типа имеют мол. массу менее 50 кДа, богаты альфа-спиралями и утрачивают тех функций, которые несут мономеры. Из них не образуются фибриллы, они связываются с бляшками, реагируют на антитела к фибриллам и, будучи нетоксичными, не нарушают память.

Патогенез БА представляет собой длительный многоступенчатый процесс, в котором токсичные олигомеры β А выступают в роли триггеров после того, как гидрофобные участки на их поверхности вступают во взаимодействие с липидным слоем клеточной мембраны нейрона. Ключевая роль в патогенезе БА принадлежит, предположительно, олигомерам β А и модифицированным формам мембранного тау-белка – прежде всего олигомерам и гиперфосфорилированным тау-фибриллам (Penke et al., 2020; Niewiadomska et al., 2021).

В начале патологического процесса олигомеры β А образуют комплексы со специфическими белками-рецепторами. Особая роль при этом отводится

клеточному прионному белку PrP. Он представляет собой гликозилированный белок, локализованный (заякоренный) в липидных слоях мембраны. Влияние PrP, связывающегося с β А, на проявление токсичности показано на дрозофиле (Younan et al., 2018). В интактной мономерной форме PrP участвует в передаче сигнала, а измененные формы этого белка значительно влияют на развитие БА (Nachiya et al., 2021; König et al., 2021). Кроме того, прионная форма PrP-Sc меняет структуру и экспрессию тау-белка, также связанного с клеточной мембраной. В норме фосфорилированный тау-белок связывается с микротубулинами, обеспечивая стабильность генетического материала нейронов, а связываясь с актином, участвует в работе цитоскелета, защищая концы микротубулина от деполимеризации. Благодаря альтернативному сплайсингу, разной степени фосфорилирования и фибрилляции в нейронах существует большое разнообразие изоформ тау-белка. При БА за счет взаимодействия с амилоидным β А происходит олигомеризация тау-белка, которая снижает его способность связываться с микротубулинами и выполнять свои функции (Barbier et al., 2019).

Изменение сигналинга под действием олигомеров β А приводит к появлению токсичных гиперфосфорилированных форм тау-белка как мономерной, так и олигомерной протеоформ. При этом он пре-

вращается в тяжи, препятствующие образованию стрессовых гранул, и в этом состоянии становится вискозотоксичным. Гиперфосфорилирование сопровождается превращением молекул белка в клубки спутанных филаментов или сеть нейрофибрилярных тяжей (NETs), которую всегда находят в мозгу больных БА. Но хотя эти тяжи и состоят из токсических изоформ, они не обязательно приводят к нейрональной дисфункции. Ключевая роль в индукции и развитии токсичности принадлежит олигомерам тау-белка (TauOs) независимо от степени их фосфорилирования. Они имеют развитую бета-структуру и механизм их патологического действия на нейроны отличается от β A. Они вызывают множественные нарушения за счет экзоцитоза и возможности распространяться среди окружающих нервных клеток благодаря эндоцитозу. Патологические процессы, запускаемые олигомерами β A в межклеточном пространстве и тау-белка внутри клетки, весьма разнообразны (Nygaard et al., 2014; Zhang et al., 2019). Это нарушения геномной стабильности, энергетического и ионного обмена, митохондриальных функций, клеточного сигналинга, синаптической проводимости, сборки микротрубулина, повреждение нейронного цитоскелета, аксонального транспорта и протеолитической системы. Стоит отметить, что увеличение уровня β A в цереброспинальной жидкости пациентов обнаруживают до появления увеличенного уровня токсических форм тау-белка, поэтому считается, что токсичные олигомеры β A – главный первичный триггер БА.

ПАТОГЕНЕЗ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Среди нейродегенеративных заболеваний БП по встречаемости стоит на втором месте после БА. Ее внешние симптомы: акинезия, снижение тонуса скелетной и внутренней мускулатуры, тремор в состоянии покоя, нарушение координации движений, а также в некоторых случаях поражение когнитивной сферы. В основе перечисленных патологических изменений лежит утрата допаминергических нейронов в области мозга, называемой черной субстанцией (*substantia nigra*). Сохранившиеся нейроны содержат цитоплазматические включения, так называемые тельца Леви, состоящие из белка альфа-синуклеина (AS) в амилоидной форме в виде фибриллярных структур (Vaba et al., 1998).

Мономеры альфа-синуклеина состоят из 140 аминокислот и контролируют нейрональную трансмиссию, т.е. передачу нервного импульса в синапсах допаминергических нейронов. Агрегация альфа-синуклеина блокирует эти жизненно важные функции. Среди интермедиатов на пути агрегации самыми токсичными считаются олигомеры, но и зрелые фибриллы, препятствуя нейрональной трансмиссии в аксонах, также вносят вклад в синуклеиновую токсичность (Stefanis, 2012).

Существует множество процессов, участвующих в гибели нейронов, вызванных амилоидизацией аль-

фа-синуклеина. В основе их способность определенных форм амилоида встраиваться в липидные слои клеточной мембраны, нарушая ее целостность.

На начальных этапах фибрилляции структура олигомеров богата альфа-спиралями, но по мере роста фибриллы пропорция бета-слоев в них резко возрастает. Паславский с соавторами обнаружили два типа олигомеров: неспособный к обратной диссоциации мономеров, но способный в процессе элонгации трансформироваться в фибриллы, и другой, не участвующий ни в образовании фибрилл, ни в синуклеин-индуцированном патогенезе (Paslawski et al., 2014). В дальнейшем предложены уже три класса олигомеров (Casella et al., 2022). Первый включает тетрамерные или более сложные олигомеры, богатые альфа-спиралями, короткоживущие и не отличающиеся от мономеров по биологической функции. Они не способны давать агрегированные амилоидные формы и не являются токсичными. Второй – олигомеры с неупорядоченной структурой, коротким временем жизни, чувствительные к протеиназе К и биологически инертные (ОА). Третий – олигомеры из 15–30 мономеров, богатые бета-структурой. Они долгоживущие, устойчивы к действию протеиназы К и не выполняют функции мономерного альфа-синуклеина (ОВ).

Хотя классы ОА и ОВ способны связываться с клеточной мембраной, показано, что нетоксичные олигомеры ОА и токсичные ОВ по-разному нарушают целостность двухслойной липидной мембраны (Fusco et al., 2017). Авторы использовали рекомбинантный амилоид AS человека, экспрессированный в *E. coli*. Выделенные и очищенные фракции AS добавляли к кальцеин-АМ содержащим модельным везикулам с интактной липидной мембраной. О нарушении мембраны судили по увеличению флуоресценции кальцеина, высвобождаемого из везикул. Инкубация везикул с ОА индуцировала незначительное количество выделяемого из них кальцеина, сопоставимое с тем, которое вызывали альфа-синуклеиновые мономеры и зрелые фибриллы. В то же время инкубация везикул с ОВ приводила к высвобождению кальцеина в 10 раз интенсивнее, что говорит о том, что ОВ вызывает значительное повреждение липидных слоев. Эти результаты совпадали с данными, полученными на клеточных линиях нейробластомы человека и кортикальных нейронов крысы: только фракция ОВ индуцировала высокий уровень свечения свободного кальцеина. Она же значительно повышала количество АФК и клеточную гибель.

Методом конфокальной сканирующей микроскопии исследовали взаимодействие олигомеров альфа-синуклеина с двухслойной липидной мембраной клетки. Показано, что ОА имеют в основном неупорядоченную структуру и связываются исключительно с поверхностью мембраны. Токсичные олигомеры ОВ связываются с поверхностью мембраны за счет сворачивания мобильного N-терминального участка в амфипатические альфа-спирали и за счет

сердцевинных, коровых районов, богатых бета-структурами, проникают в липидные слои. При этом нарушается целостность двухслойной клеточной мембраны, сопровождаемая ее значительными повреждениями. ОВ олигомеры индуцируют поступление ионов кальция в цитоплазму из эндоплазматического ретикула или из межклеточного пространства. Так как альфа-синуклеин – липофильный белок, колокализованный с митохондриями, (Volles et al., 2001) избыток кальция, накапливаемого в митохондриях, нарушает транспорт электронов дыхательной цепи, а нарушения функций митохондрий запускает митофагию (Зубова, 2019). Митохондрии фрагментируются, возникает окислительный стресс, накапливаются АФК, нарушая функции других клеточных структур. В частности, происходит переход допамина из везикул в цитоплазму, где он высоко токсичен (Luth et al., 2014; Vivoli Vega et al., 2019). Скопление олигомеров вызывает эндоплазматический стресс (Colla et al., 2012) и дисфункцию системы протеостаза, нарушая в ходе аутофагии процессы в протеасомной системе и в системе лизосомной деградации (Lindersson et al., 2004; Scudamore, Ciossek, 2018). Подавление аутофагии, в свою очередь, приводит к накоплению неправильно уложенных белков и усиливает окислительный стресс с последующим дополнительным накоплением АФК.

Касчелла с соавторами (Cascella et al., 2021) показали, что фибриллы становятся источниками токсичных олигомеров, при этом длинные фибриллы менее токсичны, чем короткие. Авторы объясняют это тем, что их большая пропорция приходится на небольшие фибриллы, поскольку “отщепление” олигомеров идет от концов фибрилл. Малые по размеру фибриллы, как и олигомеры ОВ, взаимодействуют с поверхностью мембраны клетки за счет особого строения своего N-концевого участка, но не проникают вглубь мембраны и поэтому не вызывают в ней значительных повреждений.

Основной механизм альфа-синуклеиновой токсичности связан таким образом преимущественно с олигомерами ОВ, богатыми бета-структурами и гидрофобными участками, ориентированными в сторону липидных слоев клеточной мембраны. В то время как основная роль фибрилл в патогенезе БП состоит не в повреждении клеточных мембран, а в том, что они служат источником токсичных олигомеров, а также необходимы для воспроизведения и распространения БП по прионному типу. То есть альфа-синуклеиновые агрегаты действуют как затравки, вызывая амилоидную конверсию мономеров даже с правильной конформацией и таким образом запуская патологические изменения в реципиентных нейронах. Распространение альфа-синуклеина осуществляется за счет экзо- и эндоцитоза. Нейроны секретируют альфа-синуклеиновые мономеры, олигомеры и фибриллы из везикул и экзосом за счет кальций-зависимого экзоцитоза (Emmanouilidou et al., 2010), а с помощью мембранных рецепторов или

эндоцитоза свободные фибриллы связываются с плазматической мембраной и проникают в цитозоль нервных клеток (Hijaz et al., 2020).

РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В АМИЛОИДИЗАЦИИ

В ряде нейродегенеративных заболеваний отмечено нарушение гомеостаза ионов металлов – количество ионов металлов в клетках мозга возрастает до 10 раз. В норме защитную функцию в клетке выполняет нейтральная эндопептидаза, (NEP-Zn-металлотрионеин), которая расщепляет токсичные олигомеры β A, регулируя баланс между ними и мономерами (Russo et al., 2005), при этом повышение концентрации β A-металлопротеина, а также ионов меди, железа и цинка действует как фактор инициации БА (Orazo et al., 2002; Li et al., 2004). Найдена корреляция между концентрациями названных ионов в мозге, формированием бляшек β A и усилением окислительного стресса, связанного с нарушением баланса окислительно-восстановительных реакций в митохондриях: увеличение концентрации ионов металлов в нейронах вызывает окислительный стресс с последующим губительным для клетки накоплением АФК (Bush, 2003; Jomova et al., 2010).

Одним из эффективных способов борьбы с металло-индуцированной токсичностью может стать поиск хелатных лигандов, которые, связываясь с металлами, обладают большей аффинностью к клеточной мембране по сравнению с той, какой обладает комплекс металла с молекулами амилоидного белка. Некоторые аналоги пуриновых нуклеотидов, являясь природными хелаторами, могут оказаться полезными в терапии БА, вызывая дезагрегацию β A и одновременно действуя как антиоксиданты (Nevroni et al., 2016). Вильяр-Пике с соавторами (Villar-Piqué et al., 2016) показал, что мутантный белок H50-Q, связываясь с Cu^{2+} , вызывает вытеснение комплекса H50 с медью в молекуле амилоидного синуклеина. При этом происходит конверсия токсичных форм белка ОВ в нетоксичные альфа-синуклеиновые агрегаты типа ОА. Формирующиеся олигомеры были аморфны, не связывались с тиофлавином Т и были неспособны исполнять роль затравки. Структура и хелатное действие некоторых металлсодержащих комплексов подробно описаны (см. обзор: Gomes et al., 2020).

КРОСС-СИДИНГ И ГЕТЕРОТИПИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ АМИЛОИДАМИ

Хотя механизмы токсичности сегодня в значительной мере выяснены, остается непонятным, что запускает самосборку, т.е. амилоидную агрегацию белков, склонных к протеинопатиям, в частности β A и альфа-синуклеина. Предполагается наиболее вероятным, что ее запускает либо стресс, либо достигшая критической величины концентрация мономеров. Показано, что высокая концентрация мономеров вызывает конверсию нативного белка в белок с

нарушенной конформацией, склонный к агрегации. В результате возникают затравки. Начальный процесс самосборки называется первичной нуклеацией. Она происходит в отсутствие сформированных амилоидных агрегатов и приводит к образованию метастабильного олигомерного ядра, из которого затем в процессе элонгации формируются фибриллы. Первая стадия нуклеации может занимать длительное время, но после ее завершения, следующая стадия вторичной нуклеации проходит быстро (Habchi et al., 2018). Вторичная нуклеация – процесс, при котором зрелые фибриллы катализируют появление новых олигомеров, выполняющих роль затравок. Последние не только обеспечивают усиленный рост фибрилл, но, благодаря эндоцитозу, распространяют патологию среди нервных клеток через синапсы (Wells et al., 2019).

При многих нейродегенеративных заболеваниях, включая БА и БП, большую роль в агрегации играет кросс-сидинг (cross-seeding), когда существующие затравки одного белка стимулируют нуклеацию других. В последние годы было обнаружено, что гетеротипические взаимодействия между амилоидами весьма распространены при нейродегенеративных заболеваниях, и от них зависят такие фундаментальные процессы, как агрегация, нуклеация и токсичность (Konstantoulea et al., 2021; Subedi et al., 2022). Недавние исследования показали, что гетеротипические взаимодействия белков при АБ не исчерпываются связью β A с белками тау и PrP, но распространяются также на полипептид IAPP, вызывающий у людей диабет второго типа (Wang, Westermark, 2021). У больных этим заболеванием шанс заболеть БА повышается в несколько раз. В экспериментах *in vitro* на разных клеточных линиях млекопитающих показано, что инъекции IAPP увеличивают агрегацию β A (Bharadwaj et al., 2020), а инъекции β A-фибрилл у трансгенных мышей с диабетом второго типа индуцируют агрегацию IAPP (Jackson et al., 2013).

Кросс-сидинг, взаимозависимость агрегации и физическое взаимодействие IAPP с β A на молекулярном уровне показаны в 2015 г. (Young et al., 2015). Применив ион-мобильную масс-спектрометрию, эти авторы показали формирование гетерогенных префибрилярных структур – гетеро-олигомеров. Возможное объяснение гетеротипических взаимоотношений этих белков лежит в значительном подобии их первичной аминокислотной последовательности, которое составляет 47%, в то время как на определенных коротких участках в гидрофобных районах, особенно важных для самосборки амилоидов, это сходство еще больше. Стерический эффект “молнии”, формируемый между бета слоями разных амилоидных пептидов, обуславливает возможность эффективного кросс-сидинга. В дрожжевом прионе Sur35 найден короткий фрагмент -GNINQNU-, стимулирующий кросс-сидинг как с амилоидом β A, так и с амилоидом IAPP, и вызывающий ко-экспрессию обоих амилоидов (Zhang Y. et al., 2021). Показано влияние кросс-сидинга между β A и белком-эн-

хансером вирусного иммунодефицита, проявляющего типичные черты приона (HIV/AIDS-SEVI); в экспериментах *in vivo* и *in vitro* кросс-сидинг приводил к ингибирующему влиянию SEVI на агрегацию и токсичность β A (Tang et al., 2022b).

Накоплено много информации о гетеротипической связи амилоидов при БА и БП: в мозгу многих пациентов с БА обнаружены тельца Леви (Hashimoto, Masliah, 1999), а в мозгу больных БП – бляшки β A (Kalaitzakis et al., 2008). Данные *in vivo* на тканях мозга человека и трансгенных мышцах говорят о большей нейрональной дегенерации и больших дефектах как в когнитивной сфере, так и в моторной деятельности при одновременном присутствии обоих амилоидов (Masliah, 2001). При этом амилоиды разных белков взаимодействуют как в клетках, так и в межклеточном матриксе, что доказывает возможность альфа-синуклеина экскретироваться из клетки, и что β A может проникать в нейроны (La Ferla et al., 2007). Особенность взаимодействий β A и альфа-синуклеина состоит в том, что фибрилляция β A подавляется мономерами и олигомерами альфа-синуклеина, хотя олигомеризация β A, наоборот, ими стимулируется (Candreva et al., 2020).

На разных клеточных моделях показана ко-экспрессия альфа-синуклеина и тау-белка, который меняет кинетику агрегации и амилоидный полиморфизм альфа-синуклеина (Badiola et al., 2011). Интересный результат получен при кросс-сидинге октопептида TKEQVTNU, выделенного из альфа-синуклеина, и амилоида IAPP: в результате апоптоз клеток поджелудочной железы значительно уменьшался (Tang et al., 2022a). В системе *in vitro* на альфа-синуклеине и PrP показано, что если амилоидные белки находятся в состоянии коацерватов в немембранных органеллах (НМО), то их гетерологическое взаимодействие в процессе фазового перехода жидкость–твердое тело сильно ускоряется (Agarwal et al., 2022).

СТРАТЕГИЯ БОРЬБЫ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Для формирования эффективной стратегии борьбы с нейродегенеративными заболеваниями важно знать, какие молекулы и процессы в клетке могут противостоять неправильной укладке и распространению амилоидного белка. Система клеточного контроля за качеством белка (protein quality control, PQC) решает несколько задач. Главная из них – контроль за фолдингом, рефолдингом и деградацией с помощью прежде всего молекулярных шаперонов, главным образом Hsp70 и Hsp90, действующих часто совместно с ко-шаперонами (Margulis et al., 2020). Показано, что некоторые шапероны участвуют в процессах фибрилляции и вторичной нуклеации. Так, белок теплового шока HSP104, связываясь с олигомерами, протофибриллами и небольшими фибриллами β A, подавляет их дальнейшую фибрилляцию.

Похожим образом введение шаперонов Hsp40 и Hsp70 подавляет созревание фибрилл, необходимых для вторичной нуклеации при БА и БП. Ряд амилоидогенных белков содержат домены примерно из 100-аминокислот, которые выполняют функцию шаперонов, ограничивая образование олигомеров (Cohen et al., 2015). Эндогенный амфипатический антимикробный пептид LL-37, связываясь с С-концевым участком альфа-синуклеина, проявляет шаперонную активность, блокируя его, и тем самым препятствуя его проникновению в клеточную мембрану (Santos et al., 2022). На дрожжевой модели показано опосредованное шаперонное действие факторов, сортирующих неправильно уложенные неактивные белки по разным внутриклеточным депозитам (Barbitoff et al., 2017).

Подавление олигомер-индуцированной токсичности часто связано с объединением олигомеров в кластеры. Кластерин связывает префибриллярные формы разных белков, в том числе β A и альфа-синуклеина, тем самым ограничивая их токсичность и нуклеацию (Beeg et al., 2016). В некоторых случаях связывание шаперона с гидрофобными участками β A и с поверхностью нейрона оказывается важнее, чем снижение уровня агрегации β A (Fernandez-Funez et al., 2016). Так, действие некоторых шаперонов семейства Hsp состоит в том, что, соединяясь с соответствующим сайтом на молекуле амилоида, они сильно меняют его конформацию. Это препятствует связыванию амилоида с клеточными белками-рецепторами и тем самым блокирует запуск дальнейших патологических процессов (Wentink et al., 2019).

Кроме того, найдены и охарактеризованы малые молекулы, которые, подобно допамину, содержат одно ароматическое кольцо (Pena-Diaz, Ventura, 2022). В отличие от допамина, который, временно облегчая проявление симптомов, не влияет на механизмы БП, эти вещества действуют как молекулярные шапероны. Они эффективно блокируют агрегацию, ремодулируя этот процесс за счет конверсии токсичных олигомеров в нетоксичные, так называемые off-pathway агрегаты.

Однако использование шаперонов может в ряде случаев привести к отрицательным результатам, связанным с тем, что для нормальной деятельности белков необходим баланс между Hsp90, Hsp70 и Hsp40. Кроме того, превышение концентрации шаперонов, вызывающих диссоциацию фибрилл, может привести к противоположному результату за счет образования затравок и увеличения вторичной нуклеации.

Особым подходом к подавлению токсичности β A является использование моноклональных антител к конформационному эпитопу, присущему богатым бета-структурами олигомерам и фибриллам, но не мономерам. Эти же антитела блокировали увеличение количества фосфорилированного тау-белка (Lambert et al., 2007). Похожий результат получен при вакцинации мышей, экспрессирующих альфа-синуклеин человека, моноклональными антителами против прото-

фибрилл. Эффективными оказались не только антитела, специфичные для олигомеров, но и пептидомиметики, которые пересобирают токсичные олигомеры, переводя их в нетоксичные формы (Liang et al., 2019).

В ряде случаев к снижению токсичности может приводить более опосредованное воздействие на клетки. Так, показано, что триггерами амилоидизации в случае БП могут служить клеточные белки FABP3 и FABP7, связанные с жирными кислотами (Cheng et al., 2022). Они локализованы с альфа-синуклеином, образуя с ним комплексы, а их индукция стимулирует окислительный стресс, который, в свою очередь, активирует олигомеризацию. Если воздействовать на клетки белком FABP7, модифицированным лигандом, олигомеризация и гибель клеток резко снижаются.

У дрожжей в стрессовых условиях белок Lsb2, принимая прионную форму, способствует сборке других клеточных белков и их конверсии в агрегированное состояние в сайтах, ассоциированных с цитоскелетом. В виде таких временных депозитов белки сохраняются, пока стресс не закончится и прион Lsb2 не утратится в ходе клеточного деления (Chernova et al., 2019).

Представитель имидазолхинолинов имихимод, действуя на определенные клеточные рецепторы, оказывает противоамилоидное действие на дрожжевые и высшие клеточные культуры, специфически подавляя участие рибосом в сборке белка (Banerjee, Sanyal, 2014; Blondel et al., 2016).

Кроме того, показана неселективная деградация белковых агрегатов при протеолизе в процессе аутофагии (Thellung et al., 2019). Спермидин – полуамин, стимулирующий аутофагию; у дрожжей он элиминирует прионы PSI⁺ и PIN⁺. Димебон, блокирующий гистаминовые серотониновые и холиновые рецепторы, регулирует лизосомальную активность и обеспечивает деградацию β A в процессе аутофагии. На дрожжевой модели показано снижение уровня агрегированного β A под действием димебона в случае, если клетка не несет мутацию в гене *Atg8*, необходимом для процесса формирования фаготозома (Doody et al., 2008).

Механизмы апоптоза, аутофагии и контроля качества белка высоко консервативны, поэтому быстро делящиеся и генетически хорошо изученные клетки дрожжей являются очень удобным объектом для моделирования нейродегенеративных заболеваний (Votstein, Fink, 2011; Tenreiro et al., 2013; Chernoff et al., 2020). Большинство ключевых шаперонов, модулирующих белковую агрегацию, у дрожжей те же, что у человека, поэтому гуманизированные дрожжи – чрезвычайно удачная модель для поиска протекторных веществ, влияющих на разных этапах патогенеза. На них отработано много эффективных и простых подходов, с помощью которых выявлено большое количество потенциально перспективных веществ (Su et al., 2010; Faria et al., 2013; Tardiff et al., 2013; Fernandes et al., 2014).

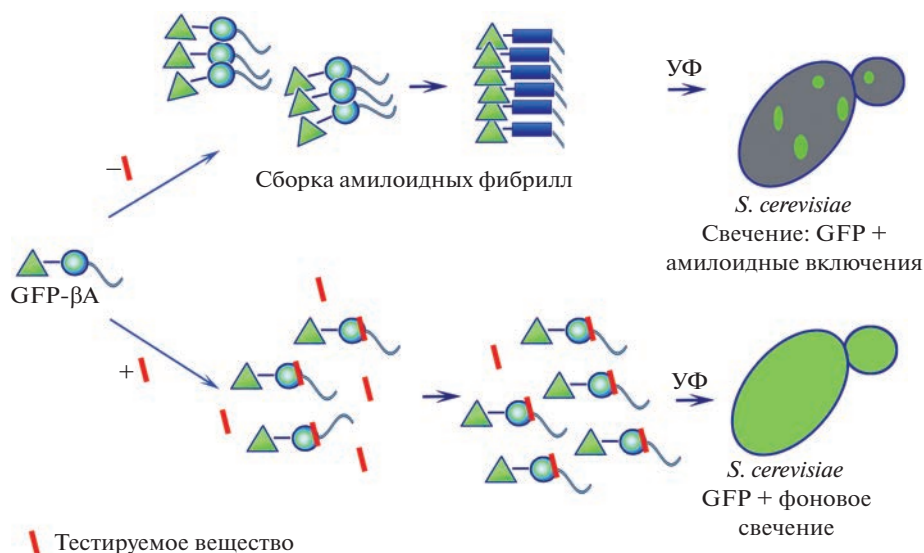


Рис. 2. Дрожжевая модель для поиска веществ, подавляющих амилоидизацию. Подавление флуоресценции цитоплазматических включений, вызванное тестируемым веществом, означает отсутствие в клетках агрегированных GFP-содержащих молекул бета-амилоида (β A) и тем самым служит индикатором его антиамилоидной активности.

Приведем один из них, примененный в нескольких лабораториях. Использовали конструкции, включающие варианты β A человека, слитые с флуоресцентным белком (GFP, YFP, CFP), который при накоплении и агрегации обеспечивает флуоресценцию внутриклеточных включений. Супрессия флуоресценции, вызываемая тестируемым веществом, свидетельствует о том, что оно подавляет агрегацию β A. Таким способом, показали влияние непосредственно на фибриллогенез фолиевой кислоты (окисленной формы витамина B9) — вещества с хорошей противовоспалительной активностью, а также ряда пептидомиметиков, полученных к амилоидогенному участку β A (рис. 2) (Macreadie et al., 2008; Rajasekhar et al., 2015). Подробный анализ полученных на дрожжевых моделях результатов содержится в ряде работ (Chernova et al., 2019; Tuite, 2019). Особенно перспективным (по крайней мере, для лечения синуклеинопатий) может стать использование дрожжей с мутацией чувствительности к синуклеин-индуцированной токсичности (Sangkaew et al., 2022).

Среди больных БП около 15% случаев относится к семейным или наследственным формам заболевания, вызванным мутациями в гене альфа-синуклеина. Так, мутация S129, вызывая фосфорилирование и, обеспечивая лучшее связывание фибриллярного синуклеина с клеточной мембраной, значительно увеличивает распространение aberrантного синуклеина и его патологические последствия (Zhang S. et al., 2021). Аналогичные механизмы агрегации и нуклеации у мутантов A30 и A50 и вызываемые ими проявления токсичности эффективно изучаются на животных моделях — нематоде *C. elegans* (A30 и A50) и плодовой мушке *D. melanogaster* (Mizuno et al., 2010; Perni et al., 2021). Модели, созданные с использованием мутантных

линий, перспективны для поиска средств от наследственных вариантов БП.

НМО (они же биологические конденсаты) часто служат центром формирования амилоидных и амилоидо-подобных фибрилл (Li, Liu, 2022; Simonsen, Wollert, 2022). НМО состоят из триацилглицеролового ядра (ТАГ) и стеринных эфиров (ЭС), окруженных фосфолипидным слоем, и формируются как временные структуры между мембранами эндоплазматического ретикула (Choudhary et al., 2015). В этих органеллах осуществляется разделение фаз, или фазовый переход “жидкость—жидкость” (LLPS). В результате, благодаря дегидратации, меняются взаимодействия между растворителем и растворенными молекулами внутри гомогенной системы, т.е. происходит замещение взаимодействия между макромолекулой и водой взаимодействием между самими макромолекулами (Коорман et al., 2022). В ряде работ показано, что 40% белков подвергается фазовому разделению и такие белки часто содержат домены с неупорядоченной структурой (intrinsically disordered regions, IDR) (Vernon et al., 2018; Hardenberg et al., 2020). Связи этих доменов за счет коротких сайтов с определенным набором аминокислот формируют НМО.

Фазовые переходы могут приводить к патологической агрегации белков, лежащей в основе многих нейродегенеративных патологий, таких как БП, боковой амиотрофической склероз, фронтально-темпоральная деменция и ряд тауопатий (Li, Liu, 2022). Однако НМО также используются клеткой для контроля за протеостазом, а именно за селективной аутофагией, ответственной за деградацию неправильно уложенных белков. Какой процесс возобладает — агрегация фибрилл или их деградация в ходе аутофагии, зависит от состояния рецепторов ауто-

фагии или других белков, участвующих в синтезе компонентов НМО и ТАГ, а также от инкорпорированных в НМО молекулярных шаперонов (Scherpers, Behl, 2021).

Убиквитин-зависимые и убиквитин-независимые рецепторы представляют собой мембранные белки, активируемые стрессом или дисфункцией клеточных органелл. Они содержат интерактивный участок с неупорядоченной структурой, за счет которого осуществляется их связь с белком ATG8. Получая энергию от НМО, ATG8 запускает формирование аутофагофора. После элонгации зрелая аутофагосома вместе с карго (испорченным белком) доставляется к лизосоме, сливается с ней и подвергается деградации (Jacquier et al., 2011; Abada, Elazar, 2014). В процессе селективной аутофагии взаимодействие аутофагических рецепторов с центральными (коровыми) районами контролирующими аутофагию белками обеспечивает синтез аутофагосомальных мембран (Simonsen, Wollert, 2022).

Синтез ЭС осуществляется с помощью двух мембранных белков эндоплазматического ретикулума — Atg1 и Atg2. На дрожжевой модели показано, что их отсутствие приводит к редукции аутофагической деградационной активности. Присутствие эргостерола в мембранах эндоплазматического ретикулума восстанавливало вакуолярную активность (Hurst, Fratti, 2020). Некоторые липазы, локализованные в НМО, деградируют ТАГ и ЭС, в то время как другие играют существенную роль в аутофагии (Tanguy et al., 2019).

НМО возникают как временные образования в ответ на действия разных экзогенных и эндогенных факторов. Молекулярные шапероны, интеркалируясь в НМО, регулируют их динамическую сборку и стабильность. Некоторые шапероны переключают свою активность и, благодаря посттрансляционным модификациям, предотвращают или стимулируют фазовые переходы (Li, Liu, 2022). Наподобие шаперонов действуют и одно- и двухцепочечные ДНК, РНК и малые РНК. Они модулируют фазовое разделение и фазовый переход, индуцируя, например, конверсию PrP в прионную форму. В то же время антисмысловые олигонуклеотиды, действуя на РНК белка PrP, увеличивают продолжительность жизни инфицированного животного и тем самым могут служить потенциальным средством против прионных болезней (Silva et al., 2022).

НАИБОЛЕЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АНТИАМИЛОИДНЫЕ ВЕЩЕСТВА, ПРИРОДНЫЕ И РАЗНОНАПРАВЛЕННЫЕ ПО СВОЕМУ ДЕЙСТВИЮ

Особый интерес с точки зрения терапии представляют натуральные продукты — встречающиеся в природе органические молекулы, способные эффективно модулировать белковую агрегацию (Ashrafian et al., 2021). Два натуральных продукта, относя-

щиеся к классу аминостеролов, скваламин и тродусквемин, могут модулировать агрегацию β A и альфа-синуклеина, меняя физико-химические свойства олигомеров и подавляя токсичность в клетках нейробластомы. Механизм супрессии токсичности связан с хелатным вытеснением амилоидных агрегатов из клеточной мембраны в присутствии ионов цинка (Perni et al., 2018; Limbocker et al., 2021).

Натуральные соединения, структура которых включает одно или более фенольных колец, активно подавляют агрегацию β A, а некоторые из них также и альфа-синуклеина. За счет особенности строения фенольного кольца они образуют нековалентные связи с бета-слоями, общими для всех амилоидогенных структур.

Оригинальная двухступенчатая система поиска ингибиторов агрегирования альфа-синуклеина приводится в работе Хидешимы с соавторами (Hideshima et al., 2022). На первом этапе эти авторы трансформировали клетки HeLa префибриллярной изоформой альфа-синуклеина, меченной флуоресцентным белком. Клетки окрашивали тиофлавином Т, что позволяло судить о степени амилоидизации, а на втором этапе проводили тесты на выживаемость (cell-based assay). В результате такого скрининга вещества оценивали по способности подавлять фибрилляцию, не подавляя выживаемость клеток. Из 1262 низкомолекулярных веществ, одобренных к применению в медицине, авторы выбрали семь соединений, среди которых наиболее перспективной оказалась тиаминовая кислота, содержащая фенольное кольцо. Проверку тиаминовой кислоты успешно провели в опытах *in vitro* на широко используемых моделях — нейронах мыши и мышечных клетках нематоды *C. elegans* (Hideshima et al., 2022).

В целом полифенольные кольца эффективно подавляют нуклеацию и элонгацию агрегатов, взаимодействуя с ароматическими аминокислотными остатками. Эти вещества встречаются в ягодах, орехах, красном вине и зеленом чае. Широкий спектр полифенолов снижает окислительный стресс, связывая ионы металлов. Антиоксидантная активность таких полифенолов, как куэритин, катетин, рутин, обусловлена хелатированием ионов Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , которые, связываясь с агрегированной формой β A, индуцируют образование свободных радикалов. Содержащийся в винограде и красном вине ресвератрол связывается с N-концом β A, препятствуя дальнейшей олигомеризации. Показано также его влияние на протеасомную активность (Beldona et al., 2022). Полифенолы осуществляют усиленную положительную регуляцию таких клеточных антиоксидантных ферментов, как каталаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза.

Среди природных полифенолов можно отметить также катехины. Они эффективно подавляют формирование приона PrP, а также меняют способ расщепления предшественника APP по типу неамилоидогенного гидролиза. Среди них найдено уникальное

соединение, выделяемое из зеленого чая, галлат эпигаллокатехина, EGCG, которое имеет множественное нейропротекторное действие, хорошо изученное на амилоиде β A (Youn et al., 2022). EGCG направляет протеолиз предшественника β A по неамилоидогенному пути, тем самым блокируя формирование токсичных олигомеров. Кроме того, EGCG прямо связывается со зрелыми фибриллами и трансформирует их в аморфные нетоксичные агрегаты. При этом диссоциации фибрилл на мономеры и олигомеры не происходит (Gauci et al., 2011; Grelle et al., 2011; Palhano et al., 2013). EGCG также стимулирует агрегацию мономеров β A, превращая их в неструктурируемые и нетоксичные олигомеры (Ehrnhoefer et al., 2008).

Показано, что EGCG может трансформировать плотные фибриллярные структуры комплексов β A– Cu^{2+} , превращая их в глобулярные агрегаты с недоступными свободными концами (Tavanti et al., 2020). В этом случае EGCG оказывает хелатное действие за счет того, что центральный (коровый) район β A обладает к нему большим сродством, чем комплекс с медью. EGCG действует как молекулярный шаперон и в случае БП направляет формирование олигомеров по нетоксичному пути (Hardenberg et al., 2021). На клеточных моделях показано, что EGCG формирует межмолекулярные водородные связи с IAPP и β A и оказывается высоко эффективным в подавлении гетероагрегатов IAPP– β A, снижая их коагрегацию и цитотоксичность (Adem et al., 2022).

В предыдущей обзорной работе мы приводим собственные данные о разнонаправленном противामीлоидном действии еще одного природного соединения – красного пигмента (КП), продуцируемого дрожжами-сахаромицетами, мутантными по генам *ADE1* и *ADE2* (Nevzglyadova et al., 2022). Это вещество – продукт полимеризации аминокислоты азотриботида – исследовано нами в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. КП значительно снижает количество как собственных дрожжевых амилоидов, уровень которых с возрастом увеличивается, так и агрегированных белков β A и альфа-синуклеина человека, экспрессируемых в дрожжах. В модельных экспериментах с выращиванием фибрилл инсулина, лизоцима и β A КП практически полностью подавляет их рост на префибриллярной стадии, способствуя образованию устойчивых конгломератов. В дрожжах, накапливающих КП, агрегированная фракция лизатов не содержала прион-зависимые белки, к которым относятся некоторые шапероны, участвующие в индукции затравок и в их распространении. Способность КП менять структуру токсичных агрегатов показано нами с помощью FRAP-анализа дрожжевых клеток, экспрессирующих альфа-синуклеин–GFP (Nevzglyadova et al., 2022). У клеток, выращенных в присутствии КП, возрастала выживаемость и уменьшалась доля клеточных включений с высокой диффузией, наиболее мобильной и полно восстанавливающейся после лазерного облучения, и появлялась новая фракция включений, практически не

восстанавливающих свечение. Такой состав цитоплазматических включений можно объяснить тем, что под действием КП плотные бета-слои токсичных олигомеров трансформируются в неупорядоченную структуру, а возникающие нетоксичные агрегаты образуют устойчивые конгломераты, подобные тем, которые возникают под действием EGCG.

Общепринято считать, что гибель нейронов при БА и БП наступает благодаря окислительному стрессу и накоплению АФК. Мы показали, что в присутствии КП накопления АФК практически не происходит. Протекторное действие КП подтверждено в экспериментах на трансгенных линиях дрозофилы, экспрессирующих белки β A и альфа-синуклеин человека. Эти модели позволили увидеть связь между изменениями, вызываемыми КП в клетках мозга и улучшением поведенческих показателей: памяти при БА и двигательной активности при БП.

Следует отметить, что трудность в поиске эффективной терапии нейронной деградации состоит в том, что она возникает в результате целого каскада процессов, протекающих как внутри, так и вне клетки. Стратегии для лечения нейродегенеративных заболеваний, связанные с модулированием механизмов фибриллогенеза, могут приводить к значительным осложнениям на средние и долгосрочные этапы лечения. Попытки терапии с помощью ингибиторов роста фибрилл не приводят к желаемому результату в среднесрочных исследованиях, потому что достаточно малого количества токсичных олигомеров, чтобы послужить триггерами дальнейших патологических процессов. К тому же прямое разрушение амилоидных отложений (например, при использовании специфичных антител) может вызывать серьезные осложнения, потому что в результате распада фибрилл возникают токсичные олигомеры, действующие как затравка для вторичной нуклеации. Поэтому мы считаем, что дальнейший поиск соединений, обладающих многофункциональным действием, а также веществ, подавляющих агрегацию на самом раннем этапе и (или) переводящих олигомеры в нетоксичное состояние, имеет наибольшие шансы привести к положительным результатам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работах последних лет наиболее значимой является расшифровка каскадного механизма, лежащего в основе нейродегенерации, в том числе таких широко распространенных болезней, как болезни Альцгеймера и Паркинсона. К звеньям этого каскада относятся реакции β A и альфа-синуклеина с мембранными рецепторами, а также модификации агрегации фазовым разделением и гетеротипическими взаимодействиями с другими клеточными амилоидами. Заслуживает внимание тот факт, что среди класса растворимых олигомеров, считающихся триггерами процесса нейродегенерации, найдены нетоксичные

варианты, неспособные к агрегации. Показано, что натуральные полифункциональные вещества, под-держивающие селекцию нетоксичных олигомеров, особенно перспективны для терапии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет бюджетных средств Института цитологии РАН (Тема № АААА-А17-117032350034-7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не включала эксперименты с участием животных или людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зубова С.Г.* 2019. Многоликость аутофагии и ее неоднозначная роль в биологических процессах. Цитология. Т. 61. № 12. С. 941. (*Zubova S.G.* 2019. The diversity of autophagy and its controversial role in biological processes. Tsitologiya. V. 61. № 12. P. 941). <https://doi.org/10.1134/S0041377119120095>
- Agarwal A., Arora L., Rai S.K., Avni A., Mukhopadhyay S.* 2022. Spatiotemporal modulations in heterotypic condensates of prion and α -synuclein control phase transitions and amyloid conversion. Nature Commun. V. 13. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28797-5>
- Adem K., Shanti A., Srivastava A., Homouz D., Thomas S.A., Khair M., Stefanini C., Chan V., Kim T.Y., Lee S.* 2022. Linking Alzheimer's disease and type 2 diabetes: characterization and inhibition of cytotoxic A β and IAPP heteroaggregates. Front. Mol. Biosci. V. 9. P. 842582. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.842582>
- Alam P., Bousset L., Melki R., Otzen D.E.* 2019. α -Synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities. J. Neurochem. V. 150. P. 522. <https://doi.org/10.1111/jnc.14808>
- Ashrafian H., Zadeh E.H., Khan R.H.* 2021. Review on Alzheimer's disease: inhibition of amyloid beta and tau tangle formation. Int. J. Biol. Macromol. V. 167. P. 382. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.192>
- Baba M., Nakajo S., Tu P.H., Tomita T., Nakaya K., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Iwatsubo T.* 1998. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Am. J. Pathol. V. 152. P. 879.
- Badiola N., de Oliveira R.M., Herrera F., Guardia-Laguarta C., Gonçalves S.A., Pera M., Suárez-Calvet M., Clarimon J., Outeiro T.F., Lleó A.* 2011. Tau enhances α -synuclein aggregation and toxicity in cellular models of synucleinopathy. PLoS One. V. 6. P. e26609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026609>
- Banerjee D., Sanyal S.* 2014. Protein folding activity of the ribosome (PFAR) — a target for antiprion compounds. Viruses. V. 6. P. 3907. <https://doi.org/10.3390/v6103907>
- Barbier P., Zejneli O., Martinho M., Lasorsa A., Belle V., Smet-Nocca C., Tsvetkov P.O., Devred F., Landrieu I.* 2019. Role of Tau as a microtubule-associated protein: structural and functional aspects. Front. Aging Neurosci. V. 11. P. 204. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00204>
- Barbitoff Y.A., Matveenko A.G., Moskalenko S.E., Zemlyanko O.M., Newnam G.P., Patel A., Chernova T.A., Chernoff Y.O., Zhouravleva G.A.* 2017. To CURE or not to CURE? Differential effects of the chaperone sorting factor Cur1 on yeast prions are mediated by the chaperone Sis1. Mol. Microbiol. V. 105. P. 242. <https://doi.org/10.1111/mmi.13697>
- Beeg M., Stravalaci M., Romeo M., Carrá A.D., Cagnotto A., Rossi A., Diomedè L., Salmona M., Gobbi M.* 2016. Clusterin binds to A β 1-42 oligomers with high affinity and interferes with peptide aggregation by inhibiting primary and secondary nucleation. J. Biol. Chem. V. 291. P. 6958. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689539>
- Beldona V., Patel A., Patel K., Abraham N., Halvorsen A., Liu A., Mannem N., Renganathan G.* 2022. Natural product polyphenol inhibition of amyloid- β aggregation. J. High School Sci. V. 32281. <http://jhss.scholasticahq.com>
- Bennett R.E., DeVos S.L., Dujardin S., Corjuc B., Gor R., Gonzalez J., Roe A.D., Frosch M.P., Pitstick R., Carlson G.A., Hyman B.T.* 2017. Enhanced tau aggregation in the presence of amyloid β . Am. J. Pathol. V. 187. P. 1601. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.03.011>
- Bharadwaj P., Solomon T., Sahoo B.R., Ignasiak K., Gaskin S., Rowles J., Verdile G., Howard M.J., Bond C.S., Ramamoorthy A., Martins R.N., Newsholme P.* 2020. Amylin and beta amyloid proteins interact to form amorphous heterocomplexes with enhanced toxicity in neuronal cells. Sci. Rep. V. 10. P. 10356. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66602-9>
- Blondel M., Soubigou F., Evrard J., Nguyen P.H., Hasin N., Chédin S., Gillet R., Contesse M.A., Friocourt G., Stahl G., Jones G.W., Voisset C.* 2016. Protein folding activity of the ribosome is involved in yeast prion propagation. Sci. Rep. V. 6. P. 32117. <https://doi.org/10.1038/srep32117>
- Botstein D., Fink G.R.* 2011. Yeast: an experimental organism for 21st century biology. Genetics. V. 189. P. 695. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.130765>
- Braak H., Alafuzoff I., Arzberger T., Kretzschmar H., Del Tredici K.* 2006. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. Acta Neuropathol. V. 112. P. 389. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0127-z>
- Bush A.I.* 2003. The metallobiology of Alzheimer's disease. Trends Neurosci. V. 26. P. 207. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00067-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00067-5)
- Candrea J., Chau E., Rice M.E., Kim J.R.* 2020. Interactions between soluble species of β -Amyloid and α -Synuclein promote oligomerization while inhibiting fibrillization. Biochemistry. V. 59. P. 425. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00655>
- Cascella R., Bigi A., Cremades N., Cecchi C.* 2022. Effects of oligomer toxicity, fibril toxicity and fibril spreading in synucleinopathies. Cell Mol. Life Sci. V. 79. P. 174. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04166-9>
- Cascella R., Chen S.W., Bigi A., Camino J.D., Xu C.K., Dobson C.M., Chiti F., Cremades N., Cecchi C.* 2021. The re-

- lease of toxic oligomers from α -synuclein fibrils induces dysfunction in neuronal cells. *Nat. Commun.* V. 12. P. 1814.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-21937-3>
- Cheng A., Wang Y.F., Shinoda Y., Kawahata I., Yamamoto T., Jia W.B., Yamamoto H., Mizobata T., Kawata Y., Fukunaga K. 2022. Fatty acid-binding protein 7 triggers α -synuclein oligomerization in glial cells and oligodendrocytes associated with oxidative stress. *Acta Pharmacol. Sin.* V. 43. P. 552.
<https://doi.org/10.1038/s41401-021-00675-8>
- Chernoff Y.O., Grizel A.V., Rubel A.A., Zelinsky A.A., Chandramowliswaran P., Chernova T.A. 2020. Application of yeast to studying amyloid and prion diseases. *Adv. Genet.* V. 105. P. 293.
<https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2020.01.002>
- Chernova T.A., Chernoff Y.O., Wilkinson K.D. 2019. Yeast models for amyloids and prions: environmental modulation and drug discovery. *Molecules.* V. 24. P. 3388.
<https://doi.org/10.3390/molecules24183388>
- Choudhary V., Ojha N., Golden A., Prinz W.A. 2015. A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the ER. *J. Cell Biol.* V. 211. P. 261.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201505067>
- Cohen S.I.A., Arosio P., Presto J., Kurudenkandy F.R., Biverstal H., Dolfe L., Dunning C., Yang X., Frohm B., Vendruscolo M., Johansson J., Dobson C.M., Fisahn A., Knowles T.P.J., Linse S. 2015. A molecular chaperone breaks the catalytic cycle that generates toxic A β -oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* V. 22. P. 207.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2971>
- Colla E., Coune P., Liu Y., Pletnikova O., Troncoso J.C., Iwatsubo T., Schneider B.L., Lee M.K. 2012. Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of α -synucleinopathy *in vivo*. *J. Neurosci.* V. 32. P. 3306.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2617-07.2007>
- Desplats P., Lee H.J., Bae E.J., Patrick C., Rockenstein E., Crews L., Spencer B., Masliah E., Lee S.J. 2009. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 106. P. 13010.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0903691106>
- Doody R.S., Gavrilova S.I., Sano M., Thomas R.G., Aisen P.S., Bachurin S.O., Seely L., Hung D., Dimebon I. 2008. Effect of dimebon on cognition, activities of daily living, behaviour, and global function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet.* V. 372. P. 207.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61074-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61074-0)
- Dujardin S., Bégard S., Caillierez R., Lachaud C., Delattre L., Carrier S., Loyens A., Galas M.-C., Bousset L., Melki R., Auregan G., Hantraye P., Brouillet E., Buee L., Colin M. 2014. Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of Tau protein. *PLoS One.* V. 9. P. e100760.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100760>
- Ehrnhoefer D.E., Bieschke J., Boeddrich A., Herbst M., Masino L., Lurz R., Engemann S., Pastore A., Wanker E.E. 2008. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* V. 15. P. 558.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1437>
- Emmanouilidou E., Melachroinou K., Roumeliotis T., Garbis S.D., Ntzouni M., Margaritis L.H., Stefanis L., Vekrellis K. 2010. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J. Neurosci.* V. 30. P. 6838.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010>
- Faria C., Jorge C.D., Borges N., Tenreiro S., Outeiro T.F., Santos H. 2013. Inhibition of formation of α -synuclein inclusions by mannosyl glycerate in a yeast model of Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1830. P. 4065.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.015>
- Fernandes J.T., Tenreiro S., Gameiro A., Chu V., Outeiro T.F., Conde J.P. 2014. Modulation of α -synuclein toxicity in yeast using a novel microfluidic-based gradient generator. *Lab. Chip.* V. 14. P. 3949.
<https://doi.org/10.1039/C4LC00756E>
- Fernandez-Funez P., Sanchez-Garcia J., de Mena L., Zhang Y., Levites Y., Khare S., Golde T.E., Rincon-Limas D.E. 2016. Holdase activity of secreted Hsp70 masks amyloid- β 42 neurotoxicity in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 113. P. E5212.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1608045113>
- Franić D., Zubčić K., Boban M. 2021. Nuclear ubiquitin-proteasome pathways in proteostasis maintenance. *Biomolecules.* V. 4. P. 54.
<https://doi.org/10.3390/biom11010054>
- Fusco G., Chen S.W., Williamson P.T.F., Cascella R., Perni M., Jarvis J.A., Cecchi C., Vendruscolo M., Chiti F., Cremades N., Ying L., Dobson C.M., De Simone A. 2017. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science.* V. 358. P. 1440.
<https://doi.org/10.1126/science.aan6160>
- Gauci A.J., Caruana M., Giese A., Scerri C., Vassallo N. 2011. Identification of polyphenolic compounds and black tea extract as potent inhibitors of lipid membrane destabilization by A β 42 aggregates. *J. Alzheimers Dis.* V. 27. P. 767.
<https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111061>
- Gomes L.M.F., Bataglioli J.C., Storr T. 2020. Metal complexes that bind to the amyloid- β peptide of relevance to Alzheimer's disease. *Coordinat. Chem. Rev.* V. 412. P. 213255.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213255>
- Grelle G., Otto A., Lorenz M., Frank R.F., Wanker E.E., Bieschke J. 2011. Black tea theaflavins inhibit formation of toxic amyloid-beta and alpha-synuclein fibrils. *Biochemistry.* V. 50. P. 10624.
<https://doi.org/10.1021/bi2012383>
- Habchi J., Chia S., Galvagnion C., Michaels T.C.T., Bellaicche M.M.J., Ruggeri F.S., Sanguanini M., Idini I., Kumita J.R., Sparr E., Linse S., Dobson C.M., Knowles T.P.J., Vendruscolo M. 2018. Cholesterol catalyses A β 42 aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes. *Nat. Chem.* V. 10. P. 673.
<https://doi.org/10.1038/s41557-018-0031-x>
- Hachiya N., Fulek M., Zajaczkowska K., Kurpas D., Trypka E., Leszek J. 2021. Cellular prion protein and amyloid- β oligomers in Alzheimer's disease – there are connections? Preprints. 2021050032.
<https://doi.org/10.20944/preprints202105.0032.v1>
- Hamano T., Hayashi K., Shirafuji N., Nakamoto Y. 2018. The implications of autophagy in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* V. 15. P. 1283.
<https://doi.org/10.2174/1567205015666181004143432>
- Hardenberg M., Horvath A., Ambrus V., Fuxreiter M., Vendruscolo M. 2020. Widespread occurrence of the droplet state of proteins in the human proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA. V. 117. P. 33254.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2007670117>
- Hardenberg M.C., Sinnige T., Casford S., Dada S.T., Poudel C., Robinson E.A., Fuxreiter M., Kaminski C.F., Kaminski Schierle G.S., Nollen E.A.A., Dobson C.M., Vendruscolo M.* 2021. Observation of an α -synuclein liquid droplet state and its maturation into Lewy body-like assemblies. *J. Mol. Cell Biol.* V. 13. P. 282.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjaa075>
- Hashimoto M., Masliah E.* 1999. Alpha-synuclein in Lewy Body Disease and Alzheimer's Disease. *Brain Pathology.* V. 9. P. 707.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00552.x>
- Hevroni B.L., Major D.T., Dixit M., Mhashal A.R., Das S., Fischer B.* 2016. Nucleoside-2', 3'/3', 5'-bis (thio) phosphate antioxidants are also capable of disassembly of amyloid beta 42-Zn (ii)/Cu (ii) aggregates via Zn (ii)/Cu (ii)-chelation. *Organic Biomol. Chem.* V. 14. P. 4640.
<https://doi.org/10.1039/C6OB00613B>
- Hideshima M., Kimura Y., Aguirre C., Kakuda K., Takeuchi T., Choong C.J., Doi J., Nabekura K., Yamaguchi K., Nakajima K., Baba K., Nagano S., Goto Y., Nagai Y., Mochizuki H., Ikenaka K.* 2022. Two-step screening method to identify α -synuclein aggregation inhibitors for Parkinson's disease. *Sci. Rep.* V. 12. P. 351.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-04131-9>
- Hijaz B.A., Volpicelli-Daley L.A.* 2020. Initiation and propagation of α -synuclein aggregation in the nervous system. *Mol. Neurodegener.* V. 15. P. 19.
<https://doi.org/10.1186/s13024-020-00368-6>
- Hillen H.* 2019. The beta amyloid dysfunction (BAD) hypothesis for Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* V. 13. P. 1154.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01154>
- Hurst L.R., Fratti R.A.* 2020. Lipid rafts, sphingolipids, and ergosterol in yeast vacuole fusion and maturation. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8. P. 539.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00539>
- Jackson K., Barisone G.A., Diaz E., Jin L.W., DeCarli C., Despa F.* 2013. Amylin deposition in the brain: a second amyloid in Alzheimer disease? *Ann. Neurol.* V. 74. P. 517.
<https://doi.org/10.1002/ana.23956>
- Jacobs H.I.L., Hedden T., Schultz A.P., Sepulcre J., Perea R.D., Amariglio R.E., Papp K.V., Rentz D.M., Sperling R.A., Johnson K.A.* 2018. Structural tract alterations predict downstream tau accumulation in amyloid-positive older individuals. *Nat. Neurosci.* V. 21. P. 424.
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0070-z>
- Jacquier N., Choudhary V., Mari M., Toulmay A., Reggiori F., Schneider R.* 2011. Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* V. 124. P. 2424.
<https://doi.org/10.1242/jcs.076836>
- Jomova K., Vondrakova D., Lawson M., Valko M.* 2010. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol. Cell Biochem.* V. 345. P. 91.
<https://doi.org/10.1007/s11010-010-0563-x>
- Kalaitzakis M.E., Graeber M.B., Gentleman S.M., Pearce R.K.* 2008. Striatal beta-amyloid deposition in Parkinson disease with dementia. *J. Neuroopathol. Exp. Neurol.* V. 67. P. 155.
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31816362aa>
- Kieran D., Hafezparast M., Bohnert S., Dick J.R., Martin J., Schiavo G., Fisher E.M., Greensmith L.* 2005. A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *J. Cell Biol.* V. 169. P. 561.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200501085>
- König A.S., Rösener N.S., Gremer L., Tusche M., Flender D., Reinartz E., Hoyer W., Neudecker P., Willbold D., Heise H.* 2021. Structural details of amyloid β oligomers in complex with human prion protein as revealed by solid-state MAS NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* V. 296. P. 100499.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100499>
- Konstantoulea K., Louros N., Rousseau F., Schymkowitz J.* 2021. Heterotypic interactions in amyloid function and disease. *FEBS J.* V. 289. P. 2025.
<https://doi.org/10.1111/febs.15719>
- Koopman M.B., Ferrari L., Rüdiger S.G.D.* 2022. How do protein aggregates escape quality control in neurodegeneration? *Trends Neurosci.* V. 45. P. 257.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.01.006>
- LaFerla F.M., Green K.N., Oddo S.* 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 8. P. 499.
<https://doi.org/10.1038/nrn2168>
- Lambert M.P., Velasco P.T., Chang L., Viola K.L., Fernandez S., Lacor P.N., Khoun D., Gong Y., Bigio E.H., Shaw P., De Felice F.G., Krafft G.A., Klein W.L.* 2007. Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. *J. Neurochem.* V. 100. P. 23.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04157.x>
- Li D., Liu C.* 2022. Spatiotemporal dynamic regulation of membraneless organelles by chaperone networks. *Trends Cell. Biol.* V. 32. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.08.004>
- Li F., Calingasan N.Y., Yu F., Mauck W.M., Toidze M., Almeida C.G., Takahashi R.H., Carlson G.A., Flint Beal M., Lin M.T., Gouras G.K.* 2004. Increased plaque burden in brains of APP mutant MnSOD heterozygous knockout mice. *J. Neurochem.* V. 89. P. 1308.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02455.x>
- Liang C., Savinov S.N., Fejzo J., Eyles S.J., Chen J.* 2019. Modulation of amyloid- β 42 conformation by small molecules through nonspecific binding. *J. Chem. Theory Comput.* V. 15. P. 5169.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00599>
- Limbocker R., Staats R., Chia S., Ruggeri F.S., Mannini B., Xu C.K., Perni M., Cascella R., Bigi A., Sasser L.R., Block N.R., Wright A.K., Kreiser R.P., Custy E.T., Meisl G. et al.* 2021. Squalamine and its derivatives modulate the aggregation of amyloid- β and α -synuclein and suppress the toxicity of their oligomers. *Front. Neurosci.* V. 15. P. 680026.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.680026>
- Linderson E., Beedholm R., Højrup P., Moos T., Gai W., Hendil K.B., Jensen P.H.* 2004. Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *J. Biol. Chem.* V. 279. P. 12924.
- Lorenzen N., Nielsen S.B., Yoshimura Y., Vad B.S., Andersen C.B., Betzer C., Kaspersen J.D., Christiansen G., Pedersen J.S., Jensen P.H., Mulder F.A., Otzen D.E.* 2014. How epigallocatechin gallate can inhibit α -synuclein oligomer toxicity in vitro. *J. Biol. Chem.* V. 289. P. 21299.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.554667>
- Luth E.S., Stavrovskaya I.G., Bartels T., Kristal B.S., Selkoe D.J.* 2014. Soluble, prefibrillar α -synuclein oligomers promote complex I-dependent, Ca²⁺-induced mitochondrial

- dysfunction. *J. Biol. Chem.* V. 289. P. 21490. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545749>
- Macreadie I., Lofji-Miri M., Mohotti S., Shapira D., Bennett L., Varghese J. 2008. Validation of folate in a convenient yeast assay suited for identification of inhibitors of Alzheimer's amyloid- β aggregation. *J. Alzheimers Dis.* V. 15. P. 391. <https://doi.org/10.3233/JAD-2008-15305>
- Margulis B., Tsimokha A., Zubova S., Guzhova I. 2020. Molecular chaperones and proteolytic machineries regulate protein homeostasis in aging cells. *Cells.* V. 9. P. 1308. <https://doi.org/10.3390/cells9051308>
- Masliah E. 2001. Recent advances in the understanding of the role of synaptic proteins in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *J. Alzheimers Dis.* V. 3. P. 121. <https://doi.org/10.3233/jad-2001-3117>
- Mizuno H., Fujikake N., Wada K., Nagai Y. 2010. α -Synuclein transgenic *Drosophila* as a model of Parkinson's disease and related synucleinopathies. *Parkinsons Dis.* V. 2011. P. 212706. <https://doi.org/10.4061/2011/212706>
- Nevzglyadova O.V., Mikhailova E.V., Soidla T.R. 2022. Yeast red pigment, protein aggregates, and amyloidoses: a review. *Cell Tiss. Res.* V. 388. P. 211. <https://doi.org/10.1007/s00441-022-03609-w>
- Niewiadomska G., Niewiadomski W., Steczkowska M., Gasiorowska A. 2021. Tau oligomers neurotoxicity. *Life (Basel).* V. 11. P. 28. <https://doi.org/10.3390/life11010028>
- Nygaard H.B., van Dyck C.H., Strittmatter S.M. 2014. Fyn kinase inhibition as a novel therapy for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* V. 6. P. 8. <https://doi.org/10.1186/alzrt238>
- Opazo C., Huang X., Cherny R.A., Moir R.D., Roher A.E., White A.R., Cappai R., Masters C.L., Tanzi R.E., Inestrosa N.C., Bush A.I. 2002. Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease beta-amyloid. Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H(2)O(2). *J. Biol. Chem.* V. 277. P. 40302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206428200>
- Palhano F.L., Lee J., Grimster N.P., Kelly J.W. 2013. Toward the molecular mechanism(s) by which EGCG treatment remodels mature amyloid fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* V. 135. P. 7503. <https://doi.org/10.1021/ja3115696>
- Paslowski W., Mysling S., Thomsen K., Jorgensen T.J., Otzen D.E. 2014. Co-existence of two different α -synuclein oligomers with different core structures determined by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* V. 53. P. 7560. <https://doi.org/10.1002/anie.201400491>
- Pena-Diaz S., Ventura S. 2022. One ring is sufficient to inhibit α -synuclein aggregation. *Neural Regen. Res.* V. 17. P. 508. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.320973>
- Penke B., Bogár F., Paragi G., Gera J., Fülöp L. 2019. Key peptides and proteins in Alzheimer's disease. *Curr. Protein Pept. Sci.* V. 20. P. 577. <https://doi.org/10.2174/1389203720666190103123434>
- Penke B., Szűcs M., Bogár F. 2020. Oligomerization and conformational change turn monomeric β -Amyloid and tau proteins toxic: their role in Alzheimer's pathogenesis. *Molecules.* V. 25. P. 1659. <https://doi.org/10.3390/molecules25071659>
- Perni M., Flagmeier P., Limbocker R., Cascella R., Aprile F.A., Galvagnion C., Heller G.T., Meisl G., Chen S.W., Kumita J.R., Challa P.K., Kirkegaard J.B., Cohen S.I.A., Mannini B., Barbut D. et al. 2018. Multistep inhibition of α -synuclein aggregation and toxicity *in vitro* and *in vivo* by trodusquemine. *ACS Chem. Biol.* V. 13. P. 2308. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00466>
- Perni M., van der Goot A., Limbocker R., van Ham T.J., Aprile F.A., Xu C.K., Flagmeier P., Thijssen K., Sormanni P., Fusco G., Chen S.W., Challa P.K., Kirkegaard J.B., Laine R.F., Ma K.Y. et al. 2021. Comparative studies in the A30P and A53T α -synuclein *C. elegans* strains to investigate the molecular origins of Parkinson's disease. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 9. P. 552549. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.552549>
- Rajasekhar K., Suresh S.N., Manjithaya R., Govindaraju T. 2015. Rationally designed peptidomimetic modulators of $\alpha\beta$ toxicity in Alzheimer's disease. *Sci Rep.* V. 30. P. 8139. <https://doi.org/10.1038/srep08139>
- Russo R., Borghi R., Markesbery W., Tabaton M., Piccini A. 2005. Nепрыlisin decreases uniformly in Alzheimer's disease and in normal aging. *FEBS Lett.* V. 579. P. 6027. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.054>
- Sangkaew A., Kojornna T., Tanahashi R., Takagi H., Yompakdee C. 2022. A novel yeast-based screening system for potential compounds that can alleviate human α -synuclein toxicity. *J. Appl. Microbiol.* V. 132. P. 1409. <https://doi.org/10.1111/jam.15256>
- Santos J., Pallarès I., Ventura S. 2022. Is a cure for Parkinson's disease hiding inside us? *Trends Biochem. Sci.* V. 19. P. S0968-0004(22)00025-1. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.02.001>
- Schepers J., Behl C. 2021. Lipid droplets and autophagy-links and regulations from yeast to humans. *J. Cell Biochem.* V. 122. P. 602. <https://doi.org/10.1002/jcb.29889>
- Scudamore O., Ciossek T. 2018. Increased oxidative stress exacerbates α -synuclein aggregation *in vivo*. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* V. 77. P. 443. <https://doi.org/10.1093/jnen/nly024>
- Silva J.L., Vieira T.C., Cordeiro Y., de Oliveira G.A.P. 2022. Nucleic acid actions on abnormal protein aggregation, phase transitions and phase separation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* V. 73. P. 102346. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102346>
- Simonsen A., Wollert T. 2022. Don't forget to be picky – selective autophagy of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Cell Biol.* V. 75. P. 102064. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2022.01.009>
- Stefani M., Dobson C.M. 2003. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med. (Berl.)* V. 81. P. 678. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0464-5>
- Stefanis L. 2012. α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* V. 2. P. a009399. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>
- Su L.J., Auluck P.K., Outeiro T.F., Yeager-Lotem E., Kritzer J.A., Tardiff D.F., Strathearn K.E., Liu F., Cao S., Hamamichi S., Hill K.J., Caldwell K.A., Bell G.W., Fraenkel E., Cooper A.A. et al. 2010. Compounds from an unbiased chemical screen reverse both ER-to-Golgi trafficking defects and mito-

- chondrial dysfunction in Parkinson's disease models. *Dis. Model. Mech.* V. 3. P. 194.
<https://doi.org/10.1242/dmm.004267>
- Subedi S., Sasidharan S., Nag N., Saudagar P., Tripathi T. 2022. Amyloid cross-seeding: mechanism, implication, and inhibition. *Molecules.* V. 27. P. 1776.
<https://doi.org/10.3390/molecules27061776>
- Tang Y., Zhang D., Liu Y., Zhang Y., Zhou Y., Chang Y., Zheng B., Xu A., Zheng J. 2022a. A new strategy to reconcile amyloid cross-seeding and amyloid prevention in a binary system of α -synuclein fragmental peptide and hIAPP. *Protein Science.* V. 31. P. 485.
<https://doi.org/10.1002/pro.4247>
- Tang Y., Zhang D., Zhang Y., Liu Y., Miller Y., Gong K., Zheng J. 2022b. Cross-seeding between A β and SEVI indicates a pathogenic link and gender difference between Alzheimer diseases and AIDS. *Communications Biology.* V. 5. P. 417.
<https://doi.org/10.1038/s42003-022-03343-7>
- Tanguy E., Wang Q., Moine H., Vitale N. 2019. Phosphatidic acid: from pleiotropic functions to neuronal pathology. *Front. Cell Neurosci.* V. 13. P. 2.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00002>
- Tardiff D.F., Jui N.T., Khurana V., Tambe M.A., Thompson M.L., Chung C.Y., Kamadurai H.B., Kim H.T., Lancaster A.K., Caldwell K.A., Caldwell G.A., Rochet J.C., Buchwald S.L., Lindquist S. 2013. Yeast reveal a druggable Rsp5/Nedd4 network that ameliorates α -synuclein toxicity in neurons. *Science.* V. 342. P. 979.
<https://doi.org/10.1126/science.1245321>
- Tavanti F., Pedone A., Menziani M.C. 2020. Insights into the effect of curcumin and (-)-epigallocatechin-3-gallate on the aggregation of A β (1–40) monomers by means of molecular dynamics. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 5462.
<https://doi.org/10.3390/ijms21155462>
- Tenreiro S., Munder M.C., Alberti S., Outeiro T.F. 2013. Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. *J. Neurochem.* V. 127. P. 438.
<https://doi.org/10.1111/jnc.12271>
- Thellung S., Corsaro A., Nizzari M., Barbieri F., Florio T. 2019. Autophagy activator drugs: anew opportunity in neuroprotection from misfolded protein toxicity. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 901.
<https://doi.org/10.3390/ijms20040901>
- Tuite M.F. 2019. Yeast models of neurodegenerative diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* V. 168. P. 351.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.07.001>
- Vernon R.M., Chong P.A., Tsang B., Kim T.H., Bah A., Farber P., Lin H., Forman-Kay J.D. 2018. Pi-Pi contacts are an overlooked protein feature relevant to phase separation. *Elife.* V. 7. P. e31486.
<https://doi.org/10.7554/eLife.31486>
- Villar-Piqué A., da Fonseca T.L., Sant'Anna R., Szegő É.M., Fonseca-Ornelas L., Pinho R., Carija A., Gerhardt E., Masaracchia C., Abad G.E., Rossetti G., Carloni P., Fernández C.O., Foguel D., Milosevic I. et al. 2016. Environmental and genetic factors support the dissociation between α -synuclein aggregation and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 113. P. E6506.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1606791113>
- Vivoli Vega M., Cascella R., Chen S.W., Fusco G., De Simone A., Dobson C.M., Cecchi C., Chiti F. 2019. The toxicity of misfolded protein oligomers is independent of their secondary structure. *ACS Chem. Biol.* V. 14. P. 1593.
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00324>
- Volles M.J., Lee S.J., Rochet J.C., Shtilerman M.D., Ding T.T., Kessler J.C., Lansbury P.T. Jr. 2001. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry.* V. 40. P. 7812.
<https://doi.org/10.1021/bi0102398>
- Wang Y., Westermark G.T. 2021. The amyloid forming peptide islet amyloid polypeptide and amyloid β interact at the molecular level. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 11153.
<https://doi.org/10.3390/ijms222011153>
- Wells C., Brennan S.E., Keon M., Ooi L. 2021. The role of amyloid oligomers in neurodegenerative pathologies. *Int. J. Biol. Macromol.* V. 181. P. 582.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.113>
- Wells C., Brennan S.E., Keon M., Saksena N.K. 2019. Prionoid proteins in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Front. Mol. Neurosci.* V. 12. P. 271.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00271>
- Wentink A., Nussbaum-Krammer C., Bukau B. 2019. Modulation of amyloid states by molecular chaperones. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 11. P. a033969.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033969>
- Xue W.F., Hellewell A.L., Hewitt E.W., Radford S.E. 2010. Fibril fragmentation in amyloid assembly and cytotoxicity. *Prion.* V. 4. P. 20.
<https://doi.org/10.4161/pri.4.1.11378>
- Youn K., Ho C., Jun M. 2022. Multifaceted neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in Alzheimer's disease: an overview of pre-clinical studies focused on β -amyloid peptide. *Food Sci. Human Wellness.* V. 11. P. 483.
<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.12.006>
- Younan N.D., Chen K.F., Rose R.S., Crowther D.C., Viles J.H. 2018. Prion protein stabilizes amyloid- β (β A) oligomers and enhances A β neurotoxicity in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* V. 293. P. 13090.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003319>
- Young L.M., Mahood R.A., Saunders J.C., Tu L.H., Raleigh D.P., Radford S.E., Ashcroft A.E. 2015. Insights into the consequences of co-polymerisation in the early stages of IAPP and A β peptide assembly from mass spectrometry. *Analyst.* V. 140. P. 6990.
<https://doi.org/10.1039/c5an00865d>
- Zhang S., Liu Y.Q., Jia C., Lim Y.J., Feng G., Xu E., Long H., Kimura Y., Tao Y., Zhao C., Wang C., Liu Z., Hu J.J., Ma M.R., Liu Z. et al. 2021. Mechanistic basis for receptor-mediated pathological α -synuclein fibril cell-to-cell transmission in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 118. P. e2011196118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2011196118>
- Zhang Y., Zhang M., Liu Y., Zhang D., Tang Y., Ren B., Zheng J. 2021. Dual amyloid cross-seeding reveals steric zipper-facilitated fibrillization and pathological links between protein misfolding diseases. *J. Mat. Chem B.* V. 9. P. 3300.
<https://doi.org/10.1039/D0TB0295K>
- Zhang Y., Zhao Y., Zhang L., Yu W., Wang Y., Chang W. 2019. Cellular prion protein as a receptor of toxic amyloid- β 42 oligomers is important for Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci.* V. 13. P. 339.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00339>

Molecular Mechanisms Underlying Alzheimer's and Parkinson's Diseases and the Potential Possibility of their Neutralization

O. V. Nevzglyadova^{a, *}, E. V. Mikhailova^a, and T. R. Soidla^a

^aInstitute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia

**e-mail: oneva43@yahoo.com*

Different protein forms inevitably load up in the cell under the influence of external and internal factors. With aging, the activity of chaperones and other components of the cell protein quality control machinery decreases. This results in accumulation of misfolded proteins with altered conformation. The most drastic alteration is the conversion of the active soluble molecules to the insoluble and inactive amyloid. Such a conformation shift of proteins is considered to lie behind the neurodegeneration process. A number of studies are devoted to neurodegeneration, but many details of the process still need to be clarified. In this review we outline some modern views on molecular mechanisms underlying the pathogenesis of the most widespread Alzheimer and Parkinson diseases. These are based on a series of interactions between Abeta and alfa-synuclein and membrane receptors and are modulated by phase separation and cross-seeding with other cell prions. Special attention is paid to natural polyfunctional compounds as promising therapeutic agents.

Keywords: amyloid, anti-amyloid compounds, non-membrane organelles, cross-seeding

НЕЙРОГЕНЕЗ В НЕЙРОГЕННЫХ НИШАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА НА ДОСИМПТОМАТИЧЕСКОЙ СТАДИИ РАЗВИТИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

© 2023 г. А. С. Аверчук¹, *, М. В. Рязанова¹, Н. А. Розанова¹, Н. А. Колотьева¹,
А. В. Ставровская¹, С. В. Новикова¹, А. Б. Салмина¹

¹Научный центр неврологии, Москва, 125367 Россия

*E-mail: antonaverchuk@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.03.2023 г.

После доработки 22.04.2023 г.

Принята к публикации 25.04.2023 г.

Расшифровка механизмов развития нейродегенерации на досимптоматической стадии – актуальная задача, решение которой позволит оптимизировать методы ранней диагностики и профилактики болезни Альцгеймера (БА). В настоящей работе изучены особенности нейрогенеза в нейрогенных нишах головного мозга при экспериментальной БА на досимптоматической стадии нейродегенерации. Было осуществлено моделирование БА *in vivo* у экспериментальных животных (мышей-самцов, C57BL/6 в возрасте 8 мес.). Для этого контрольной группе ($n = 30$) в поле CA1 гиппокампа вводили по 2 мкл раствора 0.9%-ного NaCl, а экспериментальной группе, ($n = 30$) – 1М раствор (2 мкл билатерально) олигомеризованного бета-амилоида 25–35 (A β 25–35). Оценку нарушений когнитивных функций у животных осуществляли с использованием теста условной реакции пассивного избегания (УРПИ). Для иммуногистохимического исследования использовали замороженные срезы головного мозга, в которых анализировали изменения экспрессии маркеров Nestin, Pax6, NeuroD1, VEGFR2; апоптоз клеток оценивали по протоколу TUNEL в субгранулярной зоне гиппокампа (SGZ) и субвентрикулярной зоне (SVZ). Были установлены разнонаправленные изменения экспрессии маркеров нейрогенеза, неоангиогенеза и выраженность апоптоза в SGZ и SVZ в период 9–17 сут после интрагиппокампального введения A β 25–35. На 9-е сут развития нейродегенерации альцгеймеровского типа была увеличена экспрессия Pax6 и VEGFR2 в SGZ и Nestin в SVZ. Последующее применение протокола УРПИ с предьявлением аверсивного раздражителя (10-е сут) или соответствующего контекста (11- и 17-е сут) приводило к динамическим изменениям экспрессии маркеров клеток, находящихся на разных стадиях нейрогенеза. Таким образом, на досимптоматической стадии развития нейродегенерации альцгеймеровского типа зоны SGZ и SVZ проявляют признаки aberrантного нейрогенеза, связанного с нарушением пула стволовых и прогениторных клеток и подавлением производства нейробластов (незрелых нейронов) в период, предшествующий формированию когнитивной дисфункции.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, нейрогенез, нейрогенная ниша, субгранулярная зона, субвентрикулярная зона

DOI: 10.31857/S004137712304003X, **EDN:** ZFKNDM

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой прогрессирующее дегенеративное заболевание центральной нервной системы. Это одно из наиболее распространенных неврологических патологий, часто встречающихся у пожилых людей. Основными клиническими проявлениями являются прогрессирующая деменция, снижение памяти и когнитивных функций. Ключевыми патологическими признаками являются внеклеточное накопление β -амилоида

(A β) и внутриклеточная аккумуляция тау-белка, индуцирующие или сопровождающие развитие митохондриальной дисфункции, кальциевый дисбаланс, окислительный стресс, клеточную гибель, нарушения пластичности (Jack et al., 2013). Нейрогенез головного мозга взрослых млекопитающих происходит в субгранулярной зоне гиппокампа (SGZ) и в субвентрикулярной зоне (SVZ), чье микроокружение, в том числе формируемое клетками глиальной и эндотелиальной природы, регулирует поддержание пула нейральных стволовых клеток (НСК), их пролиферацию и дифференцировку с последовательным образованием нейральных прогениторных клеток (НПК), нейробла-

Принятые сокращения: БА – Болезнь Альцгеймера; НПК – нейральные прогениторные клетки; НСК – нейральные стволовые клетки; УРПИ – условная реакция пассивного избегания; A β 25–35 – β -амилоид 25–35; SGZ – субгранулярная зона гиппокампа; SVZ – субвентрикулярная зона.

стов, постмитотических незрелых и зрелых нейронов (Ning et al., 2021).

Подавление нейрогенеза при болезни Альцгеймера является экспериментально доказанным феноменом (Моргун и др., 2019), что связывают с прямым токсическим действием олигомеров Аβ на стволовые клетки нейрогенных ниш (Scora et al., 2020), нарушением продукции гуморальных регуляторов нейрогенеза (Eu et al., 2021) и процессов миграции нейробластов и незрелых нейронов в ткани мозга (Esteve et al., 2022). Вместе с тем зарегистрированы и признаки интенсификации нейрогенеза при развитии болезни Альцгеймера у экспериментальных животных (Steinman et al., 2021), что связывают с запуском компенсаторных механизмов на ранних этапах нейродегенерации.

Цель исследования заключалась в изучении особенностей нейрогенеза в нейрогенных нишах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера на стадии развития нейродегенерации, предшествующей проявлению когнитивного дефицита.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. Эксперименты проведены на мышах в возрасте 8 мес. линии C57BL/6 (самцах весом 25–30 г) из питомника филиала “Андреевка” (Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России). Животных содержали в условиях вивария с неограниченным количеством пищи и воды при 12-часовом режиме освещенности.

Моделирование нейродегенерации *in vivo*. Было осуществлено моделирование БА *in vivo* у животных с применением стереотаксической операции (экспериментальная и контрольная группы) с использованием рамы двойного лабораторного стереотаксического манипулятора (Stoelting, США). Анестезировали животных с помощью Золетила-100 (Virbac Sante Animale, Франция) и раствора Ксила (Interchemie Werken “de Adelaar” BV”, Нидерланды), разведенных в физиологическом растворе в соотношении 1 : 4 (1.5 мг действующего вещества на 25 г веса животного) и 1 : 2 (0.6 мг действующего вещества на 25 г веса животного) соответственно. Контрольной группе из 30 животных (ложно-оперированных) через просверленные в черепе отверстия в соответствии с координатами атласа мозга мышей (AP – 2.0; ML – 1.9; DV – 1.3; билатерально) в поле CA1 гиппокампа вводили по 2 мкл раствор 0.9%-ного NaCl. Экспериментальной группе ($n = 30$) вводили по 2 мкл билатерально 1 М раствора олигомеризованного бета-амилоида Аβ25–35 (Sigma-Aldrich, США) в 0.9%-ном NaCl по соответствующим координатам. Общее время наблюдения за животными обеих групп составило 38 сут с момента интрагиппокампального введения пептида или растворителя.

Верификацию модели и оценку формирования когнитивного дефицита осуществляли с использованием теста условной реакции пассивного избегания (УРПИ) и программы ShutAvoid 1.8.03 на установке Panlab Harvard Apparatus (Испания) по стандартному протоколу. На 10-е сут моделирования БА животное получало неизбегаемое болевое воздействие. Применение электрического шока умеренной интенсивности (0.2 мА, 3 с) в темном отсеке обеспечивает обучение животного подавлению естественного поведения для грызунов и предотвращает переход их в темную зону из светлой. На следующий день (11-е сут после моделирования БА) и далее на 17-, 24-, 38-е сут оценивали нарушение памяти, учитывали время перехода мыши из светлой зоны камеры в темную (контекстная память без предъявления аверсивного раздражителя). В каждую временную точку (через 1 ч после теста УРПИ) производили выведение животных из эксперимента методом цервикальной дислокации в виварии под наблюдением ветеринарного врача и осуществляли забор биоматериала для последующего исследования.

Приготовление срезов и иммуногистохимия. Мозг фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине (Histoline, Россия). Образцы хранили при 4°C в холодильнике. Для иммуногистохимического исследования использовали замороженные срезы головного мозга толщиной 10 мкм для максимального прокрашивания, изготовленные при помощи криостата (Tissue-Tek® Cryo3; Sakura-Finetek, Япония), в которых идентифицировались зоны SGZ и SVZ.

Срезы ткани на стекле отмывали по 5 мин в фосфатно-солевом буфере (PBS), после чего пермеабелизовали в 0.1%-ном растворе Тритона X-100 (Calbiochem Biochemicals, США) в PBS и 2%-ного бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma, США) 1 ч при комнатной температуре. Затем трехкратно промывали в PBS и в течение ночи при 4°C инкубировали с антителами (Abcam, Великобритания): мышинными моноклональными против маркера стволовых клеток Nestin (ab254048; разведение 1 : 500); с кроличьими моноклональными против маркера пролиферирующих клеток Pax6 (ab195045; 1 : 500); с кроличьими моноклональными против NeuroD1 (ab109224; 1 : 500) и кроличьими поликлональными против VEGFR2 (ab39638; 1 : 75) и разведенными в ИНС Diluent (Novocastra, Leica, Великобритания) для блокировки неспецифического связывания. Затем срезы промывали в 0.1%-ном растворе Тритона X-100 в PBS три раза по 5 мин с последующим 2-часовым инкубированием со вторичными конъюгированными с Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 594 ослинами и козьими антителами против кроличьего и мышинного IgG (Abcam, Великобритания, 1 : 500) соответственно. Срезы заключали под покровное стекло с помощью Fluoroshield with DAPI (Sigma, США). Установление факта апоптоза клеток в замороженных срезах осу-

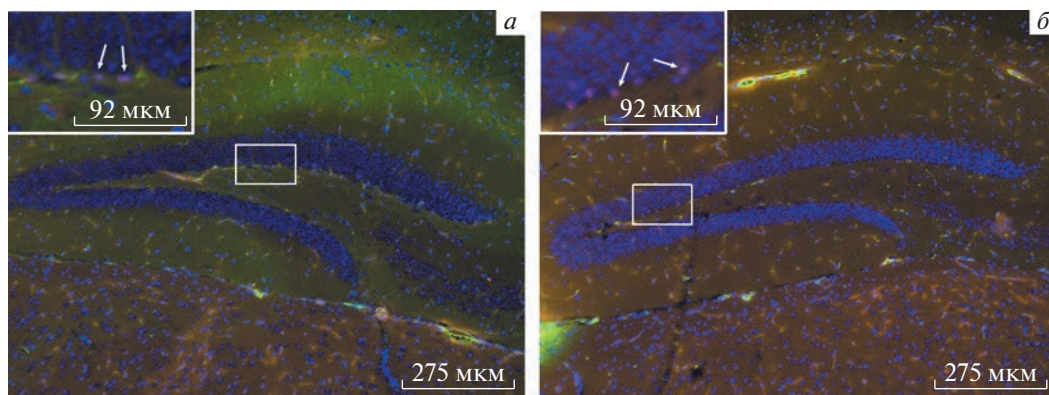


Рис. 1. Изменение количества Pax6-иммунопозитивных клеток в субгранулярной зоне гиппокампа (SGZ) головного мозга животных в контроле и при экспериментальной болезни Альцгеймера. *a* – контроль, *б* – модель нейродегенерации альцгеймеровского типа, 9 сут. Стрелками показаны Pax6-иммунопозитивные клетки, ядра окрашены DAPI.

ществляли с помощью набора TUNEL *in situ* по протоколу производителя (Elabscience, США).

Цифровые изображения получали с помощью системы визуализации EVOS M7000 (Thermo Fisher Scientific, США) и обрабатывали в программе ImageJ с помощью плагина для подсчета флуоресцентных меток на микрофотографиях.

Количество маркеров нейрогенеза и неоангиогенеза характеризовали количеством клеток, окрашенных на соответствующий маркер, а для оценки уровня апоптоза подсчитывали общее количество TUNEL-позитивных клеток, нормированных на 100 DAPI-позитивных клеток в нейрогенной нише и представляли в виде среднего числа с указанием стандартного отклонения.

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 13.3 (StatSoft Inc., Россия). Результаты теста УРПИ обрабатывали с использованием однофакторного анализа ANOVA и теста Фишера, результаты иммуногистохимии – с помощью критерия *U*-теста Манна-Уитни. Результаты считали значимыми при $p < 0.05$. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка динамики прогрессирования когнитивного дефицита позволяет не только верифицировать развитие нейродегенерации альцгеймеровского типа у экспериментальных животных, но и определять сроки ее появления. Выполненный нами ранее анализ результатов теста УРПИ показал, что тенденция к появлению нарушений когниции (запоминания) у экспериментальных животных фиксируется на 24-е сут после интрагиппокампального введения A β 25–35, а на 38-е сут изменения по результатам тестирования становятся достоверно отличными от контрольной группы ($p = 0.0449$) (Аверчук и др., 2023).

С помощью иммуногистохимического протокола мы проанализировали, как изменяется содержание некоторых маркеров нейрогенеза – Nestin, Pax6, NeuroD1 (Roybon et al., 2009) и неоангиогенеза – VEGFR2 (Рудько и др., 2017), а также выраженность апоптоза в нейрогенных нишах (зонах SGZ и SVZ) у животных в период, предшествующий появлению когнитивной дисфункции (в период 9–17-е сут с момента введения пептида в ткань гиппокампа).

К 9-м сут развития нейродегенерации мы зарегистрировали существенные отличия профиля экспрессии обеих нейрогенных ниш у животных с моделью БА по сравнению с контролем: в зоне SGZ гиппокампа значительно увеличилось количество Pax6-иммунопозитивных (рис. 1) и VEGFR2-иммунопозитивных клеток, тогда как в SVZ – только количество Nestin-иммунопозитивных клеток (табл. 1).

В SGZ гиппокампа ложно-оперированных животных уровень Nestin (маркер НСК) и Pax6 (маркер НСК и НПК) остается стабильным на протяжении всего периода наблюдения и значимо не меняется после тренинга (обучения) в тесте УРПИ (10-е сут развития нейродегенерации) (рис. 2). Примечательно, что содержание NeuroD1 (маркера нейробластов и незрелых нейронов) прогрессивно увеличивается, достигая максимума к 17-м сут наблюдения (рис. 2). Напротив, с 11-х до 17-х сут наблюдения регистрируется снижение экспрессии VEGFR2 (рис. 2).

Таким образом, у животных контрольной группы применение неизбежного болевого стимула (10-е сут) индуцирует увеличение количества нейробластов без значимого влияния на процессы мобилизации НСК или НПК с последующей вероятной редукцией VEGFR2-опосредованного нейрогенеза или неоангиогенеза. Интересно, что последующая сессия в тесте УРПИ, регистрирующая реконсолидацию долговременной памяти (17-е сут наблюдения), также способствует значительному дополнительному увеличению числа нейробластов в SGZ гиппокампа.

Таблица 1. Содержание маркеров нейрогенеза и неоангиогенеза в субгранулярной (SGZ) и субвентрикулярной (SVZ) зонах головного мозга животных в контроле и в начальной стадии (9-е сут) развития экспериментальной БА

Маркер	SGZ, % (M ± SD)			SVZ, % (M ± SD)		
	Контроль	БА	<i>p</i>	Контроль	БА	<i>p</i>
Nestin	1.8 ± 0.5	1.9 ± 0.21	0.5127	7.2 ± 4.8	22.9 ± 7.2	0.0495
Рах6	4.9 ± 0.5	12.8 ± 1.9	0.0495	4.9 ± 0.5	8.3 ± 5.3	0.5127
NeuroD1	1.5 ± 0.27 × 10 ⁻¹⁵	1.6 ± 0.4	0.5127	3.6 ± 1.2	7.6 ± 3.0	0.0809
VEGFR2	5.9 ± 2.5	9.2 ± 0.5	0.0495	10.8 ± 0.22 × 10 ⁻¹⁴	9.2 ± 1.9	0.5127

У животных с экспериментальной моделью нейродегенерации альцгеймеровского типа мы зарегистрировали существенные отличия динамики содержания перечисленных маркеров: количество Nestin-иммунопозитивных клеток возрастало сразу после первой сессии обучения (неизбегаемый болевой стимул, 10-е сут) к 10 сут и далее оставалось стабильно высоким, а количество Рах6-иммунопозитивных НПК снижалось на 10-е сут и сохранялось на низком уровне до 17-х сут наблюдения; аверсивный раздражитель (10-е сут) вызывал увеличение числа NeuroD1-иммунопозитивных нейробластов. Однако последующее наблюдение не выявило дополнительного увеличения количества NeuroD1-иммунопозитивных нейробластов на 17 сут развития нейродегенерации, в отличие от контроля. Так же, как и в контроле, в период 11–17-е сут количество клеток, экспрессирующих VEGFR2, в SGZ гиппокампа (рис. 2) снижается. Примечательно, что в SGZ в период, предшествующий появлению первых признаков когнитивного нарушения (17-е сут эксперимента), была зарегистрирована интенсификация процессов апоптоза ($p = 0.049535$) (рис. 3).

В другой нейрогенной нише – SVZ – у животных контрольной группы применение неизбежного болевого стимула (10-е сут) приводило к существенному росту содержания NeuroD1, и последующая сессия в тесте УРПИ на 17-е сут наблюдения вызывала

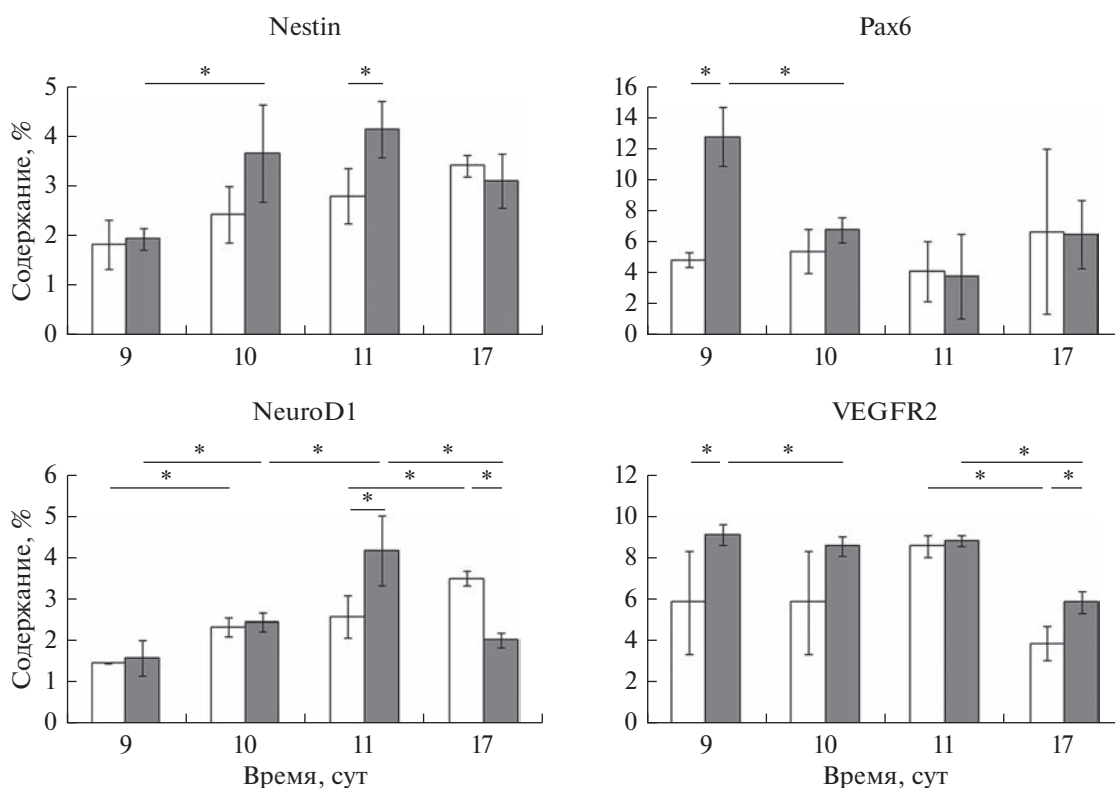


Рис. 2. Динамика изменения содержания маркеров Nestin, Рах6, NeuroD1, VEGFR2 в субгранулярной зоне гиппокампа (SGZ) головного мозга животных в контроле (белые столбцы) и при экспериментальной болезни Альцгеймера (черные столбцы). Различия достоверны (*) при $p < 0.05$.

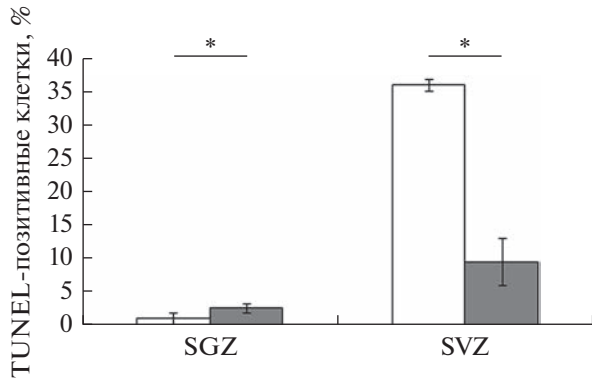


Рис. 3. Динамика изменения относительного количества TUNEL-позитивных клеток в субгранулярной (SGZ) и субвентрикулярной (SVZ) зонах головного мозга в контроле (белые столбцы) и при экспериментальной болезни Альцгеймера (черные столбцы).

У животных с экспериментальной моделью БА высокий уровень содержания маркера Nestin в SVZ на 9-е сут развития нейродегенерации сменялся его снижением уже после 1-ой сессии обучения в протоколе УРПИ, что может свидетельствовать о сокращении пула НСК в ответ на действие аверсивного раздражителя (когнитивной нагрузки) (рис. 4). Примечательно, что число NeuroD1-иммунопозитивных клеток в SVZ, как и в SGZ гиппокампа, значительно возросло на 11-е сут наблюдения, но, в отличие от контрольных животных, редуцировалось на 17-е сут. В отличие от зоны SGZ, в SVZ количество VEGFR2⁺-клеток возрастало после 1-ой сессии в протоколе УРПИ (10-е сут) и далее возвращалось к исходному уровню (рис. 4).

Оценка апоптоза в SVZ на момент манифестации когнитивного дефицита у животных показала значительное снижение гибели клеток ($p = 0.049535$) (рис. 3).

дополнительное увеличение этого показателя (рис. 4). Динамика изменения числа NeuroD1-иммунопозитивных клеток в SVZ, в целом, повторяла таковую в SGZ гиппокампа. В SVZ контрольных животных мы зарегистрировали снижение количества VEGFR2-иммунопозитивных клеток к 17-м сут наблюдения (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

С учетом важности идентификации механизмов и информативных маркеров досимптоматической стадии болезни Альцгеймера, особую значимость приобретают исследования нарушений нейрогенеза в нейрогенных нишах головного мозга экспериментальных животных на ранних стадиях развития нейродегене-

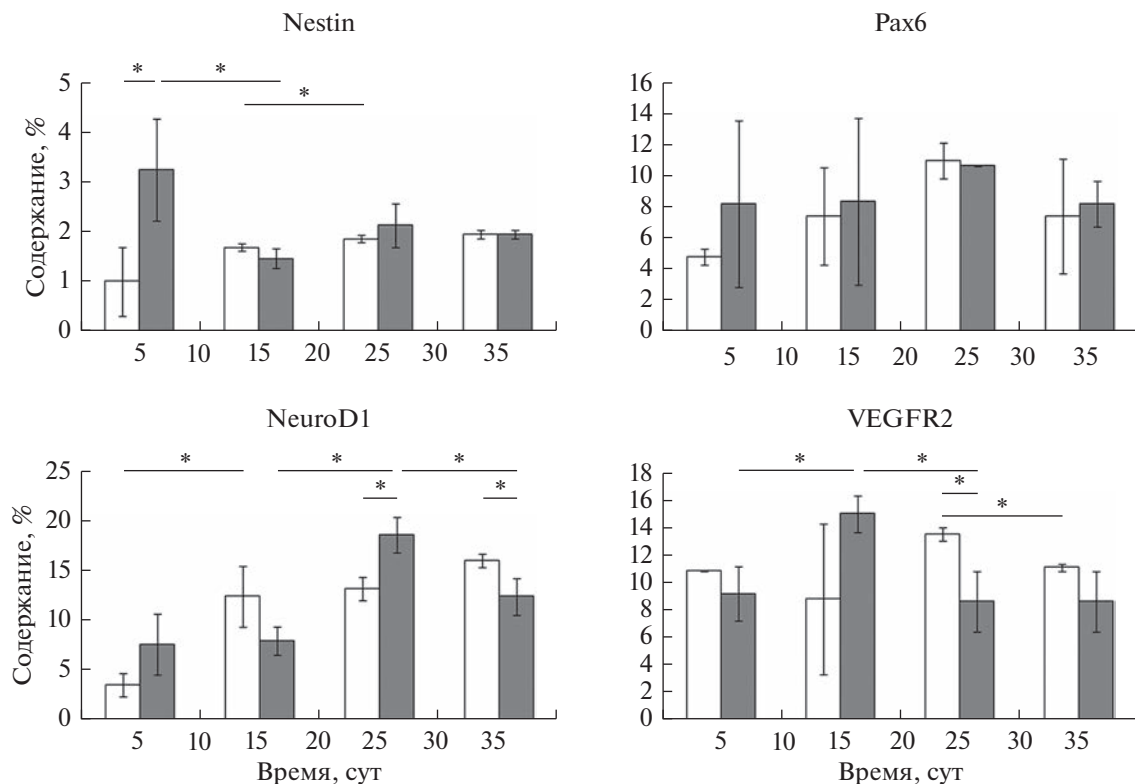


Рис. 4. Динамика изменения содержания маркеров Nestin, Pax6, NeuroD1, VEGFR2 в субвентрикулярной зоне (SVZ) головного мозга животных в контроле (белые столбцы) и при экспериментальной болезни Альцгеймера (черные столбцы). Различия достоверны (*) при $p < 0.05$.

рации альцгеймеровского типа, когда когнитивный дефицит еще не выражен. Некоторые наблюдения свидетельствуют о том, что нарушения пролиферации и дифференцировки НСК – ранние проявления aberrантного нейрогенеза в зоне SVZ при экспериментальной болезни Альцгеймера (Scora et al., 2020), тогда как зона SGZ в этот период может демонстрировать признаки интенсификации нейрогенеза с последующим его подавлением (López-Toledano, Shelanski, 2007), что нами и было зафиксировано на 9-е сут после введения A β 25–35 (табл. 1). Однако феномен интенсификации нейрогенеза при действии A β был описан только для A β 1–40, но не A β 25–35 (López-Toledano, Shelanski, 2004).

Известно, что в физиологических условиях в головном мозге млекопитающих происходит постоянный нейрогенез в нейрогенных нишах на протяжении всего периода постнатального развития, с последующим прогрессирующим подавлением в стареющем головном мозге (Riddle, Lichtenwalner, 2007). Мы использовали протокол обучения животных с применением неизбежного болевого воздействия с последующим тестированием памяти (с помощью теста УРПИ) (Ögren, Stiedl, 2013), который дает возможность интерпретировать степень сохранности и степень адаптивности нейрогенеза в нейрогенных нишах (SGZ и SVZ) (Dermon et al., 2002), исходя из продолжительности латентного периода, соответствующего сформированному “следу” эмоциональной памяти страха (Иноземцев, 2013).

Мы обнаружили, что важным отличием динамики экспрессионного профиля и в зоне гиппокампа SGZ, и в SVZ головного мозга животных на досимптоматической стадии развития нейродегенерации (по сравнению с животными контрольной группы) является отсутствие стимул-индуцированной интенсификации образования NeuroD1-иммунопозитивных клеток в период, непосредственно предшествующий проявлению когнитивной дисфункции.

В SGZ это наблюдение, в совокупности с данными о количестве Nestin⁺- и Pax6⁺-клеток, означает, что в указанной нейрогенной нише изначально остаются сохранными процессы мобилизации НСК (НПК) и образования нейробластов (незрелых постмитотических нейронов), но затем, к началу формирования когнитивного дефицита, возможности генерации пула NeuroD1⁺-клеток в ответ на предъявление соответствующего контекста истощаются. Одной из возможных причин может быть трехкратная (по сравнению с контролем) интенсификация процессов апоптоза в SGZ к 17-м сут развития нейродегенерации.

Интересно, что при развитии A β 25–35-индуцированной нейродегенерации возможным механизмом (дополнительным к пролиферации нейробластов, регистрируемой у животных контрольной группы), обеспечивающим стимуляцию нейрогенеза в протоколе УРПИ, становится рекрутинг НСК в SGZ

гиппокампа. Совпадающее по времени с мобилизацией NeuroD1⁺-нейробластов и Nestin⁺-НСК уменьшение количества Pax6⁺-НПК, вероятно, отражает быстрое истощение пула прогениторных клеток у животных с нейродегенерацией альцгеймеровского типа, несмотря на то, что изначально их количество у животных с моделью БА было выше, чем у животных контрольной группы. Подобный феномен – прогрессирующее уменьшение количества Pax6-иммунопозитивных НПК в нейрогенных нишах головного мозга – был ранее зарегистрирован при старении и трансгенных животных с экспериментальной БА (Polis et al., 2020).

В зоне SVZ токсическое действие A β 25–35 на ранней стадии проявилось в том, что общее количество Nestin⁺-клеток было изначально увеличено, но при применении протокола УРПИ уже после 1-ой сессии их число значительно сокращалось. Не исключено, что это обусловлено либо запуском процессов репаративного нейрогенеза, либо высокой чувствительностью НСК этой нейрогенной ниши к токсическому действию A β 25–35.

Иными словами, если применение аверсивного раздражителя в зоне SGZ животных с нейродегенерацией проявлялось снижением числа Pax6⁺-НПК, то Nestin⁺-НСК в зоне SVZ демонстрировали аналогичную динамику. Логично предположить, что в зоне гиппокампа (в SGZ) развитие нейродегенерации сопровождается преимущественной мобилизацией НПК, а в SVZ – НСК, популяции которых максимально чувствительны к дополнительной функциональной нагрузке на соответствующую нейрогенную нишу.

Интересно, что у животных контрольной группы динамика изменения числа NeuroD1⁺-нейробластов, простимулированных применением неизбежного стимула и (или) нахождением животных в соответствующей обстановке, способствующей проявлению условной реакции пассивного избегания, в SVZ и SGZ была практически идентичной. Следует отметить, что участие SVZ-генерируемых нейронов в механизмах обучения и запоминания, оцениваемых в тесте УРПИ, было показано ранее (Fiore et al., 2002), поэтому зарегистрированная нами односторонняя направленность изменений числа NeuroD1⁺-НПК в зонах SGZ и SVZ не удивительна.

Экспрессия VEGFR2 может быть характерна не только для клеток эндотелия, но и для пролиферирующих нейробластов нейрогенных ниш (Jin et al., 2002). Коль скоро мы обнаружили, что к 17-м сут наблюдения количество VEGFR2-иммунопозитивных клеток в SGZ снизилось у животных и контрольной, и экспериментальной групп, а в SVZ она не изменялась на протяжении всего периода наблюдения, логично предположить, что в нейрогенной нише, сохраняющей относительно интактными процессы нейрогенеза на раннем этапе развития нейродегенерации (SGZ), вклад VEGFR2-опосредованных меха-

низмов регуляции нейрогенеза и неоангиогенеза по-степенно редуцируется.

Еще в меньшей степени изучены особенности неоангиогенеза в нейрогенных нишах, однако существующие экспериментальные находки и полученные нами результаты оценки апоптоза позволяют предполагать вклад aberrантного микрососудистого окружения в нарушение генерации новых нейронов при развитии хронической нейродегенерации (Steinman et al., 2021).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что SGZ и SVZ в раннем периоде развития нейродегенерации, индуцированной действием A β 25–35, когда еще не очевидны нарушения формирования следа эмоциональной памяти страха, присутствуют различные проявления нарушенного нейрогенеза.

В целом, результаты экспериментальной оценки состояния нейрогенеза свидетельствуют о том, что уже на досимптоматической стадии развития нейродегенерации альцгеймеровского типа процессы нейрогенеза в зоне SGZ и SVZ нарушены: процессы мобилизации НСК при предъявлении аверсивного раздражителя и индукции процесса запоминания в SGZ относительно сохранены, тогда как в SVZ изначально увеличенный пул НСК, вероятно, обеспечивающих процессы репаративного нейрогенеза при повреждении ткани мозга, демонстрирует их высокую чувствительность к повреждающему действию A β 25–35 и когнитивной нагрузке. В обеих нейрогенных нишах наблюдается утрата стимул-индуцированной генерации нейробластов и незрелых нейронов в период, непосредственно предшествующий проявлению когнитивного дефицита.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00126; <https://rscf.ru/project/22-15-00126>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты выполняли с учетом принципов гуманного обращения с животными и на основании решения Локального этического комитета Научного центра неврологии (протокол № 5-3/22 от 01.06.2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

А.С. Аверчук: дизайн исследования, сбор материала, статистическая обработка материала, анализ полученных данных, написание текста статьи; М.В. Рязанова, Н.А. Розано-

ва, А.В. Ставровская, С.В. Новикова: сбор и обработка материала; Н.А. Колотьева: обработка материала; А.Б. Салмина: концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аверчук А.С., Рязанова М.В., Баранич Т.И., Ставровская А.В., Розанова Н.А., Новикова С.В., Салмина А.Б.* 2023. Нейротоксическое действие бета-амилоида сопровождается изменением митохондриальной динамики и аутофагии нейронов и клеток церебрального эндотелия в экспериментальной модели болезни Альцгеймера. Бюллетень экспер. биол. мед. Т. 175. № 3. С. 291. (*Averchuk A.S., Ryzanova M.V., Baranich T.I., Stavrovskaya A.V., Rozanova N.A., Novikova S.V., Salmina A.B.* 2023. The neurotoxic effect of beta-amyloid is accompanied with changes in the mitochondrial dynamics and autophagy in neurons and brain endothelial cells in the experimental model of Alzheimer's disease. *Bulletin Exper. Biol. Med.* V. 175. № 3. P. 291.) <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-175-3-291-297>
- Иноземцев А.Н.* 2013. Анализ природы следа памяти в условной реакции пассивного избегания. Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. № 1. С. 3 (*Inozemtsev A.N.* 2013. The analysis of the memory trace nature in passive avoidance response. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya.* № 1. С. 3.)
- Моргун А.В., Осипова Е.Д., Бойцова Е.Б., Шуваев А.Н., Комлева Ю.К., Труфанова Л.В., Вайс Е.Ф., Салмина А.Б.* 2019. Астроцит-опосредованные механизмы регуляции нейрогенеза в модели нейрогенной ниши *in vitro* при действии A β 1–42. Биомедицинская химия. Т. 65. № 5. С. 366. (*Morgun A.V., Osipova E.D., Boytsova E.B., Shuvaev A.N., Komleva Yu.K., Trufanova L.V., Weiss E.F., Salmina A.B.* 2019. Astrocyte-mediated regulation of cell development in the model of neurogenic niche *in vitro* treated with A β 1–42. *Biomed. Chemistry.* V. 65. № 5. P. 366.) <https://doi.org/10.18097/PBMC20196505366>
- Рудько А.С., Эфендиева М.Х., Будзинская М.В., Карпилова М.А.* 2017. Влияние фактора роста эндотелия сосудов на ангиогенез и нейрогенез. Вестник офтальмологии. Т. 133. № 3. С. 75. (*Rud'ko A.S., Efendieva M.Kh., Budzinskaia M.V., Karpilova M.A.* 2017. Influence of vascular endothelial growth factor on angiogenesis and neurogenesis. *Vestnik Oftalmologii.* V. 133. № 3. P. 75.) <https://doi.org/10.17116/oftalma2017133375-80>
- Dermon C.R., Zikopoulos B., Panagis L., Harrison E., Lancashire C.L., Mileusnic R., Stewart M.G.* 2002. Passive avoidance training enhances cell proliferation in 1-day-old chicks. *Eur. J. Neurosci.* V. 16. P. 1267. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02177.x>
- Esteve D., Molina-Navarro M.M., Giraldo E., Martínez-Varea N., Blanco-Gandia M.C., Rodríguez-Arias M., García-Verdugo J.M., Viña J., Lloret A.* 2022. Adult neural stem cell migration is impaired in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* V. 59. P. 1168. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02620-6>

- Eu W.Z., Chen Y.J., Chen W.T., Wu K.Y., Tsai C.Y., Cheng S.J., Carter R.N., Huang G.J. 2021. The effect of nerve growth factor on supporting spatial memory depends upon hippocampal cholinergic innervation. *Transl. Psychiatry*. V. 11. P. 162.
<https://doi.org/10.1038/s41398-021-01280-3>
- Fiore M., Triaca V., Amendola T., Tirassa P., Aloe L. 2002. Brain NGF and EGF administration improves passive avoidance response and stimulates brain precursor cells in aged male mice. *Physiol. Behav.* V. 77. P. 437.
[https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00875-2](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00875-2)
- Jack C.R., Knopman D.S., Jagust W.J., Petersen R.C., Weiner M.W., Aisen P.S., Shaw L.M., Vemuri P., Wiste H.J., Weigand S.D., Lesnick T.G., Pankratz V.S., Donohue M.C., Trojanowski J.Q. 2013. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol.* V. 12. P. 207.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70291-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70291-0)
- Jin K., Zhu Y., Sun Y., Mao X.O., Xie L., Greenberg D.A. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 99. P. 11946.
<https://doi.org/10.1073/pnas.182296499>
- López-Toledano M.A., Shelanski M.L. 2004. Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells. *J. Neurosci.* V. 24. P. 5439.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0974-04.2004>
- López-Toledano M.A., Shelanski M.L. 2007. Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP (Sw, Ind). *J. Alzheimers Dis.* V. 12. P. 229.
<https://doi.org/10.3233/jad-2007-12304>
- Ning W.J., Lv R.J., Xu N., Hou X.Y., Shen C., Guo Y.L., Fan Z.Y., Cao N., Liu X.P. 2021. Lycopene-loaded microemulsion regulates neurogenesis in rats with A β -induced Alzheimer's disease rats based on the Wnt/ β -catenin pathway. *Neural Plast.* V. 6. P. e5519330.
<https://doi.org/10.1155/2021/5519330>
- Ögren S.O., Stiedl O. 2013. Passive avoidance. *Encyclopedia of psychopharmacology*. V. 3. P. 960.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-27772-6_160-2
- Polis B., Srikanth K.D., Gurevich V., Bloch N., Gil-Henn H., Samson A.O. 2020. Arginase inhibition supports survival and differentiation of neuronal precursors in adult Alzheimer's disease mice. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 1133.
<https://doi.org/10.3390/ijms21031133>
- Riddle D.R., Lichtenwalner R.J. 2007. Neurogenesis in the adult and aging brain. *brain aging: models, methods, and mechanisms*. V. 131.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.07.006>
- Roybon L., Hjalt T., Stott S., Guillemot F., Li J.Y., Brundin P. 2009. Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis. *PLoS One*. V. 4. P. e4779.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004779>
- Scopa C., Marrocco F., Latina V., Ruggeri F., Corvaglia V., La Regina F., Ammassari-Teule M., Middei S., Amadoro G., Meli G., Scardigli R., Cattaneo A. 2020. Impaired adult neurogenesis is an early event in Alzheimer's disease neurodegeneration, mediated by intracellular A β oligomers. *Cell Death Differ.* V. 27. P. 934.
<https://doi.org/10.1038/s41418-019-0409-3>
- Scopa C., Marrocco F., Latina V., Ruggeri F., Corvaglia V., La Regina F., Ammassari-Teule M., Middei S., Amadoro G., Meli G., Scardigli R., Cattaneo A. 2020. Impaired adult neurogenesis is an early event in Alzheimer's disease neurodegeneration, mediated by intracellular A β oligomers. *Cell Death Differ.* V. 27. P. 934.
<https://doi.org/10.1038/s41418-019-0409-3>
- Steinman J., Sun H.S., Feng Z.P. 2021. Microvascular alterations in Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* V. 14. P. 618986.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.618986>

Neurogenesis in Brain Neurogenic Niches in Experimental Alzheimer's Disease at the Presymptomatic Stage of Neurodegeneration

A. S. Averchuk^{a, *}, M. V. Ryazanova^a, N. A. Rozanova^a, N. A. Kolotyeva^a, A. V. Stavrovskaya^a, S. V. Novikova^a, and A. B. Salmina^a

^aResearch Center of Neurology, Moscow, 125367 Russia

*e-mail: antonaverchuk@yandex.ru

Deciphering the mechanisms of development of neurodegeneration at the presymptomatic stage is an urgent task. It's solving allows optimizing the methods of early diagnostics and prevention of Alzheimer's disease (AD). Goal of the study: to study the features of neurogenesis in brain neurogenic niches in experimental Alzheimer's disease at the presymptomatic stage of neurodegeneration. Modeling of AD *in vivo* was carried out in experimental animals (male mice, C57BL/6, 8 months old) as follows: the control group, $n = 30$, animals were injected with 2 μ l of a 0.9% NaCl solution in the CA1 field of the hippocampus; the experimental group, $n = 30$, animals were injected with a 1M solution of oligomerized beta-amyloid 25–35 (A β 25–35) (2 μ l bilaterally). Cognitive impairments have been assessed with the passive avoidance task (PAT). For immunohistochemical studies, we identified the subgranular zone of the hippocampus (SGZ) and the subventricular zone (SVZ) in frozen sections of the brain tissue. We have analyzed the expression of markers – Nestin, Pax6, NeuroD1, VEGFR2, as well as apoptosis (TUNEL protocol) in neurogenic niches. In the period preceding the manifestation of cognitive dysfunction (from 9 to 17 days after intrahippocampal administration of A β 25–35), we registered multidirectional changes in the expression of markers of neurogenesis,

neoangiogenesis and the severity of apoptosis in the SGZ of the hippocampus and in the SVZ. At 9th day since the beginning of development of Alzheimer's type neurodegeneration, we found elevated expression of Pax6 and VEGFR2 in the SGZ and higher number of Nestin+ cells in the SVZ. Subsequent application of the PAT protocol with the presentation of an aversive stimulus (day 10) or the corresponding context (days 11 and 17) resulted in dynamic changes in the expression of cell markers at different stages of neurogenesis. In sum, at the presymptomatic stage of the Alzheimer's type neurodegeneration, SGZ and SVZ show signs of aberrant neurogenesis associated with a disruption in the pool of stem and progenitor cells and suppression of the production of neuroblasts/immature neurons in the period preceding the evident cognitive dysfunction.

Keywords: Alzheimer's disease, neurogenesis, subgranular zone, subventricular zone

СИНАПТОФИЗИН В СУПРАЭПЕНДИМНЫХ СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

© 2023 г. В. А. Разенкова¹, *, О. В. Кирик¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*E-mail: valeriya.raz@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.03.2023 г.

После доработки 29.03.2023 г.

Принята к публикации 04.04.2023 г.

Супраэпендимное сплетение желудочков головного мозга — одно из самых загадочных структурных образований центральной нервной системы. Поскольку как топография супраэпендимных элементов, так и их функциональное значение остаются неясными, целью настоящего исследования стало изучение распределения супраэпендимных структур в пределах желудочковой системы головного мозга крыс с использованием функционального иммуногистохимического маркера — синаптофизина. С помощью иммуногистохимической реакции на синаптофизин и тирозингидроксилазу были изучены последовательные срезы головного мозга крыс Вистар (4–6 мес., $n = 6$). Показано, что супраэпендимные структуры образуют на апикальной поверхности эпендимоцитов некрупные дискретные скопления, что указывает на зоны формирования синаптических контактов. Установлено, что катехоламинергические волокна присутствуют на поверхности эпендимоцитов всех исследованных областей, при этом наличие нервных волокон на поверхности желудочков не всегда сопряжено с наличием в них синаптофизина. Таким образом предполагается, что функциональное назначение супраэпендимного нервного сплетения зависит от его локализации и может быть связано как с регуляцией функционального статуса эпендимных клеток и формированием состава ликвора, так и с образованием межнейронных синаптических коммуникаций.

Ключевые слова: синаптофизин, желудочки головного мозга, тирозингидроксилаза, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S0041377123040107, **EDN:** ZKYDBB

Супраэпендимные структуры в желудочках головного мозга были впервые обнаружены в 70-х гг. 20-го века при проведении ультраструктурных исследований (Chan-Palay, 1976; Cupédo, 1977; Richards et al., 1981). Они могут включать супраэпендимные глиальные и нервные клетки, а также эпиплексусные макрофаги (клетки Колмера) (Cupédo, 1977). Частично супраэпендимные элементы представлены нервными сплетениями, которые образованы волокнами, проходящими по поверхности эпендимного пласта. Предполагалось что, в основном, эти волокна образованы отростками супраэпендимных нейронов (Martínez, de Weerd, 1977), однако дальнейшие исследования показали, что эти элементы могут быть сформированы также волокнами серотонинергических нейронов ядер шва (Cupédo, de Weerd, 1980). Существует мнение, что нервное сплетение, расположенное на поверхности эпендимы боковых желудочков, состоит из проходящих сквозь эпендимный слой отростков подлежащих дофаминергических нейронов (Troshev et al., 2022). Поскольку структурное исследование супраэпендимных структур

традиционно велось с помощью трудоемких и сложностандартизируемых методов электронной микроскопии, в настоящее время остается неясным, насколько распространены эти элементы в желудочках головного мозга, а также остается невыясненной медиаторная принадлежность и функциональное значение супраэпендимных волокон. В последнее время значительное внимание уделяется изучению эндокринной функции мозговых структур (Угрюмов, 2009), а наличие в головном мозге ликвор-контактирующих нейронов позволяет поставить вопрос о вероятной вовлеченности супраэпендимных элементов в эндокринную регуляцию. В связи с этим, особую актуальность приобретает оценка не только их структурной, но и функциональной составляющей.

Использование более легкодоступных методов световой микроскопии в изучении распределения и функционального статуса супраэпендимных волокон может быть осуществлено с помощью иммуноселективной окраски, позволяющей маркировать сайты, обладающие синаптической активностью. В настоящее время известно несколько белков, связанных с синаптическими терминалями. Один из таких белков — пресинаптический везикулярный гликопротеин синаптофизин (Janz et al., 1999). Синаптофизин

Принятые сокращения: СВЗ — субвентрикулярная зона; ТГ — тирозингидроксилаза; ЦСЖ — цереброспинальная жидкость.

ассоциирован с мембраной малых синаптических пузырьков и, таким образом, выявляет синаптические структуры ЦНС, независимо от того, какой нейромедиатор они содержат. Подобное свойство синаптофизина обуславливает его широкое использование в качестве маркера синаптической пластичности и целостности в исследованиях, касающихся как центральной, так и периферической нервной системы (Calhoun et al., 1996; Колос и др., 2015). Поэтому представляется, что использование высокоспецифической иммуногистохимической реакции на синаптофизин (как белка синаптических структур) позволит оценить плотность распределения и интерпретировать функциональное состояние супраэпендимных элементов головного мозга с помощью методов, не требующих сложной пробоподготовки, как в случае использования электронной микроскопии.

Таким образом, целью настоящего исследования было изучить распределение супраэпендимных структур в желудочках головного мозга крыс с использованием функционального иммуногистохимического маркера – синаптофизина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве материала для исследования использовали фронтальные срезы головного мозга половозрелых крыс-самцов породы Вистар (4–6 мес., $n = 6$). При проведении исследования соблюдали основные принципы Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.) и “Правила надлежащей лабораторной практики” (приказ № 199н от 01.04.2016 г. Минздрава России). Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ “ИЭМ” (заключение № 2/22 от 06.04.2022). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде (Korzhevskii et al., 2015) и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы толщиной 5 мкм наклеивали на предметные стекла с адгезивным покрытием “Superfrost Ultra Plus” (Menzel Gläser, Германия). После стандартной процедуры депарафинирования и регидратации, срезы подвергали тепловому демаскированию в водном растворе тиосульфата натрия (патент № RU 2719163 C1) в течение 22 мин. Ингибирование эндогенной пероксидазы проводили путем обработки срезов 3%-ным водным раствором перекиси водорода, а блокирование неспецифических сайтов связывания антигена – блокировочным раствором (Protein Block, Spring Bioscience, США) в течение 10 мин. Синаптические структуры на срезах выявляли с использованием мышинных моноклональных (клон SY38, ab8049, Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 60 и кроличьих поликлональных антител (Ready-To-Use, MON-RTU1195, Monosan, Нидерланды) к синаптофизину. Для выявления катехоламинергических структур использовали кроличьи поликло-

нальные антитела к тирозингидроксилазе (ТГ, ab112, Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 1000. В качестве вторичных реагентов использовали набор UltraVision Quanto HRP DAB Detection System (TL-060-QHL, Thermo Fisher Scientific, США). В раствор вторичных антител, для предотвращения перекрестного связывания вторичных реагентов с собственными иммуноглобулинами крысы, добавляли сыворотку, полученную из крови крыс Вистар, содержащихся в виварии ФГБНУ “ИЭМ”, до конечной концентрации раствора 0.5%. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген 3’3-диаминобензидин из набора DAB+ (Agilent, США). Часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином. Полученные препараты анализировали с использованием микроскопа Leica DM750 (Германия) и фотографировали с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). В качестве положительного контроля антигена при постановке иммуногистохимических реакций на синаптофизин были использованы препараты мозжечка крысы, в зрелом слое коры которого дендриты клеток-зерен образуют особые синаптические структуры – клубочки мозжечка (Hámori, Somogyi, 1983). В качестве положительного контроля при выявлении катехоламинергических структур были использованы препараты промежуточного мозга крысы на уровне черной субстанции (Rabey, Nefti, 1990). Для постановки отрицательного контроля антител на один из срезов обрабатываемой серии препаратов вместо раствора первичных антител наносили раствор для разведения антител Antibody Diluent (Spring Bioscience, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате иммуногистохимической реакции на препаратах головного мозга четко идентифицируются синаптофизин-содержащие структуры. Синаптофизин-положительные супраэпендимные элементы представляют собой округлые гранулы, которые располагаются дискретно, в виде цепочек обособленных гранул, на поверхности эпендимных клеток (рис. 1). В ходе анализа препаратов на большом увеличении было выявлено неравномерное распределение синаптофизин-положительных структур в пределах поверхности желудочков мозга. Так, в области боковых желудочков синаптофизин выявлялся над апикальной поверхностью эпендимноцитов медиальной и дорсальной стенки, но редко выявлялся в нижней стенке III желудочка в области Монроева (межжелудочкового) отверстия. Высокая плотность синаптических структур наблюдалась вблизи боковых стенок и дна III желудочка в зоне дорсального гиппокампа и хабенулы, но не в зоне инфундибулярного углубления. Далее интенсивная реакция на синаптофизин сохраняется в супраэпендимных структурах дорсальной части мозга на всем протяжении III желудочка и практически исчезает в районе Сильвиева водопровода.

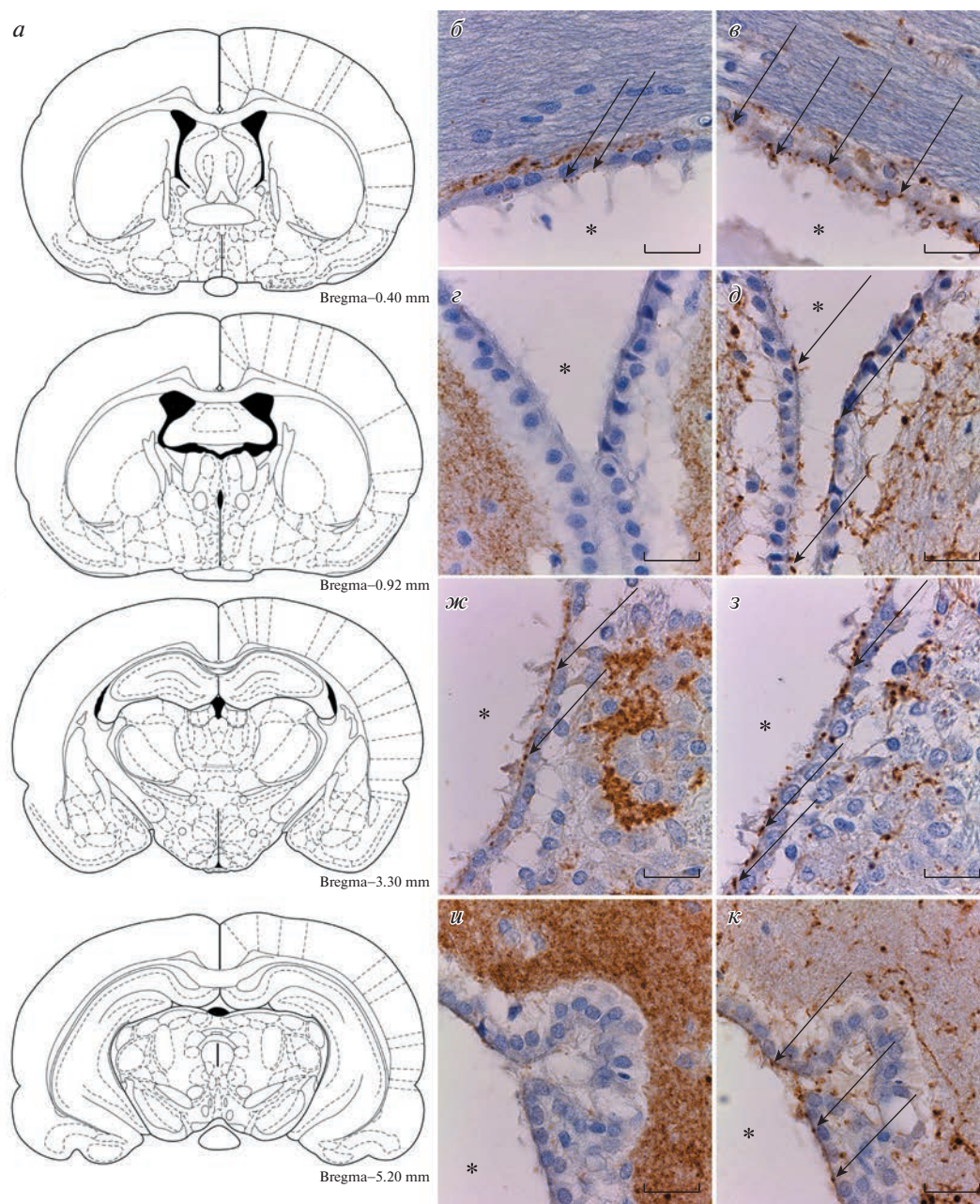


Рис. 1. Супраэпендимные волокна в желудочках мозга. *а* – Схемы срезов головного мозга на уровне исследованных областей, *б–к* – серии последовательных срезов, демонстрирующих распределение синаптофизина (*б, г, ж, и*) и тирозингидроксилазы (*в, д, з, к*) в различных структурах. *б, в* – Дорсальная стенка бокового желудочка; *г, д* – третий желудочек, ростральная часть; *ж, з* – третий желудочек, область хабенулы; *и, к* – Сильвиев водопровод. Стрелки указывают на супраэпендимные элементы, звездочка – полость желудочков мозга. Объектив Plan-Apochromat 100×/1.25 Oil (масляная иммерсия). Масштабные отрезки – 20 мкм.

В дополнение к синаптофизину, была поставлена иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу, позволяющая выявлять катехоламинергические волокна на всей их протяженности. Исследование препаратов с использованием этого маркера показало, что ТГ-содержащие волокна присутствуют на поверхности эпендимноцитов всех исследованных областей (см. рис. 1*в, д, з, к*). ТГ-иммуноположительные

элементы выявляются в виде обособленных округлых или сферических гранул и непротяженных волокон с четкообразными утолщениями. Плотность их распределения визуально выше, чем плотность распределения синаптофизин-содержащих структур, а наиболее интенсивная реакция наблюдалась на поверхности нижней стенки III желудочка в зоне межжелудочкового отверстия, а также на поверхности эпендимноцитов

боковой стенки III желудочка в области хабенулы. При этом пространственное распределение супраэпендимных катехоламинергических волокон часто совпадало с наличием в подлежащей нервной ткани супраэпендимного ТГ-положительного сплетения. Такая картина характерна для прилегающего к боковым желудочкам белого вещества мозолистого тела, хабенулы и гипоталамических ядер инфундибулярного углубления.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на многочисленные упоминания в литературе, сведения о супраэпендимных элементах на настоящий момент фрагментарны и преимущественно относятся к 80-м гг. двадцатого века, в связи с чем нуждаются в тщательной проверке и систематизации. Нет единого мнения о распределении, источниках и функциональном назначении супраэпендимного нервного сплетения. Подобный пробел во многом связан с крайней специфичностью объекта исследования, особенностями его локализации и выявления на гистологических препаратах.

Методический подход с использованием пресинаптического маркера синаптофизина позволил выявить интенсивную супраэпендимную иннервацию стенок боковых и третьего желудочков головного мозга. Показано, что синаптические супраэпендимные структуры образуют на апикальной поверхности эпендимоцитов некрупные дискретные скопления, которые могут оказаться узлами синаптической передачи. В пользу этого говорят ультраструктурные исследования, показывающие возможность образования супраэпендимными волокнами асимметричных (тип I по Грею) синаптических контактов с телами и отростками эпендимных клеток (Mollgard, Wiklund, 1979; Naemmerle et al., 2015). Помимо этого, доказано наличие синаптофизина в микровезикулах нейроэндокринных клеток (Navone et al., 1986), что позволяет предположить нейросекреторную природу супраэпендимных элементов. Примечательными в этом контексте оказываются данные А.Р. Муртазиной с соавторами (Муртазина и др., 2021), согласно которым, присутствующие в ЦСЖ моноамины имеют преимущественно нейрональное происхождение. Опираясь на вышеуказанные литературные данные, а также наши собственные результаты, можно сделать вывод о возможной роли супраэпендимного сплетения в качестве потенциального источника моноаминов (в частности катехоламинов), содержащихся в ЦСЖ.

В ходе исследования препаратов отмечено, что наибольшей плотностью распределения супраэпендимных синаптических элементов отличаются боковые желудочки и дорсальная зона III желудочка головного мозга. Любопытно, что синаптические структуры выстилки боковых желудочков сконцентрированы, в основном, в области медиальной и дорсальной, но не латеральной стенки. Принимая во внимание высокую актуальность обеспечения всесторонней регуляции

нейрогенной ниши – субвентрикулярной зоны (СВЗ), можно было бы ожидать интенсивную реакцию в области латеральных стенок желудочка. На это указывают более ранние ультраструктурные исследования, выявившие тесные синаптические контакты между варикозными расширениями супраэпендимных серотонинергических аксонов и апикальными отростками клеток ниши (Tong et al., 2014), а также наблюдения Д.В. Трошева с соавторами, подтвердивших наличие вблизи СВЗ супраэпендимных катехоламинергических отростков (Troshev et al., 2022). Однако наши данные показывают, что типичная синаптическая иннервация СВЗ со стороны желудочков отсутствует. В соответствии с этим наблюдением можно сделать вывод, что контроль нейрогенной ниши не является основной функциональной задачей супраэпендимного сплетения боковых желудочков.

Еще одним заслуживающим внимание результатом стало сопоставление последовательных срезов, окрашенных на синаптофизин и ТГ: выявлено, что наличие нервных волокон на поверхности желудочков не всегда сопряжено с наличием в них синаптофизина, а, следовательно, синаптических структур. Так, в области инфундибулярного углубления и Сильвиева водопровода иммуногистохимическая реакция на ТГ позволяет четко выявить супраэпендимные катехоламинергические волокна, которые не содержат синаптофизин. Эта особенность выявления двух различных антигенов дает основания заключить, что не во всех исследуемых областях ТГ-иммунопозитивные супраэпендимные волокна являются функционально активными, а, по-видимому, выполняют транзитную функцию.

Однако, рассматривая область стенки срединного возвышения, следует учитывать также структурно-функциональные особенности этой зоны головного мозга, выстилку которой формируют танициты (Page, 2006). Известно, что для таницитов срединного возвышения характерен уникальный паттерн экспрессии белков клеточных контактов, что обуславливает их уникальные свойства в качестве структурных компонентов барьерной системы головного мозга. В частности, в ходе сравнительных исследований субпопуляций таницитов было показано, что отличительной особенностью $\alpha 2$ -таницитов является неорганизованный (диффузный) паттерн распределения белков плотных контактов, что может указывать на наличие парацеллюлярного транспорта между телами таницитов и структурами подлежащей нервной ткани (Mullier et al., 2010). При исследовании распределения белков щелевых контактов было обнаружено, что в апикальной части и ножках таницитов присутствует белок коннексин 43, что, предположительно, позволяет этим клеткам формировать гемиканалы не только для транспорта веществ в цереброспинальную жидкость (ЦСЖ), но и двустороннего регулируемого транспорта веществ между ЦСЖ и кровью (Суфиева и др., 2019). В таком случае, область срединного возвышения может не

нуждаться в дополнительной дистанционной нейро-эндокринной регуляции супраэпендимных волокон.

Опираясь на вышесказанное, можно выделить три наиболее вероятных гипотезы о возможной функции супраэпендимного сплетения. Во-первых, отростки нейронов могут достигать клеток-мишеней не по проводящим путям нервной ткани, а вдоль стенок желудочков мозга, и роль супраэпендимных волокон в этом случае заключается в транспорте биологически активных молекул и нейрогормонов. Во-вторых, супраэпендимные структуры могут влиять на состав ЦСЖ. В-третьих, они могут обеспечивать паракринную регуляцию функционального статуса эпендимных клеток. При этом выполняемая роль супраэпендимных элементов, очевидно, регионально специфична.

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить, что синаптофизин является удобным маркером, позволяющим на световом уровне определить супраэпендимные структуры головного мозга крысы. Его наличие в супраэпендимных волокнах свидетельствует о том, что выявленные структуры обладают функциональной активностью и способны образовывать межнейронные синаптические коммуникации, либо высвобождать нейромедиатор в ЦСЖ, выполняя эндокринную регуляторную функцию.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института экспериментальной медицины.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные принципы использования животных. Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ “ИЭМ” (заключение № 2/22 от 06.04.2022).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

В.А. Разенкова: постановка иммуногистохимических реакций, анализ литературы, интерпретация результатов, работа с иллюстрациями, написание текста статьи; О.В. Кирик: планирование исследования, сбор и обработка биологического материала, фотографирование и анализ препаратов, редактирование рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Колос Е.А., Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. 2015. Маркер синаптических контактов — синаптофизин. Морфология. Т. 147. № 1. С. 78. (Kolos E.A., Grigoriyev I.P., Kor-

zhevskiy D.E. 2015. A synaptic marker synaptophysin. Morphologija. V. 147. № 1. P. 78.)

Муртазина А.Р., Бондаренко Н.С., Пронина Т.С., Чандрян К.И., Богданов В.В., Дильмухаметова Л.К., Угрюмов М.В. 2021. Сравнительный анализ содержания моноаминов как нейрогормонов в ликворе и крови крыс в онтогенезе. Acta Naturae. Т. 13. № 4. С. 89. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11516> (Murtazina A.R., Bondarenko N.S., Pronina T.S., Chandran K.I., Bogdanov V.V., Dilmukhametova L.K., Ugryumov M.V. 2021. A comparative analysis of CSF and the blood levels of monoamines as neurohormones in rats during ontogenesis. Acta Naturae. V. 13. № 4. P. 89.)

Суфияева Д.А., Кирик О.В., Коржевский Д.Э. 2019. Астроцитарные маркеры в таницитах третьего желудочка головного мозга крысы в постнатальном онтогенезе и при старении. Онтогенез. Т. 50. № 3. С. 205. <https://doi.org/10.1134/S0475145019030066> (Suftieva D.A., Kirik O.V., Korzhevskii D.E. 2019. Astrocyte markers in the tanycytes of the third brain ventricle in postnatal development and aging in rats. Russ. J. Dev. Biol. V. 50. P. 146.)

Угрюмов М.В. 2009. Эндокринные функции мозга у взрослых млекопитающих и в онтогенезе. Онтогенез. Т. 40. № 1. С. 19. (Ugryumov M.V. 2009. Endocrine functions of brain in adult and developing mammals. Russ. J. Dev. Biol. V. 40. № 1. P. 14.)

Calhoun M.E., Jucker M., Martin L.J., Thinakaran G., Price D.L., Mouton P.R. 1996. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. J. Neurocytol. V. 25. P. 821. <https://doi.org/10.1007/BF02284844>

Chan-Palay V. 1976. Serotonin axons in the supra- and subependymal plexuses and in the leptomeninges; their roles in local alterations of cerebrospinal fluid and vasomotor activity. Brain Res. V. 102. P. 103. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90578-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90578-3)

Cupédo R.N.J. 1977. The surface ultrastructure of the habenular complex of the rat. Anat. Embryol. V. 152. P. 43. <https://doi.org/10.1007/BF00341434>

Cupédo R.N.J., de Weerd H. 1980. Serotonergic intraventricular axons in the habenular region. Phagocytosis after induced degeneration. Anat. Embryol. V. 158. P. 213. <https://doi.org/10.1007/BF00315907>

Haemmerle C.A., Nogueira M.I., Watanabe I.S. 2015. The neural elements in the lining of the ventricular-subventricular zone: making an old story new by high-resolution scanning electron microscopy. Front. Neuroanat. V. 9. <https://doi.org/10.3389/FNANA.2015.00134>

Hámori J., Somogyi J. 1983. Differentiation of cerebellar mossy fiber synapses in the rat: a quantitative electron microscope study. J. Comp. Neurol. V. 220. P. 365. <https://doi.org/10.1002/CNE.902200402>

Janz R., Südhof T.C., Hammer R.E., Unni V., Siegelbaum S.A., Bolshakov V.Y. 1999. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. Neuron. V. 24. P. 687. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81122-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81122-8)

Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. 2015. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. Eur. J. Histochem. V. 59. P. 5. <https://doi.org/10.4081/EJH.2015.2530>

- Martínez P.M., de Weerd H.* 1977. The fine structure of the ependymal surface of the recessus infundibularis in the rat. *Anat. Embryol.* V. 151. P. 241.
<https://doi.org/10.1007/BF00318929>
- Mollgard K., Wiklund L.* 1979. Serotonergic synapses on ependymal and hypendymal cells of the rat subcommissural organ. *J. Neurocytol.* V. 8. P. 445.
<https://doi.org/10.1007/BF01214802>
- Mullier A., Bouret S.G., Prevot V., Dehouck B.* 2010. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* V. 518. P. 943.
<https://doi.org/10.1002/CNE.22273>
- Navone F., Jahn R., Di Gioia G., Stukenbrok H., Greengard P., De Camilli P.* 1986. Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J. Cell Biol.* V. 103. P. 2511.
<https://doi.org/10.1083/JCB.103.6.2511>
- Page R.B.* 2006. Anatomy of the hypothalamo-hypophysial complex. In: *Physiology of Reproduction*. Academic Press. P. 1309.
- Rabey J.M., Hefji F.* 1990. Neuromelanin synthesis in rat and human substantia nigra. *J. Neural Transm.: Parkinson's Dis. Dementia Sect.* V. 2. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/BF02251241>
- Richards J.G., Lorez H.P., Colombo V.E., Guggenheim R., Kiss D., Wu J.Y.* 1981. Demonstration of supra-ependymal 5-HT nerve fibres in human brain and their immunohistochemical identification in rat brain. *J. Physiol. (Paris)*. V. 77. P. 219.
- Tong C.K., Chen J., Cebrián-Silla A., Mirzadeh Z., Obernier K., Guinto C.D., Tecott L.H., García-Verdugo J.M., Kriegstein A., Alvarez-Buylla A.* 2014. Axonal control of the adult neural stem cell niche. *Cell Stem Cell.* V. 14. P. 500.
<https://doi.org/10.1016/J.STEM.2014.01.014>
- Troshev D., Bannikova A., Blokhin V., Kolacheva A., Pronina T., Ugrumov M.* 2022. Striatal neurons partially expressing a dopaminergic phenotype: functional significance and regulation. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23.
<https://doi.org/10.3390/IJMS231911054/S1>

Synaptophysin Expression by Supraependymal Structures of the Rat Brain

V. A. Razenkova^a, * and O. V. Kirik^a

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

**e-mail: valeriya.raz@yandex.ru*

Supraependymal plexus in ventricular system is one of the most cryptic structures in the mammalian central nervous system. Since both the topography of supraependymal elements and their functional role remain unclear, the aim of this research was to study the distribution of supraependymal structures within the ventricular system of the rat brain with synaptic function associated marker, synaptophysin. Serial sections of Wistar rats (4–6 month, $n = 6$) forebrain were examined using immunohistochemical detection of synaptophysin and tyrosine hydroxylase. It was shown that supraependymal plexus can form on the surface of ependymal cells synaptophysin-immunopositive discrete structures, which indicates the formation of synaptic contacts. Although catecholaminergic nerve fibers were present on the ventricular surface in all studied zones, it seems that these nerve fibers may not always contain synaptophysin. Thus, it is assumed that the functional purpose of the supraependymal nerve plexus depends on its localization and can be associated whether with the regulation of ependymal cells and cerebrospinal fluid formation, or with the formation of long-range interneuronal connectivities.

Keywords: synaptophysin, ventricular system, tyrosine hydroxylase, immunohistochemistry

РЕАКЦИЯ ГЕНОМА ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПРОЦЕДУРУ ДЛИТЕЛЬНОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

© 2023 г. Т. М. Гринчук¹, М. А. Шорохова¹, *, Н. А. Пуговкина¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: shili-mariya@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.03.2023 г.

После доработки 28.03.2023 г.

Принята к публикации 13.04.2023 г.

Сведения о влиянии криоконсервации на клеточные функции и генетический аппарат клеток разного генеза неоднозначны и находятся в стадии накопления. Настоящая работа направлена на изучение влияния длительного пребывания (7 лет) в замороженном состоянии эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека (эмСК) на стабильность их генома *in vitro*. Результаты показали дестабилизацию структуры кариотипа у потомков клеток после их размораживания, а именно анеуполиплоидизацию хромосомного набора, повышенную ломкость хромосом, влекущую за собой огромный пул aberrантных хромосом, и нарушение конденсации в гомологах. Хромосомные поломки, затрагивающие прицентромерные области, в ряде случаев сопровождались сохранением генетического материала в виде самостоятельных хромосом. В процесс дестабилизации клеточного генома эмСК были вовлечены почти все хромосомы набора. Показано, что процедура многолетней криоконсервации может стать индуктором преждевременного клеточного старения эмСК после их размораживания. Сравнение полученных данных с результатами кариотипирования трансформированных клеток китайского хомячка, претерпевших аналогичную процедуру, позволило заключить, что криоконсервация для биологических систем может являться стрессом, индуцирующим разнотипные генетические дефекты на уровне кариотипа. Реакция генома клеток различного происхождения на одни и те же условия криоконсервации может различаться.

Ключевые слова: эндометриальные мезенхимные стволовые клетки человека, кариотип, хромосомы, криоконсервация, нестабильность генома

DOI: 10.31857/S0041377123040065, EDN: ZGVVAN

Использование различного по происхождению биологического материала в научных и прикладных целях требует сохранения физиологических и генетических свойств клеток. В настоящее время в качестве широко используемых в этих целях методов рассматривается процедура криоконсервации, в основе которой лежит замораживание живых биологических объектов в жидком азоте при температуре -196°C . Постоянное совершенствование протокола криоконсервации в настоящее время позволяет сохранять биологические объекты в течение многих лет. Однако как реагирует геном разных по чувствительности клеток на погружение в глубокий холод, на используемые реагенты, на длительность криоконсервации и другие факторы далеко не ясно. Сведения о возможном влиянии криопротокола на клеточные функции и геном неоднозначны и находятся

в стадии накопления. Одни авторы указывают на то, что замораживание, в частности краткосрочное (от нескольких суток до нескольких недель), не влияет на фенотипическую и генотипическую стабильность клеток (de-Lima et al., 2012; Polchow et al., 2012; Астрелина и др., 2013; Imaizumi et al., 2014). Согласно другим работам, в клеточном геноме в связи с замораживанием могут возникать изменения, затрагивающие как важнейшие клеточные элементы, так и генетический аппарат, влияя на выживание клеток, их пролиферацию и дифференцировку (Семенова, 1988; Полянская и др., 1990; Duarte et al., 2012). Таким образом, вопрос о влиянии криоконсервации на физиологическую и генетическую стабильность клеток остается открытым.

Известно, что в основе сохранения генетической информации в неизменном виде в клетках-потомках лежит точность осуществления митотического деления родительской клеткой. Нарушения в программе клеточного деления ведут к генетическим дефектам. Основные типы кариотипической нестабильности, опосредованные сбоями в программе клеточного де-

Принятые сокращения: эмСК – эндометриальные мезенхимные стволовые клетки; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор; SA- β -Gal – β -галактозидаза, ассоциированная со старением.

ления, связаны как с изменением числа хромосом в клетках, так и с изменением их структуры и функциональной активности (Diaferia et al., 2008; Tan et al., 2019). Возникновение геномной нестабильности, меняющей архитектуру генома и функции отдельных генов, может инициировать клеточную иммортализацию и трансформацию (Heng et al., 2005; Tang et al., 2012; Heng et al., 2013; Passerini et al., 2016).

Актуальность проблемы влияния процедуры криоконсервации биологических систем на генетический аппарат с каждым годом все более очевидна, однако данные по системному кариотипическому анализу клеточных линий различного генетического статуса и после криоконсервации, в литературе практически отсутствуют. В связи с интересом к данной проблеме ранее нами была охарактеризована стабильность культуры трансформированных фибробластов легкого китайского хомячка (линия V-79 RJK), претерпевших криоконсервацию (-196°C) (Гринчук, Шилина, 2021).

В процессе этой работы было установлено, что при длительном пребывании клеток линии V-79 RJK в жидком азоте (10 лет), в отличие от краткосрочных заморозок (3 или 6 мес.), клетки характеризовались дестабилизацией клеточного генома (Гринчук, Шилина, 2021). Выявленные изменения были связаны, как с усилением вариативности числа хромосом в клетках, в результате нарушения копийности тех или иных хромосом набора, так и с появлением структурно перестроенных хромосом, возникающих в результате поломок хромосомного материала. Как правило, образование структурных перестроек носило случайный характер. На этом фоне одна из хромосом набора (хромосома Z3) была подвержена разнотипным поломкам. Повторившаяся неоднократно (в 30% кариотипированных клеток) ломкость этой хромосомы позволила рассматривать ее как неслучайную, хотя локусы, в которых выявлялись поломки, были разными. Был сделан вывод, что данная хромосома имеет предрасположенность к поломкам в условиях многолетней криоконсервации (Гринчук, Шилина, 2021).

В связи с перспективами клинического применения мезенхимных стволовых клеток человека (МСК) особую актуальность приобретает вопрос о влиянии криоконсервации на кариотип этих клеток. На данном этапе существует ряд работ по изучению влияния криоконсервации на МСК различного происхождения. Так, в работе Астрелиной с коллегами (2013) при изучении качества и безопасности криоконсервированных МСК плаценты, подготовленных для клинического применения, показано, что аллогенные МСК плаценты после криоконсервации безопасны для клинического применения и имеют высокий индекс пролиферации, позволяющий получить необходимое количество клеток для достижения максимального терапевтического эффекта (Астрелина и др., 2013). С другой стороны, исследо-

вания доктора Антеби на МСК костного мозга (Antebi et al., 2019) показали, что криоконсервация оказывает пагубное влияние на различные клеточные характеристики и функции. А именно, в клетках после криоконсервации было обнаружено снижение поверхностных маркеров CD44 и CD105, в клеточной популяции наблюдали увеличение апоптоза с одновременным снижением уровня клеточной пролиферации, клоногенной способности и экспрессии ключевых регенеративных генов. При этом особенно важное значение имели первые 24 ч после возврата размороженных клеток к нормальным условиям культивирования. Этот период нивелировал негативные последствия криоконсервации и позволял клеткам восстановить их функциональную активность (Antebi et al., 2019). В этой связи стоит отметить работу, в которой был проведен аналитический обзор 41 исследования, выполненных на МСК костного мозга (Bahsoun et al., 2019). Было сделано заключение, что криоконсервация не влияет на морфологию МСК, экспрессию поверхностных маркеров, дифференцировочный потенциал и пролиферацию. Однако влияние криоконсервации на способность к образованию колоний, жизнеспособность, адгезию, миграцию, стабильность генома и паракринную функцию неоднозначны, и очень варьируют в различных исследованиях (Bahsoun et al., 2019). Таким образом, вопрос о влиянии криоконсервации на МСК остается открытым и требует дополнительного исследования, особенно с точки зрения генетической стабильности клеток.

Цель настоящей работы заключалась в цитогенетическом анализе мезенхимных стволовых клеток человека в культуре после их многолетнего пребывания в жидком азоте при температуре -196°C . В качестве объекта исследования была использована клеточная линия эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека (эМСК), полученная из десквамированного эндометрия менструальной крови. Стоит отметить, что полученные данные, в сравнении с результатами кариотипирования трансформированных клеток китайского хомячка, претерпевших аналогичную процедуру, полученными нами ранее, (Гринчук, Шилина, 2021) расширит представление о влиянии длительной криоконсервации на геном клеток различного происхождения и статуса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточная линия и культивирование. В работе использованы эМСК человека линии 2304 из десквамированного эндометрия менструальной крови, полученной и охарактеризованной ранее в ИИЦ РАН (Санкт-Петербург; Земелько и др. 2011). Клетки данной линии в процессе культивирования характеризовались относительной кариотипической стабильностью. Клетки культивировали во флаконах Карреля площадью 25 см^2 (Corning, США), в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% эмбриональной бы-

чьей сыворотки (HyClone, США), 1% пенициллина-стрептомицина и 1% GlutaMAX (Gibco, США) в стандартных условиях (при 5% CO₂ и 37°C), пересеивали 2 раза в неделю в соотношении 1 : 3–1 : 4, используя 0.05%-ный раствор трипсина–ЭДТА (Invitrogen, США).

Криоконсервация. Клетки открепляли от поверхности пластика 0.05%-ным раствором трипсина–ЭДТА (Gibco, США), помещали в пробирку, добавляли культуральную среду и центрифугировали при 1500 об./мин в течение 5 мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспензировали в растворе 90%-ной бычьей сыворотки (HyClone, США), содержащей 10% DMSO (Sigma, США). Ресуспензированные клетки переносили в криовials (Nunc, США) и замораживали со скоростью 1°C/мин с последующим хранением в жидком азоте при –196°C. При размораживании ампулу с клетками быстро нагревали в водяной бане при 37°C. Клетки переносили в центрифужную пробирку, добавляли ростовую среду и центрифугировали при 1500 об./мин в течение 5 мин. Отмытые от DMSO клетки помещали в культуральные флаконы для дальнейшего культивирования в соответствии со стандартным протоколом.

Приготовление препаратов метафазных хромосом. Клетки высевали с плотностью $(14–15) \times 10^3$ кл./см². Через 24–25 ч в культуральную среду с клетками добавляли колцемид в концентрации 0.02 мг/мл (Sigma, США). Через 1 ч среду удаляли, клетки промывали раствором PBS (Sigma, США) и ферментативно открепляли от пластика 0.05%-ным раствором трипсина. Клеточную суспензию центрифугировали, супернатант удаляли, осадок ресуспензировали и подвергали гипотонической обработке 0.56%-ным раствором KCl (Реахим, Россия). После гипотонической обработки клеточную суспензию центрифугировали (1500 об./мин), супернатант удаляли, клетки фиксировали в течение 1.5 ч холодной смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3 : 1), трижды меняя за это время фиксатор на свежий. Фиксированный материал раскапывали на холодные и влажные предметные стекла. Препараты в течение 1 нед. высушивали при комнатной температуре. Цитологические препараты метафазных хромосом окрашивали красителем Гимза (BDH, Англия) в PBS после предварительной трипсинизации. Кариотипический анализ проводили с использованием светового микроскопа Axio Scop (Carl Zeiss, Германия) при увеличениях объектива 20, 40 и 100×. Хромосомы идентифицировали в соответствии с международной номенклатурой (Mitelman, 1995) и атласом хромосом человека (Мамаева, 2000).

Кариотипический анализ клеточной культуры, после размораживания, осуществляли на 4-ом пассаже культивирования в стандартных условиях.

Определение активности β-галактозидазы (SA-β-Gal) ассоциированной со старением. Активность фермента является маркером клеточного старения. Клетки (10⁵) высевали в чашки Петри диаметром 3 см и

культивировали в течение 3 сут. Затем среду удаляли, клетки промывали PBS, фиксировали 4%-ным формальдегидом и окрашивали набором на SA-β-Gal (Cell Signaling, США) согласно инструкции производителя. Активность SA-β-Gal определяли по окрашиванию клеток в синий цвет под микроскопом.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кариотипическая характеристика эМСК линии 2304 до заморозки. Неоднократное кариотипирование эМСК линии 2304 на разных этапах культивирования (Шорохова, Гринчук, 2021) позволило рассматривать ее как генетически стабильную. На первых пассажах после получения линии (пассаж 6) на фоне относительной кариотипической стабильности клеток (рис. 1а, табл. 1) в некоторых из них выявлялись дефекты – нарушение копийности хромосом, различия в конденсации между гомологами, межхромосомные ассоциации, в некоторых случаях приводящие к образованию атипичных двуплечих хромосом. На пассаже 15 культура характеризовалась как кариотипически стабильная. Отклонения от нормы были единичными (табл. 1, рис. 1б).

Кариотипирование эМСК 2304 после длительной (7 лет) криоконсервации. Две дочерние клеточные популяции были заморожены в жидком азоте с использованием ДМСО при температуре –196°C на 4- и 5-ом пассажах соответственно. В условиях глубокого холода они находились в течение 7 лет. Затем клетки размораживали и культивировали их в течение 3-х пассажей. С 4-ого пассажа после разморозки клетки анализировали кариотипически (рис. 2).

Анализ клеток на пассаже 4 после разморозки показал следующее. В обоих случаях стабильность генома в большей части кариотипированных клеток была нарушена в связи с возникновением анеуплоидии и структурных хромосомных перестроек (рис 3а, табл. 2). Анеуплоидия была обусловлена нестабильностью числа хромосомных копий в пределах кариотипа (моносомия, трисомия). Образование aberrантных хромосом было опосредовано ломкостью хромосомного материала. В поломки вовлекались разные хромосомы набора, при этом только один из гомологов. Поломки могли быть как прицентромерные, так и терминальные, либо с сохранением, либо с делетированием генетического материала. Некоторые хромосомы (чаще хромосомы 12 и X) характеризовались повышенной генетической нестабильностью – неоднократными aberrациями и нарушением числа копий. Общее число хромосом в клетках варьировало. Преимущество имели околодиплоидные клеточные варианты, однако единичные клетки типировались как околотри- и околотетраплоидные.

Повторный анализ после непродолжительного культивирования (пассаж 7 после размораживания) выявил усиление кариотипической гетерогенности клеток и увеличение числа aberrантных хромосом

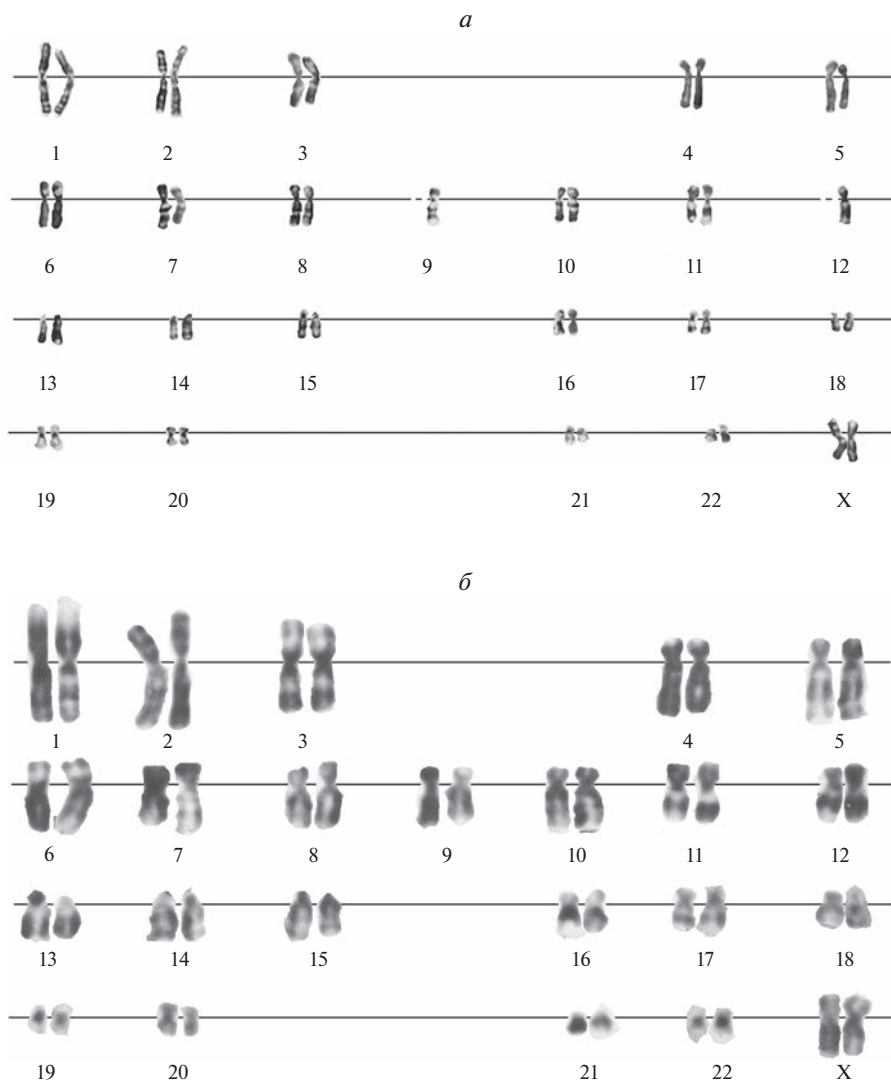


Рис. 1. Кариотип клеток ЭМСК человека линии 2304. *а* – На пассаже 6; *б* – на пассаже 15, нормальный кариотип.

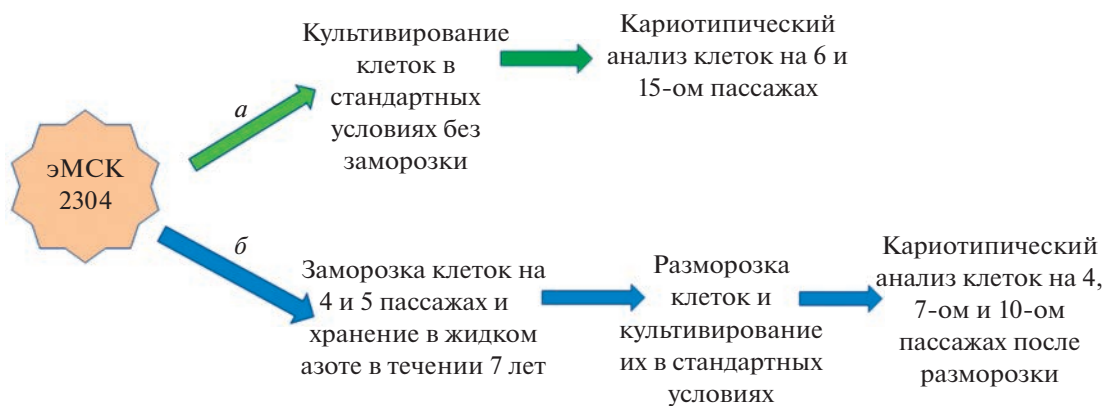


Рис. 2. Схема проведения эксперимента по кариотипированию ЭМСК человека линии 2304 при культивировании клеток до криоконсервации и после криоконсервации. *а* – Кариотипирование на пассажах 6 и 15 при культивировании клеток в стандартных условиях, *б* – длительная (7 лет) криоконсервация клеток с последующим размораживанием и переводом в стандартные условия культивирования. Кариотипический анализ проводили на пассажах 4, 7, 10.

Таблица 1. Кариотипические отклонения в эМСК линии 2304 при культивировании в стандартных условиях, пассажи 6 и 15

Ядро, № п.п.	Хромосома																						
	Пассаж 6																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
1	2n	2n	n	2n	n	2n	2n	2n	2n	2n	n	2n	2n	2n	2n	3n	2n	2n	3n	2n	2n	2n	2n
2	3n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	n + (p + q)	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
3	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
4	2n	2n	n + (p + q)	2n	2n	n(p + q)	2n	2n	2n	3n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
5	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
6	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	n	2n	2n	2n
7	2n	2n	2n	-	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	n	2n	2n	2n	2n	2n	n	2n	2n	2n	2n
8	2n	n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
9	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
10	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	n	n + (p + q)	2n	2n	2n	2n	2n	n	2n	2n	2n	2n	n	2n	2n

Пассаж 15																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
1	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	n	2n	2n	2n	2n	2n	n
2	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
3	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
4	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
5	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
6	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
7	2n	2n	2n	2n	2n	n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
8	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
9	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
10	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
11	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
12	2n	2n	2n	2n	2n	2n	n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
13	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n
14	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	n	2n	2n	n
15	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n	2n

Примечание. 2n – 2 нормальных гомолога хромосомы; n – моносомия; n + (p + q) – прицентромержная поломка с сохранением p- и q-плеча в одном гомологе; n(p + q) – моносомия и прицентромержная поломка с сохранением p- и q-плеча.

(рис. 3б, табл. 2). Генетическое разнообразие дефектных хромосом было усилено вовлечением в поломки второго гомолога и наличием (редко) аберраций нового типа (транслокаций, инверсий, дупликаций), не свойственных ни клеткам исходной линии до замораживания, ни клеткам на 4-ом пассаже после размораживания. Дестабилизированы были практически все метафазные пластинки. При наличии в кариотипе трех копий в перестройки могли быть вовлечены 2 из них или все 3.

Еще через 3 пассажа (пассаж 10 после размораживания) митотические пластинки были единичными и не удовлетворяли требованиям для их детального

цитогенетического анализа. Клеточная популяция через 7 пассажей после размораживания проявляла все признаки клеточного старения: клетки значительно увеличивались в размере и меняли свою форму, снижали пролиферативную активность, окрасивались на SA-β-Gal (рис. 4). Стоит отметить, что контрольные клетки, не подвергнутые криоконсервации, активно пролиферировали до 25–27-ого пассажа, тогда как клетки, подвергнутые длительной криоконсервации, останавливали свою пролиферацию и подвергались старению уже на 15–16 пассажах.

По результатам настоящей работы было сделано заключение, что пребывание эМСК линии 2304 в

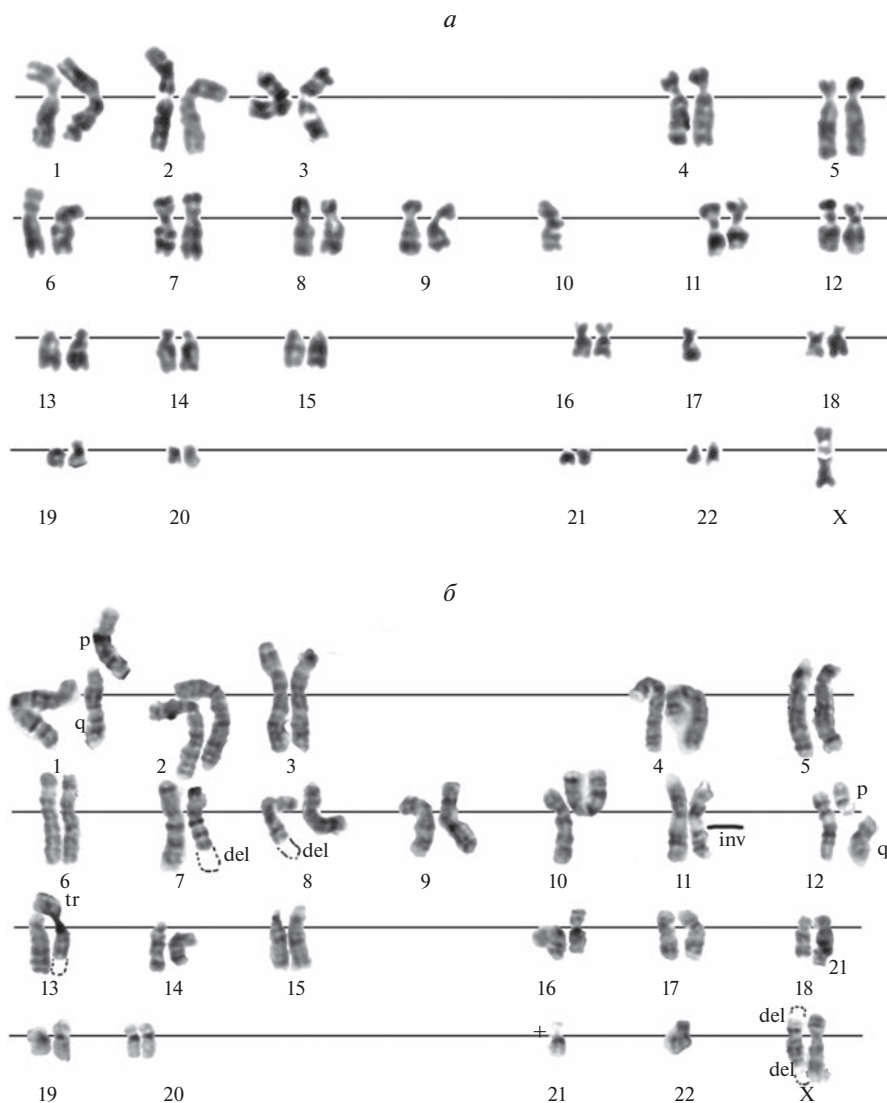


Рис. 3. Кариотипы ЭМСК человека линии 2304 при культивировании в стандартных условиях после 7 лет криоконсервации. *a* – Пассаж 4 после размораживания: терминальная делеция в хромосоме 1, прицентромержная поломка в X-хромосоме с сохранением генетического материала, моносомия по хромосомам 10, 17 и X; нарушение конденсации в гомологах хромосомы 11. *б* – Пассаж 7 после размораживания: прицентромержные поломки в хромосомах 1 и 12 с сохранением генетического материала; терминальные делеции в хромосомах 7, 8, X; моносомия по хромосомам 22; инверсия в *q*-плече хромосомы 11, транслокация в хромосоме 13.

условиях многолетней криоконсервации приводит к дестабилизации генетического аппарата и преждевременному клеточному старению.

ОБСУЖДЕНИЕ

Широкое использование процедуры замораживания, дальнейшей криоконсервации и последующей разморозки различных биологических объектов предполагает сохранность их в неизменном виде. Тем не менее, вопрос о влиянии этой многоступенчатой процедуры на клеточный геном остается открытым.

Известно, что большинство процессов в клетках, поддерживающих стабильность генома, находятся под контролем гена *TP53*. Нарушение функций белка *p53* ведет к возникновению и сохранению в популяции генетически дефектных клеток. Существуют данные, что наличие в кариотипе нарушения даже по одной хромосоме может спровоцировать дальнейшее развитие нестабильности генома (McGrathan et al., 2012).

В основе структурных хромосомных перестроек (делеций, транслокаций инверсий) лежат двуцепочечные разрывы ДНК. К механизмам поломок относят неспецифические слипания между негомологичными хромосомами, нарушение конденсации в митозе (Ran-

Таблица 2. Карิโอтипические особенности эмСК линии 2304 в процессе культивирования после криоконсервации в жидком азоте в течение 7 лет

Ядро, № п.п.	Хромосома																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	
	Клетки заморожены на пассаже 4 после получения линии, карiotипированы на пассаже 4 после размораживания																							
1	$n + delpter$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	n	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	n	$2n$	$n + delp$	$2n$	$2n$	$2n$	$p + q$	
2	$n + (p + q)$	$2n$	$2n$	$4n$	$5n$	$6n$	$7n$	$n + delpter$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + brq$	n	n	$2n$	$2n$	n	$n + delpter$	$n + delp$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$
3	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + delpter$	$3n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + brq$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + delpter$	
4	$n + delpter$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + delpter$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	
5	$2n$	$4n$	$2n$	$2n$	$n + (p + q)$	$2n$	$2n + (p + q)$	$2n$	$2n + delp$	$2n$	$2n$	$3n$	$3n$	$3n$	$3n$	$3n$	$2n + delp$	$3n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$3n$	
6	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + delpter$	$2n$	$2n$	$n + brq$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + delpter$	
7	$n + (p + q)$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$3n$	$3n$	$2n$	$2n$	n	n	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	
8	$2n$	$2n$	$n + delpter$	$n + brqter$	$n + delpter$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + brq$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	
9	$2n$	$n + delp$	n	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	n	$2n$	n	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	
10	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	n	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	
11	$2n$	n	$n + delpter$	n	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	n	$2n$	n	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	n	n	n	n	$2n$	$2n$	
12	$2n$	$n + (p + q)$	$2n$	$2n$	$2n$	n	$2n$	$2n$	$2n$	n	$2n$	n	$2n$	$2n$	n	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	
13	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n + delq$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + delp + q$	$n + delpter$	$n + brq$	$3n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	
7	$2n + delq$	$n + (p + q)$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + (p + q)$	$n + delpter$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	n	$n + (p + q)$	
8	$2n$	$2n$	$n + delpter$	$2n$	$n + delpter$	$delpter$	$2brq$	$2n$	$2n$	$n + delpter$	$n + (p + q)$	$2n$	$2n$	$2n$	n	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + (p + q)$	
9	$2n$	$n + (p + q)$	$n + delpter$	$n + brq$	$n + (p + q)$	$2n$	$2n$	$3n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + (p + q)$	$2n$	$n + delp$	$n + delq$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + (p + q)$	

Таблица 2. Окончание

Ядро, № плл.		Хромосома																					
		Клетки заморожены на пассаже 5 после получения линии, карiotипированы на пассаже 7 после размораживания																					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	
$n + (p + q)$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + delqter$	$n + delqter$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + invqter + trqter$	$n + (p + q) + delqter$	$n + trqter$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + delqter$
$2n$	$2n$	$2n$	$n + delqter$	$n + brigmed$	$3n$	$n + delqter$	$n + delqter$	$2n$	—	$2n + q$	$2n + delqter$	n	n	$3n$	$2n$	n	$2n$	n	n	$2n$	n	$3n$	$n + brig$
$n + delqter$	$3n$	$n + delqter$	$2n$	$n + delqter$	$2n$	$2n$	$delqter$	$2n$	$2n$	$2n$	—	n	—	n	$2n$	$2n$	$2n$	n	n	$2n$	n	—	—
$3n$	$n + delqter$	$2n$	n	$2n$	n	$2n$	—	$2n$	$2n$	n	$2n$	n	n	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	n	$n + delqter$
$2n$	$n + 2brqter$	$3n$	$n + brig$	$n + brig$	$3n$	$3n$	$2n$	$n + delq$	$2n$	$q + 2delq$	$n + delq$	$2n$	$2n$	$2n$	—	$2n$	$2n$	—	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	n
$2n$	$2n$	$n + (p + q)$	$n + delq$	$n + delq$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + delq$	$2n$	$2n + brig$	$2n$	$n + delqter$	n	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	n	$delq$
$2n + delq$	$n + (p + q)$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + (p + q)$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	n	n	$n + (p + q)$
$2n$	$2n$	$n + ddelqter$	$2n$	$n + ddelqter$	$delqter$	$2brq$	$2n$	$2n$	$n + ddelqter$	$n + (p + q)$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	n	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	—	—	$n + (p + q)$
$2n$	$n + (p + q) + 2brqter$	$n + 2brqter$	$n + brig$	$n + (p + q)$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + (p + q) + delq$	$2n$	$n + delq$	$n + delq$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$2n$	$n + (p + q)$

Примечание: $2n$ — два нормальных гомолога хромосомы; n — моносомия; $3n$ — трисомия; $4n$ — тетрасомия; p — короткое плечо хромосомы, q — длинное плечо, $p + q$ — прицентромерная поломка хромосомы с сохранением материала; $delqter$ — один гомолог хромосомы с терминальной делецией q -плеча; $delqter$ — один гомолог хромосомы с терминальной делецией q -плеча; $delqter$ — один гомолог хромосомы с терминальной делецией p -плеча; $n + (p + q)$ — один гомолог хромосомы с сохранением материала; $n + delq + (p + q)$ — трисомия: один гомолог нормальный, второй — с утратой q -плеча, третий — с прицентромерной поломкой с сохранением материала; $n + delq + (p + q)$ — трисомия: один гомолог нормальный, второй — с утратой q -плеча, третий — с прицентромерной поломкой с сохранением материала; $n + delq + (p + q)$ — трисомия: один гомолог нормальный, второй — с утратой p -плеча; $2n + delq + (p + q)$ — тетрасомия: два гомолога нормальные, третий — с делецией терминальной части q -плеча, четвертый — с прицентромерной поломкой с сохранением материала; $2n + (p + q)$ — трисомия: два гомолога нормальные, третий — с прицентромерной поломкой с сохранением материала; $2n + delq + (p + q)$ — тетрасомия: два гомолога нормальные, третий — с делецией терминальной части q -плеча, четвертый — с прицентромерной поломкой с сохранением материала; $2n + delq + (p + q)$ — трисомия: два гомолога нормальные, третий — с прицентромерной поломкой с сохранением материала; $2n + delq + (p + q)$ — трисомия: два гомолога нормальные, третий — с прицентромерной поломкой с сохранением материала; $n + delq + (p + q)$ — трисомия: один гомолог нормальный, второй — с делецией в терминальной части q -плеча; $n + invqter$ — один гомолог нормальный, второй — с инверсией в терминальной части q -плеча; $n + brig + delq + (p + q)$ — трисомия: один гомолог нормальный, второй и третий — с поломкой в терминальной части q -плеча с сохранением хромосомного материала; $2n + brig + delq + (p + q)$ — трисомия: два гомолога нормальные, гомолог с поломкой в терминальной части q -плеча с сохранением хромосомного материала; tr — транслокация.

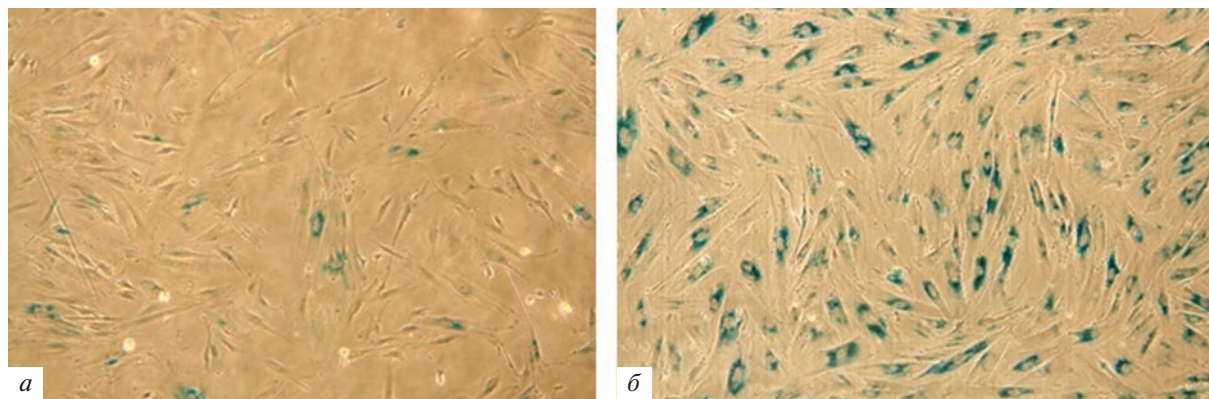


Рис. 4. Окраска ЭМСК линии 2304 на маркер старения SA-β-Gal. *а* – ЭМСК до длительного криохранения, пассаж 13; *б* – ЭМСК после 7 лет пребывания в условиях криохранения, пассаж 14.

gel et al., 2017). Индукторами двуцепочечных разрывов могут выступать экзогенные стрессы, в частности радиация, окислительный стресс, изменение температурного режима. Использование процедуры криоконсервации для стволовых клеток, мужских и женских половых клеток, эмбрионов, элементов крови и другого биоматериала, используемого в медицинских целях, по ряду причин входит в зону повышенного риска, так как, по имеющимся данным, криоконсервация не всегда обеспечивает полную сохранность его свойств (Pera et al., 2000; Reubinoff et al., 2000; Matidi, Bhone, 2011; Одинцова и др., 2021).

Результаты настоящей работы, изучающей влияние процедуры криоконсервации и длительного (7 лет) хранения ЭМСК в жидком азоте на стабильность клеточного генома, показали дестабилизацию генетического аппарата у потомков клеток после их размораживания, а именно анеуплоидизацию хромосомного набора, повышенную ломкость хромосом, влекущую за собой огромный пул aberrantных хромосом, и нарушение конденсации в гомологах. Наличие таких изменений в геноме потомков ЭМСК, родительские клетки которых были подвергнуты криоконсервации, говорит том, что эта процедура для клеток данного типа является стрессовой, способствующей развитию кариотипической нестабильности.

Известно, что причины развития кариотипической нестабильности могут быть разными, но, тем не менее, связанными с нарушениями механизмов клеточного деления. Это могут быть повреждения веретена деления, сбой при расхождении центриолей, нарушение процессов репарации и репликации. Любая из причин может нарушить зеркальное деление родительской клетки на две дочерние. Кариотип, являясь индикатором генетической стабильности, равно как и нестабильности, отражает генетическое состояние клетки.

Анализируя полученные в настоящей работе данные в сравнении с данными, полученными нами при

анализе трансформированных клеток китайского хомячка в культуре (Гринчук, Шилина, 2021), можно сделать вывод, что как сама процедура криоконсервации, так и длительное хранение материала в жидком азоте оказывает дестабилизирующее действие на клеточный геном клеток. Характер кариотипических изменений в трансформированных клетках китайского хомячка и ЭМСК имел как сходные черты, так и отличия. В обоих случаях выявленные изменения были связаны с анеуплоидизацией размороженных клеток и повышенной ломкостью хромосомного материала. К отличиям относилось то, что в трансформированных клетках повышенной ломкостью характеризовалась только одна хромосома кариотипического набора.

В процесс дестабилизации клеточного генома ЭМСК были вовлечены почти все хромосомы набора. В поломки вовлекались с равной вероятностью разные хромосомы кариотипического набора, чаще других – хромосомы 12 и X. Хромосомные поломки, затрагивающие прицентромерные области, в ряде случаев сопровождались сохранением генетического материала в виде самостоятельных хромосом. Бесцентромерный материал, возникший в результате терминальных поломок хромосом, в ряде случаев был элиминирован. На раннем этапе культивирования ЭМСК после разморозки в процесс дестабилизации, как правило, вовлекалась только одна из гомологичных хромосом. После непродолжительного культивирования число разнотипных хромосомных дефектов увеличивалось т.к. в процесс дестабилизации вовлекались оба гомолога. Стоит отметить, что, в отличие от экспериментов с трансформированными клетками китайского хомячка, в настоящей работе отсутствовала работа с краткосрочным хранением в жидком азоте, в связи с чем мы не можем рассматривать возникшую кариотипическую нестабильность только как ответ на длительность хранения в жидком азоте.

Криоконсервация – процесс многогранный и многоэтапный. Каждый этап (замораживание, хра-

нение, размораживание) в той или иной степени является стрессом для клеток. Таким образом, возникшая хромосомная нестабильность расценивается нами как клеточный ответ на стресс, вызванный как процедурой криоконсервации, так и ее длительным воздействием. Существует представление о том, что укорочение хромосом в терминальной части ведет к клеточному старению. Терминальная часть хромосом (теломеры) представляет собой богатые гуанином тандемные повторы ДНК и обеспечивает хромосоме структурную стабильность в процессе клеточного деления. В каждом цикле клеточного деления длина теломер уменьшается, что в результате приводит к клеточному старению (Нiyата, Нiyата, 2007). В этой связи, интерпретируя полученные нами данные, можно предположить, что возникновение в кариотипе эМСК, претерпевших длительную криоконсервацию, разнотипных по величине терминальных поломок и ускоренной прогрессии их разнообразия, это путь к ускоренному клеточному старению и последующей гибели клеток.

Необходимо подчеркнуть, что при длительной работе с эМСК эффекта преждевременного клеточного старения после краткосрочного (от нескольких недель до полугода) пребывания в жидком азоте не наблюдали (Земелько и др., 2011; Шорохова, Гринчук, 2021), тогда как мы обнаружили его в настоящей работе после длительной криоконсервации клеток. В этой связи, анализируя полученные в настоящей работе данные, возникшую кариотипическую нестабильность мы рассматриваем как следствие и самой процедуры криоконсервации, и ее длительного воздействия, однако длительность криохранения оказывает более выраженное стрессовое воздействие на пролиферацию клеток после разморозки, чем непосредственно сама процедура криоконсервации. В пользу этого заключения говорит и работа Астрелиной с соавторами (2013), в которой показано, что краткосрочная криоконсервация МСК (в их случае – плаценты) не снижала пролиферативной активности клеток после разморозки и не вызывала кариотипических отклонений.

Подводя итог проделанной работе можно сделать следующие выводы:

1) Процедура криоконсервации и длительное хранение в жидком азоте для клеточных культур млекопитающих является стрессом, индуцирующим изменения в структуре кариотипа.

2) Реакция генома клеток различного происхождения на одни и те же условия криоконсервации может различаться.

3) Криоконсервация эМСК может стать индуктором преждевременного клеточного старения.

4) Для того чтобы избежать рисков, связанных с криоконсервацией эМСК, необходим анализ их генетических характеристик после процедуры размораживания, в первую очередь – детальный кариотипический анализ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда и Санкт-Петербургского научного фонда (проект № 22-24-20122).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Астрелина Т.А., Гомзяков А.Е., Кобзева И.В., Карпова Е.Э., Круглова Я.А., Скоробогатова Е.В., Балашов Д.Н., Князев О.В., Яковлева М.В.* 2013. Оценка качества и безопасности применения криоконсервированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток плаценты в клинической практике. Гены и клетки. № 4. С. 82 (*Astrelina T.A., Gomzyakov A. E., Kobzeva I.V., Karpova E.E., Kruglova Ya.A., Skorobogatova E.V., Balashov D.N., Knyazev O.V., Yakovleva M.V.* 2013. Evaluation of the quality and safety of cryopreserved multipotent placental mesenchymal stromal cells in clinical practice. Genes and Cells. № 4. P. 82.)
- Гринчук Т.М., Шилина М.А.* 2021. Влияние криоконсервации на стабильность кариотипа трансформированных фибробластов легкого китайского хомячка *in vitro*. Цитология. Т. 63. № 1. С. 63. (*Grinchuk T.M., Shilina M.A.* 2021. Effect of cryopreservation on the stability of the karyotype of transformed Chinese hamster lung fibroblasts *in vitro*. Tsitologiya V. 63. № 1. P. 63.)
- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н.* 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. № 12. С. 919. (*Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artsybasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Beachevaya N.K., Korsak V.S., Nikolskiy N.N.* 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium. Identification, characterization and use as a feeder layer for the cultivation of human embryonic stem lines. Tsitologiya. V. 53. № 12. P. 919.)
- Мамаева С.Е.* 2002. Атлас хромосом – постоянные клеточные линии человека и животных. М.: Науч. мир. 231 с. (*Mamaeva S.E.* 2002. Atlas chromosomes permanent cell lines of human and animals. M.: Nauchniy mir. 231 p.)
- Одинцова И.А., Русакова С.Э., Шмидт А.А., Тимошкова Ю.Л.* 2021. Криоконсервация половых клеток: история и современное состояние вопроса. Гены и клетки. № 3. С. 44 (*Odintsova I.A., Rusakova S.E., Schmidt A.A., Timoshkova Yu.L.* 2021. Cryopreservation of germ cells: history and current state of the issue. Genes and cells. № 3. P. 44.)
- Полянская Г.Г., Семенова Е.Г., Шубин Н.А.* 1990. Влияние криоконсервации на цитогенетические характеристики клеточной сублинии фибробластов кожи ин-

- дийского мунджука. Цитология. Т. 32. № 3. С. 256. (Polyanskaya G.G., Semenova E.G., Shubin N.A. 1990. Cytological variations in the Indian muntjac skin fibroblast cell line as a result of cryoconservation. Tsytologiya. V. 32. № 3. P. 256.)
- Семенова Е.Г. 1988. Внеплановый синтез ДНК в культивируемых клетках после криоконсервации. Криобиология. № 1. С. 17. (Semenova E.G. 1988. Unscheduled DNA synthesis in cultured cells after cryoconservation. Cryobiology. № 1. P. 17.)
- Шорохова М.А., Гринчук Т.М. 2021. Стабильность кариотипа мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека *in vitro*. Цитология. Т. 63. № 5. С. 491. (Shorokhova M.A., Grinchuk T.M. Stability of the human endometrial mesenchymal stem cells karyotype *in vitro*. Tsitologiya. V. 63. № 5. P. 491.)
- Antebi B., Asher A.M., Rodriguez L.A. 2nd, Moore R.K., Mohammadipoor A., Cancio L.C. 2019. Cryopreserved mesenchymal stem cells regain functional potency following a 24-h acclimation period. J. Transl. Med. V. 17. P. 297. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2038-5>
- Bahsoun S., Coopman K., Akam E.C. 2019. The impact of cryopreservation on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a systematic review. J. Transl. Med. V. 17. P. 397. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02136-7>
- de-Lima Prata K., de Santis G.C., Orellana M.D., Palma P.V., Brassesco M.S., Covas D.T. 2012. Cryopreservation of umbilical cord mesenchymal cells in xenofree conditions. Cytotherapy. V. 14. P. 694.
- Diaferia G.R., Dessi S.S., Deblasio P., Biunno I. 2008. Is stem cell chromosomes stability affected by cryopreservation conditions? Cytotechnology. V. 58. P. 11.
- Duarte D.M., Cornélio D.A., Corado C., Medeiros V.K., de Araujo L.A., Cavalvanti G.B.J., de Medeiros S.R. 2012. Chromosomal characterization of cryopreserved mesenchymal stem cells from the human subendothelium umbilical cord vein. Regen. Med. V. 7. P. 147.
- Heng B.C., Kuleshova L.L., Bsted S.M., Liu H., Cao T. 2005. The cryopreservation of human embryonic stem cells. Biotechnol. Appl. Biochem. V. 41. P. 97.
- Heng H.H., Liu G., Stevens J.B., Abdallah B.Y., Horne S.D., Ye K.J., Bremer S.W., Chowdhury S.K., Ye C.J. 2013. Karyotype heterogeneity and unclassified chromosomal abnormalities. Cytogenet. Genome Res. V. 139. P. 144.
- Hiyama E., Hiyama K. 2007. Telomere and telomerase. Br. J. Cancer. V. 96. P. 1020.
- Imaizumi K., Nishishita N., Muramatsu M., Yamamoto T., Takenaka C., Kawamata S., Kobayashi K., Nishikawa S., Akuta T. 2014. A simple and highly effective method for slow-freezing human pluripotent stem cells using dimethyl sulfoxide, hydroxyethyl starch and ethylene glycol. PLoS One. V. 9. P. e88696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088696>
- Matidi M., Bhonde R. 2011. Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells. Arch. Toxicol. V. 86. P. 651.
- McGranahan N., Burrell R.A., Endesfelder D., Novelli M.R., Swanton C. 2012. Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges. EMBO Rep. V. 13. P. 528.
- Passerini V., Ozeri-Galai E., de Pagter M.S., Donnelly N., Schmalbrock S., Kloosterman W.P., Kerem B., Storchová Z. 2016. The presence of extra chromosomes leads to genomic instability. Nat. Commun. V. 7. P. 10754. <https://doi.org/10.1038/ncomms10754>
- Pera M.F., Reubinoff B., Trounson A. 2000. Human embryonic stem cells. J. Cell Sci. V. 113. P. 5.
- Polchow B., Kebbel K., Schmiedeknecht G., Reichardt A., Henrich W., Hetzer R., Lueders C. 2012. Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks. J. Transl. Med. V. 10. P. 98.
- Rangel N., Forero-Castro M., Rondón-Lagos M. 2017. New insights in the cytogenetic practice: Karyotypic chaos, non-clonal chromosomal alterations and chromosomal instability in human cancer and therapy response. Genes (Basel). V. 8. P. 155.
- Ray M., Mohandas T. 1975. Proposed banding nomenclature for the Chinese hamster chromosomes (*Cricetulus griseus*). Cytogenet. Cell Genet. V. 16. P. 83.
- Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C.Y., Trounson A., Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. Nat. Biotechnol. V. 18. P. 399.
- Tan Z., Chan Y.J.A., Chua Y.J.K., Rutledge S.D., Pavelka N., Cimini D., Rancati G. 2019. Environmental stresses induce karyotypic instability in colorectal cancer cells. Mol. Biol. Cell. V. 30. P. 42.
- Tang D.Q., Wang Q., Burkhardt B.R., Litherland S.A., Atkinson M.A., Yang L.J. 2012. *In vitro* generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation. Am. J. Stem Cells. V. 1. P. 114.

Response of the Endometrial Mesenchymal Stem Cell Genome to the Procedure of Long-Term Cryopreservation

T. M. Grinchuk^a, M. A. Shorokhova^a, *, and N. A. Pugovkina^a

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

*e-mail: shili-mariya@yandex.ru

Information about the effect of cryopreservation on functions and the genetic of cells of different genesis is not unambiguous and is in the process of accumulation. This work is aimed at studying the effect of long-term storage (7 years) of human endometrial mesenchymal stem cells (eMSCs) in the frozen state on the stability of their genome *in vitro*. The results showed destabilization of the karyotype structure in the descendants of cells after their thawing, namely, aneuployploidization, increased fragility of chromosomes, resulting in a huge pool of aberrant chromosomes, and impaired condensation in homologues. Chromosomal breaks in centromeric regions often accompa-

nied by the preservation of genetic material in the form of independent chromosomes. Almost all chromosomes of the set were involved in the process of destabilization of the eMSCs cell genome. It has been shown that the procedure of long-term cryopreservation can become an inducer of premature cellular aging of eMSCs after their thawing. Comparison of the data obtained with the results of karyotyping of transformed Chinese hamster cells that underwent a similar procedure led to the conclusion that cryopreservation for biological systems can be a stress that induces genetic defects of various types at the karyotype level. The response of the genome of cells of different origin to the same conditions of cryopreservation may differ.

Keywords: human endometrial mesenchymal stem cells, karyotype, chromosomes, cryogenic freezing, genome instability

УДК 577.333

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНОЙ СВЯЗИ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ Keap1/Nrf2/ARE И ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ЛИЗОСОМАЛЬНОГО БИОГЕНЕЗА

© 2023 г. А. В. Чечушков¹, Е. Б. Меньщикова¹, *

¹Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, 630117 Россия

*E-mail: lemen7383@mail.ru

Поступила в редакцию 17.03.2023 г.

После доработки 07.04.2023 г.

Принята к публикации 08.04.2023 г.

Несмотря на ключевую роль редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE в клеточном метаболизме, практически ничего не известно о ее связи с биогенезом лизосом. В настоящей работе выполнен теоретический и экспериментальный анализ возможности наличия такой связи. Путем формирования позиционной матрицы в генах транскрипционных факторов TFEB и TFE3 обнаружено наличие в некодирующих участках большого количества ARE-подобных последовательностей. Воздействие *in vitro* на клетки J774 активаторами системы Keap1/Nrf2/ARE (оригинального синтетического монофенола ТС-13 и препарата сравнения трет-бутилгидрохинона) приводит к дозозависимой индукции генов *Tfe3* и *Tfeb*, сопровождающейся постепенным увеличением количества лизосом и интенсивности аутофагосомно-лизосомного слияния. Таким образом, можно сделать предположение о том, что белки, контролирующие ARE-зависимые гены, способны влиять на лизосомный биогенез.

Ключевые слова: сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE, транскрипционные факторы TFEB и TFE3, лизосомы, аутофагия

DOI: 10.31857/S0041377123040041, **EDN:** ZFKNHA

Многие лекарственные препараты лизосомотропны (т.е. способные избирательно накапливаться в лизосомном аппарате клеток), и в лизосомах начинается первый этап их метаболизма. Наиболее часто он сводится к выбросу соединений из клеток с помощью системы белков ABC и MDR, что приводит к необходимости повышения терапевтических дозировок и приближения их к токсическим (Maniganda et al., 2014). Еще одна проблема лизосомотропных химиотерапевтических препаратов – вызываемое ими по-

вреждение лизосомных мембран, неизбежно ведущее к лизосомной дисфункции и гибели клеток (Mahapatra et al., 2021). Подобные эффекты проявляются при проведении химиотерапии и антибактериальной терапии (в частности при лечении инфекций, ассоциированных с персистирующими внутриклеточными патогенами).

Существует общая система регуляции генов, имеющих отношение к формированию и функционированию лизосом, ключевыми регуляторами их транскрипции являются белки семейства MITF/TFE, к которым относятся MITF, TFEB, TFE3 и TFEC. Они специфически распознают короткую палиндромную последовательность GTCACGTGAC (CLEAR), а содержащие ее гены условно объединены в одноименную генетическую сеть CLEAR (Sardiello et al., 2009). Индукция сигнальных систем, ассоциированных с лизосомной мембраной и контролируемых транскрипционными факторами TFEB и TFE3, непосредственно влияющих на активность генов CLEAR, а также фармакологическая активация последних – проблемная задача, являющаяся в настоящий момент мировым трендом в области экспериментальной терапии болезней накопления.

Все метаболические процессы в организме, в том числе с участием лизосом, сопровождаются генера-

Принятые сокращения: АКМ – активированные кислородные метаболиты; ТС-13 – 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксибензил)пропилтиосульфат натрия; ABC – АТФ-связывающие кассетные транспортеры; ARE – антиоксидант-репсонс(ив)ный элемент; CLEAR – скоординированное усиление и регулирование лизосом; LC3B – легкая цепь β 3-ассоциированного с микротрубочками белка 1A/1B; Nrf2 – фактор 2, родственник NF-E2 (NF-E2-related factor 2); Keap1 – ассоциированный с ECH Kelch-подобный белок 1; MDR – белки множественной лекарственной устойчивости; MITF – транскрипционный фактор, ассоциированный с микрофтальмией; p62/SQSTM – убиквитин-связывающий белок p62, он же секвестосом 1 (sequestosome 1), tBHQ – *трет*-бутилгидрохинон (*tert-butyl hydroquinone*); PBS – фосфатно-солевой буферный раствор; TFE3 – транскрипционный фактор, связывающийся с энхансером 3 тяжелой μ -цепи иммуноглобулина; TFEB – транскрипционный фактор EB; TFEC – транскрипционный фактор EC.

цией активированных кислородных метаболитов (АКМ), редокс-баланс поддерживается антиоксидантной системой, а главным регулятором их неразрывного единства выступает сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE (Зенков и др., 2017; Ngo, Duenwald, 2022; Redza-Dutordoir, Averill-Bates, 2021), регуляторные полномочия которой, тем не менее, более широки, и заключаются в поддержании внутреннего гомеостаза при апоптоз-индуцирующих, канцерогенных и стрессовых воздействиях. Так, Nrf2 контролирует метаболические процессы, прямо влияя на экспрессию генов, необходимых для тех или иных биохимических процессов, и регулируя ферменты, ключевые моменты метаболических реакций или точки разветвления таковых.

Интересно, что несмотря на тесные связи сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE с клеточным метаболизмом, практически ничего не известно о связях этой системы с биогенезом лизосом, имеющиеся сведения в основном касаются деградации ее компонентов (главным образом Keap1) посредством аутофагии (Redza-Dutordoir, Averill-Bates, 2021; Zhu et al., 2022) и их влияния на слияние аутофагосом и лизосом (Qiu et al., 2022). В то же время существует непосредственная зависимость между состоянием лизосомного аппарата и митохондрий (главного продуцента АКМ), и экспериментально вызванная дисфункция последних сопровождается клеточным фенотипом, напоминая таковой лизосомных болезней накопления. Более того, митохондриальная дисфункция сопровождается компенсаторной активацией мастер-регулятора лизосомного биогенеза TFEB и увеличением его транскрипционной активности (Baixauli et al., 2015).

Поскольку активация транскрипционных факторов TFEB и TFE3 строго регулируема и происходит в ответ на нарушение лизосомного гомеостаза и повреждающие воздействия на клетки, которые сопровождаются изменением редокс-баланса и, вероятно, индукцией Keap1/Nrf2/ARE, возникает вопрос о наличии регуляторных связей между сигнальными системами Keap1/Nrf2/ARE и TFEB(TFE3)/CLEAR.

Цель исследования – теоретический и экспериментальный анализ регуляторной связи сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE и транскрипционных регуляторов лизосомного биогенеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Поиск регуляторных последовательностей ARE в генах TFEB и TFE3. Для того, чтобы установить возможности обнаружения регуляторной связи между сигнальными системами Keap1/Nrf2/ARE и TFEB(TFE3)/CLEAR, мы проверили наличие элементов ARE в генах транскрипционных факторов TFEB и TFE3 человека и мыши. Для поиска последовательности ARE в интересующих генах на основании 52 различных последовательностей ARE

(Wang et al., 2007) была сформирована позиционная матрица (position frequency matrix). Обнаружение последовательности проводили с помощью программного пакета RSAT (Santana-Garcia et al., 2022). Для контроля качества собранной матрицы она была проверена на нуклеотидной последовательности гена *Mafg* мыши, в котором локализован мотив ARE с экспериментально подтвержденной функциональной значимостью (Зенков и др., 2017; Simov et al., 2021). Выявлена соответствующая описанной в литературе последовательность TCATGCTGACTCAGCGGATCG с уровнем значимости 1.4×10^{-6} . С помощью аналогичного подхода на предмет наличия ARE-подобных элементов проанализировали последовательности генов *TFEB* и *TFE3* человека и мыши, взятые из GenBank, с добавлением по 5000 пар нуклеотидов до и после окончания рамок считывания гена. Полученные ARE-подобные последовательности маркировали в геномном браузере UCSC для анализа эволюционной консервативности, ко-локализации с различными функциональными модификациями ДНК и хроматина, а также с другими регуляторными элементами.

Активаторы и клетки. В качестве индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE использовали синтезированный нами оригинальный гидрофильный монофенол 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-13), который получали из 2,6-ди-*трет*-бутилфенола по ранее описанной последовательности превращений (Олейник и др., 2007), а также прототипический индуктор *трет*-бутилгидрохинон (tBHQ; Sigma-Aldrich, США).

Клетки линии J774, полученные из Банка клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия), культивировали в 250 мл культуральных флаконах в среде DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 1% раствора пенициллина/стрептомицина при 37°C во влажной атмосфере с 5%-ным насыщением CO₂. За ночь до начала экспериментов клетки снимали с пластика, трижды отмывали в предварительно прогретом растворе Версена, центрифугировали при ускорении 300 g в течение 5 мин, ресуспендировали в предварительно прогретой культуральной среде и рассаживали в лунки 24-луночного планшета по 10⁵ клеток на 1 лунку в 0.5 мл среды. Для микроскопического исследования клетки помещали на предварительно отмытые стерилизованные покровные стекла по 4 × 10⁴ клеток на 1 см² за ночь до начала эксперимента. Экспериментальное фармакологическое воздействие на клетки осуществляли через 4, 12 и 24 ч после рекультивирования, тестируемые соединения растворяли в культуральной среде (tBHQ сначала растворяли в ДМСО, конечная концентрация составляла 1%).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией. РНК выделяли с использованием TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию (ОТ) с использованием

Таблица 1. Подобранные пары прямых (F) и обратных (R) праймеров, TaqMan-зондов (Pr) с флуоресцентной меткой Fam-5'

Ген	Номер в GenBank	Последовательность праймера
<i>GAPDH</i>	NM_008084.3	F: 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGGGCTC-3' R: 5'-ACCAGTGGATGCAGGGATGATGTT-3' Pr: R6G-5'-ATGACCACAGTCCATGCCATCACTGCCA-3'-Q
<i>TFEB</i>	NM_001161722.1 NM_001161723.1 NM_011549.3	F: 5'-CCCTGTCCACTTCCAGTC-3' R: 5'-GATACTCCCCGAACCTTCTGATG-3' Pr: Fam-5'-TCCTACCACCTGCAACAGTCCCA-3'-Q
<i>TFE3</i>	NM_172472.3 NM_001105196.1 NM_001105197.1 NM_001271489.1 NM_001271490.1 NM_001271491.1	F: 5'-CACACTGAGTCGTCCACCT-3' R: 5'-GACAAGTACTGTTTGACCTGCTG-3' Pr: Fam-5'-AACCTACACGCTACCACCTGCA-3'-Q

набора реагентов iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, США) согласно инструкции. Методом TaqMan ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories) изучали изменение экспрессии мРНК генов *TFEB* и *TFE3*. Реакцию амплификации проводили в следующих условиях: реакционная смесь ПЦР объемом 20 мкл содержала буфер для ПЦР, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP's, 1.5 е.а. Taq-полимеразы. Амплификацию выполняли согласно следующей программе: 3 мин при 95°C начальной денатурации, далее 40 циклов: 10 с при 95°C для денатурации, 20 с при 60°C для гибридизации праймеров, съём флуоресцентного сигнала, 20 с при 72°C для элонгации. Уровень экспрессии мРНК генов рассчитывали согласно методу 2^{-ΔΔCT} и нормировали относительно референсного гена *GAPDH*. Подобранные пары праймеров и TaqMan-зондов приведены в табл. 1.

Определение содержания лизосом. Индикатор Lysotracker Red DND-99 (Thermo Fisher Scientific), свежеразведенный в растворе Хенкса, содержащем глюкозу в концентрации 1.8 г/л, добавляли к клеткам на покровных стеклах в финальной концентрации 1 мкМ и инкубировали 30 мин при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Затем клетки трижды отмывали холодным фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и заключали в монтирующую среду Fluoroshield (Sigma-Aldrich), содержащую интеркалирующий краситель DAPI для окраски ядер (Abcam, США). Изображения получали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM710/NLO (Zeiss AG, Германия) с объективом Plan-Apochromat 63×/1.4 и анализировали с помощью программного пакета ImageJ, количество лизосом определяли по интенсивности флуоресценции индикатора (усл. ед.).

Анализ аутофагии. Для сравнения выраженности образования аутофагосом и скорости их лизосомной деградации каждую экспериментальную точку дублировали экспериментом с добавлением в культураль-

ную среду, помимо тестируемого соединения, хлорохина (C6628, Sigma-Aldrich) в концентрации 60 мкМ за 1 ч до выведения из эксперимента. Соотношение количества аутофагосом в группах с хлорохином и без него (коэффициент k_{CO}) отражает способность клеток удалять вновь формирующиеся аутофагосомы (Klionsky et al., 2021), будучи важным показателем защитных свойств аутофагии. Клетки фиксировали в 10%-ном формалине, пермеабилizировали в 0.15%-ном растворе Тритона X-100, после чего покрывали 200 мкл блокирующего раствора (PBS, содержащий 5% бычьего сывороточного альбумина, 0.05% Тритона X-100) и инкубировали в шейкер-термостате (40 мин при 37°C). Далее блокирующий раствор меняли на аналогичный (но без сыворотки), содержащий антитела кролика против белка LC3В млекопитающих (L10382, Invitrogen, США), и проводили гибридизацию (60 мин, 37°C). После трехкратной пятиминутной отмывки бессывороточным блокирующим раствором выполняли гибридизацию с антителами против кроличьих антител, конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor 488 (Abcam, США) (30 мин, 37°C), затем PBS удаляли коротким промыванием деионизированной водой и заключали клетки в монтирующую среду Fluoroshield, содержащую DAPI. Внутриклеточную локализацию LC3В исследовали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM710/NLO и анализировали с помощью программного пакета ImageJ.

Обработка данных. Количественные данные на предварительном этапе статистического анализа оценивали на нормальность распределения по критерию Шапиро–Уилка. Поскольку распределение отличалось от нормального, результаты представлены в виде медианы и межквартильных интервалов. Для оценки различий данных использовали критерий Манна–Уитни и Даннета. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0.05.

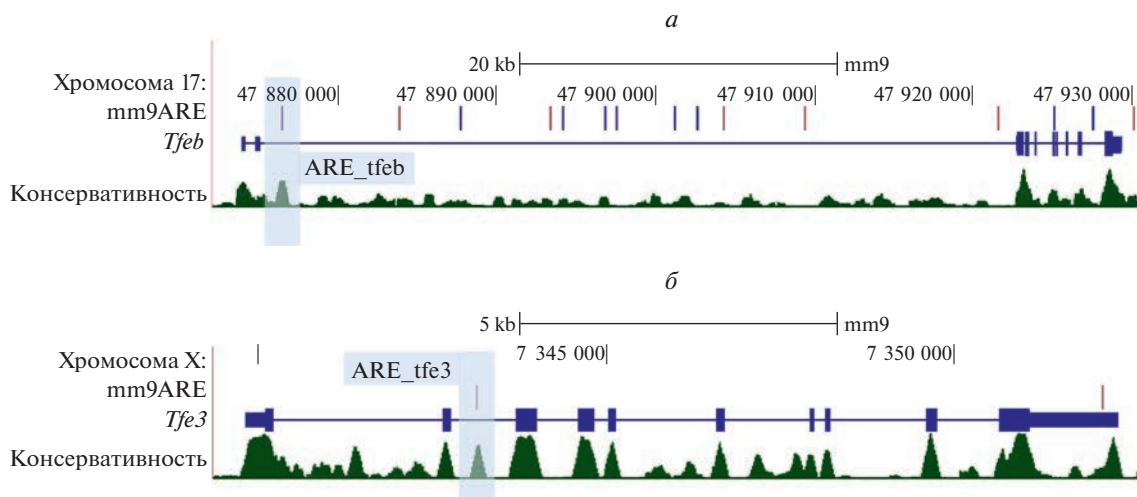


Рис. 1. Локализация последовательностей ARE в области генов *Tfeb* (а) и *Tfe3* мыши (б). Гистограмма характеризует уровень консервативности соответствующих последовательностей среди позвоночных животных (получены с помощью инструмента PhastCons).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наличие элемента ARE в генах *TFEB* и *TFE3*. Анализ сформированной позиционной матрицы показал присутствие в генах *TFEB* человека и *Tfeb* мыши по 15 ARE-подобных последовательностей (рис. 1а). Среди них консервативными для позвоночных оказались мотивы, находящиеся в первом интроне (человек, мышь; обозначены как ARE_tfeb) и в экзоне кодирующей области (мышь).

В генах человека и мыши, кодирующих транскрипционный фактор TFE3, также выявлены мотивы ARE, хотя и в меньшем количестве (рис. 1б), при этом, как и в гене TFEB, один из них расположен в некодирующем участке гена TFE3 обоих видов (во втором интроне, ARE_tfe3) и является высококонсервативным.

На основании анализа элементов хроматина, картированных международным исследовательским консорциумом ENCODE с помощью метода анализа ДНК-белковых взаимодействий ChIP-seq (Roopra, 2020), мы изучили ландшафт его модификаций в областях генома, в которые входят мотивы ARE_tfeb и ARE_tfe3. Для фрагмента хроматина, содержащего ARE_tfeb, установлена высокая частота H3K4me3, эпигенетической модификации гистона H3 (триметилирование по остатку лизина в положении 4), что свидетельствует о локализации данной последовательности в промоторной области гена (Sharifi-Zarchi et al., 2017). При этом сайтов связывания транскрипционных факторов подсемейства NFE2 (Nrf2, Nrf1, BACH1, р45) и MAF, вспомогательного белка для взаимодействия Nrf2 с ARE, не обнаружено.

Аналогичный анализ участка хроматина, содержащего последовательность ARE_tfe3, показал отсутствие характерного для энхансерных областей преобладания эпигенетических модификаций H3-

гистона H3K27Ac (ацетилирование по остатку лизина в положении 27) и H3K4Me1 (метилирование по остатку лизина в положении 4) (Maurya, 2021; Sharifi-Zarchi et al., 2017) (рис. 2). Напротив, в отличие от мотива ARE_tfeb, обнаружено связывание с ARE_tfe3 транскрипционных факторов BACH1 и NFE2, сателлитных белков MAF и Jun, белков семейства AP-1 (часть ARE включает в себя сайт связывания фактора AP-1 TRE, 5'-TGACTCA-3'), в непосредственной близости находятся консервативные участки связывания таких регуляторов транскрипции, как SEBPB, MAZ, CTCF.

Экспериментальная проверка возможности регуляции лизосомного биогенеза со стороны сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE. С целью исследовать регуляторное влияние сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE на экспрессию генов *Tfeb* и *Tfe3* выполнен ПЦР-анализ продуктов их транскрипции в клетках J774. Для гена *Tfe3* отмечено увеличение экспрессии при добавлении в культуральную среду оригинального синтетического индуктора системы Keap1/Nrf2/ARE TC-13, с максимальной выраженностью в концентрации 10 мкМ и падением эффекта при увеличении концентрации до 100 мкМ. Интересно, что подобную зависимость мы наблюдали при исследовании влияния TC-13 на транслокацию Nrf2 в ядро клеток J774, ключевой момент активации системы Keap1/Nrf2/ARE: вплоть до концентрации TC-13 50 мкМ она возрастала и уменьшалась почти до контрольных значений при концентрации TC-13 100 мкМ (Меньщикова и др., 2020), что можно трактовать как косвенное доказательство прямой позитивной связи между системой Keap1/Nrf2/ARE и регуляцией лизосомного биогенеза. Для гена *Tfeb* характерен менее выраженный, но устойчивый дозозависимый ответ (рис. 3).

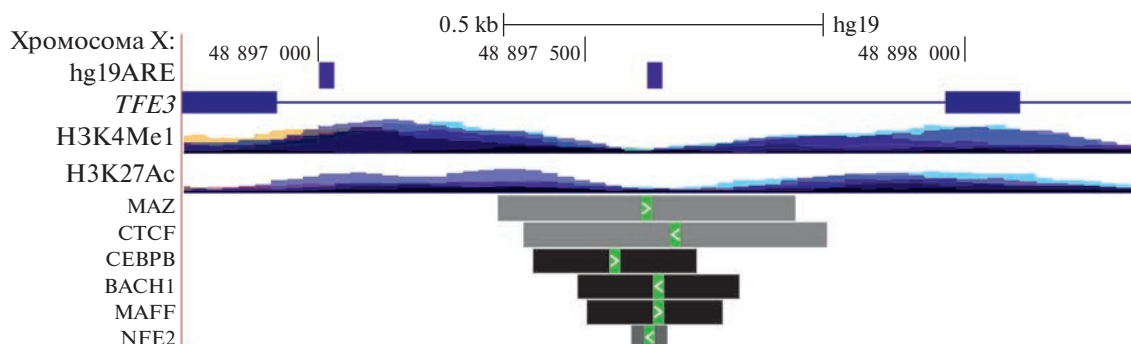


Рис. 2. Гистоновые модификации (H3K4Me1 и H3K27Ac) и мотивы связывания различных транскрипционных факторов в области ARE_tfe3.

ТС-13 оказывал аналогичное воздействие на количество лизосом в цитоплазме клеток J774, дозозависимо увеличивая его в используемом диапазоне концентраций, что показано с помощью лизосомного индикатора LysoTracker DND-99. Прототипический индуктор Keap1/Nrf2/ARE tBHQ, схожий по структуре с ТС-13, но жирорастворимый, вызывал аналогичный, но более выраженный эффект (рис. 4). Следует заметить, что в отличие от ТС-13, tBHQ токсичен для клеток J774 в концентрациях более 10 мкМ, что и ограничило диапазон использованных концентраций.

Влияние индукторов Keap1/Nrf2/ARE на аутофагию. Поскольку TFE3 и TFEВ позитивно регулируют экспрессию генов, ассоциированных с аутофагией, мы исследовали, в какой степени индуктор Nrf2 ТС-13 влияет на этот механизм. Четырехчасовая экспозиция ТС-13 практически не влияла на количество

клеток, восприимчивых к индукции аутофагии. При этом отмечалось небольшое, но статистически значимое снижение величины этого показателя при воздействии ТС-13 в концентрации 100 мкМ в условиях блокирования слияния аутофагосом с лизосомами, что может указывать на снижение способности клеток индуцировать аутофагию (рис. 5а). Двадцатичетырехчасовая экспозиция клеток с ТС-13 характеризуется дозозависимым снижением доли LC3В-позитивных клеток в экспериментах без блокатора аутофагосомно-лизосомного слияния и стабильным количеством таких клеток в экспериментах с добавлением блокатора с результирующим уменьшением активности аутофагии k_{CO} (рис. 5а, б). Интересно, что при низких дозах ТС-13 (от 0.01 до

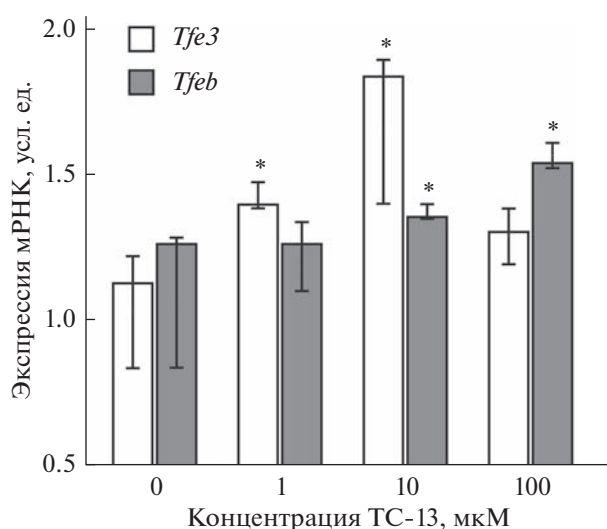


Рис. 3. Экспрессия генов, кодирующих TFE3 и TFEВ, при культивировании клеток J774 в течение 12 ч с индуктором Nrf2 ТС-13 в различных концентрациях; * – отличие от величины соответствующего показателя контроля статистически значимо при $p < 0.05$.

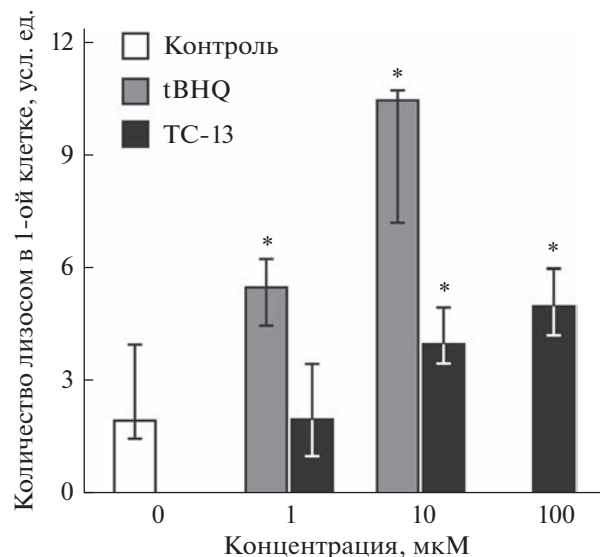


Рис. 4. Изменение содержания лизосом в клетках J774 при их культивировании в присутствии ТС-13 и tBHQ в течение 24 ч, оцениваемого по накоплению флуоресцентного лизосомотропного индикатора LysoTracker DND-99 (усл. ед.). * – отличие от величины соответствующего показателя группы контроля статистически значимо при $p < 0.05$.

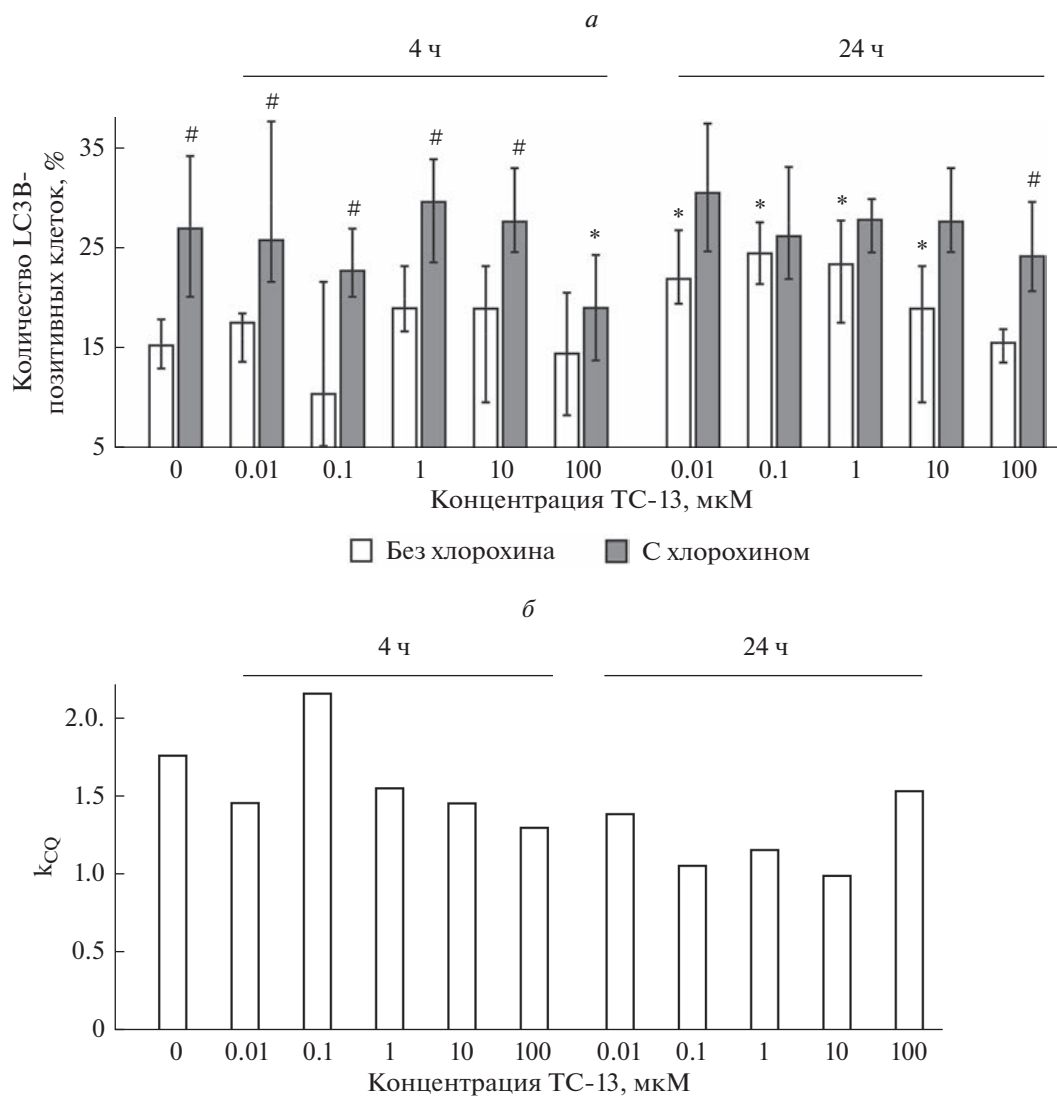


Рис. 5. Влияние ТС-13 на процессы аутофагии в клетках J774. *а* – Количество LC3B-позитивных клеток; отличия от соответствующего показателя статистически значимы при $p < 0.05$: от группы контроля (*), от клеток, культивированных в аналогичных условиях без хлорохина (#). *б* – Величина коэффициента k_{SQ} .

10 мкМ) количество позитивных клеток больше, чем в контроле.

ОБСУЖДЕНИЕ

Последовательности ARE, с которыми специфично связывается Nrf2, помимо генов эффекторных белков, непосредственно участвующих в биохимических процессах, локализируются в регуляторных областях генов различных транскрипционных факторов и сигнальных белков (Зенков и др., 2017; Egbujor et al., 2022), что характеризует ARE как высокоуровневые транскрипционные регуляторы. Неизвестно, насколько широко распространяется такая сеть, поскольку ежегодно открываются новые функциональные ARE-подобные мотивы в генах, казалось бы, не имеющих непосредственного отноше-

ния к антиоксидантной защите клеток. В контексте данного исследования следует отметить наличие двусторонних регуляторных связей между Nrf2 и аутофагией, которые были обнаружены относительно недавно, и роль которых мало понятна. Индукция Keap1/Nrf2/ARE может осуществляться с помощью белка p62/SQSTM1, который связывает белок Keap1 с образованием агрегатов Keap1/p62, что в свою очередь увеличивает активность Nrf2 (Zhang et al., 2021). Одновременно Nrf2 стимулирует экспрессию гена p62/SQSTM1, что может дополнительно повышать интенсивность связывания Keap1 и активность Nrf2, образуя таким образом петлю положительной обратной связи в механизме собственной активации. В дополнение к этому, Nrf2 положительно контролирует экспрессию генов рецепторов аутофагии NDP52 и Parkin1.

Аутофагия в этом механизме выполняет лимитирующую функцию (петлю негативной обратной связи), удаляя агрегаты Keap1/p62. При этом влияние Nrf2 на данную сторону процесса не исследовано. В то же время, принимая во внимание стимуляцию аутофагии АКМ, окисляющими цистеиновые остатки белков-эффекторов аутофагии, а также существенное влияние активности аутофагии на генерацию АКМ клетками, мы предположили наличие такой регуляторной связи.

С точки зрения анализа возможной связи двух сигнальных систем – регулирующей активность генетической сети CLEAR (лизосомного аппарата) и системы Keap1/Nrf2/ARE (редокс-гомеостаза) – наибольшее значение может иметь последовательность ARE_tfeb в силу своего расположения в интроне (некодирующей области, находящейся под сильным эволюционным давлением) и высокой консервативности; ее наличие впервые установлено в настоящем исследовании.

Расположение последовательности ARE_tfeb в промоторных участках и в то же время отсутствие признаков локализации характерных для ARE транскрипционных факторов и белков позволяет предположить, что данный мотив не выполняет свойственную ARE функцию, при этом участвуя в регуляции экспрессии гена *TFE3* посредством взаимодействия с транскрипционными факторами других сигнальных систем, о чем также свидетельствует его высокая консервативность. Локализация сайтов связывания с мотивом ARE_tfe3 транскрипционных факторов подсемейства NFE2, вспомогательных белков и регуляторов транскрипции и их консервативность дают основание заключить, что регуляция активности гена *TFE3* осуществляется с участием белков как системы Keap1/Nrf2/ARE, так и других сигнальных систем, в том числе взаимодействующих с первой.

Геном человека содержит тысячи некодирующих последовательностей, которые для позвоночных зачастую более консервативны, чем экзоны, кодирующие белки. Как правило, они входят в состав регуляторных участков, и изменение их структуры грозит нарушением структуры и функции белков, кодируемых соответствующими генами, что, в частности, и объясняет необходимость консервативности таких мотивов (Pearson, 2016).

В результате выполнения экспериментального раздела исследования установлено, что воздействие на клетки активаторами системы Keap1/Nrf2/ARE действительно приводит к дозозависимой индукции генов *Tfe3* и *Tfeb*, сопровождающейся постепенным увеличением количества лизосом и интенсивности аутофагосомно-лизосомного слияния.

Вероятно, индукция Keap1/Nrf2/ARE при повышении концентрации соединений положительно влияет на экспрессию генов *TFE3* и *TFEB*, тем самым способствуя нормализации количества лизосом в клетках и увеличению активности аутофагии.

При этом влияние TC-13 и tBHQ на лизосомный аппарат клеток может не зависеть от Nrf2 и быть опосредованным их непосредственным взаимодействием с митохондриальной мембраной. Так, известно, что TC-13 способен снижать митохондриальный потенциал и вызывать генерацию АКМ, что, вероятно, связано с влиянием на активность цепи переноса электронов (Мартиневич и др., 2015). То же характерно и для tBHQ (Li et al., 2014). Нарушение функционирования цепи переноса электронов негативно влияет на функцию и количество лизосом, при этом ведет к снижению соотношения $NAD^+/NADH$, к которому чувствителен транскрипционный фактор TFEB (его уменьшение активирует TFEB и стимулирует лизосомный биогенез) (Baixauli et al., 2015). Таким образом, эффект индукции экспрессии генов *TFE3* и *TFEB*, а также увеличения количества лизосом может быть опосредован одновременно несколькими факторами, и проблема требует более детального исследования.

Полученные результаты, с одной стороны, не демонстрируют непосредственного влияния индукторов Keap1/Nrf2/ARE на аутофагию. С другой стороны, они свидетельствуют о возможности влияния на этап слияния аутофагосом с лизосомами, критически важный для реализации всего процесса аутофагии в целом. Принимая во внимание обнаруженные эволюционно консервативные регуляторные элементы, характерные для транскрипционного контроля элементом ARE, можно сделать предположение о том, что белки, контролируемые ARE-зависимые гены (Nrf2, Nrf1, BACH1 и BACH2, а также белки-сателлиты и другие представители семейства NFE), способны влиять на лизосомный биогенез. Учитывая антагонистичный характер взаимоотношений Nrf2 и BACH1, можно предположить разнонаправленность такого влияния.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для генов транскрипционных факторов TFEB и TFE3 характерно наличие в некодирующих участках большого количества ARE-подобных последовательностей. Воздействие на клетки J774 активаторами системы Keap1/Nrf2/ARE приводит к дозозависимой индукции генов *Tfe3* и *Tfeb*, сопровождающейся постепенным увеличением количества лизосом и интенсивности аутофагосомно-лизосомного слияния. Таким образом, можно сделать предположение о том, что белки, контролируемые ARE-зависимые гены, способны влиять на лизосомный биогенез.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Современные оптические системы” и “Протеомный анализ”, поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Кандалинцева Н.В., Черенкевич С.Н.* 2015. Индуктор экспрессии ARE-регулируемых генов фенольный антиоксидант ТС-13 вызывает гибель опухолевых клеток через митохондриально-опосредованный путь. *Биофизика*. Т. 60. С. 120. (*Martinovich G.G., Martinovich I.V., Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Kandallintseva N.V., Cherenkevich S.N.* 2015. Phenolic antioxidant TS-13 regulating ARE-driven genes induces tumor cell death by a mitochondria-dependent pathway. *Biophysics*. V. 60. P. 94.) <https://doi.org/10.1134/S0006350915010194>
- Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Кожин П.М., Чечушков А.В., Павлов В.С., Ромах Л.П., Храпова М.В., Серых А.Е., Кандалинцева Н.В.* 2020. Влияние новых водорастворимых фенольных антиоксидантов на активность Nrf2-подконтрольных ферментов, систему глутатиона и транслокацию Nrf2 в ядро. *Сибирский научный медицинский журнал*. Т. 40. № 6. С. 58. (*Menshchikova E.B., Zenkov N.K., Kozhin P.M., Chechushkov A.V., Pavlov V.S., Romakh L.P., Khrapova M.V., Serykh A.E., Gritsyk O.B., Kandallintseva N.V.* 2020. Effect of new water-soluble phenolic antioxidants on the activity of Nrf2-driven enzymes, glutathione system, and Nrf2 translocation into the nucleus. *Sibirskij nauchnyj meditsinskij zhurnal*. V. 40. № 6. P. 58.) <https://doi.org/10.15372/SSMJ20200606>
- Зенков Н.К., Кожин П.М., Чечушков А.В., Мартинович Г.Г., Кандалинцева Н.В., Меньщикова Е.Б.* 2017. Лабиринты регуляции Nrf2. *Биохимия*. Т. 82. С. 757. (*Zenkov N.K., Kozhin P.M., Chechushkov A.V., Martinovich G.G., Kandallintseva N.V., Menshchikova E.B.* 2017. Mazes of Nrf2 regulation. *Biochemistry (Moscow)*. V. 82. P. 556.) <https://doi.org/10.1134/s0006297917050030>
- Олейник А.С., Куприна Т.С., Певнева Н.Ю., Марков А.Ф., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е., Григорьев И.А.* 2007. Синтез и антиоксидантные свойства S-[3-(гидроксиарил)пропил]тиосульфатов и [3-(гидроксиарил)пропан]-1-сульфонатов натрия. *Изв. АН. Серия химическая*. № 6. С. 1094. (*Oleynik A.S., Kuprina T.S., Pevneva N.Yu., Markov A.F., Kandallintseva N.V., Prosenko A.E., Grigorev I.A.* 2007. Synthesis and antioxidant properties of sodium S-[3-(hydroxyaryl)propyl] thiosulfates and [3-(hydroxyaryl)propane]-1-sulfonates. *Russian Chemical Bulletin*. V. 56. P. 1135.)
- Baixauli F., Acin-Perez R., Villarroya-Beltri C., Mazzeo C., Nunez-Andrade N., Gabande-Rodriguez E., Ledesma M.D., Blazquez A., Martin M.A., Falcon-Perez J.M., Redondo J.M., Enriquez J.A., Mittelbrunn M.* 2015. Mitochondrial respiration controls lysosomal function during inflammatory T cell responses. *Cell Metab*. V. 22. P. 485. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.020>
- Egbujor M.C., Petrosino M., Zuhra K., Saso L.* 2022. The role of organosulfur compounds as Nrf2 activators and their antioxidant effects. *Antioxidants (Basel)*. V. 11. P. 1255. <https://doi.org/10.3390/antiox11071255>
- Klionsky D.J., Abdel-Aziz A.K., Abdelfatah S., Abdellatif M., Abdoli A., Abel S., Abeliovich H., Abildgaard M.H., Abudu Y.P., Acevedo-Arozena A., Adamopoulos I.E., Adeli K., Adolph T.E., Adornetto A., Aflaki E. et al.* 2021. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy*. V. 17. P. 1. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>
- Li S., Li J., Shen C., Zhang X., Sun S., Cho M., Sun C., Song Z.* 2014. Tert-Butylhydroquinone (tBHQ) protects hepatocytes against lipotoxicity via inducing autophagy independently of Nrf2 activation. *Biochim. Biophys. Acta*. V. 1841. P. 22. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.09.004>
- Mahapatra K.K., Mishra S.R., Behera B.P., Patil S., Gewirtz D.A., Bhutia S.K.* 2021. The lysosome as an imperative regulator of autophagy and cell death. *Cell. Mol. Life Sci*. V. 78. P. 7435. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03988-3>
- Maniganda S., Sankar V., Nair J.B., Raghu K.G., Maiti K.K.* 2014. A lysosome-targeted drug delivery system based on sorbitol backbone towards efficient cancer therapy. *Org. Biomol. Chem*. V. 12. P. 6564–9. <https://doi.org/10.1039/c4ob01153h>
- Maurya S.S.* 2021. Role of enhancers in development and diseases. *Epigenomes*. V. 5. P. 21. <https://doi.org/10.3390/epigenomes5040021>
- Ngo V., Duennwald M.L.* 2022. Nrf2 and oxidative stress: a general overview of mechanisms and implications in human disease. *Antioxidants (Basel)*. V. 11. P. 2345. <https://doi.org/10.3390/antiox11122345>
- Pearson R.G.* 2016. Reasons to conserve Nature. *Trends Ecol. Evol*. V. 31. P. 366. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.02.005>
- Qiu S., Liang Z., Wu Q., Wang M., Yang M., Chen C., Zheng H., Zhu Z., Li L., Yang G.* 2022. Hepatic lipid accumulation induced by a high-fat diet is regulated by Nrf2 through multiple pathways. *FASEB J*. V. 36. P. e22280. <https://doi.org/10.1096/fj.202101456R>
- Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A.* 2021. Interactions between reactive oxygen species and autophagy: Special issue: Death mechanisms in cellular homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res*. V. 1868. P. 119041. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119041>
- Roopra A.* 2020. MAGIC: A tool for predicting transcription factors and cofactors driving gene sets using ENCODE data. *PLoS Comput. Biol*. V. 16. P. e1007800. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007800>
- Santana-Garcia W., Castro-Mondragon J.A., Padilla-Galvez M., Nguyen N.T.T., Elizondo-Salas A., Ksouri N., Gerbes F., Thieffry D., Vincens P., Contreras-Moreira B., Van Helden J., Thomas-Chollier M., Medina-Rivera A.* 2022. RSAT 2022: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res*. V. 50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac312>

- Sardiello M., Palmieri M., Di Ronza A., Medina D.L., Valenza M., Gennarino V.A., Di Malta C., Donaudy F., Embrione V., Polishchuk R.S., Banfi S., Parenti G., Cattaneo E., Ballabio A. 2009. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*. V. 325. P. 473.
<https://doi.org/10.1126/science.1174447>
- Sharifi-Zarchi A., Gerovska D., Adachi K., Totonchi M., Pezeshk H., Taft R.J., Scholer H.R., Chitsaz H., Sadeghi M., Baharvand H., Arauzo-Bravo M.J. 2017. DNA methylation regulates discrimination of enhancers from promoters through a H3K4me1-H3K4me3 seesaw mechanism. *BMC Genomics*. V. 18. P. 964.
<https://doi.org/10.1186/s12864-017-4353-7>
- Simov V., Altman M.D., Bianchi E., Delrizzo S., Dinunzio E.N., Feng G., Goldenblatt P., Ingenito R., Johnson S.A., Mansueto M.S., Mayhood T., Mortison J.D., Serebrov V., Sondey C., Sriraman V. et al. 2021. Discovery and characterization of novel peptide inhibitors of the NRF2/MAFG/DNA ternary complex for the treatment of cancer. *Eur. J. Med. Chem.* V. 224. P. 113686.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113686>
- Wang X., Tomso D.J., Chorley B.N., Cho H.Y., Cheung V.G., Kleeberger S.R., Bell D.A. 2007. Identification of polymorphic antioxidant response elements in the human genome. *Hum. Mol. Genet.* V. 16. P. 1188.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddm066>
- Zhang W., Feng C., Jiang H. 2021. Novel target for treating Alzheimer's diseases: crosstalk between the Nrf2 pathway and autophagy. *Ageing Res. Rev.* V. 65. P. 101207.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101207>
- Zhu L., He S., Huang L., Ren D., Nie T., Tao K., Xia L., Lu F., Mao Z., Yang Q. 2022. Chaperone-mediated autophagy degrades Keap1 and promotes Nrf2-mediated antioxidative response. *Aging Cell.* V. 21. P. e13616.
<https://doi.org/10.1111/acel.13616>

Regulatory Relationship between the Keap1/Nrf2/ARE Signaling System and Transcriptional Regulators of Lysosomal Biogenesis

A. V. Chechushkov^a and E. B. Menshchikova^{a, *}

^aFederal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, 630117 Russia

*e-mail: lemen7383@mail.ru

Despite the key role of the Keap1/Nrf2/ARE redox-sensitive signaling system in cellular metabolism, little is known about its relationship to lysosome biogenesis. In this paper, a theoretical and experimental analysis of the possibility of such a link has been carried out. By forming a position frequency matrix in the transcription factor genes TFEB and TFE3, the presence of a large number of ARE-like sequences was found in the non-coding regions. In vitro exposure to J774 cells by Keap1/Nrf2/ARE activators (original synthetic monophenol TS-13 and *tert*-butylhydroquinone as comparison compound) results in dose-dependent induction of *Tfe3* and *Tfeb* genes, accompanied by a gradual increase in the lysosome number and autosomal-lysosomal fusion intensity. Thus, it can be assumed that the proteins controlling the ARE-dependent genes are able to influence lysosome biogenesis.

Keywords: Keap1/Nrf2/ARE signaling system, transcription factors TFEB and TFE3, lysosomes, autophagy

ФАГОЦИТОЗ ИММУННЫМИ КЛЕТКАМИ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОЧАСТИЦ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ БЕЛКАМИ

© 2023 г. Р. Г. Сахабеев^{1, 2, *}, Д. С. Поляков², Н. А. Грудина², О. И. Антимонова², В. А. Коржиков-Влах³, Э. Р. Аликпарова³, Е. С. Сеницына^{3, 4}, М. М. Шавловский²

¹Санкт-Петербургский технологический институт (Технический университет), Санкт-Петербург, 190013 Россия

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197022 Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии, Санкт-Петербург, 198504 Россия

⁴Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, 199004 Россия

*E-mail: helm505@mail.ru

Поступила в редакцию 10.03.2023 г.

После доработки 13.04.2023 г.

Принята к публикации 15.04.2023 г.

В работе изучали способность трех модельных зеленых белков ковалентно связываться с микрочастицами (МЧ) на основе поли(D,L-молочной кислоты) (ПМК). Зеленый флуоресцентный белок (sfGFP), рекомбинантный белок слияния бета2-микроглобулина человека (β 2M) с sfGFP (β 2M-sfGFP), а также рекомбинантный белок слияния амилина человека (IAPP) с sfGFP (IAPP-sfGFP) выделяли методом аффинной хроматографии. Для формирования МЧ-ПМК использовали метод двойной эмульсии. Модификацию МЧ-ПМК белком подтверждали при помощи лазерной сканирующей микроскопии (ЛСМ). Кроме того, при помощи ЛСМ исследовали фагоцитоз МЧ-ПМК, модифицированных различными белками, и свободных модельных белков макрофагами. Было показано, что рекомбинантный sfGFP связывается с поверхностью частиц в меньших количествах по сравнению с β 2M-sfGFP и IAPP-sfGFP. По-видимому, это обусловлено тем, что аминокислотные группы белка, которые потенциально могли бы вступить в реакцию с активированными карбоксильными группами на поверхности частиц, оказываются стерически недоступными для этой реакции из-за структуры sfGFP. Белки β 2M и IAPP в составе соответствующих рекомбинантных белков слияния являются спейсерными структурами между поверхностью сферических частиц и sfGFP. Установлено, что увеличение соотношения белок : частица в три раза не приводило к повышению количества связанного белка на единицу массы частиц, что может свидетельствовать о том, что количество белка, которое может быть связано на единицу массы частиц, ограничивается емкостью самих частиц. Изучение фагоцитоза модифицированных белками МЧ-ПМК показало, что МЧ-ПМК, содержащие на поверхности модельные белки (β 2M-sfGFP и IAPP-sfGFP), успешно фагоцитируются макрофагами и, таким образом, могут способствовать активации клеточного иммунного ответа, что важно при борьбе с различными инфекциями, в том числе вирусными. Кроме того, в работе был показан фагоцитоз модельных белков (β 2M-sfGFP, IAPP-sfGFP). Это может быть связано с тем, что как β 2M, так и IAPP являются амфилогенными и склонными к агрегации белками. По всей видимости, агрегаты этих белков тоже способны поглощаться макрофагами благодаря увеличению размера по сравнению с их мономерными формами.

Ключевые слова: микрочастицы, поли(молочная кислота), иммобилизация белка, зеленый флуоресцентный белок, фагоцитоз

DOI: 10.31857/S0041377123040119, **EDN:** ZLIPYJ

В настоящее время, микро- и наночастицы на основе биосовместимых и биodeградируемых полимеров активно изучаются в качестве носителей для получения вирусоподобных частиц с целью разработки

вакцин (Lin et al., 2015; Simón-Vázquez et al., 2020), а также привлекают внимание для создания ловушек вирусов, обладающих значительным потенциалом в комплексной терапии вирусных инфекции для снижения вирусной нагрузки, развивающейся в остром периоде заболевания (Chen et al., 2021). В последнем случае ключевым моментом применения микрочастиц (МЧ) в качестве ловушек является их способность подвергаться ускоренному фагоцитозу (Peres et al., 2017). Известно, что для ряда вирусных инфекций виремия является важной стадией течения заболевания. При

Принятые сокращения: ЛСМ – лазерная сканирующая микроскопия; МЧ – микрочастицы; ПМК – поли(D,L-молочная кислота); β 2M – рекомбинантный бета2-микроглобулин человека; IAPP – рекомбинантный амилин человека; sfGFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein superfolder); β 2M-sfGFP и IAPP-sfGFP – белки слияния β 2M и IAPP с sfGFP соответственно.

этом повышение концентрации вирусных частиц в кровотоке сопровождается появлением вирионов с новыми антигенными детерминантами, вследствие этого использование экзогенных антител часто не обеспечивает достаточную терапевтическую эффективность (Taylor et al., 2021). В то же время применение полимерных ловушек, модифицированных рецепторными белками, позволит связать вирусы и за счет ускоренного фагоцитоза обеспечит их попадание в клетки ретикулоэндотелиальной системы, в частности в макрофаги (Fajardo-Moser et al., 2008). Это, в свою очередь, обеспечит более быстрый клеточный иммунный ответ и образование антител к генетическим вариантам вирусных белков, что должно способствовать дополнительному обезвреживанию циркулирующих вирусов (Сахабеев и др., 2020).

Кроме того, полимерные частицы нашли широкое применение в качестве систем доставки различных лекарственных субстанций, включая адресную доставку за счет модификации полимерных частиц векторными белками (Begines et al., 2020; Vilos, Velasquez, 2012; Vlachopoulos et al., 2022). В этом случае фагоцитоз также может играть положительную роль за счет присущей макрофагам способности миграции в организме. Поглощая системы доставки лекарств, макрофаги предположительно могут обеспечивать перенос лекарственных веществ в очаги инфекций и зоны воспаления, что, по сути, представляет собой биогрибридный подход к доставке лекарств.

В настоящей работе сообщаются результаты получения МЧ на основе поли(молочной кислоты) (ПМК), данные по ковалентной модификации МЧ-ПМК модельными белками, а также результаты изучения поглощения модифицированных частиц макрофагами человека в культуре. Выбор МЧ-ПМК обусловлен биосовместимостью, способностью к биодеградации ПМК под действием эстераз, а также тем, что этот полимер одобрен для медицинского применения, в том числе в качестве носителя лекарственных веществ (Peres et al., 2017; Tyler et al., 2016). В качестве модельных белков использовали рекомбинантные белки слияния: зеленый флуоресцентный белок sfGFP (green fluorescent protein superfolder) и два белка человека, а именно бета2-микроглобулин человека ($\beta 2M$) и амилин человека (IAPP). Связывание белков слияния ($\beta 2M$ -sfGFP и IAPP-sfGFP), обладающих флуоресценцией, обеспечивает возможность легкой визуализации при определении эффективности модификации МЧ-ПМК и их фагоцитоза.

Представленные данные могут служить методологической основой для получения МЧ-ПМК, ковалентно модифицированных рекомбинантными рецепторами для связывания вирусных частиц или векторными белками для адресной доставки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Получение модельных рекомбинантных белков. Модельные белки sfGFP (26.8 кДа), $\beta 2M$ -sfGFP (38.6 кДа) и IAPP-sfGFP (30.7 кДа) получали из клеток *Escherichia coli* штамма BL21 (DE3), трансформированных плазмидами, содержащими гены соответствующих белков, по описанным ранее методикам (Антимонова и др., 2016; Сахабеев и др., 2020). Клетки *E. coli* разрушали обработкой ультразвуком, растворимую клеточную фракцию отделяли центрифугированием и целевые рекомбинантные белки очищали с использованием Ni-агарозы (Ni-NTA Agarose, QIAgen, США) в соответствии с протоколом производителя.

Получение МЧ на основе ПМК. Получение МЧ осуществляли методом одинарной эмульсии. Органическая фаза представляла собой раствор ПМК ($M_w = 11\,300$) в дихлорметане (50 мг/мл). Водная фаза состояла из 1%-ного раствора поливинилового спирта ($M_w = 130\,000$, степень гидролиза 99%). Для получения эмульсии использовали ультразвуковой гомогенизатор Sonopuls HD 2070, снабженный микророзондом MS 73 диаметром 3 мм (Bandelin, Германия). Органическую фазу вводили в водную фазу с применением одноканального инфузионного насоса Инстилар 1438 (Диксион, Россия); скорость введения – 2 мл/мин, скорость перемешивания – 800 об./мин с помощью магнитной мешалки (MR Hei-Mix S, Heidolph, Schwabach, Германия). Одновременно с перемешиванием систему дополнительно обрабатывали ультразвуком с помощью зондового гомогенизатора при мощности 18% в течение 3 мин (время введения органической фазы), затем повышали мощность УЗ-гомогенизатора до 35% и обрабатывали систему еще в течение 90 с. Соотношение объемов органической и водной фаз составляло 1 : 20. Удаление дихлорметана осуществляли с использованием роторного испарителя (Hei-VAP Precision ML/G3B, Германия). После формирования суспензии частицы осаждали центрифугированием в течение 10 мин (10000 g, 4°C). Далее частицы редиспергировали под действием ультразвука в течение 7 с в дистиллированной воде и снова осаждали. Процедуру промывания частиц водой повторяли дважды с целью удаления избытков поли(винилового спирта). Для фракционирования по размерам частицы центрифугировали в течение 2 мин (1000 g, 4°C). Для экспериментов использовали фракцию крупных частиц. Выход МЧ составил 49%.

Ковалентная иммобилизация белков на поверхности частиц. Процесс иммобилизации белков на поверхности МЧ-ПМК состоял из нескольких этапов. На первом этапе осуществляли получение свободных карбоксильных групп на поверхности МЧ путем частичного гидролиза 0.1 М раствором NaOH в течение 30 мин при комнатной температуре (25°C) согласно ранее опубликованному протоколу (Korzhiakov-Vlakh et al., 2018). Далее частицы отделяли и промывали дистиллированной водой с последующим центрифугированием. На втором этапе проводили

активацию свободных карбоксильных групп. Образовавшиеся на поверхности частиц карбоксильные группы активировали смесью N-гидроксисукцинимидом и водорастворимого карбодиимида – гидрохлорида (N-3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида с целью получения активированного эфира (Korzhirov-Vlakh et al., 2018). Далее к обработанным таким образом частицам добавляли различные количества одного из трех модельных белков (sfGFP, β 2M-sfGFP или IAPP-sfGFP) и инкубировали в течение 2 ч в 0.01 М боратном буферном растворе (pH 9.0). Потом отмывали полученные конъюгаты 5 раз 0.01 М фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, pH 7.4). Измерение концентрации исследуемых белков осуществляли на спектрофотометре Thermo Scientific NanoDrop 2000 (США) по поглощению на длине волны 490 нм. После определения концентрации белка в надосадочной жидкости и промывочных растворах (после проведения связывания с частицами) рассчитывали количество белка, ковалентно связанного с частицами.

Микроскопия модифицированных частиц. Микроскопию модифицированных флуоресцентными белками МЧ-ПМК осуществляли, используя инвертированный конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM 510 Meta с иммерсионным объективом C-Apochromat 40 \times /1.2 W Corr UV-VIS-IR M27 (Zeiss, Германия). Флуоресценцию sfGFP детектировали с использованием оптического фильтра 505 нм при возбуждении флуоресценции лазером с длиной волны 488 нм. В проходящем свете изображения получали при помощи метода дифференциально-интерференционного контраста (DIC). Обработку изображений осуществляли при помощи прилагаемого к микроскопу программного обеспечения LSM 510.

Получение макрофагов и поглощение макрофагами модифицированных МЧ. Первичную культуру макрофагов человека получали из моноцитов крови практических здоровых доноров (Davies, Gordon, 2005). Подтверждение дифференцировки моноцитов в макрофаги подтверждали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии по морфологическим признакам. После инкубации крови с 3.2%-ным цитратом натрия в течение 20 мин при комнатной температуре осаждали форменные элементы крови центрифугированием при 145 g в течение 15 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в PBS. Лейкоцитарную фракцию выделяли в градиенте плотности фикола (1.077 г/см³; (Биолот, Россия)) центрифугированием при 400 g в течение 45 мин при 15 $^{\circ}$ C. Полученные клетки трижды отмывали PBS и осаждали центрифугированием при 580 g в течение 15 мин. Клетки ресуспендировали в питательной среде RPMI1640 (Биолот, Россия), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (NuClone, США), антибиотики пенициллин G (5000 ед./мл) и стрептомицин (50 мкг/мл), 25 мкг/мл амфотерицина В и 300 мкг/мл L-глутамин (все от

Биолот, Россия), и рассеивали по 1×10^6 клеток на 1 лунку 6-луночного планшета на стерильные покровные стекла. После культивирования в течение 24 ч в атмосфере 5% CO₂ и 100%-ой влажности воздуха не прикрепившиеся клетки удаляли и продолжали культивирование в указанной среде при 37 $^{\circ}$ C в CO₂-инкубаторе в течение 10–14 сут. Затем клетки трижды отмывали раствором Хенкса (Биолот, Россия), добавляли МЧ-ПМК, конъюгированные с модельным белком (β 2M-sfGFP или IAPP-sfGFP), в растворе Хенкса, содержащем 10 мМ HEPES в количестве 50 мкг на лунку, и культивировали в течение 90 мин при 37 $^{\circ}$ C в CO₂-инкубаторе. Клетки дважды отмывали раствором Хенкса и фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 10 мин при комнатной температуре. Промывали PBS и покровные стекла с клетками монтировали на предметные с помощью полимеризующейся смолы для флуоресцентной микроскопии (Dako, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модификация частиц белками. Влияние спейсеров на количество связанного белка. МЧ-ПМК использовали для проведения связывания с модельными флуоресцентными белками: sfGFP, β 2M-sfGFP или IAPP-sfGFP. Преимуществом работы с такими белками является возможность их визуализации при помощи флуоресцентной микроскопии. Модельный белок sfGFP обладает сравнительно плотной упаковкой полипептидной цепи, которая представляет собой бета-бочонок (Pedelacq, Cabantous, 2019). Возможно, что аминокислотные группы sfGFP скрыты в бочкообразной структуре данного белка и пространственно недоступны для реакции с активированными карбоксильными группами на поверхности частиц. Для получения белков слияния, более эффективно связывающихся с МЧ-ПМК, был проведен поиск среди белков, имеющих менее жесткую упаковку полипептидной цепи. В качестве таких белков были выбраны микроглобулин β 2M и амилин IAPP, методики получения которых хорошо отработаны и изучены, в том числе нами (Антимонова и др., 2016; Сахабеев и др., 2020). Белок β 2M состоит из 99 аминокислотных остатков, его молекулярная масса составляет 11.8 кДа. IAPP представляет собой полипептид, состоящий из 37 аминокислотных остатков с молекулярной массой 3.91 кДа (Bhattacharya et al., 2007). Эти белки объединяет относительно небольшой размер, что, возможно, позволяет им быть спейсерными структурами между поверхностью сферических частиц и sfGFP.

Ковалентную модификацию белком проводили, активируя предварительно сгенерированные карбоксильные группы на поверхности МЧ-ПМК, до сложноэфирных групп с последующей их реакцией с аминокислотными группами белка. Характеристики, а именно гидродинамический диаметр (D_H) и дзета-потенциал

Таблица 1. Модификация МЧ-ПМК белком IAPP-sfGFP

Начальные количества компонентов, взятые для модификации МЧ белком			Количество иммобилизованного белка на 1 мг МЧ	
IAPP-sfGFP, мкг	МЧ, мг	IAPP-sfGFP/МЧ, мкг/мг МЧ	мкг	нмоль
1010	100	10	6.1 ± 0.3	0.199 ± 0.009
845	30	28	5.7 ± 0.2	0.185 ± 0.006

поверхности исходных и модифицированных МЧ, определяли методом динамического и электрофоретического рассеяния света. Полученные исходные наночастицы имели $D_H = 2.23 \pm 0.38$ нм и дзета-потенциал поверхности равный $-(34.6 \pm 4.7)$ мВ; в свою очередь данные характеристики для карбоксилированных наночастиц составили 2.04 ± 0.34 нм и -41.6 ± 5.4 мВ соответственно.

Первоначально были проведены эксперименты, позволяющие установить, влияет ли соотношение количеств белка и микрочастиц на количество белка, ковалентно связывающегося с поверхностью МЧ-ПМК (табл. 1). Для этого эксперимента был выбран белок IAPP-sfGFP, а реакцию модификации проводили при начальных соотношениях белка и МЧ 10 и 28. На основании полученных данных установлено, что увеличение соотношения белок : МЧ в 2.8 раз не приводило к повышению количества связанного белка на единицу массы частиц. Вероятно, иммобилизованное количество белка, а именно, ~6 мкг на 1 мг частиц, представляет собой предельную иммобилизационную емкость МЧ, ограниченную содержанием функциональных групп на поверхности и их стерической доступностью для макромолекул белка.

На следующем этапе работы проводили иммобилизацию модельных белков sfGFP, β 2M-sfGFP и IAPP-sfGFP, отличающихся между собой по аминокислотному составу и пространственной структуре, на поверхности МЧ-ПМК. Показано, что не имеющий спейсерного фрагмента рекомбинантный sfGFP связывается с поверхностью частиц в меньших количествах по сравнению с β 2M-sfGFP и IAPP-sfGFP

Таблица 2. Модификация МЧ-ПМК белком sfGFP, β 2M-sfGFP или IAPP-sfGFP

Белок	Количество иммобилизованного белка на 1 мг МЧ	
	мкг	нмоль
sfGFP	2.0 ± 0.2	0.074 ± 0.007
IAPP-sfGFP	6.1 ± 0.3	0.199 ± 0.009
β 2M-sfGFP	6.2 ± 0.2	0.161 ± 0.005

(табл. 2). Это может быть обусловлено тем, что sfGFP обладает меньшей способностью связываться с МЧ, чем β 2M и IAPP. Аминогруппы, которые потенциально могли бы вступить в реакцию с активированными карбоксильными группами на поверхности частиц, оказываются стерически недоступными для этой реакции из-за структуры sfGFP.

Преимущество белков β 2M-sfGFP и IAPP-sfGFP перед sfGFP состоит в том, что они, с одной стороны, обладают флуоресценцией, свойственной зеленому флуоресцентному белку sfGFP, а с другой стороны, содержат последовательности β 2M или IAPP, существенно облегчающие иммобилизацию комплексного белка на поверхности частиц. При этом важно отметить, что конъюгирование β 2M или IAPP с sfGFP не нарушает способность последнего к флуоресценции.

Исследование при помощи лазерной сканирующей микроскопии МЧ-ПМК (рис. 1), модифицированных белками слияния IAPP-sfGFP (панель I) и β 2M-sfGFP (панель II), показало наличие флуоресцирующих структур. Также было установлено, что частицы, не модифицированные белком, флуоресценцией не обладают (панель III). Полученные данные подтверждают связывание МЧ-ПМК с модельными белками и демонстрирует способность модельных зеленых белков слияния сохранять флуоресценцию при ковалентном связывании с частицами.

Как и предполагалось, частицы имеют сферическую форму, демонстрируют флуоресценцию на поверхности, а их центральная часть не флуоресцирует. Таким образом, белки иммобилизуются на поверхности частиц, не проникая внутрь. Это может говорить об отсутствии пор в полученных частицах, либо о слишком маленьких порах, не позволяющих белку диффундировать во внутреннее пространство частиц.

Фагоцитоз частиц и свободных модельных белков макрофагами. В предыдущих работах мы предполагали, что ковалентное связывание модельного белка с МЧ-ПМК повысит эффективность гуморального ответа у животных. Однако результаты экспериментов показали (Сахабеев et al., 2020), что более выраженный ответ в плане количественного содержания антител в сыворотке крови имеет место в случае им-

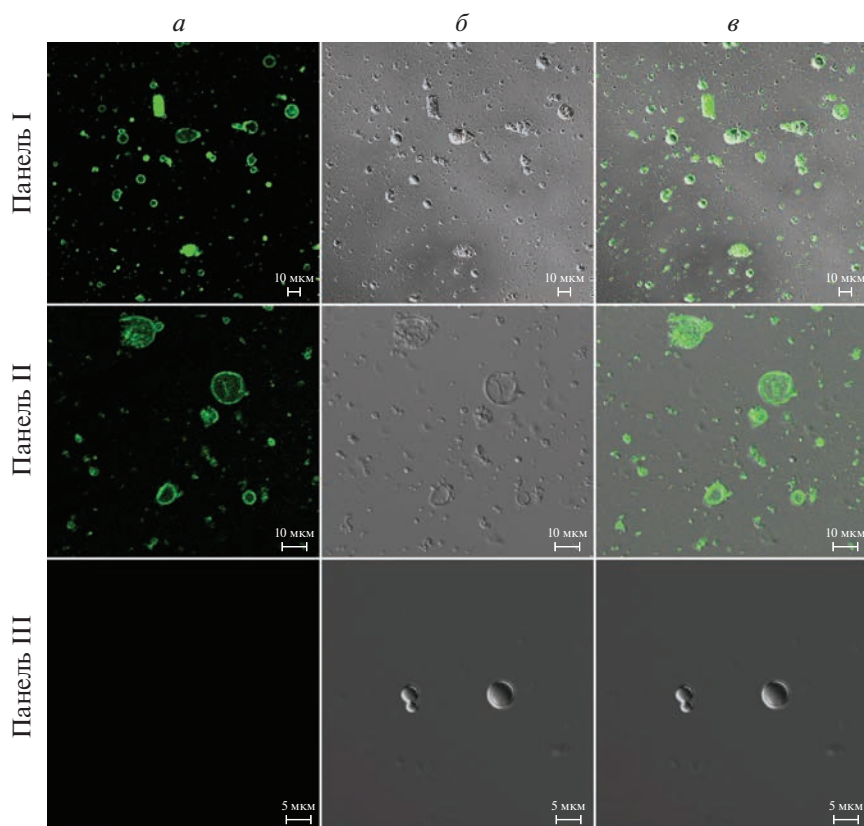


Рис. 1. Визуализация sfGFP по флуоресценции при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм (а) и с помощью дифференциально-интерференционного контраста (б). в – Совмещенное изображение. МЧ-ПМК модифицированы IAPP-sfGFP (панель I) и β 2M-sfGFP (панель II); панель III – немодифицированные МЧ-ПМК. Масштабная линейка: 10 мкм (панели I и II) и 5 мкм (панель III).

мунизации смесью белка и немодифицированных частиц. Этот результат можно объяснить следующим образом. Предположительно, частицы элиминируются из брюшной полости в результате их захвата макрофагами. Макрофаги обеспечивают деградацию связанных с частицами белков. Захват частиц макрофагами может ослаблять поступление антигена в лимфоузлы и, таким образом, снижать эффективность гуморального ответа. Однако наша работа в глобальном плане имеет целью воздействие на противовирусный иммунитет. Эффективность последнего напрямую не связана с количеством специфических антител к антигенам вируса. Мы предполагаем, что несмотря на менее эффективный гуморальный иммунный ответ на белки, иммобилизованные на частицах ПМК, их быстрая элиминация из брюшной полости макрофагами может способствовать усиленному Т-клеточному ответу, что наиболее важно при борьбе с вирусными инфекциями (Сахабеев и др., 2020).

В настоящей работе необходимо было экспериментально подтвердить способность макрофагов поглощать модифицированные белками МЧ-ПМК. С этой целью макрофаги, полученные по вышеприведенной методике из крови человека, инкубировали с

суспензией исходных МЧ-ПМК, модифицированных белками слияния β 2M-sfGFP или IAPP-sfGFP, а также с растворами соответствующих белков слияния в качестве контроля.

Фагоцитоз исследовали при помощи лазерной сканирующей микроскопии. По интенсивности флуоресценции на рис. 2 можно предположить, что частицы с ковалентно присоединенными β 2M-sfGFP или IAPP-sfGFP (панели II и IV соответственно) поглощаются макрофагами более эффективно, чем свободные белки (панели I и III соответственно). Это отражает известную зависимость: более эффективно макрофагами поглощаются частицы с размерами более 500 нм (Gamvrellis et al., 2004; Сахабеев и др., 2020). Однако видно, что на панелях I и III (рис. 2) модельные белки также способны фагоцитироваться макрофагами. Это может быть связано с тем, что белки β 2M и IAPP являются амилоидогенными и склонны к агрегации (Антимонова и др., 2016). По всей видимости, агрегаты этих белков тоже способны поглощаться фагоцитами благодаря увеличению размера по сравнению с их мономерными формами.

Аналогичным образом были изучены макрофаги, проинкубированные с немодифицированными

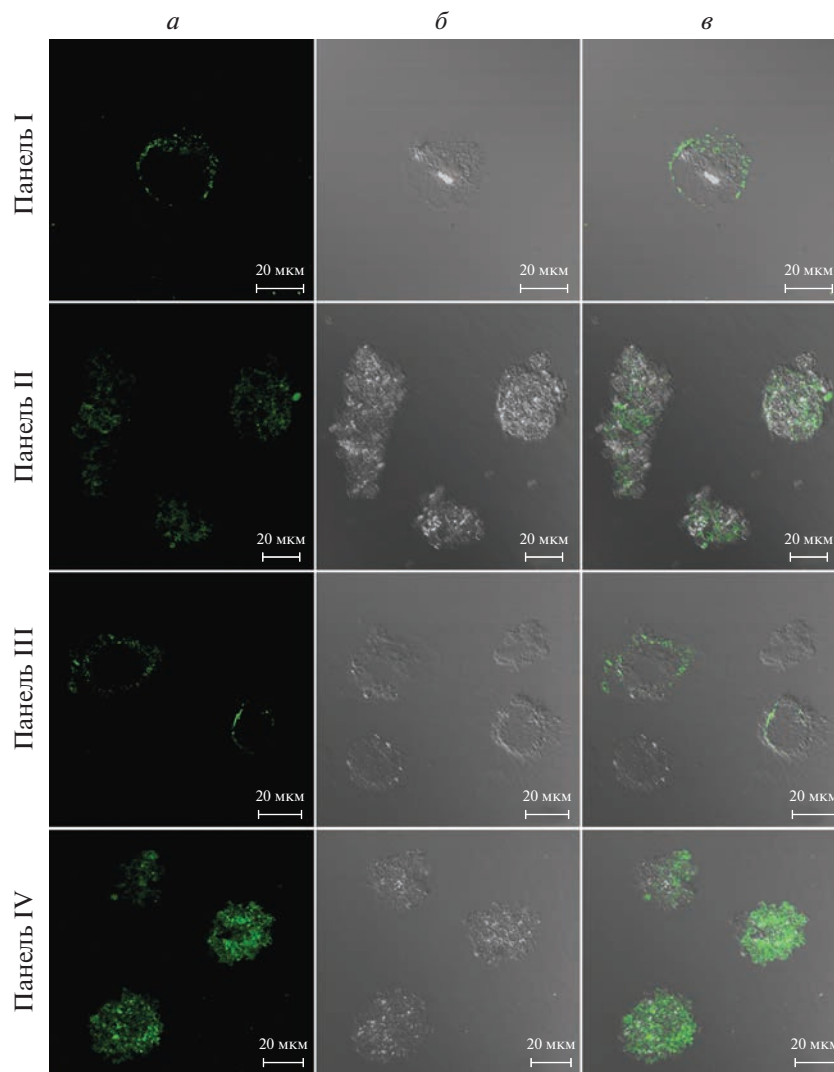


Рис. 2. Микрофотографии макрофагов после культивирования в среде RPMI, содержащей 10% сыворотки и L-глутамин, с различными объектами. *а* – Флуоресценция при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм; *б* – дифференциально-интерференционный контраст; *в* – совмещенное изображение. Панели показывают фагоциты после их культивирования с β 2M-sfGFP (I), с МЧ-ПМК, модифицированными β 2M-sfGFP (II), с IAPP-sfGFP (III) и с МЧ-ПМК, модифицированными IAPP-sfGFP (панель IV). Масштабная линейка: 20 мкм.

МЧ-ПМК. Значимой флуоресценции не наблюдали (данные не представлены).

Таким образом, в ходе работы продемонстрировано, что МЧ-ПМК способны к связыванию с белками на своей поверхности. Однако пространственная структура белка имеет большое значение для связывания белка на поверхности частиц. При этом лучше связываются те белки, которые характеризуются менее компактной структурой. Очевидно, что для более эффективного связывания белков с МЧ-ПМК могут быть использованы спейсеры, например, пептидной природы.

Кроме того, было показано, что конъюгаты МЧ-ПМК с модельными белками фагоцитируются макрофагами. По всей видимости, это может способствовать активации клеточного иммунного ответа,

которая была обнаружена в наших предыдущих исследованиях (Сахабеев и др., 2020).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы по получению МЧ на основе ПМК, их карбоксилированию, ковалентной иммобилизации белков на поверхности частиц, а также характеристики полученных полимерных систем выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-73-20104). Работы по получению модельных рекомбинантных белков, выделению макрофагов, поглощению макрофагами модифицированных МЧ, а также проведению конфокальной микроскопии выполнены в рамках государственных заданий Министерства науки и высшего образования РФ: НИР № FGWG-2022-0009 (рег. № НИОКТР 122020300191-9).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Локального этического комитета Института экспериментальной медицины (выписка из протокола № 3/19 от 25.04.2019 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антимонова О.И., Грудинина Н.А., Поляков Д.С., Шавловский М.М. 2016. Белок слияния амилина человека с зеленым флуоресцентным белком "Superfolder." Естественные и мат. науки в совр. мире. Т. 4. № 39. С. 15. (Antimonova O.I., Grudinina N.A., Polyakov D.S., Shavlovskij M.M. 2016. Belok sliyaniya amilina cheloveka s zelenym fluorescentnym belkom "Superfolder." Estestvennye i mat. nauki v sovremennom. mire. V. 4. № 39. P. 15.)
- Сахабеев Р.Г., Поляков Д.С., Гошина А.Д., Вишня А.А., Кудрявцев И.В., Сеницына Е.С., Корзиков-Влах В.А., Тенникова Т.Б., Шавловский М.М. 2021. Усиление специфического Т-клеточного иммунного ответа при иммобилизации антигена на микро- и наночастицах. Инфекция и иммунитет. Т. 11. № 4. С. 777. (Sakhabeev R.G., Polyakov D.S., Goshina A.D., Vishnya A.A., Kudryavtsev I.V., Siniicina E.S., Korzhikov-Vlakh V.A., Tennikova T.B., Shavlovskiy M.M. 2021. Enhancing the specific T cell immune response against micro- and nanoparticle immobilized antigen. Russ. J. Infection Immunity. V. 11. № 4. P. 777.) <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ETS-1374>
- Begines B., Ortiz T., Pérez-Aranda M., Martínez G., Merinero M., Argüelles-Arias F., Alcudia A. 2020. Polymeric nanoparticles for drug delivery: recent developments and future prospects. *Nanomaterials*. V. 10. P. 1403.
- Bhattacharya S., Naveena Lavanya Latha J., Kumresan R., Singh S. 2007. Cloning and expression of human islet amyloid polypeptide in cultured cells. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* V. 356. P. 622.
- Chen M., Rosenberg J., Cai X., Lee A.C.H., Shi J., Nguyen M., Wignakumar T., Mirle V., Edobor A.J., Fung J., Donington J.S., Shanmugarajah K., Lin Y., Chang E. et al. 2021. Nanotraps for the containment and clearance of SARS-CoV-2. *Matter*. V. 4. P. 2059.
- Davies J.Q., Gordon S. Isolation and culture of human macrophages. *Basic Cell Culture Protocols*. V. 290. P. 105.
- Fajardo-Moser M., Berzel S., Moll H. 2008. Mechanisms of dendritic cell-based vaccination against infection. *Internat. J. Med. Microbiol.* V. 298. P. 11.
- Gamvrellis A., Leong D., Hanley J.C., Xiang S.D., Mottram P., Plebanski M. 2004. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Imm. Cell Biol.* V. 82. P. 506.
- Korzhiikov-Vlakh V., Averianov I., Sinityna E., Nashchekina Y., Polyakov D., Guryanov I., Lavrentieva A., Raddatz L., Korzhikova-Vlakh E., Scheper T., Tennikova T. 2018. Novel pathway for efficient covalent modification of polyester materials of different design to prepare biomimetic surfaces. *Polymers*. V. 10. P. 1299.
- Lin C.-Y., Lin S.-J., Yang Y.-C., Wang D.-Y., Cheng H.-F., Yeh M.-K. 2015. Biodegradable polymeric microsphere-based vaccines and their applications in infectious diseases. *Human Vaccines Immunother.* V. 11. P. 650.
- Pedelaq J.-D., Cabantous S. 2019. Development and applications of superfolder and split fluorescent protein detection systems in biology. *Internat. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 3479.
- Peres C., Matos A.I., Conniot J., Sainz V., Zupančič E., Silva J.M., Graca L., Gaspar R.S., Preat V., Florindo H.F. 2017. Poly(lactic acid)-based particulate systems are promising tools for immune modulation. *Acta Biomaterialia*. V. 48. P. 41.
- Simón-Vázquez R., Peleteiro M., González-Fernández Á. 2020. Polymeric nanostructure vaccines: applications and challenges. *Expert Opinion Drug Delivery*. V. 17. P. 1007.
- Taylor P.C., Adams A.C., Hufford M.M., de la Torre I., Winthrop K., Gottlieb R.L. 2021. Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. *Nature Rev. Immunol.* V. 21. P. 382.
- Tyler B., Gullotti D., Mangraviti A., Utsuki T., Brem H. 2016. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Rev.* V. 107. P. 163.
- Vilos C., Velasquez L.A. 2012. Therapeutic strategies based on polymeric microparticles. *J. Biomed. Biotech.* V. 2012. P. 1.
- Vlachopoulos A., Karlioti G., Balla E., Daniilidis V., Kalamas T., Stefanidou M., Bikiaris N.D., Christodoulou E., Koumentakou I., Karavas E., Bikiaris D.N. 2022. Poly(lactic acid)-based microparticles for drug delivery applications: an overview of recent advances. *Pharmaceutics*. V. 14. P. 359.

Phagocytosis of Protein-Modified Polymer Microparticles by Immune Cells

R. G. Sakhabeev^{a, b, *}, D. S. Polyakov^b, N. A. Grudinina^b, O. I. Antimonova^b, V. A. Korzhikov-Vlakh^c, E. R. Alikparova^c, E. S. Sinityna^{c, d}, and M. M. Shavlovskiy^b

^aSt. Petersburg State Technological Institute (Technical University), St. Petersburg, 190013 Russia

^bInstitute of Experimental Medicine, St.-Petersburg, 197022 Russia

^cInstitute of Chemistry, St.-Petersburg State University, St. Petersburg, 198504 Russia

^dInstitute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199004 Russia

*e-mail: helm505@mail.ru

The ability of three model green proteins to covalently bind to microparticles (MP) based on poly(D,L-lactic acid) (PLA). Green fluorescent protein (sfGFP), recombinant human beta2-microglobulin-sfGFP fusion protein (β 2M-sfGFP), and recombinant human amylin-sfGFP fusion protein (IAPP-sfGFP) were isolated by affinity chromatog-

raphy. The double emulsion method was used to form PLA-MPs. The modification of PLA MPs by proteins was testified using laser scanning microscopy (LSM). Phagocytosis of PLA-MPs modified with different proteins and free model proteins by macrophages was also studied using LSM. Recombinant sfGFP has been shown to bind to particle surfaces at lower levels compared to β 2M-sfGFP and IAPP-sfGFP. Presumably, this is due to the fact that amino groups that could potentially react with activated carboxyl groups on particle surfaces, are spatially unavailable for this reaction due to the structure of sfGFP. β 2M and IAPP within the corresponding recombinant proteins are spacer structures between the surface of spherical particles and sfGFP. It was also found that increasing the protein/particle ratio by a factor of three did not lead to an increase in the amount of bound protein per unit mass of particles, which may indicate that the amount of protein that can be bound per unit mass of particles is limited by the capacity of the particles themselves. The study of phagocytosis of PLA-MPs modified with model proteins revealed that MPs bearing β 2M-sfGFP and IAPP-sfGFP were captured by macrophages and, therefore, contribute to the activation of the cellular immune response, which is important in the fight against various viral infections. In addition, model proteins (β 2M-sfGFP, IAPP-sfGFP) appeared to be also capable of phagocytosis. This may be due to the fact that both β 2M and IAPP are amyloidogenic and aggregation prone proteins. Apparently, the aggregates of these proteins are also able to be absorbed by macrophages due to the increase in size compared to their monomeric forms.

Keywords: microparticles, poly(lactic acid), protein immobilization, green fluorescent protein, virus “traps”, phagocytosis

УДК 576.08:612.11

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ ПЕРИНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ

© 2023 г. О. Д. Денисенко^{1, *}, С. А. Перепелица^{1, 2}, В. А. Сергунова², С. С. Ляпунова², Л. С. Литвинова¹

¹Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, 236016 Россия

²Научно-исследовательский институт общей реаниматологии и реабилитологии им. В.А. Неговского
Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии, Москва, 107031 Россия

*E-mail: ksushadenisenko@mail.ru

Поступила в редакцию 07.02.2023 г.

После доработки 06.03.2023 г.

Принята к публикации 27.03.2023 г.

Несмотря на активное исследование функциональных свойств эритроцитов при патологических состояниях, данная проблема достаточно актуальна. Одной из причин дистресса плода и новорожденного является гипоксия. Последствия негативного влияния дефицита кислорода для эмбриона и плода могут проявляться как внутриутробно, так и после рождения, приводя к заболеваниям различного рода. Цель настоящей работы – изучение влияния ацидоза, как маркера перинатальной гипоксии, на мембрану эритроцитов у новорожденных в раннем неонатальном периоде. Применение атомно-силового микроскопа позволило получить изображения и профили клеток для оценки морфологических и структурных особенностей эритроцитов при гипоксии у детей в раннем неонатальном периоде. Установлено, что перинатальная гипоксия вызывает изменение морфологии и структур мембран эритроцитов. Ранний неонатальный период характеризуется изменением морфологических форм и нестабильностью мембран эритроцита.

Ключевые слова: новорожденные, перинатальная гипоксия, мембрана эритроцитов, морфология эритроцитов

DOI: 10.31857/S0041377123040053, **EDN:** ZFPEUY

Пусковым механизмом гипоксических повреждений у новорожденных в неонатальном периоде является типовой патологический процесс – перинатальная гипоксия, связанная с нарушениями плацентарного кровообращения, приводящая к активации оксидативных процессов в организме плода (Чайка и др., 2019). Возникающие гипоксия и ацидоз негативно влияют на все клетки, в том числе и эритроциты, которые очень чувствительны к нарушениям гомеостаза (Steiner, Gallagher, 2007; Shankaran, 2015). Изменение функциональных свойств эритроцитов приводит к повышению деформируемости, проницаемости мембран и снижению транспорта кислорода (Мороз и др., 2012). Под влиянием гипоксии в эритроцитах происходит истощение продукции АТФ, запускается активация протеинкиназы С и фосфорилирование неселективных катионных каналов, что способствует входу в клетку ионов Ca^{2+} (Белевич и др., 2015; Чумакова и др., 2018; Ващенко, Вильянинов, 2019). Прогрессирующий процесс деформации сопровождается нарушениями цитоске-

лета и плазматической мембраны эритроцита (Сергунова и др., 2015). Образовавшиеся количественные или качественные дефекты в мембранных белках приводят к уменьшению стабильности мембраны и последующему разрушению клеток и их программированной смерти – эритрозу (Мороз и др., 2012; Хадарцев и др., 2022).

Мембрана эритроцита имеет сложную структуру (Рязанцева, Новицкий, 2004). В ее состав входят три основных компонента: тонкий липидный бислои (4–5 нм), белки (периферические и интегральные) и цитоскелет (Трошкина и др., 2007; Kim et al., 2017). Большинство белков периферической мембраны образуют мембранный цитоскелет толщиной от 40 до 90 нм, который составляет основу внутренней поверхности мембраны и выполняет роль каркаса клетки (Мушкамбаров, Кузнецов, 2007). Цитоскелет представляет собой белковую сеть, состоящую в основном из тетрамеров спектрина, которые связаны с белковыми комплексами актина, белка 4.1R, анкирина, тропомиозина, тропоподулина, аддуцина и дематина. Связывание цитоскелета с липидным бислоем осуществляется с помощью анкирина и белка 4.1R через белок полосы 3 (Kim et al., 2017). Размер ячеек сети цитоскелета составляет 80–100 нм

Принятые сокращения: АСМ – атомно-силовой микроскоп; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; BE (Base Excess) – сдвиг буферных оснований; HCO_3^- – ион бикарбоната; $p\text{CO}_2$ – парциальное напряжение углекислого газа в крови.

(Мушкамбаров, Кузнецов, 2007; Kodippili et al., 2009).

Для мембраны эритроцитов характерно колебательное движение – “фликкеринг” (мерцание) (Конonenko, 2009; Jafarzadeh et al., 2019). Возникшие под влиянием неблагоприятных факторов патологические колебания мембраны приводят к изменению формы эритроцитов.

Эритроциты новорожденных детей и взрослых имеют отличия по таким параметрам, как размер, морфология, состояние клеточных мембран, состав, глубина и другие. У здоровых людей большая часть эритроцитов представлена дискоцитами. Их мембрана состоит из липидов и белков, которые взаимодействуя друг с другом, сохраняют эритроциту физиологическую деформируемость и гибкость, обеспечивая газотранспортную функцию крови (Steiner, Gallagher, 2007). Для новорожденных характерен внутриутробный физиологический эритроцитоз и повышенный уровень гемоглобина, включающий фетальный гемоглобин. Основной морфологической формой эритроцитов являются планоциты, которые имеют внешние отличия от дискоцитов, но считаются физиологической транзитной формой, обеспечивающей полноценную газотранспортную функцию (Перепелица и др., 2014а, 2014б). Показано, что в перинатальном периоде повреждение красных клеток у новорожденных индуцируется тяжелой гипоксией и ацидозом (Pegione et al., 2012), что приводит к неоднородности морфологического состава эритроцитов и выраженному пойкилоцитозу (Перепелица и др., 2017).

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) относится к классу сканирующей зондовой микроскопии. Этот метод позволяет визуализировать структуры клеток, размер которых колеблется в диапазоне от 0.5 до 100 нм. Поверхность мембраны эритроцитов представляет собой сложную неоднородную структуру, а с помощью пространственного преобразования Фурье сложное изображение поверхности мембран эритроцитов, полученное на АСМ, раскладывается на поверхности двух порядков (1 и 2) (Kozlova et al., 2018, 2019).

Преимущества АСМ перед другими методами микроскопии включают высокое разрешение и простоту приготовления образца для исследования (Sergunova et al., 2022). С момента своего изобретения в 1986 г. (Binnig et al., 1986) атомно-силовой микроскоп стал одним из важнейших инструментов для визуализации биологических объектов как на макро-, так и на микроуровне. По сравнению со световой микроскопией, которая позволяет исследовать только морфологию и размер клетки, АСМ позволяет детально изучить структуры клеточной мембраны при гипоксии (Revin et al., 2019) и различных заболеваниях (Kamruzzahan et al., 2004; Zhang et al., 2012; Мельченко, 2015; Стародубцева и др., 2015), оценить влияние лекарственных препаратов (Niese et al.,

2015; Starodubtseva et al., 2022) и солей кадмия на структуру мембраны эритроцитов (Demchenkov et al., 2020).

Учитывая особенности адаптации новорожденного в перинатальном периоде, анализ влияния гипоксии на мембрану эритроцитов с помощью АСМ представляет научный интерес.

Цель настоящей работы – изучить влияния ацидоза, как маркера перинатальной гипоксии, на мембрану эритроцитов у новорожденных в раннем неонатальном периоде. Задачи работы включали сравнительное исследование морфологических форм эритроцитов и изменения структуры мембран эритроцитов (у новорожденных без признаков гипоксии и перенесших перинатальную гипоксию).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объект. Работа включала 27 новорожденных детей, родившихся в ГБУЗ “Родильный дом Калининградской области № 1”. В зависимости от показателей кислотно-основного состояния крови при рождении выделяли две группы для исследования – А и Б.

Группа А – 20 новорожденных с признаками гипоксии, у которых в остаточной пуповиной крови определялся метаболический ацидоз, величина рН была < 7.35 . Средний срок гестации составлял 34 ± 0.5 нед., масса тела при рождении – 2224.2 ± 151.8 г. Группа Б – 7 новорожденных без признаков гипоксии, у которых в остаточной пуповиной крови признаков ацидоза не было, величина рН > 7.35 . Средний срок гестации составлял 33.1 ± 0.8 нед., масса тела при рождении – 2001.4 ± 158.9 г.

Достоверных различий между группами по гестационному возрасту, массе тела при рождении не выявлено ($p > 0.05$). Всем новорожденным была оказана квалифицированная помощь в соответствии с порядком оказания медицинской помощи по профилю “неонатология” (Володин, 2019). Новорожденные обеих групп с рождения получали комплексное лечение, направленное на обеспечение жизненно важных функций: инфузионную, кардиотоническую и симптоматическую терапию. В проведении искусственной вентиляции легких (ИВЛ) нуждалось 13 детей (65%) группы А и 2 ребенка (28.6%) группы Б ($p = 0.0003$). Новорожденным, включенным в исследование, не проводили трансфузия препаратов крови, и они не получали препараты, которые могли бы влиять на количественный и качественный состав эритроцитов.

Анализ кислотно-основного состояния крови. Сразу после рождения исследовали величины следующих параметров крови: рН, ВЕ, pCO_2 содержание HCO_3^- на анализаторе Gem Premier 3000 (США).

Подготовка препарата монослоя эритроцитов. Исследовали остаточную пуповинную (венозную) кровь через 7 ч и 7 сут после рождения. Забор крови осуществляли в пробирки объемом 0.2 мл с добавле-

нием консерванта ЭДТА, кровь перемешивали и отстаивали в течение 30 мин. Затем готовили монослой эритроцитов для дальнейшего сканирования на АСМ: 20 мкл крови наносили на предметное стекло и приготавливали монослой эритроцитов с помощью центрифуги Diff Spin 2 (США).

Анализ морфологии эритроцитов с помощью АСМ. Для каждого образца было приготовлено по 3 мазка с монослоем эритроцитов. На каждом мазке сканировали по 5 изображений размером 100×100 мкм и 10×10 мкм. Среднее число клеток на участке 100×100 мкм составляло 108 ± 20 . Всего было просканировано 810 изображений. Для получения данных о структуре мембран эритроцитов анализировали области размером 1.5×1.5 мкм на 30 клетках для каждого образца. Всего было проанализировано 2430 участков изображений. Использовали атомно-силовой микроскоп АСМ NTEGRA Prima (NT-MDT Spectrum Instruments, РФ) в методике осцилляционной резонансной АСМ (Zhong et al., 1993).

Изображения поверхности эритроцитов получали на воздухе в полуконтактном режиме с помощью кремниевых кантилеверов серии NSG01 с золотым отражающим покрытием (NT-MDT Spectrum Instruments, РФ). Высота иглы кантилевера 14–16 нм, а радиус закругления – 10 нм. Типичное значение резонансной частоты составило 148 кГц, коэффициент жесткости $k = 5$ Н/м. Поля сканирования выбирали от 100×100 мкм до 10×10 мкм. Число точек в скане составляло 512 или 1024, частота сканирования строк варьировала от 0.3 до 0.9 Гц. Полученные изображения и их профили были проанализированы в двумерном (2D) и трехмерном (3D) форматах. Для выявления небольших структурных изменений, количественной оценки в разных масштабах и статистического сравнения их размеров использовали математическое программное обеспечение FemtoScan Online (Фемтоскан, Россия). Использовали пространственное преобразование Фурье, сложное АСМ-изображение поверхности раскладывали на два более простых с разным пространственным разрешением (рис. 1). Спектральное окно с низкими пространственными частотами содержит изображения мембранных структур с большим пространственным периодом (600–1200 нм) с высотой h_1 , а спектральное окно с высокими пространственными частотами – изображения мембранных структур с малым пространственным периодом (80–200 нм) с высотой h_2 . Параметры пространственных масштабов были выбраны в соответствии с естественными структурами мембран эритроцитов. Первый порядок соответствует фликерингу мембраны и отражает его макроструктурные свойства. Второй порядок связан с конфигурацией цитоскелета эритроцита. Более подробное описание метода пространственного преобразования Фурье приведено в наших предыдущих исследованиях (Шерстюкова и др., 2021; Sergunova et al., 2022).

Полученные изображения эритроцитов классифицировали согласно общепринятой классификации (Новицкий и др., 2003, Льюис и др., 2009).

Статистическая обработка данных. Результаты АСМ анализировали с помощью стандартной программы OriginPro 2019 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, США). Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA). Отличия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0.05$.

Статистический анализ клинических и лабораторных исследований проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Для данных, распределение которых в вариационном ряду носило нормальный характер, использовали среднее арифметическое и его стандартное отклонение. Нормальность выборок проверяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лилефорса. Для количественных признаков, отличных от нормального распределения, определяли медиану (Me) и междуквартильный размах ($Q1$; $Q3$). Различия между двумя числовыми выборками, имеющие признаки негауссовского распределения, определяли при помощи критерия Манна–Уитни, а для сравнения связанных выборок использовали критерий Вилкоксона. Качественные данные анализировали путем вычисления доли (в %) каждого значения. Сравнение групп по качественному признаку проводили с помощью критерия χ^2 Пирсона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При рождении в остаточной пуповинной крови определяли значения pH, BE, $p\text{CO}_2$, HCO_3^- как диагностические критерии ацидоза (табл. 1). Нами показано, что при рождении у новорожденных группы А, по сравнению с группой Б, величина pH крови статистически значимо ниже ($p < 0.05$), а $p\text{CO}_2$ выше ($p < 0.05$). Между группами не установлено статистически значимых различий по уровням BE и HCO_3^- ($p > 0.05$). Учитывая выявленные изменения, у новорожденных группы А диагностирован субкомпенсированный смешанный ацидоз, свидетельствующий о перенесенной перинатальной гипоксии.

Клеточный состав эритроцитов новорожденных в раннем неонатальном периоде представлен на рис. 2. В остаточной пуповинной крови новорожденных основной морфологической формой эритроцитов являются планоциты. На рис. 3 представлено 3D-изображение планоцита (а) и его боковое сечение (профиль, б). Клетка представляет собой диск с ровной поверхностью; впадина и патологическая деформация, а также выросты мембраны отсутствуют, диаметр клетки составляет 10413 ± 301 нм, высота – 310 ± 43 нм. У детей группы А на долю планоцитов при-

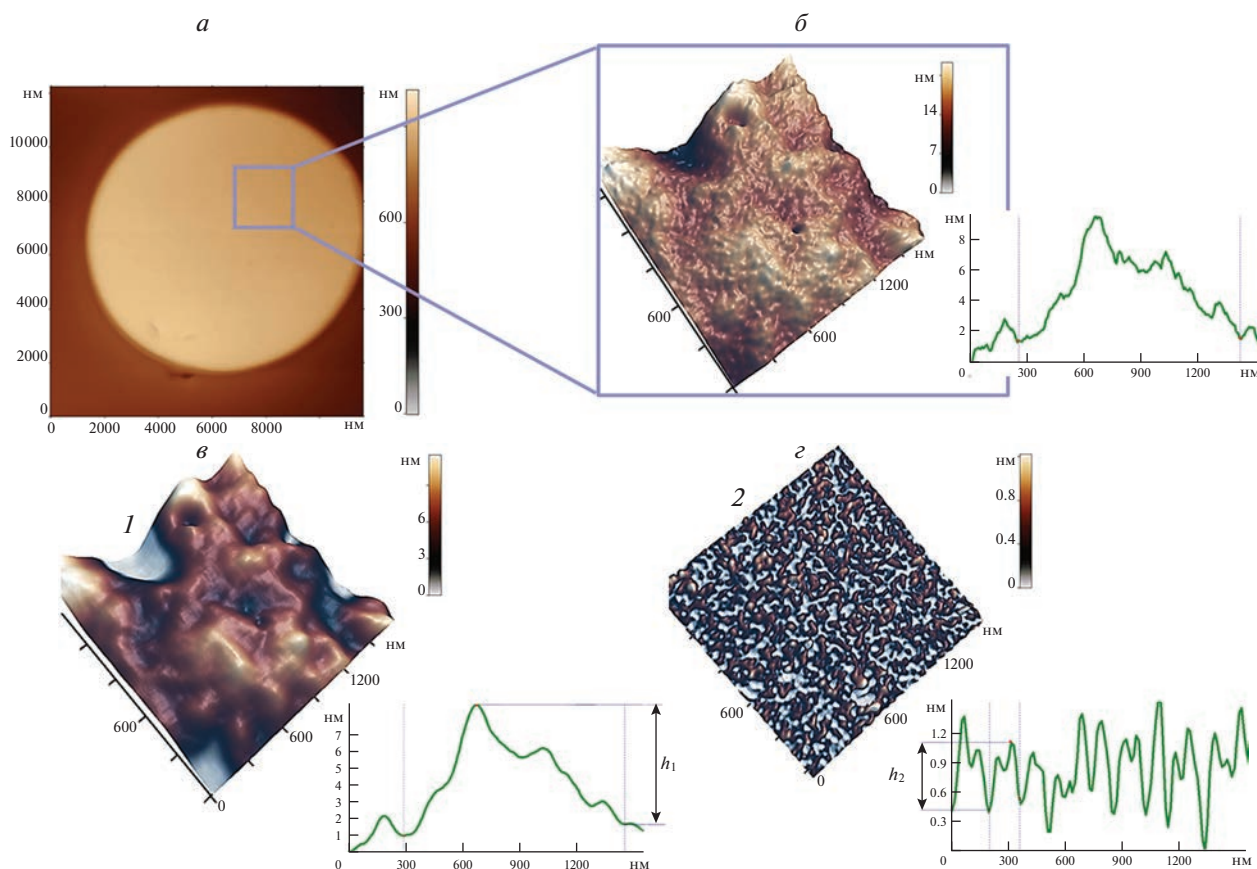


Рис. 1. Иллюстрация анализа АСМ-изображения эритроцита и ее участка размером 1.5×1.5 мкм с профилем мембраны эритроцита на основе пространственного преобразования Фурье. *a* – эритроцит, *б* – исследуемый участок поверхности с его профилем. *в*, *г* – Пространственные компоненты (*в*: 1 и *г*: 2), суммирующиеся в исходном изображении и профиле *б*: профиль поверхности первого порядка (1) высотой h_1 (*в*); профиль поверхности второго порядка (2) высотой h_2 (*г*).

ходится 46% от общего количества эритроцитов, а в группе В их количество достигает 68%, и различия статистически значимы ($p < 0.05$)

Единичные дискоциты встречаются лишь у детей группы А, но в этой группе, по сравнению с группой Б, определяется статистически значимый стоматоцитоз ($p < 0.05$), определяются и другие измененные эритроциты, не входящие в определенную классификацию; вероятно, они находятся в стадии промежуточной трансформации.

Таблица 1. Показатели кислотно-основного состояния крови новорожденных

Параметры	Группа А ($n = 20$)	Группа Б ($n = 7$)
рН	7.3 ± 0.01	7.4 ± 0.01^a
pCO_2 , мм рт. ст.	49.5 ± 2.2	35 ± 2.4^a
HCO_3^- , ммоль/л	21.6 ± 0.9	20.6 ± 0.9
ВЕ, ммоль/л	-4.8 ± 1.8	-3.9 ± 0.5

Примечание. ВЕ (Base Excess) – сдвиг буферных оснований; ^aразличия между группами статистически значимы при $p < 0.05$.

Стоматоцит представляет собой диск диаметром 9226 ± 170 нм и высотой 495 ± 31 нм с ровной поверхностью, имеющий глубокую инвагинацию чашеобразной формы (рис. 4а) (Lim et al., 2009). На профиле клетки (рис. 4б) видно, что инвагинация смещается от центра, ее глубина достигает 467 ± 42 нм.

Первые 6 ч постнатальной жизни являются периодом острой адаптации новорожденных к новым условиям внешней среды. Через 7 ч после рождения у детей группы А, по сравнению с группой Б, сохраняется статистически значимый стоматоцитоз ($p < 0.05$), а в группе Б – планоцитоз ($p < 0.05$) и появляется небольшое количество дискоцитов.

В это время обнаруживаются эритроциты, имеющие на своей поверхности незначительные изменения (рис. 5а), которые, вероятно, обусловлены процессом активной трансформации из планоцита в кодоцит. Поверхность клетки становится более рыхлой, появляются перепады высот в диапазоне от 40 до 150 нм, что наблюдается на профиле клетки (рис. 5б). По сравнению с планоцитом, у нее уменьшается диаметр до 9267 ± 260 нм, а высота увеличивается до 630 ± 78 нм.

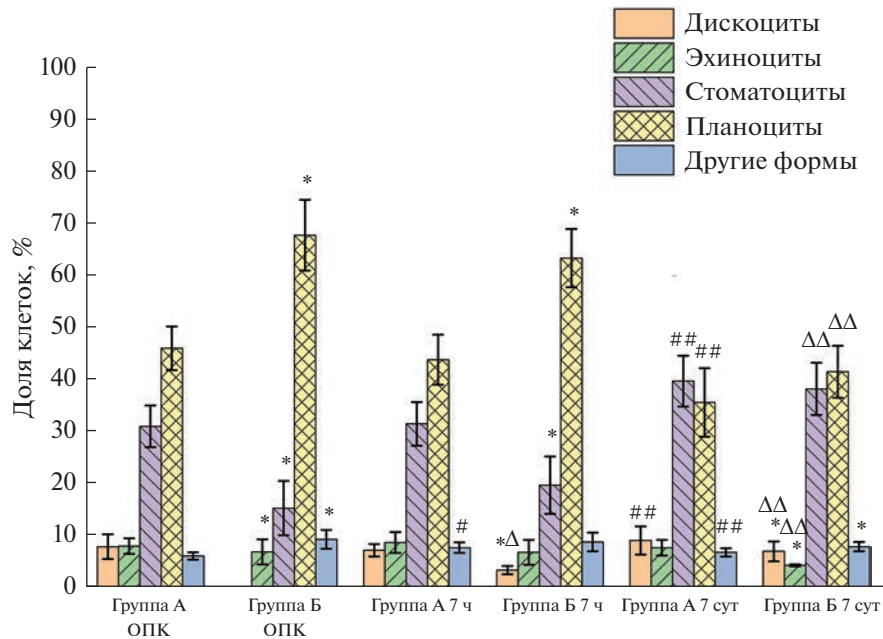


Рис. 2. Статистическое распределение форм эритроцитов в остаточной пуповинной крови (ОПК) новорожденных групп А и Б сразу после рождения и через 7 ч и 7 сут после рождения. Различия достоверны при $p < 0.05$: (*) – между группами А и Б; (#) – в группе А между ОПК и через 7 ч после рождения; (##) – в группе А между сроками 7 сут и 7 ч после рождения; (Δ) – в группе Б между ОПК и сроком 7 ч; (ΔΔ) – в группе Б между сроком 7 сут и 7 ч после рождения.

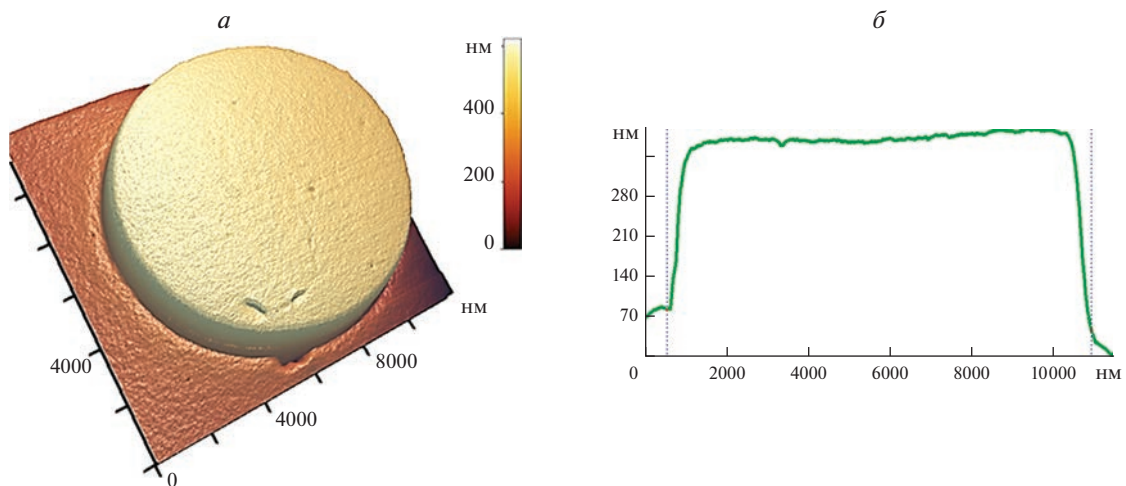


Рис. 3. АСМ-изображение планоцита в формате 3D в остаточной пуповинной крови (а) и его боковое сечение (профиль, б). Здесь и на рис. 4–6: изображение получено на воздухе в полуконтактном режиме сканирования; размер участка 10×10 мкм.

На 7-е сут жизни, когда заканчивается ранний неонатальный период, у детей группы А происходят статистически значимые изменения количественного распределения морфологических форм эритроцитов ($p < 0.05$) (по сравнению с ОПК и сроком 7 ч после рождения): уменьшается число планоцитов, увеличивается число дискоцитов и нарастает стоматоцитоз, количество эхиноцитов и других клеток не изменяется. В группе Б тоже изменяется состав форм эритроцитов ($p < 0.05$): увеличивается число дискоцитов

и уменьшается число эхиноцитов, но происходит снижение числа планоцитов и нарастание стоматоцитоза ($p < 0.05$). Таким образом, к концу неонатального периода планоциты и стоматоциты становятся основными формами эритроцитов в обеих группах, но в группе А стоматоцитоз выше, чем в группе Б ($p < 0.05$).

На рис. 6а представлен эритроцит 7-суточного новорожденного, не входящий в общепринятую классификацию эритроцитов. Диаметр эритроцита

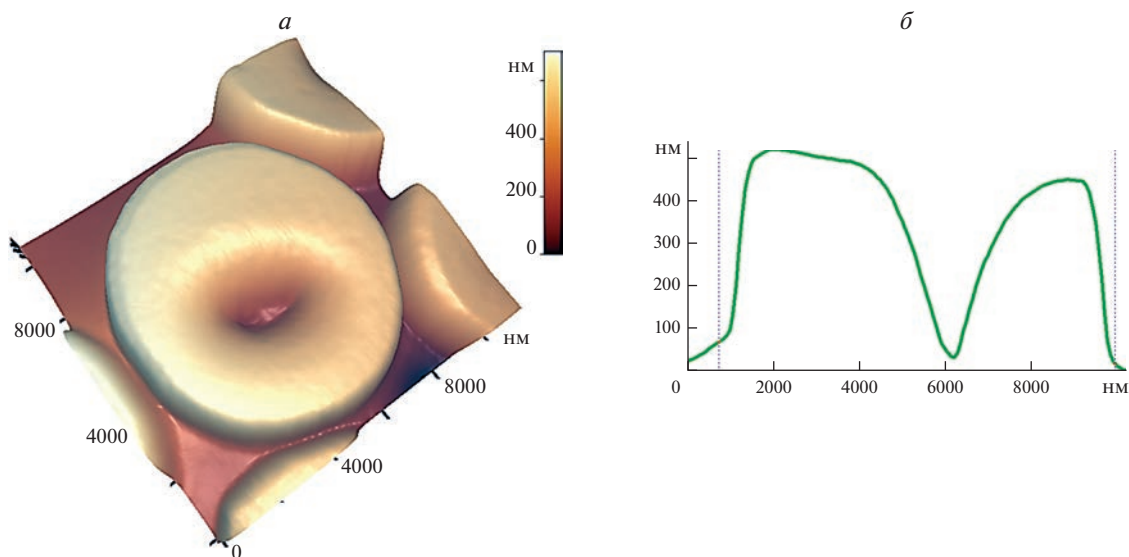


Рис. 4. АСМ-изображение стоматоцита в формате 3D в остаточной пуповинной крови (а) и его боковое сечение (профиль, б).

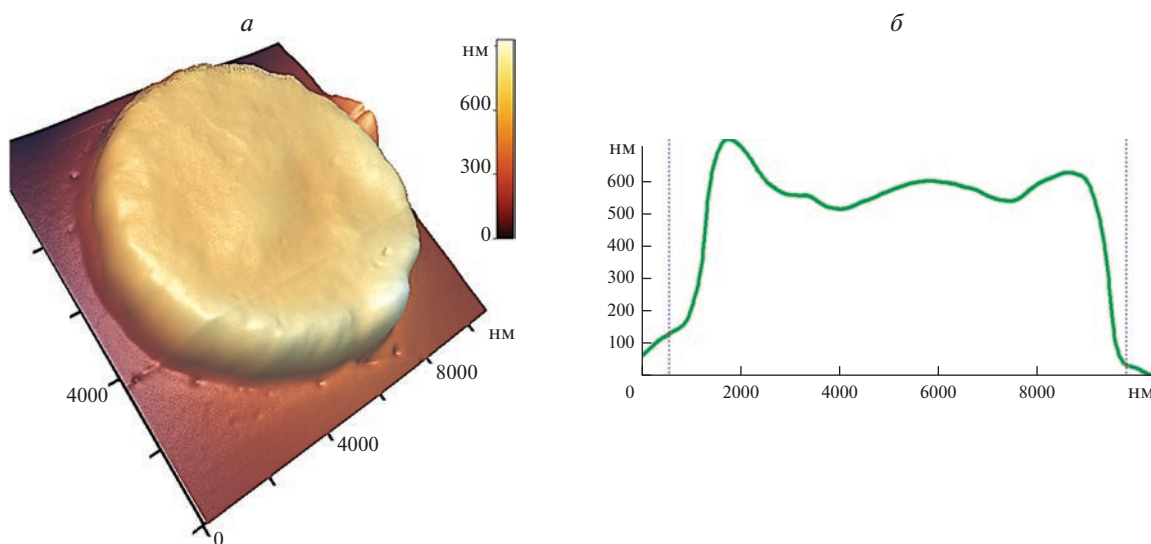


Рис. 5. АСМ-изображение кодоцита в формате 3D в остаточной пуповинной крови (а) и его боковое сечение (профиль, б).

составляет 8496 ± 280 нм, а высота — 513 ± 35 нм. На профиле (рис. 6б) видно, что клетка имеет смещенную к периферии впадину, занимающую примерно 1/3 поверхности, глубиной до 180 ± 37 нм.

Получены количественные характеристики h_i (высоты h_1 и h_2) поверхности мембраны эритроцитов (рис. 7) с помощью пространственного преобразования Фурье. Установлено, что при рождении у новорожденных группы А, по сравнению с новорожденными группы Б, высота h_1 , отражающая изменение колебания поверхности мембран, то есть мембранный фликкеринг, статистически значимо выше ($p < 0.05$). Через 7 ч после рождения в обеих группах происхо-

дил рост высоты h_1 ($p < 0.05$). В группе А ее величина увеличилась в 1.3 раза, в группе Б — в 1.4 раза ($p < 0.05$). На 7-е сут у пациентов обеих групп высота h_1 не изменилась, по сравнению с предыдущим периодом исследования, но ее величина в группе А была статистически значимо выше, чем в группе Б ($p < 0.05$).

При изучении показателя h_2 (рис. 7), отражающего изменение цитоскелета эритроцитов (Kozlova et al., 2013), установлено, что в остаточной пуповинной крови детей группы А его величина выше, чем в группе Б ($p < 0.05$). На 7-е сут у пациентов обеих групп высота h_2 не изменилась по сравнению с предыдущим периодом исследования, но ее величина

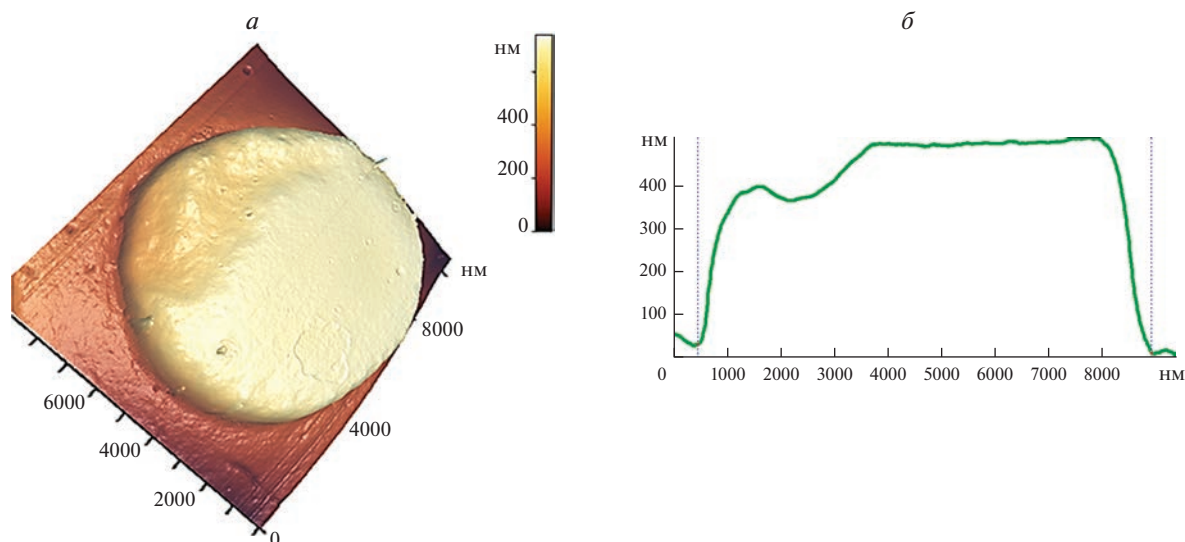


Рис. 6. АСМ-изображение эритроцита, относящегося к категории “другие формы” в формате 3D в венозной крови на 7 сут жизни ребенка (а) и его боковое сечение (профиль, б).

на в группе А, по сравнению с группой Б, была статистически значимо выше ($p < 0.05$).

В первые часы после рождения на мембране эритроцитов происходят активные процессы, обусловленные постнатальной перестройкой организма ребенка, что проявляется статистически значимым увеличением высот h_1 и h_2 . В процесс постнатальной клеточной адаптации вовлечены два параметра структуры мембраны эритроцитов – это фликкеринг мембраны и цитоскелет. В группе А этот процесс наиболее выражен, т.к. уже при рождении обнаруживаются статистически значимые различия по исследуемым показателям; выявленные изменения обусловлены влиянием ацидоза на мембрану эритроцитов (табл. 1). К окончанию раннего неонатального периода снижения h_1 и h_2 не происходит.

В нормальном физиологическом состоянии организма соотношение морфологических форм эритроцитов постоянно, но многие экзогенные и эндогенные факторы, при воздействии которых изменяется гомеостаз, приводят к активации процессов на мембране и появлению других морфологических форм эритроцитов. Нарушение электролитного состава крови, в частности гипонатриемия, гипохлоремия, ацидоз и гипохолестеринемия вызывают дисбаланс между липидными, белковыми компонентами мембраны и белками цитоскелета, что приводит к трансформации дискоцитов и появлению стоматоцитов; гипернатриемия, гиперхлоремия, алкалоз, гиперхолестеринемия, снижение содержания аденозинтрифосфата – к появлению эхиноцитоза (Tachev et al., 2004; Rudenko, 2010; Geekiyanage et al., 2019). В большинстве случаев, когда гомеостаз крови быстро нор-

мализуется, эта трансформация носит обратимый характер (Geekiyanage et al., 2019). В работе Руденко (Rudenko, 2010) показано, что морфологические изменения эритроцитов представляют собой трехфазную последовательность, включающую превращение дискоцитов в эхиноциты и стоматоциты, или двухфазную модель: дискоцит → эхиноцит, дискоцит → стоматоцит, т.е. изменения варьируют между

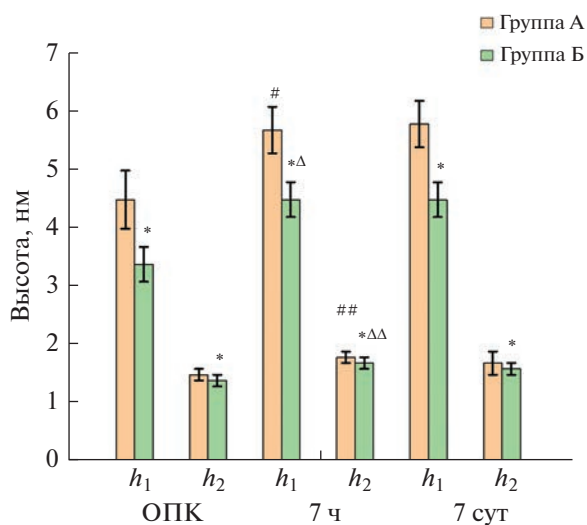


Рис. 7. Гистограммы высот h_1 и h_2 поверхности мембраны эритроцитов в остаточной пуповинной крови (ОПК) новорожденных групп А и Б сразу после рождения и через 7 ч и 7 сут после рождения. Различия достоверны при $p < 0.05$: (*) – между группами А и Б; (# и ##) – в группе А между ОПК и через 7 ч после рождения для h_1 и h_2 соответственно; (Δ и ΔΔ) – в группе Б между ОПК и сроком 7 ч после рождения для h_1 и h_2 соответственно.

тремя основными формами. Этот процесс, в первую очередь, зависит от изменений рН крови (Rudenko, 2010).

Нарушения маточно-плацентарного и плодово-плацентарного кровообращения приводят к антенатальному изменению гомеостаза и кислородного баланса, появлению ацидоза у плодов (Dodd et al., 2017; O'Sullivan et al., 2019), который является маркером степени тяжести перинатальной гипоксии у новорожденных в раннем неонатальном периоде (Perrone et al., 2012). Пусковым моментом выявленных изменений морфологии и структуры мембран эритроцитов являлась гипоксия, при которой уже антенатально происходят нарушения структуры мембран эритроцитов.

При рождении в остаточной пуповинной крови определяются изменения, характеризующие степень выраженности ацидоза (по величине рН) и полиморфизм эритроцитов. У детей, имеющих низкое значение рН крови, основные морфологические формы эритроцитов – это планоциты и стоматоциты, но количество последних позволяет нам говорить о значимом стоматоцитозе. Течение раннего неонатального периода у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, характеризовалось выраженным пойкилоцитозом, нестабильностью мембран эритроцитов, которые проявлялись изменениями высот h_1 и h_2 , отражающие мембранный фликкеринг и изгибы цитоскелета. Такая приспособительная реакция, вероятно, обеспечивает сохранение функциональной способности эритроцита при гипоксии.

Период ранней адаптации новорожденных характеризовался нестабильностью высот h_1 и h_2 мембраны эритроцитов, вариабельностью морфологических форм на протяжении всего неонатального периода. К окончанию раннего неонатального периода у новорожденных обеих групп состав морфологических форм эритроцитов мало отличается. Количество планоцитов уменьшается, появляются дискоциты, но сохраняется стоматоцитоз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ацидоз, как проявление перинатальной гипоксии, оказывает воздействие на мембрану эритроцитов новорожденных. Проявление адаптационных изменений в виде изменения высот и пространственных периодов поверхностей мембран эритроцитов служит ответной реакцией на возникшие изменения кислотно-основного состояния крови. Вероятно, стремление клеток сохранить свои функциональные способности является приспособительной реакцией.

Течение раннего периода адаптации у детей, перенесших гипоксию, характеризуется большой ва-

риабельностью морфологических форм, уменьшением количества планоцитов и появлением большого количества измененных и переходных форм эритроцитов. Выявленные изменения свидетельствуют об активности процессов на мембране эритроцитов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания № FZWM-2020-0010 Балтийского федерального университета им. И. Канта и Государственного задания № FGWS-2021-0003 Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии им. В.А. Неговского (Москва).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было одобрено Этическим комитетом Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (протокол № 2/20 от 10.06.2020) и Независимым этическим комитетом Центра клинических исследований ФГАОУ ВО “БФУ им. И. Канта” (выписка из Протокола заседания НЭК № 14 от 27.10.2020 г.) и выполнено в ГБУЗ “Родильный дом Калининградской области № 1”. Забор крови осуществляли сотрудники отделения реанимации новорожденных в рамках запланированного клинического обследования. Дополнительного забора крови не производили. Информированное согласие законных представителей ребенка на проведение медицинских манипуляций и исследования находится в истории развития новорожденного. Все стадии исследования соответствуют законодательству Российской Федерации, международным этическим нормам и нормативным документам исследовательских организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белевич Е.И., Костин Д.Г., Слобожанина Е.И. 2015. Активность каспазы-3 в эритроцитах человека при окислительном стрессе. Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биол. наук. № 2. С. 34. (Bialevich E.I., Kostin D.G., Slobozhanina E.I. 2015. Caspase-3 activity in human erythrocytes under oxidative stress. Izvestiya Nacional'noy Akademii Nauk Belarusi. Seriya boil. Nauk. № 2. P. 34.)
- Ващенко В.И., Вильянинов В.Н. 2019. Эриптоз (квазиаптоз) эритроцитов человека и его роль в лекарственной терапии. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. Т. 17. № 3. С. 5. (Vaschenko V.I., Vil'yaninov V.N. 2019. Eryptosis (quasi-apoptosis) of the human red blood cells. Its role in medicinal therapy. Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. V. 17.

- P. 5.)
<https://doi.org/10.17816/RCF1735-38>
- Володин Н.Н. 2019. Неонатология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа. (Volodin N.N. 2019. Neonatology: National guidelines. Short edition. M.: GEOTAR-Media.)
- Кононенко В.Л. 2009. Фликкер эритроцитов. 1. Теоретические модели и методы регистрации. Биологические мембраны. Т. 26. № 5. С. 352. (Kononenko V.L. 2009. Red blood cell flicker. 1. Theoretical models and methods of registration. Biol. membranes. V. 26. № 5. P. 352)
- Льюис С.М., Бэйн Б., Бэйтс И. 2009. Практическая и лабораторная гематология. М.: ГЭОТАР-МЕД. (L'juis S.M., Bjejn B., Bjejts I. 2006. Practical gematology. Churchill Livingstone.)
- Мельченко Е.А. 2015. Применение атомно-силовой микроскопии при исследовании биофизических свойств мембран эритроцитов. Наука. Инновации. Технологии. № 3. С. 131. (Melchenko E.A. 2015. Application of atomic-power microscopy at research of biophysical properties of red blood cells membranes. Science. Innovations. Technologies. № 3. P. 131)
- Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В., Кузовлев А.Н., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Черныш А.М. 2012. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях. Общая реаниматология. Т. 8. № 1. С. 52. (Moroz V.V., Golubev A.M., Afanasyev A.V., Kuzovlev A.N., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Chernysh A.M. 2012. Stroenie i funktsiya eritrotsita v norme i pri kriticheskikh sostoyaniyah. Obshchaya Reanimatologiya. V. 8. P. 52.)
- Мушкambarов Н.Н., Кузнецов С.Л. 2007. Молекулярная биология. Учебное пособие для студентов мед. вузов. М.: ООО Медицинское информационное агентство. (Mushkambarov N.N., Kuznetsov S.L. 2007. Molecular biology. Study guide for medical students. Moscow: Med. Inform. Agency.)
- Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Быстрицкий Л.Д., Ткаченко С.Б. 2003. Клинический патоморфоз эритроцита: Атлас. Томск. (Novitskiy V.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A., Bystritskiy L.D., Tkachenko S.B. 2003. Clinical erythrocyte pathomorphosis. Atlas. Tomsk.)
- Перепелица С.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е. 2014а. Состояние мембраны эритроцитов недоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде. Общая реаниматология. Т. 10. № 6. С. 46. (Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E. 2014a. The red blood cell membrane of preterm infants in the early neonatal period. Obshchaya Reanimatologiya. V. 10. P. 46.)
- Перепелица С.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е. 2017. Влияние перинатальной гипоксии на морфологию эритроцитов у новорожденных. Общая реаниматология. Т. 13. № 2. С. 14. (Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E. 2017. The effect of perinatal hypoxia on red blood cell morphology in newborns. Obshchaya Reanimatologiya. V. 13. P. 14.)
- Перепелица С.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Алексеева С.В. 2014б. Особенности мембран эритроцитов недоношенных новорожденных при многоплодной беременности. Общая реаниматология. Т. 10. № 1. С. 12. (Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Alekseyeva S.V. 2014b. Osobennosti membran eritrotsitov nedonoshennykh novorozhdennykh pri mnogoplodnoy beremennosti. Obshchaya Reanimatologiya. V. 10. P. 12.)
- Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. 2004. Типовые нарушения молекулярной организации мембраны эритроцита при соматической и психической патологии. Успехи физиол. наук. Т. 35. № 1. С. 53. (Ryazantseva N.V., Novitskiy V.V. 2004. Typical disorders in molecular organization of erythrocyte membrane in patient with somatic and mental pathology. Uspekhi Physiol. Nauk. V. 35. № 1. P. 53.)
- Сергунова В.А., Козлова Е.К., Мягкова Е.А., Черныш А.М. 2015. Измерение упругоэластических свойств мембраны нативных эритроцитов *in vitro*. Общая реаниматология. Т. 11. № 3. С. 39. (Sergunova V.A., Kozlova E.K., Myagkova E.A., Chernysh A.M. 2015. In Vitro measurement of the elastic properties of the native red blood cell membrane. Obshchaya Reanimatologiya V. 11. P. 39.)
- Стародубцева М.Н., Воронаев Е.В., Петренёв Д.Р., Мишурин В.М., Егоренков Н.И. 2015. АСМ-диагностика патологии эритроцитов на основе физико-механического образа клеточной поверхности. Проблемы здоровья и экологии. Т. 44. № 2. С. 99. (Starodubtseva M.N., Voronayev E.V., Petrenyov D.R., Mitsura V.M., Yegorenkov N.I. 2015. AFM diagnostics of red blood cell pathology based on the physical and mechanical image of the cell membrane. Problemy zdorov'â i èkologii V. 44. № 2. P. 99.)
- Трошкина Н.А., Циркин В.И., Дворянский С.А. 2007. Эритроцит: строение и функции его мембраны. Вятский медицинский вестник. Т. 3. № 2. С. 32. (Troshkina N.A., Tsirkin V.I., Dvoryanskiy S.A. 2007. Erythrocyte: membrane structure and function. Vyatka Medical Bulletin. V. 3. № 2. P. 32.)
- Хадарцев А.А., Наумова Э.М., Валентинов Б.Г., Рогачев Р.В. 2022. Эритроциты и окислительный стресс. Вестник новых медицинских технологий. Т. 29. № 1. С. 93. (Khadartsev A.A., Naumova E.M., Valentinov B.G., Grachev R.V. 2022. Erythrocytes and oxidative stress (literature review). J. New Medical Technol. V. 29. P. 93.)
- Шерстюкова Е.А., Иноземцев В.А., Козлов А.П., Гудкова О.Е., Сергунова В.А. 2021. Атомно-силовая микроскопия в оценке механических свойств мембран эритроцитов при воздействии различных физико-химических агентов. Альманах клинической медицины. Т. 49. № 6. С. 427. (Sherstyukova E.A., Inozemtsev V.A., Kozlov A.P., Gudkova O.E., Sergunova V.A. 2021. Atomic force microscopy in the assessment of erythrocyte membrane mechanical properties with exposure to various physicochemical agents. Almanac Clinical Med. V. 49. P. 427.)
- Чайка Н.А., Данилова Л.А., Литвиненко Л.А. 2019. Преэклампсия и здоровье новорожденных. Медицина: теория и практика. № 4. С. 593. (Chajka N.A., Danilova L.A., Litvinenko L.A. 2019. Prejeklampsija i zdorov'e novoro-zhdennyh. Medicina: teorija i praktika. 2019. № 4. P. 593.)
- Чумакова С.П., Уразова О.И., Зима А.П., Новицкий В.В. 2018. Особенности физиологии эритроцитов. Гемолиз и эриптоз. Гематология и трансфузиология. Т. 63. № 4. С. 343. (Chumakova S.P., Urazova O.I., Zima A.P., Novitskiy V.V. 2018. Features of the physiology of erythrocytes.

- Hemolysis and eryptosis. *Hematology and Transfusiology*. V. 63. P. 343.)
- Binnig G., Quate C.F., Gerber C. 1986. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* V. 56. P. 93.
- Demchenkov E.L., Nagdalian A.A., Budkevich R.O., Oboturova N.P., Okolelova A.I. 2020. Usage of atomic force microscopy for detection of the damaging effect of CdCl₂ on red blood cells membrane. *Ecotoxicol Environ. Saf.* 208. P. 111683.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111683>
- Dodd J.M., Grivell R.M., O'Brien C.M., Dowsell T., Deussen A.R. 2017. Prenatal administration of progestogens for preventing spontaneous preterm birth in women with a multiple pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* V. 2017. № 10. P. D012024.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD012024.pub2>
- Geekiyange N.M., Balanant M.A., Sauret E., Saha S., Flower R., Lim C.T., Gu Y.T. 2019. A coarse-grained red blood cell membrane model to study stomatocyte-discocyte-echinocyte morphologies. *PLoS One*. V. 14. P. e0215447.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215447>
- Jaferzadeh K., Sim M., Kim N., Moon I. 2019. Quantitative analysis of three-dimensional morphology and membrane dynamics of red blood cells during temperature elevation. *Scientific Reports*. V. 9. P. 1.
- Kamruzzahan A.S.M., Kienberger F., Stroh C.M., Berg J., Huss R., Ebner A., Zhu R., Rankl C., Gruber H.J., Hinterdorfer P. 2004. Imaging morphological details and pathological differences of red blood cells using tapping-mode AFM. *Biol. Chem.* V. 385. P. 955.
- Kim Y., Park J., Kim M. 2017. Diagnostic approaches for inherited hemolytic anemia in the genetic era. *Blood Res.* V. 52. P. 84.
- Kodippili G.C., Spector J., Sullivan C. 2009. Imaging of the diffusion of single band 3 molecules on normal and mutant erythrocytes. *Blood*. V. 113. P. 6237.
- Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N. 2013. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron*. V. 44. P. 218.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.06.012>
- Kozlova E., Chernysh A., Sergunova V., Gudkova O., Manchenko E., Kozlov A. 2018. Atomic force microscopy study of red blood cell membrane nanostructure during oxidation-reduction processes. *Journal of Molecular Recognition*. V. 31. № 10. P. 2724.
<https://doi.org/10.1002/jmr.2724>
- Kozlova E., Chernysh A., Sergunova V., Manchenko E., Moroz V., Kozlov A. 2019. Conformational distortions of the red blood cell spectrin matrix nanostructure in response to temperature changes *in vitro*. *Scanning*. V. 2019. P. 8218912.
<https://doi.org/10.1155/2019/8218912>
- Lim H.W.G., Wortis M., Mukhopadhyay R. 2009. Red blood cell shapes and shape transformations. Newtonian mechanics of a composite membrane. Sections 2.5–2.8. In: *Soft Matter*. Hoboken: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. P. 83.
<https://doi.org/10.1002/9783527623372.ch2a>
- Niece K.L., Boyd N.K., Akers K.S. 2015. *In vitro* study of the variable effects of proton pump inhibitors on voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* V. 59. P. 5548.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00884-15>
- Perrone S., Tataranno M.L., Stazzoni G., Del Vecchio A., Buonocore G. 2012. Oxidative injury in neonatal erythrocytes. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* V. 25 P. 104.
- O'Sullivan M.P., Looney A.M., Moloney G.M., FINDER M., Hallberg B., Clarke G., Boylan G.B., Murray D.M. 2019. Validation of altered umbilical cord blood microRNA Expression in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *JAMA Neurol.* V. 76. P. 333.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.4182>
- Revin V.V., Gromova N.V., Revina E.S., Prosnikova K.V., Revina N.V., Bochkareva S.S., Stepushkina O.G., Grunushkin I.P., Tairova M.R., Incina V. 2019. I. Effects of polyphenol compounds and nitrogen oxide donors on lipid oxidation, membrane-skeletal proteins, and erythrocyte structure under hypoxia. *BioMed. Res. Int.* 2019. Article ID 6758017.
<https://doi.org/10.1155/2019/6758017>
- Rudenko S.V. 2010. Erythrocyte morphological states, phases, transitions and trajectories. *Biochim. Biophys. Acta—Biomembranes*. V. 1798. P. 1767.
- Sergunova V., Leesment S., Kozlov A., Inozemtsev V., Platitsina P., Lyapunova S., Onufrievich A., Polyakov V., Sherstyukova E. 2022. Investigation of red blood cells by atomic force microscopy. *Sensors (Basel)*. V. 22. P. 2055.
<https://doi.org/10.3390/s22052055>
- Shankaran S. 2015. Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy. *Curr. Opin. Pediatr.* V. 2. P. 152.
- Starodubtseva M.N., Karachrysafti S., Shklierava N.M., Chelnokova I.A., Kavvadas D., Papadopoulou K., Samara P., Pappaliagkas, Sioga A., Komnenou A., Karampatakis V., Pampitsou T. 2022. The Effects of intravitreal administration of antifungal drugs on the structure and mechanical properties peripheral blood erythrocyte surface in rabbits. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. P. 10464.
<https://doi.org/10.3390/ijms231810464>
- Steiner L.A., Gallagher P.G. 2007. Erythrocyte disorders in the perinatal period. *Semin. Perinatol.* V. 31 P. 254.
- Tachev K.D., Danov K.D., Kralchevsky P.A. 2004. On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*. V. 34. P. 123.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.12.011>
- Zhang Y., Zhang W., Wang S., Wang C., Xie J., Chen X., Xu Y., Mao P. 2012. Detection of erythrocytes in patients with multiple myeloma using atomic force microscopy. *Scanning*. V. 34. P. 295.
- Zhong Q., Inniss D., Kjoller K., Elings V. 1993. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science Letters*. V. 290. P. 688.

Morphological Changes of Erythrocytes in Neonates with Perinatal Hypoxia

O. D. Denisenko^{a, *}, S. A. Perepelitsa^{a, b}, V. A. Sergunova^b, S. S. Lyapunova^b, and L. S. Litvinova^a

^a*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236016 Russia*

^b*Negovsky Research Institute of General Resuscitation Federal Scientific, Clinical Center for Resuscitation and Rehabilitology, Moscow, 107031 Russia*

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

Despite active research on the functional properties of erythrocytes under pathological conditions, this problem is of great importance. One of the causes of fetal and neonatal distress is hypoxia. The consequences of the negative effects of oxygen deficiency on the embryo and fetus can manifest both in utero and after birth, leading to various diseases. The aim of this work is to investigate the effects of acidosis as a marker of perinatal hypoxia on the erythrocyte membrane of newborns in the early neonatal period. The use of an atomic force microscope made it possible to obtain images and cell profiles to assess the morphological and structural characteristics of erythrocytes during hypoxia in children in the early neonatal period. Perinatal hypoxia has been shown to alter erythrocyte morphology and damage membrane structure. The early neonatal period is characterized by changes in the morphological forms and instability of erythrocyte membranes.

Keywords: neonates, perinatal hypoxia, erythrocyte membrane, erythrocyte morphology

ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭОЗИНОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЕНОТОВИДНЫХ СОБАК *Nyctereutes procyonoides* (GREY, 1834)

© 2023 г. С. Н. Калинина¹*, А. Г. Кижина¹, В. А. Илюха¹

¹Институт биологии Карельского научного центра РАН, ФИЦ “КарНЦ РАН”, Петрозаводск, 185910 Россия

*E-mail: cvetnick@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.02.2023 г.

После доработки 12.03.2023 г.

Принята к публикации 13.03.2023 г.

Цель исследования заключалась в анализе особенностей морфологии и морфометрических параметров эозинофилов и их гранул у енотовидных собак *Nyctereutes procyonoides* (Grey, 1834). На мазках крови, окрашенных по Паппенгейму, определяли состав лейкоцитарной формулы, оценивали особенности морфологии и морфометрические параметры эозинофилов и их гранул. Цитохимическими методами выявляли локализацию катионных белков, а также эозинофильной пероксидазы в эозинофилах. Для оценки влияния пола применяли ANOVA. В результате исследования установлено, что для енотовидных собак характерно высокое относительное содержание эозинофилов (7–10% от общей популяции лейкоцитов), а также наличие в них крупных секреторных гранул. На мазках крови, наряду с эозинофилами с типичной богатой зернистостью цитоплазмы, присутствовали более крупные клетки, содержавшие секреторные гранулы в небольшом количестве, а также в некоторых случаях вакуолеподобные гранулы. Влияние пола выразилось в более высокой доле эозинофилов с низким уровнем зернистости цитоплазмы у самцов по сравнению с самками, тогда как у самок обнаружены более высокие значения морфометрических показателей (числа и средней площади гранул в одной клетке, а также соотношения площади, занимаемой гранулами, к площади клетки). Поскольку причины появления эозинофилов с низким содержанием гранул, а также с вакуолизацией цитоплазмы у енотовидных собак не до конца ясны, существует необходимость в дальнейших исследованиях этого вопроса.

Ключевые слова: эозинофилы, гранулы, вакуоли, енотовидная собака

DOI: 10.31857/S0041377123040077, EDN: ZHIBRP

Эозинофильные гранулоциты представляют собой группу лейкоцитов, функции которых традиционно рассматриваются в связи с паразитарными и аллергическими (астматическими) иммунными реакциями (Rodrigo-Muñoz et al., 2021). Благодаря значительному распределению в тканях и способности вырабатывать ряд иммунных медиаторов, эозинофилы являются многофункциональными лейкоцитами, участвующими в поддержании гомеостаза и развитии воспаления (Rodrigo-Muñoz et al., 2021). За счет поверхностных рецепторов эозинофилы способны реагировать на различные стимулы, высвобождая содержимое специфических гранул (Melo, Weller, 2018; Fettrelet et al., 2021).

Каждая гранула окружена мембраной и содержит катионные белки (КБ), среди которых главный щелочной белок МВР-1 (major basic protein 1) составляет кристаллоид (электронно-плотное вещество), а эозинофильный катионный протеин, эозинофильный нейротоксин и эозинофильная пероксидаза (ЭПО) являются компонентами менее плотного материала или матрикса, окружающего кристаллоид (Abu-Ghazaleh et al., 1992). МВР-1 содержит большое количество аргинина, что обуславливает эозинофилию гранул. Активация эозинофилов под влиянием разного рода стимулов может приводить к дегрануляции и изменениям морфологии клетки (размеры клетки, гранул, и т.п.) (Newsome, Ebeigbe, 1991; Melo, Weller, 2018).

Актуальность исследования продиктована недостаточной изученностью морфологии и физиологии эозинофилов млекопитающих (Узенбаева и др., 2007; Минзюк и др., 2015). Эозинофильные гранулоциты являются гетерогенной популяцией по плотностным характеристикам (Prin et al., 1983; Анаев, 2002; Бондарь и др., 2011). В клетках пониженной

Принятые сокращения: ВГ – вакуолеподобные гранулы; ВЭ – вакуолизованные эозинофилы; Г-1, Г-2 – типы гранул эозинофилов; КБ – катионные белки; ЭПО – эозинофильная пероксидаза; Э-I, Э-II – типы эозинофилов; CF pull – мыши с дефицитом цистатина F; МВР-1 – главный щелочной белок (major basic protein 1).

плотности (активных) по сравнению с эозинофилами нормальной плотности число гранул значительно снижено, клетки вакуолизированы. Механизм синтеза и дифференцировки низкоплотностных эозинофилов неизвестен. В норме у человека доля эозинофилов низкой плотности (активных клеток) не превышает 10–20%, тогда как при патологических состояниях она увеличивается до 35–65–90% (Анаев, 2002). Низкое число эозинофилов (1–6% от общей популяции лейкоцитов) в периферической крови человека и млекопитающих является препятствием для исследований функций этих клеток.

Удачную экспериментальную модель в исследованиях морфологии и физиологии эозинофилов может представлять собой енотовидная собака *Nyctereutes procyonoides* (Grey, 1834) – всеядный хищник семейства псовых родом из Восточной Азии. Для этого вида животных по сравнению с таксономически близкими видами (лисица *Vulpes vulpes* и песец *V. lagopus* из семейства Canidae отряда хищников Carnivora) характерно довольно высокое число лейкоцитов, высокое относительное содержание эозинофилов, а также наличие в них крупных секреторных гранул (Узенбаева и др., 2007; Nowakowicz-Dębek et al., 2013).

В связи с вышесказанным, цель исследования заключалась в анализе особенностей морфологии и морфометрических параметров эозинофилов и их гранул у енотовидных собак.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объекты исследования. В работе использовали неполовозрелых самцов ($n = 3$) и самок ($n = 3$) енотовидной собаки (*Nyctereutes procyonoides* Grey, 1834), содержащиеся в условиях звероводческой фермы. Животные получали рацион, согласно рекомендациям для этого вида, и воду *ad libitum*. Кровь брали в ноябре из бедренной вены в утренние часы до кормления животных.

Реактивы. Использовали краситель-фиксатор эозин-метиленовый синий Мая-Грюнвальда и краситель азур-эозин по Романовскому (Минимед, Россия); о-толидин (MP Biomedicals, США); перекись водорода, сульфосалициловую кислоту, бромфеноловый синий, борную кислоту и тетраборнокислый натрий (НеваРеактив, Россия).

Окрашивание мазков крови по Паппенгейму. На свежеприготовленный и высушенный мазок крови наносили 10–15 капель готового красителя-фиксатора эозин-метиленового синего Мая-Грюнвальда (Минимед, Россия), через 3 мин по каплям наносили такой же объем воды и продолжали окрашивание еще 1 мин. Затем краситель смывали водой, а мазок высушивали на воздухе. Затем на высушенный мазок наливали свежеприготовленный раствор красителя Романовского (2 капли готового красителя азур-эозина по Романовскому (Минимед, Россия)

на 1 мл дистиллированной воды) на 12–13 мин, смывали водой и высушивали на воздухе.

Окрашивание мазков крови для выявления ЭПО (Хейхоу, Квагино, 1983). Свежеприготовленные и высушенные мазки крови фиксировали 10%-ным раствором формалина в этаноле 30 с и промывали в двух сменах дистиллированной воды. Готовили инкубационную среду: 5 г о-толидина (MP Biomedicals, США) растворяли в 120 мл 96%-ного этанола и добавляли 80 мл дистиллированной воды, далее смесь фильтровали. В полученный фильтрат вносили 3%-ную перекись водорода (готовили из концентрированного раствора перед использованием) из расчета 0.02 мл перекиси на 10 мл фильтрата. Далее мазки инкубировали в течение 7 мин, промывали дистиллированной водой и высушивали.

Окрашивание мазков крови для определения КБ. Использовали описанную методику (Шубич, 1974). Свежеприготовленные и высушенные мазки фиксировали 5%-ным раствором сульфосалициловой кислоты (НеваРеактив, Россия) и промывали в двух сменах дистиллированной воды. Высушенные мазки окрашивали 2 мин в 0.1%-ном растворе бромфенолового синего (НеваРеактив, Россия) в 0.05 М боратном буфере (pH 8.2). После окраски мазки промывали в трех сменах 0.05 М боратного буфера (pH 8.2) по 1–2 мин в каждой и высушивали.

Микроскопия и анализ изображений. Препараты изучали с помощью светового микроскопа AxioScope 40 (Zeiss, Германия) с цветной цифровой видеокамерой и компьютерной системы анализа изображений “Видеотест 4.0” (Россия). Определяли состав лейкоцитарной формулы, оценивали особенности морфологии и морфометрические параметры эозинофилов ($n = 199$) и их гранул ($n = 3628$) (число и среднюю площадь в одной клетке, а также соотношение площади, занимаемой гранулами, к площади клетки).

Статистическая обработка данных включала оценку влияния фактора “пол” с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Поскольку число эозинофилов с низким уровнем грануляции цитоплазмы зависело от пола, тип эозинофила использовался как ковариата при анализе.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Состав лейкоцитов и морфология эозинофилов периферической крови. Результаты исследования представлены в таблицах 1–3. Анализ лейкоцитарной формулы вида показал, что животные обоих полов характеризовались нейтрофильным профилем крови (табл. 1). У енотовидных собак обнаружено достаточно высокое относительное содержание эозинофилов – 7–10%. Клетки имели сегментированное (2–3 доли) ядро с глыбкообразным зрелым хроматином и серо-голубую цитоплазму, содержащую ти-

пичную крупную эозинофильную (при окраске по Паппенгейму) зернистость (рис. 1а).

По морфологическим особенностям можно выделить 2 типа эозинофилов. Тип I (Э-I) составили клетки, в которых свободное от ядра пространство цитоплазмы было полностью занято гранулами (рис. 1а), а к типу II (Э-II) относились более крупные клетки со скудной зернистостью цитоплазмы (рис. 1б, в).

Гранулы эозинофилов визуальнo различались между собой. Одни (Г-1) равномерно окрашивались в розово-красный цвет при окраске по Паппенгейму, в желто-бурый (золотистый) цвет – при окраске на наличие ЭПО и в сине-голубой цвет – при окраске на наличие КБ (рис. 1). Другие гранулы (Г-2) не окрашивались использованными красителями или окрашивались частично (рис. 1в–д). Гранулы второго типа, вакуолеподобные (ВГ), представляли собой структуры округлой формы, сопоставимые по параметрам с типичными эозинофильными гранулами, и располагались в цитоплазме или над ядром (рис. 1в–д). Ядра эозинофилов были без признаков пикноза; мембраны, ограничивающие гранулы, которые не окрашивались использованными красителями, визуализировались (рис. 1в–д).

Влияние пола на лейкоцитарную формулу, на морфологию и морфометрические параметры эозинофилов и их гранул. Не обнаружено влияния пола на относительное содержание эозинофилов в лейкоцитарной формуле (ANOVA, $p < 0.05$). Однако количество клеток с низким уровнем грануляции цитоплазмы (Э-II) различалось между особями разного пола (табл. 1, 2): у самцов такие клетки составляли практически половину всех эозинофилов, тогда как у самок – 23%. Между особями разного пола наблюдали различия числа и средней площади гранул в одной клетке, а также соотношения площади, занимаемой гранулами, к площади клетки (табл. 2, 3). По сравнению с самцами, самки характеризовались более высокими показателями.

ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические особенности эозинофилов и их гранул. Одной из особенностей состава лейкоцитов периферической крови енотовидной собаки является высокое относительное содержание эозинофилов (7–10% от общего числа лейкоцитов), что отмечают и другие авторы (Узенбаева и др., 2007; Nowakowicz-Debek et al., 2013). У человека повышение эозинофилии в крови (более 5%) является признаком эозинофилии и сопровождается многие инфекционные заболевания вирусной и бактериальной этиологии, глистные инвазии, а также аллергические, воспалительные и аутоиммунные процессы (Бондарь, Эльканова, 2014).

Уровень эозинофилов у енотовидной собаки зависит от сезона года (Mustonen et al., 2007), его высокое содержание осенью, возможно, является одной из адаптаций к зимним условиям и отражает усилен-

Таблица 1. Лейкоцитарная формула крови у самцов и самок енотовидных собак

Тип лейкоцитов	Доля лейкоцитов, %	
	самцы (n = 3)	самки (n = 3)
Моноциты	3.00 ± 1.00; 2 (2–5)	6.00 ± 1.53; 5 (4–9)
Лимфоциты	35.00 ± 6.43; 33 (25–47)	30.00 ± 4.04; 27 (25–38)
Палочкоядерные нейтрофилы	1.67 ± 0.67; 1 (1–3)	1.67 ± 0.67; 1 (1–3)
Сегментоядерные нейтрофилы	53.00 ± 4.51; 57 (44–58)	54.00 ± 3.51; 57 (47–58)
Эозинофилы	7.33 ± 0.88; 7 (6–9)	8.33 ± 1.20; 9 (6–10)
Базофилы	0	0

Примечание. Даны средние значения показателя и их ошибки, а также медиана и в скобках минимальное и максимальное значения.

Таблица 2. Морфометрические параметры эозинофилов (Э) и их гранул у енотовидных собак

Показатель	Пол животных	
	самцы (n = 3)	самки (n = 3)
Общее число Э	93 (100%)	96 (100%)
I тип	46 (49.46%)	74 (77.08%)
II тип	47 (50.54%)	22 (22.92%)
Площадь Э, мкм ² (Sэ)		
общая	93.69 ± 1.76	97.81 ± 1.59
I тип	93.17 ± 2.34	95.74 ± 1.84
II тип	97.88 ± 2.06	105.36 ± 3.01
Общее число гранул Г	1619 (100%)	2009 (100%)
1 тип	1405 (86.78%)	1720 (85.61%)
2 тип	214 (13.22%)	289 (14.39%)
Среднее число гранул в 1 Э:		
общее	18.70 ± 0.87	21.02 ± 0.78
1 тип	16.35 ± 0.79	18.00 ± 0.71
2 тип	3.57 ± 0.39	3.66 ± 0.30
Средняя площадь гранул в 1 Э, мкм ² (Sг):		
общее	0.66 ± 0.03	1.13 ± 0.03
1 тип	0.70 ± 0.03	1.21 ± 0.03
2 тип	0.61 ± 0.04	0.98 ± 0.03
Соотношение Sг/Sэ, %:		
общее	0.7 ± 0.04	1.2 ± 0.03
1 тип	0.8 ± 0.04	1.3 ± 0.04
2 тип	0.7 ± 0.04	1.0 ± 0.03

Примечание. Показаны средние значения показателя и их ошибки, а также доля (%) соответствующих клеток (гранул) в скобках.

Таблица 3. Результаты дисперсионного анализа (ANOVA): влияние пола и типа эозинофилов (Э) периферической крови енотовидных собак на исследуемые показатели

Показатель	Фактор	Степень свободы, <i>df</i>	Дисперсия (средний квадрат, <i>MS</i>), <i>S</i> ²	Критерий, <i>F</i>	<i>p</i>
Наличие Э типа II	Пол	1	3.60	16.76	0.0001
Площадь Э	Пол	1	788.33	3.20	0.075
	Тип Э (ковариата)	1	1849.45	7.50	0.0068
Среднее число гранул Г 1 типа (Г-1) в одном Э	Пол	1	121.50	2.53	0.114
	Тип Э (ковариата)	1	678.95	14.12	0.0002
Среднее число гранул Г 2 типа (Г-2) в 1-ом Э	Пол	1	0.037	0.01	0.912
	Тип Э (ковариата)	1	0.005	0.00	0.969
Среднее число гранул обоих типов в 1-ом Э	Пол	1	231.76	4.06	0.045
	Тип Э (ковариата)	1	766.94	13.43	0.0003
Средняя площадь гранул 1 типа (Г-1) в 1-ом Э	Пол	1	11.55	82.46	0.000
	Тип Э (ковариата)	1	0.32	2.32	0.13
Средняя площадь гранул 2 типа (Г-2) в 1-ом Э	Пол	1	3.94	37.28	0.000
	Тип Э (ковариата)	1	0.019	0.18	0.674
Средняя площадь гранул обоих типов в 1-ом Э	Пол	1	9.80	85.07	0.000
	Тип Э (ковариата)	1	0.04	0.35	0.55
Соотношение площади гранул 1 типа (Г-1) к площади Э	Пол	1	0.001	54.40	0.000
	Тип Э (ковариата)	1	0.000	0.00	0.98
Соотношение площади гранул 2 типа (Г-2) к площади Э	Пл	1	0.000	22.68	0.000
	Тип Э (ковариата)	1	0.000	1.76	0.19
Соотношение площади гранул обоих типов к площади Э	Пол	1	0.000	54.54	0.000
	Тип Э (ковариата)	1	0.000	0.66	0.42

Полужирным шрифтом выделены достоверно значимые результаты ($p < 0.05$).

ние иммунореактивности организма и, вероятно, другие изменения системы крови, связанные с зимним сном, характерным для этого вида животных (Узенбаева и др., 2007).

Наряду с высоким относительным содержанием эозинофилов, мы отметили особенности их морфологии. Помимо клеток (Э-I), в которых все свободное от ядра пространство занимали оксифильные гранулы, на мазках периферической крови также присутствовали более крупные эозинофилы (Э-II) с низким уровнем зернистости. Эозинофилы с не-

большим количеством гранул обнаруживаются у людей с транзиторной эозинофилией и рассматриваются как дегранулированные (Tai, Spry, 1976). У детей с эозинофилией инфекционно-аллергического генеза также изменяются морфометрические параметры эозинофилов: доминируют клетки меньших размеров с пикнотичным ядром, дегранулированной вакуолизированной цитоплазмой и низким содержанием КБ (Бондарь, Эльканова, 2014). Процесс дегрануляции эозинофилов является ключевым событием в патологии многих аллергических и неаллергиче-

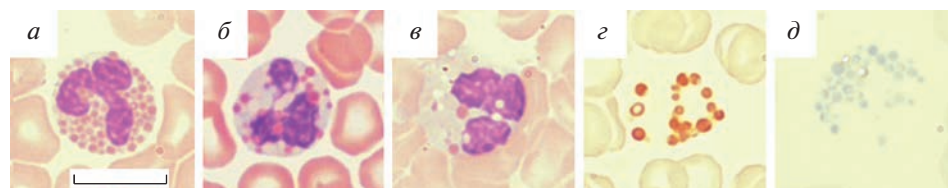


Рис. 1. Эозинофилы енотовидной собаки: *a* – эозинофил I типа (Э-I) с типичными окрашенными эозинофильными гранулами (Г-1), *b* – эозинофил II типа (Э-II) с небольшим количеством типичных эозинофильных гранул (Г-1), *в* – Э-II с типичными эозинофильными (Г-1) и вакуолеподобными (Г-2) гранулами, *г* – Э-II с пероксидазопозитивными (Г-1) и пероксидазонегативными (Г-2) гранулами, *д* – Э-II с позитивной и негативной окраской гранул на наличие КБ. Окрашивание: *a*–*в* – по Паппенгейму, *г* – на наличие ЭПО, *д* – на наличие КБ. Масляная иммерсия. Масштабная линейка: 10 мкм.

ских воспалительных процессов, при которых происходит высвобождение содержимого гранул во внеклеточное пространство после стимуляции эозинофилов (Fettrelet et al., 2021). К настоящему времени определены четыре основных механизма дегрануляции в эозинофилах: фрагментарная дегрануляция, цитолиз, классический и сложный экзоцитоз.

Нами установлено, что в цитоплазме некоторых клеток с низким уровнем зернистости также присутствовали гранулы, которые не окрашивались используемыми красителями. У енотовидных собак это зафиксировано впервые, подобный феномен ранее был обнаружен лишь у некоторых видов животных (кошка, собака (борзые, золотистые ретриверы)) и при эозинофилии у людей (Tai, Spry, 1976, 1981; Iazbik, Couto, 2005; Giori et al., 2011; Holmes et al., 2021). К эозинофилам, содержащим неокрашиваемые гранулы, из-за их сходства с вакуолями, применяют термин “серые” или “вакуолизированные” эозинофилы (ВЭ) (grey or vacuolated eosinophils) (Iazbik, Couto, 2005; Giori et al., 2011; Holmes et al., 2021).

Результаты исследований морфологических особенностей ВЭ свидетельствуют об аномалиях или отсутствии электронно-плотного вещества в ВГ (Denzler et al., 2000; Holmes et al., 2021). Поскольку главным компонентом кристаллоида специфических гранул является MBP-1, морфология ВГ может быть связана с полным отсутствием или низким содержанием этого белка (Melo, Weller, 2018; Holmes et al., 2021). У мышей, нокаутных по гену MBP-1 (MBP-1^{-/-}) гранулы эозинофилов не окрашиваются в характерный розово-красный цвет по методу Райт–Гимза (Wright–Giemsa) (Denzler et al., 2000; Matthews et al., 2016). Еще один белок, цистатин F, важен на этапах созревания эозинофилов, происходящих после высвобождения предшественников этих клеток из костного мозга (Matthews et al., 2016).

Цистатин F крайне необходим для правильного биогенеза гранул, он регулирует активность цистеиновых протеаз гранул, которые, в свою очередь, контролируют процессинг таких компонентов гранул, как MBP-1 и ЭПО. У мышей с дефицитом цистатина F (CF null) снижена продолжительность жизни эозинофилов, а количество нормальных гранул в 4 раза ниже, чем у животных дикого типа; кроме того, у мышей CF null присутствуют аномальные гранулы с электронно-прозрачными периферией и внутренним материалом, иногда конденсированным, но чаще аморфным и бесструктурным (Matthews et al., 2016). У этих животных также наблюдали вакуолеподобные структуры, которые, скорее всего, были либо пустыми гранулами, либо гранулами с недостаточным для обнаружения количеством электронно-плотного материала. В некоторых случаях профили гранул казались неполными, что свидетельствует о высвобождении содержимого гранул в цитозоль.

Гранулы без кристаллоида часто находятся в эозинофилах периферической крови и тканей в тех

случаях, когда наблюдается избыточное производство этих клеток, например, при гиперэозинофильном синдроме (Melo, Weller, 2018). Усиленная продукция эозинофилов может привести к высвобождению из костного мозга клеточной популяции, находящейся в процессе созревания (терминальной дифференцировки) и, следовательно, с заметным количеством незрелых гранул (Melo, 2018). У пациентов с транзиторной эозинофилией наличие вакуолей в эозинофилах достаточно распространено, но при снижении количества клеток до нормальных значений вакуоли не обнаруживаются (Tai, Spry, 1981).

Вакуолизация нормальных эозинофилов может быть индуцирована *in vitro* с помощью конканавалина А (Tai, Spry, 1981). Возможно, эозинофилы, которые содержат вакуоли *in vivo*, реагируют на присутствие мембраноактивирующих веществ.

Влияние пола на морфологические и цитохимические особенности эозинофилов и их гранул. Помимо участия в половой дифференцировке и размножении, половые стероиды (эстрадиол, прогестерон и тестостерон) могут оказывать воздействие на иммунную систему, по-разному влияя на функции практически всех типов иммунных клеток (Morales-Montor et al., 2011). Половые гормоны модулируют самые разные процессы, связанные с иммунным ответом, включая созревание тимоцитов, пролиферацию лимфоцитов, экспрессию молекул и рецепторов главного комплекса гистосовместимости класса II и продукцию цитокинов (Bebo et al., 2001). У самок нескольких видов животных по сравнению с самцами установлены более высокие уровни циркулирующих иммуноглобулинов и более выраженный гуморальный ответ на инфекции (Morales-Montor et al., 2011).

Под влиянием эстрадиола и прогестерона *in vivo* и *in vitro* отмечается усиление дегрануляции эозинофильных лейкоцитов (Tchernitchin et al., 1985), а тестостерон снижает адгезию и жизнеспособность эозинофилов человека (Hamano et al., 1998). В нашем исследовании впервые получены данные, свидетельствующие о половых различиях изученных показателей эозинофилов и их гранул у енотовидной собаки. Эти результаты в настоящее время не могут быть объяснены с точки зрения половых различий иммунной функции, в связи с чем необходимы дальнейшие исследования этого вопроса.

Предполагают, что иммунологическая чувствительность к гормонам могла развиваться в эволюции, как адаптация особей разного пола к инфекциям и для успешной борьбы с ними, но посредством разных механизмов, а также для решения специфических для пола проблем (например, беременность или конкуренция за территории или партнеров) (Morales-Montor et al., 2011). Давление отбора могло вызвать развитие диморфного иммунитета к инфекции и сбалансировать защиту особи от инфекции с успешным размножением и выживанием организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Енотовидные собаки характеризовались высоким относительным содержанием эозинофилов в периферической крови. Эозинофильные лейкоциты различались морфологически: клетки с нормальным высоким, а также клетки с низким уровнем зернистости цитоплазмы. Последние в некоторых случаях содержали ВГ, что зафиксировано у енотовидной собаки впервые. Наличие ВГ связывают с полным отсутствием или значительным снижением содержания МВР-1, главного компонента кристаллоида специфических гранул. Вакуолизация гранул может быть обусловлена дефектами гена, кодирующего этот белок, аномалиями развития эозинофилов, процессами дегрануляции, влиянием мембраноактивирующих веществ, а также незрелостью гранул вследствие высвобождения из костного мозга клеточной популяции, находящейся в процессе созревания (терминальной дифференцировки). Зависимость от пола выражается в более высокой доле эозинофилов с низким уровнем зернистости цитоплазмы у самцов по сравнению с самками, тогда как у самок обнаружены более высокие значения морфометрических показателей (числа и средней площади гранул в одной клетке, соотношения площади, занимаемой гранулами, к площади клетки). Поскольку причины появления эозинофилов с низким уровнем грануляции цитоплазмы у енотовидных собак не до конца ясны, остается необходимость в дальнейших исследованиях этого вопроса.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность и глубокую признательность Л.Б. Узенбаевой (Институт биологии КарНЦ РАН, г. Петрозаводск) за ценные советы и рекомендации при обсуждении результатов исследования, а также Э.Ф. Печориной (Институт биологии КарНЦ РАН, г. Петрозаводск) за помощь в обработке данных.

Лабораторные исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-0003).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтического комитета ИБ КарНЦ РАН (протокол № 1 от 16.01.2023).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анаев Э.Х.* 2002. Эозинофилы и эозинофилии. Атмосфера. Пульмонология, аллергология. Т. 6. № 3. С. 15. (*Анаев Е.Н.* 2002. Eozinofily i eozinofilii. Atmosfera. Pul'monologiya, allergologiya. V. 6. № 3. P. 15.)
- Бондарь Т.П., Ишкова Н.М., Эльканова А.Б.* 2011. Изучение денситометрических характеристик эозинофилов периферической крови при заболеваниях инфекционно-аллергической природы. Наука. Инновации. Технологий. Т. 74. С. 5. (*Bondar' T.P., Ishkova N.M., El'kanova A.B.* 2011. Izuchenie densitometricheskikh harakteristik eozinofilov perifericheskoy krovi pri zabolevaniyah infekcionno-allergicheskoy prirody. Nauka. Innovacii. Tekhnologii. V. 74. P. 5.)
- Бондарь Т.П., Эльканова А.Б.* 2014. Механизм изменения морфофункционального состояния эозинофилов при эозинофилиях различного генеза у детей. Современные проблемы науки и образования. Т. 2. С. 345. (*Bondar' T.P., El'kanova A.B.* 2014. Mekhanizm izmeneniya morfofunkcional'nogo sostoyaniya eozinofilov pri eozinofiliiyah razlichnogo geneza u detej. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya. V. 2. P. 345.)
- Минзюк Т.В., Кавцевич Н.Н., Светочев В.Н.* 2015. Новые данные о клеточном составе крови морского зайца. Доклады РАН. Т. 462. № 6. С. 727. (*Minzyuk T.V., Kavcevich N.N., Svetochev V.N.* 2015. Novye dannye o kletochnom sostave krovi morskogo zaitsa. Doklady RAN. V. 462. № 6. P. 727.)
- Узенбаева Л.Б., Голубева А.Г., Илюха В.А., Тютюнник Н.Н., Коросов С.А.* 2007. Морфофункциональные особенности лейкоцитов млекопитающих, разводимых в неволе в условиях европейского севера. Труды Карельского научного центра Росс. академии наук. Т. 11. С. 109. (*Uzenbaeva L.B., Golubeva A.G., Ilyuha V.A., Tyutyunnik N.N., Korosov S.A.* 2007. Morfofunkcional'nye osobennosti leukocitov mlekopitayushchih, razvodimyh v nevole v usloviyah evropeiskogo severa. Trudy Karel'skogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk. V. 11. P. 109.)
- Хейхоу Ф.Г., Кваглино Д.* 1983. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина. (*Heihou F.G., Kvagliano D.* 1983. Gematologicheskaya tsitohimiya. M.: Medicina.)
- Шубич М.Г.* 1974. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего. Цитология. Т. 16. № 10. С. 1321. (*Shubich M.G.* 1974. Vyyavlenie kationnogo belka v tsitoplazme leukocitov s pomoshch'yu bromfenolovogo sinego. Tsitologiya. V. 16. № 10. P. 1321.)
- Abu-Ghazaleh R.I., Dunnette S.L., Loegering D.A., Checked J.L., Kita H., Thomas L.L., Gleich G.J.* 1992. Eosinophil granule proteins in peripheral blood granulocytes. Journal of leukocyte biology. V. 52. № 6. P. 611.
- Bebo B.F.Jr., Fyfe-Johnson A., Adlard K., Beam A.G., Vandembark A.A., Offner H.* 2001. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. J. Immunol. V. 166. P. 2080.
- Denzler K.L., Farmer S.C., Crosby J.R., Borchers M., Cieslewicz G., Larson K.A., Cormier-Regard S., Lee N.A., Lee J.J.* 2000.

- Eosinophil major basic protein-1 does not contribute to allergen-induced airway pathologies in mouse models of asthma. *J. Immunol.* V. 165. P. 5509.
- Fetteiret T., Gigon L., Karaulov A., Yousefi S., Simon H.U. 2021. The enigma of eosinophil degranulation. *Int. J. Sci.* V. 22. P. 7091.
- Giori L., Gironi S., Scarpa P., Anselmi A., Gualtieri M., Paltrinieri S. 2011. Grey eosinophils in sighthounds: frequency in 3 breeds and comparison of eosinophil counts determined manually and with 2 hematology analyzers. *Vet. Clin. Pathol.* V. 40. P. 475.
- Hamano N., Terada N., Maesako K., Numata T., Konno A. 1998. Effect of sex hormones on eosinophilic inflammation in nasal mucosa. *Allergy Asthma Proc.* V. 19. P. 263.
- Holmes E., Raskin R., McGill P., Szladovits B. 2021. Morphologic, cytochemical, and ultrastructural features of gray eosinophils in nine cats. *Vet. Clin. Pathol.* V. 50. P. 52.
- Iazbik M.C., Couto C.G. 2005. Morphologic characterization of specific granules in Greyhound eosinophils. *Vet. Clin. Pathol.* V. 34. P. 140.
- Matthews S.P., McMillan S.J., Colbert J.D., Lawrence R.A., Watts C. 2016. Cystatin F ensures eosinophil survival by regulating granule biogenesis. *Immunity.* V. 44. P. 795.
- Melo R.C., Weller P.F. 2018. Contemporary understanding of the secretory granules in human eosinophils. *J. Leukocyte Biol.* V. 104. P. 85.
- Morales-Montor J., Togno-Pierce C., Munoz-Cruz S. 2011. Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role. *Current Topics Med. Chem.* V. 11. P. 1714.
- Mustonen A.M., Asikainen J., Aho J., Nieminen P. 2007. Selective seasonal fatty acid accumulation and mobilization in the wild raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*). *Lipids.* V. 42. P. 1155.
- Newsome F.V., Ebeigbe P. 1991. Blood eosinophil degranulation and vacuolation in helminthic infection. *Ann. Tropical Med. Parasitol.* V. 85. P. 239.
- Nowakowicz-Dębek B., Zoń A., Jakubczak A., Wnuk W. 2013. Hematological parameters of wild and farm mink, red fox and raccoon dog. *Med. Wet.* V. 69. P. 40.
- Prin L., Capron M., Tonnel A.B., Bletry O., Capron A. 1983. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils: variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *International Archives of Allergy and Immunology.* V. 72. № 4. P. 336.
- Rodrigo-Muñoz J.M., Gil-Martínez M., Sastre B., del Pozo V. 2021. Emerging Evidence for pleiotropism of eosinophils. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 7075.
- Tai P.C., Spry C.J. 1976. Studies on blood eosinophils. I. Patients with a transient eosinophilia. *Clinical Exper. Immunol.* V. 24. P. 415.
- Tai P.C., Spry C.J.F. 1981. The mechanisms which produce vacuolated and degranulated eosinophils. *British J. Haematol.* V. 49. P. 219.
- Tchernitchin A.N., Barrera J., Arroyo P., Mena M.A., Vilches K., Grunert G. 1985. Degranulatory action of estradiol on blood eosinophil leukocytes *in vivo* and *in vitro*. *Agents Actions.* V. 17. P. 60.

Morphological Features and Morphometric Parameters of Peripheral Blood Eosinophils in Raccoon Dogs *Nyctereutes procyonoides* (Grey, 1834)

S. N. Kalinina^a, *, A. G. Kizhina^a, and V. A. Ilyukha^a

^a*Institute of Biology of the Karelian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences", Petrozavodsk, 185910 Russia*

*e-mail: cvetnick@yandex.ru

The aim of this work was to analyze the morphology and morphometric parameters of peripheral blood eosinophils and eosinophilic granules in raccoon dogs *Nyctereutes procyonoides* (Grey, 1834). On blood smears stained by Pappenheim, the composition of the leukocyte formula was determined, the morphological features and morphometric parameters of eosinophils and their granules were evaluated. Cytochemical methods revealed the localization of peroxidase and cationic proteins in eosinophils. ANOVA was used to assess the effect of sex. As a result of the study, it was found that raccoon dogs are characterized by a high relative content of eosinophils (7–10%), as well as the presence of large secretory granules in them. Along with the common eosinophils, there were cells with abnormal granularity (low number of secretory granules, the presence of vacuole-like granules that did not stain with the dyes used). The influence of sex was expressed in a higher proportion of eosinophils with abnormal granularity in males compared to females, while the latter had higher morphometric parameters (the number and average area of granules in one cell, the ratio of the area occupied by granules to the area of the cell). Since the causes of abnormally granular eosinophils in raccoon dogs are not completely clear, there is a need for further research into this issue.

Keywords: eosinophils, granules, vacuoles, raccoon dog

ПАМЯТИ АЛЕКСЕЯ АНДРЕЕВИЧА ВЕРЕНИНОВА (1932–2022)

DOI: 10.31857/S0041377123040089, EDN: ZHIWEW



5 июля 2022 г. на 91-м году жизни после тяжелой продолжительной болезни скончался Алексей Андреевич Веренинов, доктор биологических наук, руководитель Группы физиологии ионного транспорта в Отделе молекулярной физиологии клетки Института цитологии РАН (ИНЦ РАН, Санкт-Петербург), известный ученый в области физиологии клетки.

Алексей Андреевич всю свою трудовую научную жизнь (65 лет, начиная с 1957 г.) провел в Институте цитологии РАН. Он начинал работу в Лаборатории физиологии клетки, основателями которой были Д.Н. Насонов (первый директор и основатель ИНЦ РАН) и А.С. Трошин. Эту лабораторию после смерти А.С. Трошина Алексей Андреевич возглавил и руководил ею 33 года (1986–2019 гг.).

Исследовательская работа Алексея Андреевича была направлена на изучение природы асимметрич-

ного распределения ионов между цитоплазмой и средой и механизма возникновения разности электрических потенциалов на плазматической мембране. Он занимался фундаментальными вопросами ионного гомеостаза животных клеток – изучением транспорта ионов через плазматическую мембрану клетки, регуляция которого лежит в основе функциональной активности клеток, а ее нарушение может служить первопричиной многих патологий в организме. Блестящий и бескомпромиссный экспериментатор, Алексей Андреевич начинал свою научную работу на одном из классических объектов цитологов того времени – скелетных мышечных волокнах лягушки.

Алексей Андреевич вместе с коллегами разработал комплекс методов, основанных на радиоизотопном и пламенно-эмиссионном анализе, позволяющих на одном объекте одновременно измерять внутриклеточное

содержание основных ионов и оценивать потоки однозарядных ионов через клеточную мембрану. Исследования были сосредоточены на фундаментальных вопросах ионного гомеостаза клеток животных. Результаты многолетней работы нашли свое отражение в монографии “Транспорт ионов через клеточную мембрану. Анализ потоков” (Л.: Наука, 1978. 286 стр.). В этой книге, впервые для своего времени, была представлена обширная сводка данных по концентрационным зависимостям потоков однозарядных ионов в системах переноса через плазматическую мембрану и проведен строгий анализ модели “насос–утечка”. Монография была представлена в качестве кандидатской диссертации, но ВАК присудил Веренинову Алексею Андреевичу сразу степень доктора биологических наук.

Второй значительной работой по исследованию транспорта однозарядных ионов у пролиферирующих клеток стала совместная с И.И. Мараховой книга “Транспорт ионов у клеток в культуре” (Л.: Наука, 1986. 291 стр.), не имевшая аналогов в зарубежной литературе. Книга была выбрана Издательством Regamon Press для издания на английском языке, переведена, но, к сожалению, из-за бюрократических проблем так и не была опубликована за рубежом.

В дальнейшем одним из направлений работы Алексея Андреевича было углубленное исследование транспорта моновалентных ионов при переходе клеток от покоя к пролиферации на модели активируемых лимфоцитов человека, которое включало изучение экспрессии мРНК важнейших ионных транспортеров (ATP1B1, NHE1, NKCC1) параллельно с ключевыми регуляторами клеточной пролиферации (белков Bcl-2, p53 и hSGK). Исследования динамики экспрессии группы мРНК при активации лимфоцитов человека не теряют своей оригинальности как на фоне отечественных работ, так и в сопоставлении с зарубежной литературой. В этих исследованиях предпринята попытка найти узел сигнальной сети, определяющий “групповую” экспрессию мРНК.

Еще одним направлением работы стало изучение сдвигов ионного и водного баланса клеток при апоптозе, проводимое на известной экспериментальной модели апоптоза – лимфоидных клетках человека U937, подвергнутых действию стауроспорина и этопозида. Было выявлено, что апоптоз не всегда сопровождается дегидратацией клеток. Также было установлено, что характерной особенностью “программируемой смерти” клеток следует считать не дегидратационное “сморщивание” клетки (shrinkage), а отсутствие набухания, которое при неспецифическом повреждении клетки приводит к разрывам клеточной мембраны. Количественная оценка изменения содержания внутриклеточных ионов в апоптотических клетках показала, в какой мере изменение

содержания воды в клетке во время апоптоза определяется выходом ионов калия и хлора, поступлением ионов натрия и изменением содержания эндогенных осмолитов.

Основное внимание Алексея Андреевича было направлено на системный анализ баланса потоков моновалентных ионов через плазматическую мембрану в животных клетках. Особое значение в понимании механизмов регуляции объема клетки он придавал математическому моделированию и считал, что в сложной системе взаимозависимостей ионных потоков через клеточную мембрану невозможно получить ответы на многие вопросы без адекватной математической модели. Именно разработку алгоритма расчета баланса потоков основных моновалентных ионов через мембрану животных клеток, учитывающего все основные тракты переноса (Na/K-насос, электродиффузионные каналы и катион-хлоридные котранспортеры) он считал наиболее существенным достижением своей научной деятельности. Предложенный им алгоритм успешно апробирован в экспериментах на лимфоидных клетках и на эритроцитах человека для предсказания динамики изменения баланса потоков однозарядных ионов после выключения Na/K-насоса. Разработанный Алексеем Андреевичем математический аппарат позволяет выявлять роль отдельных трактов в изменении ионного и водного баланса клетки в том или ином процессе, например, при апоптозе или переходе клеток к пролиферации, а также рассчитывать динамику перераспределения однозарядных ионов после изменения параметров систем переноса. Программа расчета потоков моновалентных ионов через плазматическую мембрану с отображением результатов в графическом формате представлена в открытом доступе (<https://vereninov.com/cellionfluxes>) и может быть использована как учебная для демонстрации роли отдельных каналов и транспортеров в регуляции мембранного потенциала и содержания ионов и воды в клетке.

Алексей Андреевич Веренинов был ведущим специалистом в области физиологии клетки и ионного транспорта, автором многих научных трудов, заслуживших мировое признание. Он поддерживал научные контакты со многими зарубежными учеными, принимал участие в международных конференциях, посвященных вопросам регуляции клеточного объема и ионного гомеостаза клеток. 20 января 2022 г. Алексею Андреевичу исполнилось 90 лет. Его зарубежные коллеги посвятили ему небольшую юбилейную online-конференцию. К сожалению, здоровье не позволило Алексею Андреевичу принять участие в этой конференции, но он подготовил материал об итогах своей работы, на публикацию которого он очень надеялся. В настоящее время этот материал принят к публикации в новом журнале “Paracelsus

Proceedings of Experimental Medicine (PPEXMed)” (издается с 2022 г. под редакцией М. Ritter, Германия), в специальном выпуске, посвященном памяти А.А. Веренинова. Этот выпуск журнала включает работы по исследованию роли транспорта ионов в регуляции функциональной активности клеток, включая апоптоз, пролиферацию и дифференцировку клеток.

Алексей Андреевич был ученым-естествоиспытателем, он активно любил природу и в совместных с зоологами экспедициях много путешествовал по стране: он побывал на Дальнем Востоке, Камчатке, Кольском полуострове, в Средней Азии и Приволжье. Бескомпромиссным отношением к главному делу своей жизни — науке — и глубокой любовью к природе Алексей Андреевич всегда стремился поделиться с окружающими, в особенности с молодым

поколением своей большой семьи Верениновых — сыном, племянниками, внуками и правнучками, к которым всегда очень чутко относился.

Алексей Андреевич Веренинов был искренне преданным науке ученым, его работы внесли существенный вклад в исследование фундаментальных вопросов физиологии клетки и надолго останутся востребованными специалистами в этой области. В июне 2021 года, приказом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Алексей Андреевич был награжден медалью “За безупречный труд и отличие”, что в полной мере соответствует его жизненной позиции.

*В.Е. Юринская, И.И. Марахова, И.А. Гамалей,
А.А. Рубашкин, А.В. Мошков, А.Н. Томилин*

In memory of Alexey Andreevich Vereninov (1932–2022)

V. E. Yurinskaya, I. I. Marakhova, I. A. Gamaley, A. A. Rubashkin, A. V. Moshkov, A. N. Tomilin