

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН  
(ИБР РАН)

УДК 576.5

Рег. № ГЗ 0108-2018-0005

Рег. № НИОКТР АААА-А18-118041690131-9



УТВЕРЖДАЮ  
Директор ИБР РАН  
д-р биол. наук, чл.-корр. РАН  
А.В. Васильев

«27» декабря 2018 г.

ОТЧЕТ

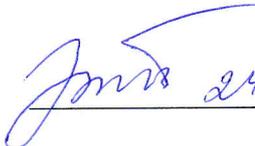
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ  
ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ У НИЗШИХ И ВЫСШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ. ПОИСК  
СПОСОБОВ РЕГУЛЯЦИИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ

по Разделу № 50 «Биология развития и эволюция живых систем»  
Программы фундаментальных научных исследований  
государственных академий наук на 2013-2020 гг.

(заключительный отчет)

Руководитель НИР,  
главный научн. сотр.,  
д-р биол. наук

 Э.Н. Григорян

подпись, дата

Москва 2018

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, главный научный  
сотрудник, доктор биологических наук,

  
подпись, дата

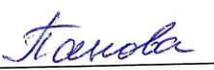
Э.Н. Григорян (Введение,  
раздел 1, 3)  
24.12.2018

Исполнители:  
Старший научный сотрудник, кандидат  
биологических наук

  
подпись, дата

Ю.В. Маркитанова,  
(раздел 1,3)  
24.12.2018

Ведущий научный сотрудник, доктор  
биологических наук

  
подпись, дата

И.Г. Панова (раздел 1)  
24.12.2018

Старший научный сотрудник, кандидат  
биол. наук

  
подпись, дата

В.Н. Смирский (раздел  
1) 24.12.2018

Главный научный сотрудник, доктор биол.  
наук

  
подпись, дата

И.В. Урываева (раздел 2)  
24.12.2018

Старший научный сотрудник, кандидат  
биол. наук

  
подпись, дата

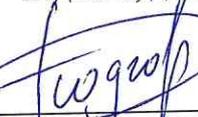
А.С. Микаелян (раздел 2)  
24.12.2018

Научный сотрудник, кандидат биол. наук

  
подпись, дата

Е.А. Радугина (раздел 3)  
24.12.2018

Старший научный сотрудник, кандидат  
биол. наук

  
подпись, дата

О.В. Подгорный (раздел  
4) 24.12.2018

Нормоконтроль, ведущий научный  
сотрудник, к.б.н.

  
подпись, дата

Е.Б. Абрамова  
24.12.2018

## РЕФЕРАТ

Отчет 63 с., 11 рисунков, 1 таблица, 103 используемых источников, 21 публикация по теме.

РЕГЕНЕРАЦИЯ, РАЗВИТИЕ, КАНЦЕРОГЕНЕЗ, ЧЕЛОВЕК, ГРЫЗУНЫ, ХВОСТАТЫЕ АМФИБИИ, МОЗГ, ТКАНИ ГЛАЗА, ПЕЧЕНЬ, МЫШЦЫ, КЛЕТКИ-ИСТОЧНИКИ РЕГЕНЕРАЦИИ, НЕЙРАЛЬНЫЕ ПРОГЕНИТОРЫ, ПЛАСТИЧНОСТЬ КЛЕТОЧНОГО ФЕНОТИПА, ПРОЛИФЕРАЦИЯ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКА, ФАКТОРЫ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА, ГИПОКСИЯ, СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ.

Цель работы - исследование механизмов развития и регенерации тканей глаза, мозга, мышц, а также канцерогенеза печени. Работа выполнена на разработанных нами моделях на низших и высших позвоночных животных с помощью иммунохимических и молекулярных методов. Изучена регуляторная роль ключевых транскрипционных факторов в развитии и регенерации тканей глаза, а также в поддержании и активации «молодого» фенотипа клеток – источников регенерации тканей глаза. Исследованы филогенетическая связь, ткане- и таксон специфическая активность генов семейства Pitx, а также их экспрессия при регенерации сетчатки у амфибий. Выявлен сложный паттерн экспрессии ламининсвязывающих интегринов в ходе формирования хрусталика у мышей. Установлено их участие в раннем морфогенезе хрусталика, а также во время дифференцировки эпителия и волокон ядра хрусталика. В качестве регулятора регенерации предварительно оценено действие секрета - экстрагируемого коктейля факторов тканей глаза тритона, способных к индукции регенераторных ответов в аналогичных тканях глаза грызунов. В тканях глаза плодов человека обнаружены белки, служащие антиоксидантной и иммунной защитой глаза. Исследованы начальные изменения тканей переднего сектора глаза крыс в условиях острой гипобарической гипоксии, обнаружена протекторная роль парааминобензойной кислоты. Завершено изучение регенерации мышц мышей, экспонированных в невесомости в течение 30 дней. На фоне масштабной мышечной атрофии, выявлена активация сателлитных клеток и формирование миобластов, доказано сохранение в условиях невесомости молекулярного механизма активации стволовых клеток и миогенеза. В нише зубчатой извилины гиппокампа мышей определены особенности пролиферации стволовых клеток и их потомков, что дает информацию для поиска способов регуляции регенераторного нейрогенеза у млекопитающих и человека. Исследована экспрессия ряда генов – регуляторов эпителио-мезенхимного перехода и миграции клеток в культурах гепатоцеллюлярной карциномы печени.

## СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	8
РАЗДЕЛ 1. КЛЕТОЧНЫЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА	8
ПОДРАЗДЕЛ 1.1.	8
ПОДРАЗДЕЛ 1.2.	14
ПОДРАЗДЕЛ 1.3.	16
ПОДРАЗДЕЛ 1.4.	20
РАЗДЕЛ 2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ	28
РАЗДЕЛ 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЙ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ У ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ	33
ПОДРАЗДЕЛ 3.1.	33
ПОДРАЗДЕЛ 3.2.	40
РАЗДЕЛ 4. ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ КАСКАД В НИШЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЗУБЧАТОЙ ИЗВИЛИНЫ ГИППОКАМПА	45
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	50
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	52
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ ЗА 2018 ГОД	61

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ:

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

м-РНК - матричная рибонуклеиновая кислота

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РПЭ - ретинальный пигментный эпителий

СТ - стекловидное тело

СК - стволовые клетки

НП - нейральные прогениторы

ТФ - транскрипционные факторы

FGF2 - фактор роста фибробластов 2

АФП - альфа-фетопротеин

СА - сывороточный альбумин

ТФ – транскрипционные факторы

ИГХ – иммуногистохимия

ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома

ЭМП – эпителио-мезенхимный переход

ВКМ – внеклеточный матрикс

ПНЖК - полиненасыщенные жирные кислоты

## ВВЕДЕНИЕ

Исследование механизмов регенерации органов и тканей у позвоночных животных и человека является актуальным, так как дает ключи к управлению этими процессами для восстановления утраченных или поврежденных при травмах и заболеваниях структур организма. В настоящее время исследования регенерации, проводимые в мире, развиваются сразу в нескольких направлениях. Основными являются поиск и изучение клеток - источников для регенерации, широкомасштабное исследование поведения и молекулярно-генетического профиля таких клеток. С учетом этих данных проводится исследование системных организменных и локальных факторов (сигнальных путей, факторов ниш стволовых и прогениторных клеток), способных регулировать поведение клеток - источников регенерации. Такая регуляция предполагает, прежде всего, активацию их регенеративных ответов, а именно - вход в пролиферативную фазу и репрограммирование клеток в заданном направлении. Еще одним существенным разделом современного изучения регенерации является исследование морфогенетических механизмов развития вновь образующейся ткани, а также влияние на этот процесс внешних условий.

Достижения мировой науки в последние годы в области фундаментальных основ регенерации, а также регенеративной медицины, постепенно подводят нас к пониманию ключевых основ многих регенерационных процессов в терминах молекулярной биологии, работы сигнальных путей, экспрессии факторов транскрипции и эпигенетических условий восстановления тканей. Исследования ведутся на различных животных моделях низших и высших позвоночных животных. Особенностью отечественной школы изучения регенерации является ее многолетний опыт в развитии теоретических и экспериментальных подходов, разработке новых животных моделей регенерации, детальное документированное описание морфологии и биохимии различных регенерационных процессов. Это позволило перейти к изучению процессов восстановления с помощью современных методов, дающих информацию о молекулярно-генетических основах выявленных ранее закономерностей и этапов регенерации многих тканей и некоторых органов.

В то же время, это не было бы возможным без параллельного изучения механизмов развития тех же тканей и органов. Известно, что при регенерации воспроизводятся многие, хотя и не все, молекулярные процессы, имеющие место в онтогенезе. Интересной и практически важной задачей при изучении регенерации тканей является сравнительное исследование процессов регенерации и канцерогенеза, а также общности поведения клеток на начальных этапах регенерации и развития патологий при заболеваниях у

человека.

В тему «Клеточные и молекулярные механизмы развития и регенерации тканей и органов у низших и высших позвоночных. Поиск способов регуляции восстановительных процессов» вошли исследования на нескольких моделях:

1) развитие тканей глаза (сетчатки, хрусталика, стекловидного тела) на моделях хвостатых и бесхвостых амфибий, млекопитающих и человека; 2) регенерация сетчатки, хрусталика после их удаления у низших позвоночных (Urodela) и исследование регенеративных ответов потенциальных клеток - источников у грызунов при повреждении тканей глаза *in vivo* и выделенных тканей *in vitro*; 3) модель восполнения клеток мозга за счет стволовых клеток в области гиппокампа мозга у мышей; 4) модель регенерации и канцерогенеза печени у мышей после химического ее повреждения. Для изучения влияния различных физических факторов (тепловой шок, разные дозы гравитации), способных оказать влияние на молекулярный механизм регуляции регенерации применяется модели тканевой (мышцы) у грызунов и эпиморфной регенерации у Urodela. Для изучения влияния гипоксии на ткани глаза применяется модель экспериментально индуцируемой гипоксии у высших позвоночных (грызуны). Разносторонние исследования на разных моделях позволяют решать не только важные частные вопросы, имеющие практическое приложение, но и выявлять общие закономерности молекулярно-генетических аспектов регенерации органов и тканей. Последнее необходимо для разработки биомедицинских подходов для стимуляции регенерации у высших позвоночных и человека, а также коррекции патологических изменений в их тканях в процессе развития.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### РАЗДЕЛ 1. КЛЕТОЧНЫЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

#### ПОДРАЗДЕЛ 1.1. ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ ГЕНОВ МУЛЬТИПОТЕНТНОГО СТАТУСА ЭСК В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ САМООБНОВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ГЛАЗА

##### 1.1.1. ВВЕДЕНИЕ.

Ранее были изучены клеточные механизмы развития и регенерации тканей глаза у позвоночных. Изучены ассоциированные с педоморфозом молекулярно-генетические характеристики пигментного эпителия сетчатки глаза *Urodela* для объяснения высокой способности этих животных к регенерации сетчатки и хрусталика. Выявлены особенности пролиферативной активности и дифференцировки клеток в эмбриональном развитии сетчатки, хрусталика глаза у низших и высших позвоночных, и при регенерации тканей глаза (сетчатки, хрусталика) у низших позвоночных.

В продолжающихся исследованиях молекулярно-генетической регуляции процессов развития/регенерации тканей глаза у низших и высших позвоночных (с использованием указанных моделей), а также глаза человека, определены ключевые регуляторные факторы. Среди них находятся: факторы транскрипции (ТФ), компоненты сигнальных каскадов, участвующие в контроле широкого спектра функций (адгезии клеток к ВКМ, миграции, пролиферации, дифференцировки и естественного репрограммирования). Поддержание пула прогениторных клеток глаза, их дифференцировка у позвоночных, в том числе у человека, естественное репрограммирование при регенерации сетчатки у хвостатых амфибий происходит при участии немногочисленного числа ключевых ТФ, и во многом определяется взаимодействиями основных форм генов со свойственным им специфическим набором изоформ. В исследованиях ткане- и таксонспецифической экспрессии регуляторных генов и их изоформ, проведен филогенетический анализ ключевых генов, участвующих в контроле регенерации сетчатки тритона, и с гомологами у представителей разных таксономических групп. У представителей разных таксономических групп изучена эволюционная взаимосвязь генов (белков) *Pitx1* и *Pitx2*, выявлено наиболее высокое их сходство с одноименными транскриптами и белками у амфибий и птиц.

В сетчатке тритона в условиях 3D-органотипического культивирования, изучена экспрессия гена Pax6, кодирующего фактор транскрипции, функции которого состоят в поддержании мультипотентности и жизнеспособности нейронов.

### 1.1.2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования в работе использованы тритоны, мыши, крысы. Применяли различные способы повреждения тканей глаза (удаление/отслойка сетчатки, удаление хрусталика), с использованием моделей *in vivo* и 3D *in vitro*. Была продолжена молекулярно-генетическая характеристика специфических, ассоциированных с педоморфозом, свойств РПЭ и радужки глаза Urodela, объясняющих высокую способность этих животных к регенерации сетчатки и хрусталика. Экспрессию гена Pax6, кодирующего фактор транскрипции, в сетчатке тритона в условиях 3D-органотипического культивирования, изучали с использованием метода ПЦР реального времени. Биоинформатический анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей регуляторных генов, выявленных в регенерирующих тканях глаза тритона, проводили с использованием пакета программ MEGA X. ПЦР проводили с использованием специфических праймеров и стандартного набора реактивов для амплификации (“Qiagen”, США). Продукты амплификации разделяли электрофорезом в агарозном геле в трис-ЭДТА-боратном буфере в присутствии бромистого этидия. Иммунофлуоресцентный анализ проводили по стандартной методике на криостатных срезах толщиной 14 мкм, фиксированных смесью ацетон–метанол (1:1) при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Использовали вторичные антитела к IgG крысы, конъюгированные с флуорохромом AlexaFluor 568 (“Molecular Probes”, США, 1:200). Ядра клеток окрашивали специфичным для ДНК красителем Draq5 (“Biostatus Limited”, Великобритания, 1:3000). Срезы заключали в забуференный глицерин (90%, трис-HCl буфер, pH 8.0), содержащий 0.1% *p*-фенилендиамина. Иммунофлуоресцентную реакцию анализировали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 (“Carl Zeiss Inc.”, Германия).

### 1.1.3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проанализирован широкий спектр ТФ, работа сигнальных путей, являющихся предпосылкой для регенерации сетчатки и хрусталика у низших позвоночных хвостатых амфибий (Urodela) и объясняющих высокие способности этих животных к полноценной регенерации сетчатки и хрусталика. Получены результаты, дополняющие характеристику

специфических, ассоциированных с пedomорфозом, клеточных и молекулярных свойств РПЭ и радужки глаза у тритонов. В соответствии с ранее полученными данными, особенности экспрессии изученных факторов транскрипции, цитоскелета клеток РПЭ, клеточных контактов и ВКМ, определяют способность к быстрой конверсии фенотипа этих клеток, их репрограммированию *in vivo* (natural reprogramming) в нейральном направлении при регенерации сетчатки у тритонов. Дальнейшая молекулярно-генетическая характеристика свойств клеток РПЭ, необходимых для их репрограммирования, направлена на поиск эффективных подходов для получения регенерационного резерва с заданными свойствами и стимуляции восстановления тканей глаза у высших позвоночных.

При органотипическом культивировании сетчатки тритона, проведен анализ экспрессии регуляторного гена *Raxb*, которая сохраняется, по крайней мере, через неделю после начала культивирования. Одна из функций этого гена может быть связана с поддержанием жизнеспособности нейронов, что было ранее показано на других моделях сетчатки позвоночных.

В исследованиях ключевых генов, участвующих в контроле регенерации, проведен филогенетический анализ секвенированных последовательностей полученных из сетчатки и РПЭ тритона *P.waltl* для генов *Pitx1* и *Pitx2* между представителями разных таксономических групп. Применяли пакет программ MEGA X, алгоритм Neighbor-Joining. Оценку статистической достоверности сравнения 1000 выборок проводили с помощью bootstrap-анализа. Она оказалась выше 70%. Филогенетический анализ показал эволюционную взаимосвязь изучаемых генов (белков) у представителей разных таксономических групп и наиболее высокое сходство *Pitx1* и *Pitx2* *P.waltl* с одноименными транскриптами и белками амфибий и птиц. Для изучаемых генов характерна избирательная ткане- и таксонспецифическая активность. Среди известных функций изучаемых генов - участие в контроле нейрогенеза (*Pitx2*) [1,2], развитии и регенерации конечности позвоночных (*Pitx1*) [3-5]. Выявление ткане- и таксонспецифических изоформ исследуемых регуляторных генов важно для объяснения их активности в развитии и регенерации тканей у эволюционно отдаленных позвоночных.

В 2018 г. собрана и проанализирована обширная информация о способах и молекулярных факторах для поддержания и активации «молодого» фенотипа клеток, являющихся потенциальными источниками для регенерации тканей глаза [6, 7].

На примере тканей глаза позвоночных можно видеть, что клетки-источники регенерации сетчатки представлены как стволовыми, так и малодифференцированными

клетками, а также латентными, но специализированными предшественниками. Эти клетки выявляются в результате изучения профиля экспрессии генов и по маркерным белкам. Профиль в разной степени отражает таковой в развитии по экспрессии набора ТФ, характерных для области глазного поля позвоночных (семейств факторов Pax6, Chx, Rx, Six, Sox, Chx, Prox, Pitx и др.), а также ТФ индукции плюрипотентности (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-мус, OSKС). Наряду с этим мало- или недодифференцированные клетки, а также латентные, но дифференцированные предшественники обладают экспрессией генов, обеспечивающих их специализацию и функционирование.

Факторов воздействия для поддержания и активации проявления «молодого» фенотипа, как системных, так и локальных, множество. Однако проведенная аналитическая работа сужает их поиск. Показано, что во многих случаях факторы роста и сигнальные пути FGF2, EGF, IGF, CNTF, WNT/ $\beta$ -катенин и Notch-Delta, антиоксиданты и другие способны не только поддержать «молодой» фенотип, но и активировать у таких клеток регенераторные ответы: пролиферацию, репрограммирование и миграцию. Напротив, TGF- $\beta$ , BMP4, RA и SHH и другие сигнальные пути часто блокируют такие ответы. Системные факторы (гормоны, факторы и клетки иммунной системы, крови) находятся в неразрывной связи с локальными факторами (рисунок 1.1). Определение экспрессии генов в клетках-источниках регенерации, их эпигенетических особенностей, возраста, локальных и системных факторов регуляции должно позволить безопасную трансляцию в медицину подходов для обеспечения регенерационных процессов за счет эндогенных клеток-источников.

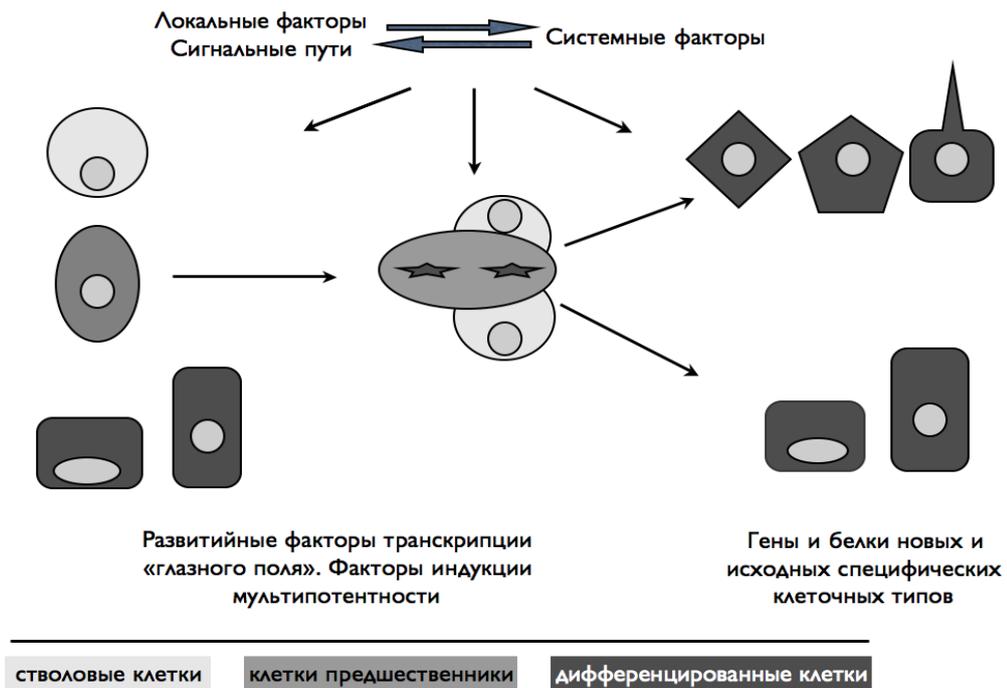


Рисунок 1.1. Схема регенераторных ответов эндогенных клеток-источников регенерации. Слева – категории клеток по уровню дифференцировки. Для них характерна экспрессия некоторых транскрипционных факторов, характерных для раннего развития глаза (белков и кодирующих их генов *Pax6*, *Rx*, *Six*, *Sox*, *Chx*, *Prox*, *Pitx* и др.), а также генов и белков транскрипционных факторов индукции плюрипотентности (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-myc*). Наряду с этим мало- или недодифференцированные клетки, а также латентные, но дифференцированные предшественники обладают экспрессией генов, ассоциированных с их специализацией, выполняемыми функциями. Посередине – вход клеток в пролиферативную фазу, репрограммирование, формирование амплифицирующихся дочерних клеток с увеличением экспрессии некоторых из характерных для раннего развития факторов и факторов плюрипотентности. Справа: сверху – возникшие клетки новой дифференцировки (нейроны внутренней сетчатки, волокна хрусталика, фоторецепторы) и воспроизведение клеток исходной дифференцировки (пигментированные клетки сетчатки и радужки, глиальные клетки). На все категории клеток оказывают влияние локальные факторы микроокружения и системные факторы, взаимодействующие друг с другом (сверху).

#### 1.1.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подраздел темы объединяет сведения о молекулярных механизмах регенерации и, в частности генах, кодирующих транскрипционные факторы – регуляторы раннего развития глаза. Получена информация о роли ряда генов и сигнальных молекул в формировании тканей глаза (хрусталик, сетчатка, стекловидное тело, радужка) амфибий, птиц, млекопитающих и человека. Выявлены характерные молекулярно-генетические особенности клеток, потенциальных источников регенерации тканей глаза позвоночных, а также локальные и системные факторы, оказывающие на них воздействие. Проанализированы молекулярно-генетические основы высокой регенераторной способности у низших позвоночных. Высказано предположение о ведущей роли ювенильного профиля генов экспрессирующихся у пedomорфных животных. Для ряда изучаемых регуляторных генов характерна избирательная ткане- и таксонспецифическая активность. Выявление таксонспецифических генов исследуемых регуляторных и тканеспецифических генов и их изоформ важно для объяснения их активности в развитии и регенерации тканей у эволюционно отдаленных позвоночных. Представленные результаты 2018 являются продолжением исследований, в конечном итоге направленных на стимуляцию регенерации тканей глаза и коррекцию аномалий их развития. Накопление сведений, дающих вклад в фундаментальные знания, необходимы для понимания механизмов дифференцировки клеток разных тканей глаза, а также для практической офтальмологии - разработки эффективных способов коррекции нарушений, возникающих в развитии глаза у человека.

## ПОДРАЗДЕЛ 1.2. АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ И КЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ЛАМИНИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ ИНТЕГРИНОВ В ХРУСТАЛИКЕ ГЛАЗА ЗАРОДЫШЕЙ МЫШИ

### 1.2.1. ВВЕДЕНИЕ

Интегрины - гетеродимерные трансмембранные белки. В настоящее время известно 8 бета и 18 альфа интегринов, которые образуют 24 типа рецепторов, в состав каждого из которых входит один альфа- и один бета-интегрин [8]. Интегрины являются не только рецепторами внеклеточного матрикса, но и участвуют в проведении сигнала внутрь клетки и из нее, тем самым участвуя в морфогенезе, пролиферации, дифференцировке миграции и других процессах большинства типов клеток [9, 10]. Специфичность рецепторов определяется типом альфа-интегрин. Различают три основные группы интегринов: специфически связывающие коллаген, ламинин и фибронектин [11-13]. В настоящей работе изучены экспрессия и клеточная локализация ламинин-связывающих интегринов в хрусталике зародышей и взрослых мышей в нормальном развитии и после нокаута бета-1 интегрин.

### 1.2.2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено исследование экспрессии и клеточной локализации интегринов в хрусталике глаза у зародышей мыши и взрослых мышей, с использованием технологии Cre-lox. Использовали генетическую конструкцию с геном Cre-рекомбиназы под контролем промотора гена альфаА-кристаллина и мышей-гибридов (C57BL6 × 129)F1 со вставками сайтов LoxP по обе стороны от экзона 3 гена бета-1 интегрин ("The Jackson Laboratory", Bar Harbor, США) [8]. ПЦР проводили с использованием специфических праймеров и стандартного набора реактивов для амплификации ("Qiagen", США). Иммунофлуоресцентный анализ проводили по стандартной методике на криостатных срезах толщиной 14 мкм, фиксированных смесью ацетон-метанол (1:1) при -20°C. Иммунофлуоресцентную реакцию анализировали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 ("Carl Zeiss Inc.", Германия). Иммуноэлектроблоттинг проводили после электрофореза в 10%-ном ПААГ в присутствии SDS с помощью электрофоретической камеры фирмы Био-Рад (Dio-Rad, США).

### 1.2.3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью методов ПЦР, иммуноэлектроблоттинга и иммунофлуоресценции изучены экспрессия и клеточная локализация ламинин-связывающих интегринов (альфа-7, -3, -6) в хрусталике глаза мыши. Альфа-7 интегрин не детектировался в хрусталике

мышь на всех изученных стадиях развития и у взрослых мышей. Альфа-3 (А3) и альфа-6 (А6) интегрин выявляли в эпителии и волокнах хрусталика зародышей, начиная с 11.5 сут (как на уровне РНК, так и на уровне белка), причем на 16.5 сут А3 локализовался преимущественно в эпителии и в волокнах экваториальной зоны, а А6 – во всех волокнах хрусталика (как поверхностных, так и глубоких слоев). После нокаута бета-1 интегрина А3 и А6 интегрин продолжали выявляться в волокнах хрусталика, несмотря на отсутствие в них бета-1 интегрин (рисунок 1.2). Однако по данным ПЦР-анализа экспрессия этих интегринов снижалась после нокаута. Известно, что в отсутствие бета-интегрин альфа-интегрин подвергаются деградации. Учитывая, что интегрин являются стабильными белками с низкой скоростью обновления, присутствие альфа-интегринов после нокаута можно объяснить сохранением ранее синтезированного интегрин. В целом, наши данные свидетельствуют о дифференциальной экспрессии ламинин-связывающих интегринов и об их участии в раннем морфогенезе хрусталика и в дальнейшем - в дифференцировке эпителиальных клеток и волокон хрусталика.

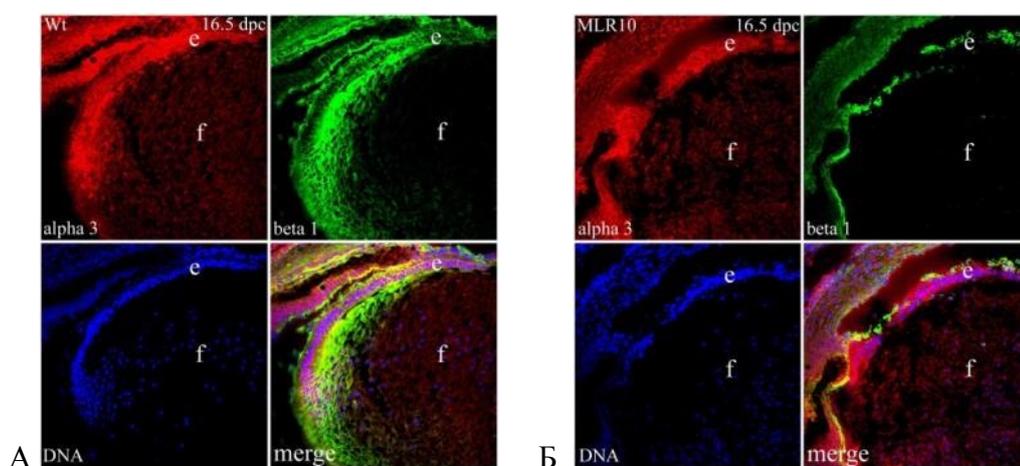


Рисунок 1.2. Иммунофлуоресцентная реакция на альфа-3 интегрин (красный цвет) и бета-1 интегрин (зеленый цвет) в хрусталике 16-суточного зародыша мыши: А – мыши дикого типа; Б – мыши с нокаутом бета-1 интегрин. Синий цвет – окраска на ДНК (ядра). е – эпителий, f - волокна.

#### 1.2.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, наши данные свидетельствуют о дифференциальной экспрессии ламинин-связывающих интегринов и об их участии в раннем морфогенезе хрусталика и в дальнейшем - в дифференцировке эпителиальных клеток и волокон хрусталика.

### ПОДРАЗДЕЛ 1.3. ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ СЕКРЕТОМА ТКАНЕЙ ГЛАЗА URODELA ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ.

#### 1.3.1. ВВЕДЕНИЕ

Органотипическое культивирование наилучшим образом помогает решать задачи, связанные с поддержанием/изменением нормальной морфологии и функций глаза и выявлением молекул, участвующих в этих процессах. Главным преимуществом метода является поддержание организации ткани близкой к нативной. Это позволяет изучать интересующую группу клеток, не изолируя её от локального окружения и не нарушая взаимодействий между тканями. Органотипическое культивирование сетчатки whole mount сегодня широко используется для самых различных целей, в том числе для морфологических, биохимических и фармакологических исследований [14]. Органотипические культуры являются хорошей альтернативой экспериментам *in vivo*, экономичны в отношении объемов тестируемых веществ, минимизируют число используемых в эксперименте животных.

Низшие позвоночные семейства Urodela в наибольшей степени способны к регенерации, они восстанавливают поврежденные/удаленные ткани глаза, спинной и головной мозг, сердце, челюсти, скелетные мышцы, кишечник, позвоночник и т.д. Именно эта группа животных перспективна для использования в качестве продуцентов факторов, индуцирующих и обеспечивающих процесс понижения уровня дедифференцировки и «омоложение» клеточных источников для восстановления той или иной ткани высших позвоночных. При этом в литературе существуют крайне немногочисленные примеры исследований с применением данного подхода [15, 16]. Эти результаты свидетельствуют о том, что некие, естественным образом секретируемые тканями или экстрагируемые искусственно из тканей хвостатых амфибий и рыб факторы белковой природы работают как индукторы дедифференцировки (омоложения) тканей высших позвоночных. Наша работа 2018 г. проведена в этом направлении при использовании тканей глаза тритонов (источника молекул воздействия) и тканей глаза грызунов (мышей и крыс) – мишени воздействия.

#### 1.3.2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе применен способ органотипического культивирования тканей глаза позвоночных, ранее разработанный в лаборатории [17, 18]. После окончания культивирования часть материала фиксировали в растворе Буэна. Для морфологического

анализа применяли рутинную методику с окрашиванием клеток гематоксилин-эозином. Анализ изображений и их регистрацию проводили с помощью светового микроскопа Olympus АН-3 (Австрия). Для иммуногистохимического исследования применяли стандартные методики после фиксации тканей в 4% PFA. Изучение пролиферативной активности клеток сетчатки осуществляли путем долговременной доставки к ткани сетчатки бромдеоксиуридина (БрдУ). Доставка БрдУ (аналога тимидина, маркера пролиферации) осуществлялась посредством введения предшественника в среду при очередной ее смене в концентрации, рекомендованной производителем (Sigma). Получение экстракта (секретома) и введение его в среду культивирования тканей глаза грызунов проводили по методу, разработанному совместно с лаб. сигнальных систем клетки МГУ [19].

Определение клеточной гибели в тканях глаза грызунов проводили с использованием метода TUNEL. Образцы после роллерного культивирования с добавлением экстрактов и без них, фиксированные 4% формалином, замораживали в OCT и изготавливали криосрезы, которые окрашивали компонентами кита DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Для изучения влияния коммерческого фактора роста фибробластов (FGF2) его добавляли ( $1 \times 10^{-8}$  г/мл) при смене среды без нарушения стерильности.

К 2018 проведен широкий спектр экспериментов и контролей к ним, где к культивируемым тканям глаза мыши и крысы (задний сектор глаза «РПЭ + хороид + склера), но без нейральной сетчатки, были добавлены экстракты заднего сектора глаза (с сетчаткой), а также экстракты изолированной нейральной сетчатки. Введение экстракта осуществляли как в среду с сывороткой, так и без сыворотки. Контролем служили образцы, культивированные сходным образом в лишенных экстрактов средах (с сывороткой и без сыворотки). Кондиционированные среды получали в результате культивирования тканей глаза тритонов ранее описанным способом [20].

### 1.3.3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В наших исследованиях мы впервые применили экстракты ретинального пигментного эпителия (РПЭ), источника регенерации сетчатки у амфибий, и нейральной сетчатки, а также кондиционированные ими среды в отношении аналогичных тканей крысы альбиноса и мыши в условиях органотипического 3D культивирования. При добавлении экстрактов в среду в культурах задней стенки взрослых мышей, выделенной

без нейральной сетчатки, была обнаружена потеря пигмента РПЭ – основного признака дифференцировки этой ткани, митотическая активность и разрастание (увеличение площадей) дедифференцированной ткани РПЭ. Потеря пигмента происходила неоднородно по пространству ткани РПЭ мышцы. Особенностью этого регенераторного ответа, а также наблюдаемой при окрашивании БрдУ пролиферации была их приуроченность в основном к периферическим областям РПЭ, как известно, поздно возникающим в развитии. Помимо этого экстракты РПЭ + сетчатка оказались способны снизить клеточную гибель в изолированной и культивированной независимо нейральной сетчатке мышцы wholemount, не допустить ее разрушения и в результате увеличить продолжительность сроков ее культивирования. В предварительных тестах на культурах клеток РПЭ человека, экстракты РПЭ и сетчатки тритонов заметным эффектом не обладали (исследование проведено в группе д.б.н Александровой М.А.). В то же время, экстракты сетчатки тритона оказались способны индуцировать пролиферацию и изменение фенотипа клеток РПЭ в составе задней стенки глаза взрослой крысы альбиноса. Где описанные для мышцы регенеративные ответы (кроме депигментации) имели еще более выраженный характер и на более обширных пространствах слоя РПЭ (рисунок.1.3). Это коррелирует с данными о более частых случаях деления клеток РПЭ у крыс альбиносов по сравнению с пигментированными крысами. Интересно, что сходным с действием экстракта эффектом обладал хорошо известный ростовой фактор FGF2. Будучи добавленным в среду культивирования в концентрации 50 нг/мл, он приводил к активации пролиферации РПЭ крысы, в норме *in vivo* демонстрирующего единичные митозы на периферии слоя. Отметим, что ранее в наших исследованиях FGF2, известный своим митогенным эффектом при регенерации и в развитии глаза, а также компоненты его сигнального пути, были обнаружены и локализованы в сетчатке тритона *Pl. waltl* [21].

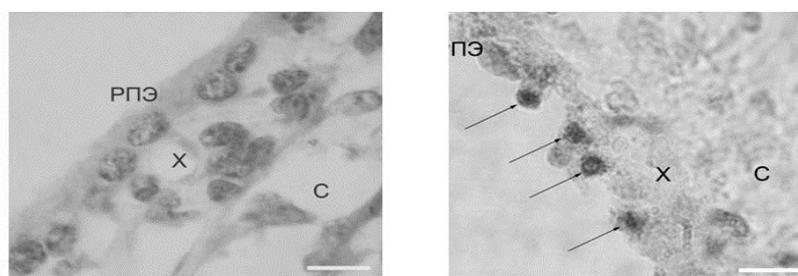


Рисунок 1.3. Культивированный РПЭ крысы при культивировании в среде в отсутствие экстракта тканей задней стенки глаза тритона (слева) и на вторые сутки после внесения его в среду. Видно включение предшественника БрдУ в качестве маркера пролиферации. Х – хороидальная оболочка, С – склеральная оболочка.

#### 1.3.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в исследовании первые результаты дают основание для продолжения исследований сразу в нескольких направлениях. Одно из них – систематизация и получение совокупных данных по регенеративным ответам РПЭ и нейральной сетчатки крысы и мыши, возникающим после введения экстрактов тканей глаза тритона в сравнении с данными культивирования тех же тканей в средах (с сывороткой и без сыворотки) без добавления экстрактов. Другое – проведение расширенного иммунохимического исследования чтобы выяснить, происходит ли на фоне пролиферации и дедифференцировки клеток РПЭ мышей и крыс приобретение ими признаков какого-либо другого фенотипа, в частности пронейрального. Третье – проведение биохимического исследования для определения круга молекул, являющихся индукторами регенеративных ответов в клетках РПЭ и обеспечивающих жизнеспособность клеток нейральной сетчатки *in vitro*. Все это позволит приблизиться к разработке способов индукции регенерации в не регенерирующих тканях глаза млекопитающих в условиях, максимально близких к условиям организма (*in vivo-like*). Данные в предварительном виде вошли в готовящуюся к печати публикацию “Natural long life juvenility and tissue regeneration in paedomorphic tailed amphibians, perspectives of this phenomena translation to biomedicine”.

## **ПОДРАЗДЕЛ 1.4. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАРОТИНОИДОВ В ТКАНЯХ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА В ПРЕНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ. РАЗРАБОТКА СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОМОЛЕКУЛ В ТКАНЯХ ГЛАЗА. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В СТЕКЛОВИДНОМ ТЕЛЕ ГЛАЗА ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА.**

### **1.4.1. ВВЕДЕНИЕ**

В исследованиях развития глаза человека, проведена детальная морфологическая характеристика периферической области сетчатки [22]. Среди важнейших условий для нормального развития человека в эмбриональном и плодном периодах относят систему антиоксидантной защиты и систему врожденного иммунитета. К настоящему времени роль этих систем в защите развивающегося глаза плодов человека и их значение для дифференцировки тканей глаза мало исследована.

Активные формы кислорода и другие окислители являются в большинстве случаев токсичными для организма, поскольку инициируют цепь реакций перекисного окисления. Сбалансированность между уровнем окислителей и антиоксидантов является жизненно необходимой для нормального роста и развития эмбрионов и плодов. Сверхпродукция свободных радикалов является повреждающим фактором для клеток, приводящим к нарушению процессов пролиферации, повреждению липидов, белков, ДНК, РНК и т. д. Во время эмбрионального и раннего плодного развития ткани глаза особенно нуждаются в антиоксидантной защите; прежде всего, сетчатка и хрусталик, имеющие высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот. При этом присутствие кровеносных сосудов (гиалоидные сосуды в процессе роста и регрессии, хориокапилляры сосудистой оболочки, развивающиеся сосуды собственно сетчатки) создает опасность повреждения тканей, вызываемого перекисным окислением липидов, что может приводить к нарушению процессов роста и дифференцировки сетчатки и формирования волокон хрусталика. В связи с этим в пренатальном развитии глаза должна быть представлена антиоксидантная система, защищающая ткани глаза от опасности повреждающего действия окислительного стресса. Для настоящего исследования были выбраны некоторые молекулы, обладающие свойствами антиоксидантов, которые являются компонентами крови взрослого человека. Это лютеин, альбумин, альфа-фетопроtein и мочевиная кислота. Вопросу выяснения присутствия этих молекул-антиоксидантов в стекловидном теле, сетчатке и хрусталике глаза человека в пренатальном развитии посвящена одна из задач настоящего исследования. Это исследование было нами предпринято впервые и начато в 2005 году. Показано присутствие альбумина, альфа-фетопроteина и лютеина в стекловидном теле и лютеина и альбумина в хрусталике и сетчатке [23-27].

Настоящая работа является продолжением этих исследований. Было проведено исследование содержания альфа-фетопротеина в сетчатке и хрусталике [26] и мочевой кислоты в стекловидном теле у плодов человека [27].

Факторы врожденного иммунитета представляют собой наследственно закрепленную систему защиты от патогенов, обеспечивающую их распознавание и элиминацию в первые часы после их вторжения, и выработку сигналов, обуславливающих формирование специфического иммунного ответа. Toll-подобные рецепторы (TLRs) представляют первую линию защиты [28].

TLRs – трансмембранные белки, способные распознавать консервативные структуры микроорганизмов и играют ключевую роль во врожденном иммунитете [29]. Их экспрессия выявлена на макрофагах, дендритных, эндотелиальных, эпителиальных и фибробластоподобных клетках, а также на естественных киллерах либо на поверхности мембраны, либо в цитоплазме клеток. Лиганд, связываясь с TLR, инициирует трансмембранный сигнал. Передачу сигналов внутри клетки, несущих TLRs, представляют как последовательную активацию цитоплазматических адапторных молекул (в частности MyD88). Через активацию MAPK-киназ активируется ТФ NF- $\kappa$ B, который проникает в ядро и взаимодействует с промотором генов противовоспалительных цитокинов и ко-стимуляторных белков. С другой стороны, TLR рецепторы способствуют (через каскад митоген-активируемых протеинкиназ MAP-киназ) активации транскрипционного фактора AP-1 (activator protein) и могут экспрессироваться в делящихся и дифференцирующихся клетках формирующихся тканей эмбрионов млекопитающих [30, 31].

У кур на разных стадиях эмбрионального развития была выявлена экспрессия генов, кодирующих TLRs в отсутствие инфекций, что позволило авторам прийти к заключению об их участии в адаптационных механизмах, направленных на защиту зародыша *in ovo* и цыпленка в момент вылупления от возможного инфицирования [32].

Кроме роли во врожденном иммунитете, TLRs, возможно, играют важную роль в регуляции эмбрионального развития позвоночных. Согласно данным литературы последних лет TLRs и их адапторные белки связаны с различными аспектами нейрогенеза в процессе развития мозга и с пластичностью нервных клеток [33-36]. Сетчатка глаза является производной нейроэктодермы (нейроэпителия) переднего мозгового пузыря. По аналогии с развитием и дифференцировкой субвентрикулярной зоны латеральных желудочков и стриатума головного мозга [33] можно предположить участие TLRs в процессах пренатального развития сетчатки глаза.

Проведенное нами исследование локализации Толл-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 в дифференцирующейся сетчатке глаза на разных стадиях пренатального развития человека отражено в работах [36, 37].

Задача настоящей работы - исследование роли антиоксидантов и врожденного иммунитета в развитии и дифференцировке тканей глаза человека.

#### 1.4.2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для биохимического анализа глаза разрезали по лимбу, вынимали стекловидное тело, хрусталик и сетчатку. Сетчатку и хрусталик промывали в 0.9 % NaCl. После взвешивания добавляли 2-3-кратный избыток дистиллированной воды и гомогенизировали. Стекловидное тело и гомогенаты сетчатки и хрусталика центрифугировали (12500 об/мин, eppendorf centrifuge 5417R, 4<sup>0</sup>C, 30 мин). После центрифугирования отбирали супернатанты, которые использовали для измерения концентрации АФП и мочевого кислоты. Измерения концентрации АФП проводили с помощью иммуноферментной диагностической тест-системы «AFP Elecsys» (каталожный номер 04481798190) на автоматическом анализаторе Cobas e 411 концерна «Ф. Хоффман – Ля Рош Лтд» (Швейцария) на 14, 16, 18/19, 22, 24 и 31 нед пренатального развития. Мочевую кислоту определяли в стекловидном теле на 17, 19, 21/22, 23, 24, 31 нед пренатального развития на биохимическом анализаторе ВА-400, компании «Biosystems S. A» (Испания).

Иммунохимическое исследование проведено на 9, 15, 17, 19, 21 и 30 нед пренатального развития. Глаза фиксировали в 10% формалине (рН 7.4). На парафиновых срезах толщиной 4 мкм с помощью иммуностейнера закрытого типа Ventana (Roche, UK) с закрытым набором для детекции проведено иммуногистохимическое исследование. Протокол автоматизированного окрашивания образцов включал все этапы стандартной процедуры иммуногистохимии: депарафинирование срезов, их демаскировку, блокирование эндогенной пероксидазы, инкубацию с первичными и вторичными антителами. Система визуализации – Ultra View Universal DAB, Detection Kit. Исследования проводили при комнатной температуре. В качестве первичных антител были использованы поликлональные антитела к TLR2 (1:600, Abcam, UK) и TLR4 (1:200, Abcam, UK). Анализ препаратов на качественном уровне проводили, сравнивая сетчатку на разных сроках развития: для TLR2 исследовали сетчатку на 9, 15, 19 и 30 неделях и для TLR4 – на 9, 15, 17 и 21 неделях пренатального развития.

Для характеристики развития сетчатки и хрусталика проведено также иммунохимическое исследование с применением антител к CD117 с 9 по 30 нед

пренатального развития. В качестве первичных антител были использованы кроличьи моноклональные антитела к CD117 (c-kit; клон YR145, Cell Mark, готовый к использованию, UK).

Продукт положительной иммуногистохимической реакции визуализировался в виде коричневого окрашивания мембраны и цитоплазмы клеток. Для проведения отрицательного контроля образцы исследуемых срезов подвергались стандартной иммуногистохимической процедуре без инкубации с первичными антителами. Положительный контроль для антител выбирали в соответствии со спецификациями фирмы-производителя.

#### 1.4.3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрация АФП в стекловидном теле, сетчатке и хрусталике глаз плодов человека представлена в таблице 1.

Таблица 1. Концентрация АФП (МЕ/мл) в стекловидном теле, сетчатке и хрусталике в пренатальном развитии глаза человека (“–“ обозначает отсутствие измерений)

Возраст плодов, нед	Стекловидное тело	Сетчатка	Хрусталик
14	2030600	–	–
16	1060600 –	– 10079	2599 –
18/19	498499	10825	3164
22	111700	–	2387
24	144900 349200	– 30516	499 16892
31	5328	–	346

Наблюдаемые колебания концентрации АФП в ходе развития могут быть обусловлены индивидуальными особенностями плодов и зависят как от возраста, так и от состояния матери и плода. Тем не менее, с возрастом на 31 неделе наблюдается снижение концентрации АФП в стекловидном теле и хрусталике, что согласуется с известной тенденцией уменьшения концентрации этого белка в общей циркуляции крови плода.

Антиоксидантные свойства АФП говорят в пользу его участия в защите глазных тканей от окислительного стресса. Известно, что АФП обладает высоким сродством к полиненасыщенным жирным кислотам (ПНЖК) [38]. В пренатальном развитии у плодов человека ПНЖК не синтезируются, и к основным функциям АФП в эмбриональный и плодный периоды относят транспорт ПНЖК из материнской крови через плаценту к органам и тканям плода.

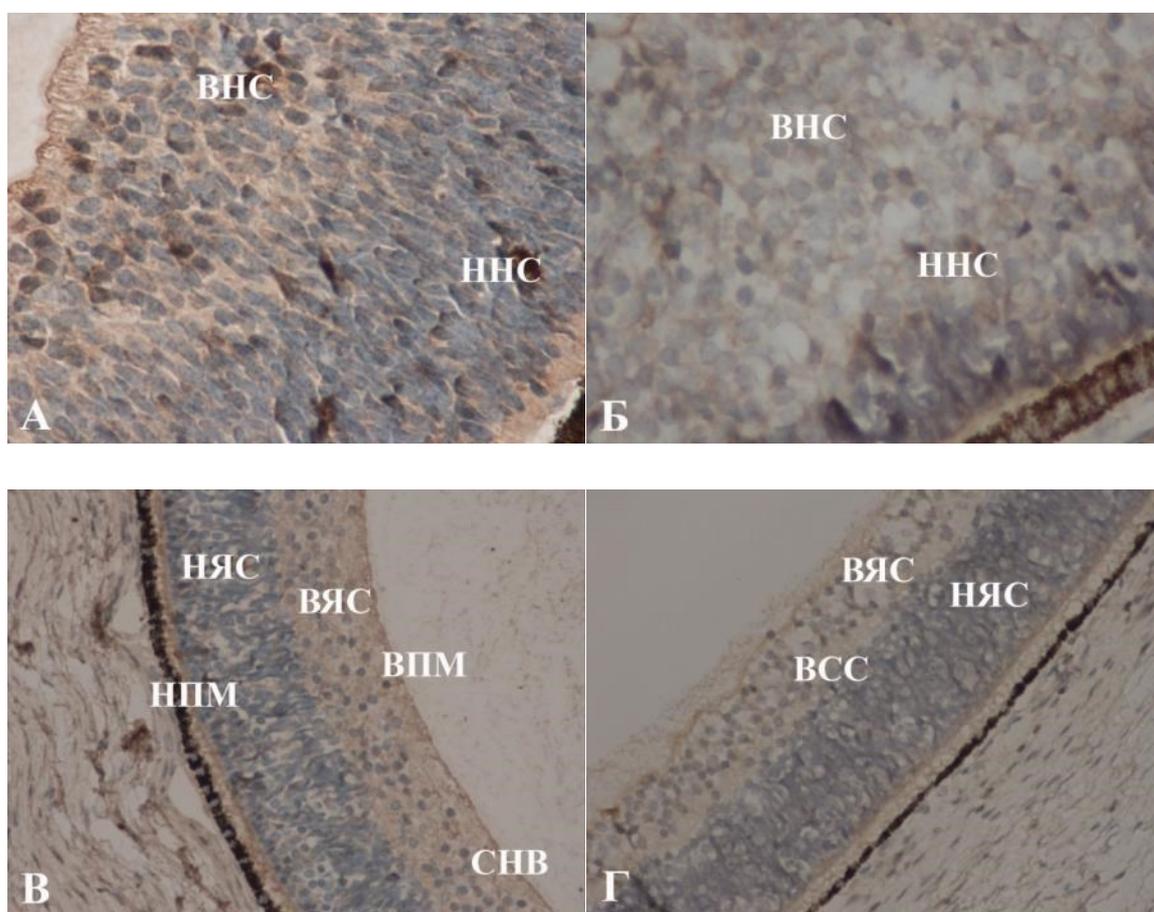
Присутствие АФП в клетках центральной нервной системы и во внутреннем нейробластическом слое сетчатки у позвоночных животных [39] и обнаруженное нами присутствие АФП в сетчатке и хрусталике у плодов человека согласуются с представлением о его участии в дифференцировке нейронов сетчатки и волокон хрусталика. Будучи белком-переносчиком, АФП по всей вероятности поставляет ПНЖК, необходимые для клеточного роста нейронов сетчатки и волокон хрусталика, которые необходимы для построения клеточных мембран. Во многих эмбриональных тканях были обнаружены рецепторы к АФП, которые участвуют в транспорте ПНЖК в клетки. Обнаружено, что развивающиеся сетчатка и мозг млекопитающих и птиц показывают строгую иммунопозитивную метку на АФП [39], и эти ткани являются структурами с высоким содержанием ПНЖК.

К настоящему времени накоплены данные, свидетельствующие о наличии ряда общих свойств между АФП и полипептидными факторами роста. Показано, что АФП способен модулировать активность ростовых факторов, и этот эффект может осуществляться путем воздействия на различные этапы каскадного механизма передачи сигналов путем связывания факторов роста с мембранными рецепторами [40].

Мочевая кислота является важной биологической молекулой, которая обладает антиоксидантными свойствами, является сильным тушителем синглетного кислорода и регулятором окислительного стресса и, следовательно, способна предохранять органы и ткани от разрушений, вызываемых свободными радикалами кислорода [41]. Важным свойством мочевой кислоты является то, что она обладает нейропротекторными свойствами [42]. Имеются также данные о том, что мочевая кислота индуцирует TLR4-зависимый врожденный иммунный ответ [43]. В нашем исследовании мы обнаружили мочевую кислоту в стекловидном теле глаза в пренатальном развитии человека.

Помимо иммунорегуляции, Toll-подобные рецепторы вовлечены также в процессы раннего развития различных органов и тканей [43,44]. На примере эмбрионального развития мозга млекопитающих было показано, что в процесс регуляции развития мозга вовлечены многие клеточные сигнальные пути. Одним из таких путей, вовлеченных в нейрогенез в развитии мозга млекопитающих, является сигнальный путь Toll-подобных рецепторов [45]. Сетчатка глаза позвоночных имеет нейральное происхождение и проходит в своем развитии все этапы морфогенеза и нейрогенеза, приводящие в конечном итоге к формированию дефинитивной сетчатки. С началом нейрогенеза начинаются сложные процессы деления, миграции и дифференцировки нейробластов, роста нервных волокон, образующих глазной нерв, синаптогенеза и формирования слоев сетчатки, что приводит к морфологически и функционально дефинитивной сетчатке с обилием

клеточных типов и синаптических связей, характерных для зрелого глаза. В настоящем исследовании нами впервые показана экспрессия Toll-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 в сетчатке глаза человека в раннем пренатальном развитии (рис. 1.4). Выявлено, что по мере развития и дифференцировки сетчатки происходит специфическое пространственное изменение локализации этих рецепторов. Преимущественная локализация TLR2 и TLR4 в сетчатых слоях на продвинутых стадиях морфогенеза сетчатки позволяет предполагать, что экспрессия этих рецепторов может быть связана с регуляцией нейрогенеза и аксоногенеза, с образованием синаптических нейрональных связей между нейронами в сетчатке. Обнаружение Toll-подобных рецепторов в эндотелиальных клетках, образующих стенки ретинальных сосудов, не исключает роли Toll-подобных рецепторов в барьере «кровь-сетчатка» в готовности защищать сетчатку от проникновения в нее патогенов.



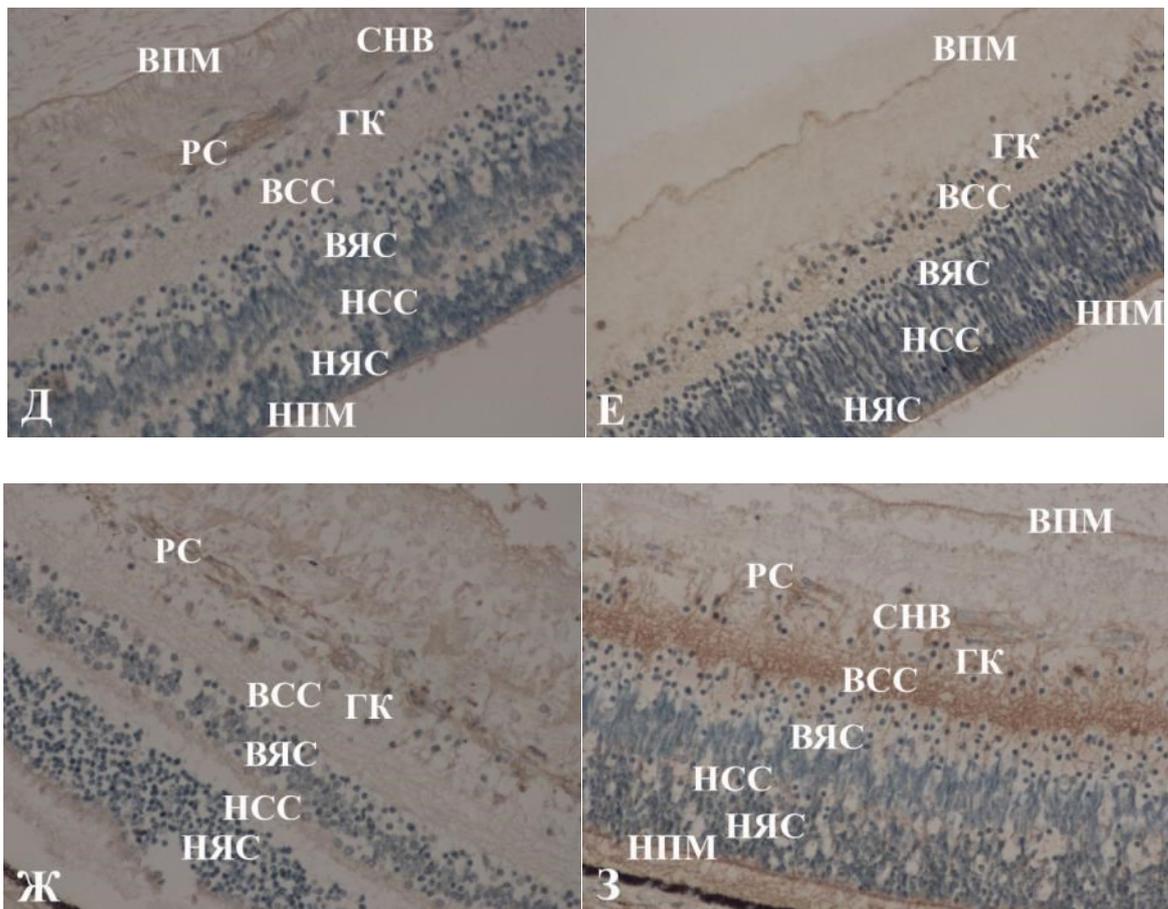


Рисунок 1.4. Экспрессия TLR2 и TLR4 в сетчатке глаза в раннем пренатальном развитии человека: А - TLR2 и Б - TLR4 в сетчатке 9-недельных плодов, ув.х 400; В - TLR2 и Г - TLR4 в сетчатке 15-недельных плодов, ув.х 200; Д - TLR2 в сетчатке 19-недельных плодов и Е - TLR4 в сетчатке 17-недельных плодов, ув.х 200; Ж - TLR2 в сетчатке 30-недельных плодов и З - TLR4 в сетчатке 21-недельных плодов, ув.х 200. ВНС и ННС – внутренний и наружный нейробластические слои, ВЯС и НЯС – внутренний и наружный ядерные слои, ВПМ и НПМ – внутренняя и наружная пограничная мембраны, СНВ – слой нервных волокон, ГК – ганглиозные клетки, ВСС и НСС – внутренний и наружный сетчатые слои, РС – ретикулярный сосуд.

Для характеристики развития сетчатки и хрусталика проведено также иммунохимическое исследование с применением антител к CD117 и морфологическое исследование крайней периферии сетчатки. Известно, что CD117 связывается с фактором стволовых клеток и участвует в регуляции дифференцировки, пролиферации и апоптозе. В нашем исследовании в сетчатке выявлена пространственная локализация CD117. Выявлена также область на крайней периферии сетчатки (части сетчатки перед *ora serrata*), где мечение CD117 не обнаруживается, что совпадает с морфологической характеристикой крайней периферии сетчатки. В хрусталике с 9 по 23 нед CD117 экспрессируется в эпителии хрусталика. На 30 нед экспрессия CD117 отсутствует и в

сетчатке и хрусталике. Данные результаты могут свидетельствовать в пользу участия СД117 в процессах регуляции и дифференцировки нейронов сетчатки и клеток эпителия хрусталика на ранних стадиях пренатального развития.

#### 1.4.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящей работы являются вкладом в понимание общих закономерностей пренатального развития глаза человека. Эти знания важны для фундаментальных исследований, в частности, для понимания роли отдельных молекул в развитии глаза. Кроме того, данные настоящего исследования могут быть использованы для практического применения, в частности, для подбора правильного питания матери в период беременности (каротиноиды, белки, жиры), для диагностики некоторых заболеваний (Toll-подобные рецепторы), а также для направленной доставки лекарственных препаратов в ткани и органы развивающегося плода (на основе белков-переносчиков альбумина и альфа-фетопротеина).

## РАЗДЕЛ 2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ.

### 2.1. ВВЕДЕНИЕ

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) является наиболее распространенным видом рака печени. Заболевание характеризуется быстрой прогрессией и устойчивостью к большинству современных методов противоопухолевой терапии.

Развитие ГЦК сопровождается рядом генетических событий, результатом которых является изменения в ограниченном количестве конкретных генов – онкогенов или опухолевых супрессоров. Одними из важных показателей выживаемости опухолевых клеток это их способность к быстрой изменчивости за счет хромосомных aberrаций и изменения их микроокружения [46].

### 2.2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования по хромотрипсису были выполнены на мышах самцах F1(CBA/C57Bl/6) массой 20–22 г в возрасте 2 мес. к началу опыта. Гепатоканцерогенез был индуцирован дипином (CAS 738-99-8). Согласно модели [47] одна инъекция алкилирующего препарата дипина, введенного мышам за 2 ч до стандартной операции частичной резекции печени, вызывает во всех покоящихся гепатоцитах (фаза клеточного цикла G<sub>0</sub>) повреждение ДНК (преимущественно двунитевые разрывы) и затем развитие в печени опухолевого процесса [47].

Исследования роли гиалуронан в развитие гепатоцеллюлярной карциномы проводили на полученных ранее клеточных культурах, описанных в статье Дашенковой и др. [48].

В работе были использованы методы гистологии, цитологии, клеточной биологии и белковой химии. Выделение и очистка РНК, синтез кДНК, ПЦР и ПЦР в реальном времени проводили с помощью коммерческих наборов в соответствии с рекомендациями фирм производителей Evrogen, MRC, Sigma. Анализ и поиск последовательностей генов проводили с помощью свободных баз данных нуклеотидных и белковых последовательностей NCBI, UCSC, EMBL и т.п.

Дизайн олигонуклеотидов для работ с кДНК осуществляли с помощью программного обеспечения Primer3, DNASTAR, BeaconDesigner. Уровень экспрессии генов определялся на системе ПЦР в реальном времени StepOnePlus, AppliedBiosystem в трех

технических повторностях для каждого из образцов. Нормализацию образцов проводили по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства GAPDH.

Анализ результатов и статистическую обработку полученных данных производили с помощью программного обеспечения Statistica 6.0. Для оценки достоверности результатов был использован статистический метод Стьюдента.

### 2.3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Хромотриписис при гепатоканцерогенезе.* В 2011 году Стефенс и др. сообщили о новой форме нестабильности генома, характеризующейся десятками или сотнями локально сгруппированных перестроек, влияющих на одну или несколько хромосом в раковых клетках [49]. Это явление было названо хромотриписисом. Для понимания хромотриписиса необходимо объяснение локального характера ключевого события – раздробления или распада хромосом, при котором процесс массивного повреждения ДНК ограничен единственной хромосомой либо ее частью.

В наших *in vivo* экспериментах с индукцией гепатоканцерогенеза в органе с исходно полиплоидной популяцией клеток - гепатоцитов были обнаружены цитогенетические изменения, суть и механизм образования которых, стали понятны только с привлечением современных концепций развития нарушения генома при опухолевой трансформации.

Для индукции гепатоканцерогенеза использована оригинальная модель, основанная на сочетании кластогенного эффекта радиомиметика дипина и стандартной частичной гепатэктомии. В цитологических препаратах изолированных клеток печени таких мышей в полиплоидных гепатоцитах выявлены структурные ядерные аберрации, среди которых особенно часто встречаются микроядра (рис.2.1).

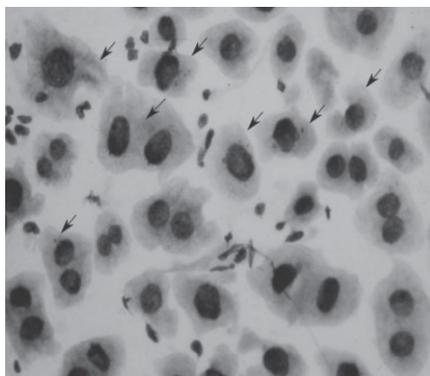


Рисунок 2.1. Единичные микроядра (стрелки) в гепатоцитах через 8 сут после индукции гепатоканцерогенеза. Метод щелочной диссоциации фиксированной формалином ткани; здесь и на рис. 2. Окраска Гимза по Романовскому; здесь и на рис. 2, 3, 4г. Об. ×20, ок. ×5.

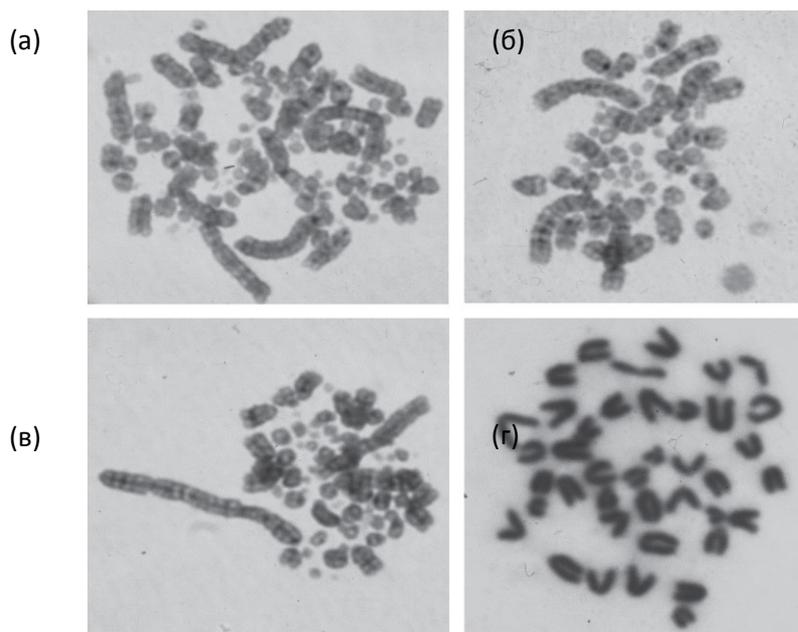


Рисунок 2.2. Метафазы гепатоцитов (хромотрипсис) и диплоидный кариотип мыши. а – в – колхицинированные метафазы гепатоцитов, содержащие новообразованные хромосомы и не вошедший в их состав хромосомный материал. 8 нед после индукции гепатоканцерогенеза. G-banding, окраска по Фельгену. а, б – об.  $\times 100$ , ок.  $\times 5$ , в – об.  $\times 100$ , ок.  $\times 3$ ; г – диплоидная метафаза (40 хромосом), одна из присутствующих в тех же препаратах. Об.  $\times 100$ , Ок.  $\times 2.5$ .

В хромосомных пластинках полиплоидных гепатоцитов обнаружены многочисленные хромосомные aberrации, в том числе предполагаемые морфологические проявления хромотрипсиса – особого типа реорганизации генома, связанного с локальным распадом хромосом (рис.2.1). Поскольку микроядрам, содержащим хромосомные фрагменты как результат двунитевых разрывов ДНК, отводится роль исходного субстрата для развития хромотрипсиса, доступная для воспроизведения модель гепатоканцерогенеза может быть полезна для дальнейшего изучения этого явления [46].

*Паттерн экспрессии генов, регулирующих синтез, связывание и деградацию гиалуроновой кислоты.* Локальное микроокружение, или ниша, раковой клетки играет важную роль в развитии рака. Основным компонентом ниши является внеклеточный матрикс (ВКМ), сложная сеть макромолекул с характерными физическими, биохимическими и биомеханическими свойствами. При патологических процессах, таких как рак, происходит дерегуляция и дезорганизация ВКМ, что способствует прогрессированию рака путем стимуляции клеточной трансформации и метастазирования [50]. Одним из основных компонентов не белкового внеклеточного матрикса является гиалуроновая кислота (гиалуронан). Увеличение количества гиалуронана обычно

коррелирует с плохим прогнозом во многих типах рака, включая рак желудка, кишечника, груди, яичника, мочевого пузыря, поджелудочной железы и т.д. [51]. Избыточное накопление компонентов внеклеточного матрикса, включая гиалуроновую кислоту, характерно для цирроза печени. Однако данных о гиалуронане и его роли в канцерогенезе печени недостаточно. Проведен анализ паттерна экспрессии генов, регулирующих синтез, связывание и деградацию гиалуроновой кислоты (рис. 2.3). Повышенный уровень экспрессии генов *Has2* и *Has3* наблюдался в 6 культурах из 11. Ни в одной из культур, полученных из единичных клеток, не выявлено повышенной экспрессии *Has2* и *Has3*. Уровень экспрессии *Hyal2* понижен или находится на уровне контроля во всех культурах. Уровень экспрессии *Hyal1* повышен в 2-х культурах из 11, в которых также повышен *Has2*. Экспрессия генов *CD44* и *Rhamm* повышена (в 7-65 и 3-24 раз) во всех первичных культурах ГЦК.

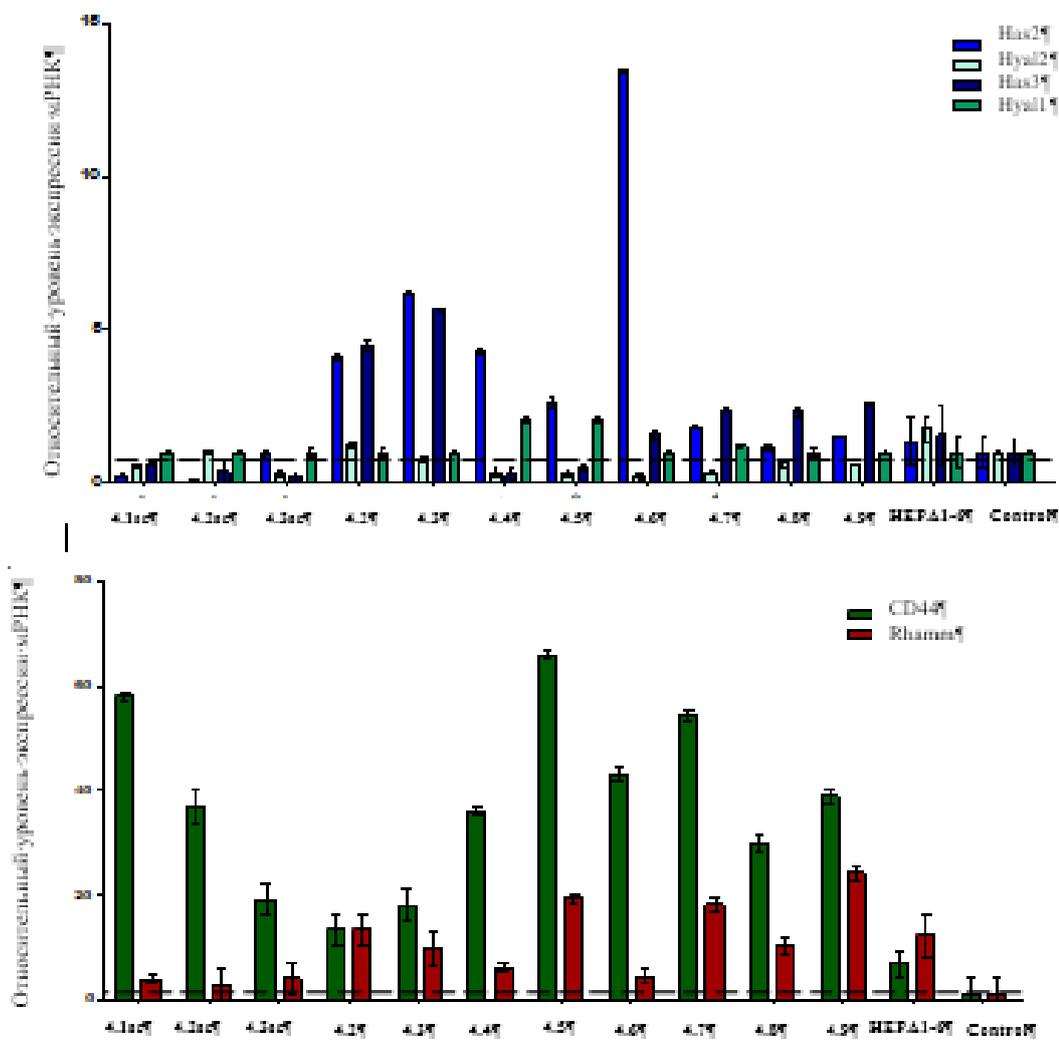


Рисунок 2. 3. Уровень экспрессии генов *Has2*, *Has3*, *Hyal1*, *Hyal2*, *CD44* и *Rhamm* в первичных культурах ГЦК относительно нативной печени мыши. Mean $\pm$ -Error.

## 2.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, перестройка генома, сопровождающая опухолевую трансформацию клеток в процессе развития гепатоканцерогенеза в разработанной нами модели, полностью соответствует явлению хромотрипсиса. Можно полагать, что доступная для воспроизведения модель гепатоканцерогенеза может быть использована для экспериментального изучения хромотрипсиса. Нами также показан высокий уровень экспрессии гиалуронан синтетаз Has2 и Has3 при сохранении уровня гиалуронидаз Hyal1 и Hyal2 в культурах ГЦК свидетельствует об увеличении продукции гиалуронана в межклеточном матриксе. Наши данные могут свидетельствовать об участии гиалуронана в формировании и прогрессии опухолевого роста ГЦК.

### **РАЗДЕЛ 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЙ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ У ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ**

#### **ПОДРАЗДЕЛ 3.1. ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА. РАЗРАБОТКА МОДЕЛЕЙ РЕГЕНЕРАЦИИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ (ГРЫЗУНОВ) ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНЫХ КОСМИЧЕСКИХ ПОЛЕТОВ.**

##### **3.1.1. ВВЕДЕНИЕ**

Механическая разгрузка в невесомости в ходе космического полета, как известно, вызывает атрофию мышечных волокон, изменения в их составе и экспрессии генов, уменьшение регенерационного потенциала мышц [52-55].

Несмотря на существование отдельных исследований, касающихся долговременных эффектов невесомости на мышцы человека, эти процессы изучались преимущественно на грызунах и в кратковременных экспериментах. Нашей задачей стало изучение влияние длительной (30-дневной) механической разгрузки в невесомости на мышцы бедра и их регенерацию у мышей [56].

Осуществленный нами детальный анализ проведенных ранее и проводимых в настоящее время исследований регенерации тканей и органов у животных и человека в условиях космических полетов демонстрирует крайнюю их недостаточность. Это объясняется высокой стоимостью экспериментирования в области гравитационной биологии, редкими полетами биоспутников и приоритетами, диктуемыми, прежде всего, прямыми задачами сохранения здоровья человека в космических полетах. Основным разработчиком темы регенерации в космических полетах на протяжении длительного времени является ИБР РАН совместно с ГНЦ РФ ИМБП РАН. Объектом исследования на протяжении многих лет служили хвостатые амфибии и именно на моделях регенерации тканей глаза, хвоста и конечности этих животных сделаны основные находки, заключения и выводы. Эта широкая информация содержится в многочисленных статьях прошлых лет и отражена в обзоре [57-61].

Помимо регенерации разных тканей и органов у тритонов, недавно изучена регенерация головного отдела планарий [62]. К этому короткому списку можно добавить работу по регенерации мышц у мышей, экспонированных в длительном 30 дневном

полете на борту Бион – М1 (2013), проведенную нашей лабораторией и также представленную в отчете (см. выше) [60].

### 3.1.2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях регенерации мышечной ткани в условиях длительного космического полета, были использованы образцы мышечной ткани из 6 мышей полетной группы, 7 мышей в синхронном контроле и 14 мышей в виварном контроле, полученные в рамках программы обеспечения биологическими образцами NASA Biospecimen Sharing Program, проводимой в сотрудничестве с ИМБП РАН после полета российского биоспутника Бион М1. Каждый образец был разделен на две равные части, одна из которых подвергалась формальдегидной фиксации с последующей гистологической либо иммунохимической обработкой, а вторая фиксировалась в реагенте RNA Later с последующим выделением РНК и проведением обратной транскрипции.

Гистологический анализ образцов проводился после окрашивания гематоксилин-эозином. Помимо визуальной характеристики морфологии мышечной ткани и фиксации репрезентативных изображений, был проведен ее количественный анализ. Вручную при помощи окулярной сетки подсчитывались ядра на участках мышечной ткани без пустот и иных структур. На изображениях аналогичных участков с помощью компьютерной программы Image J подсчитывались ядра, а также определялась площадь, занимаемая мышечным волокном. Данные обрабатывались статистически с помощью непараметрического критерия сравнения нескольких независимых групп.

Образцы для иммунохимического анализа подвергались криопробовке и стандартному протоколу иммуногистохимического окрашивания с использованием антител к белкам *c-Myc*, *c-Jun*, *Rax7*, *Myogenin*. Часть срезов тех же образцов использовалась для оценки апоптоза в ткани методом TUNEL с помощью одноименного набора. Результаты оценивались визуально с помощью флуоресцентного микроскопа, репрезентативные изображения фиксировались.

Оценка экспрессии гена *Myogenin* проводилась с помощью ПЦР с анализом в конечной точке посредством электрофореза. В качестве референсных генов использовались *Rpl19m* и *Hprt1m*.

### 3.1.3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ожидаемая в длительном космическом полете мышечная атрофия была очевидна при оценке морфологии тканей из полетной группы по сравнению в виварным и синхронным контролями: имело место уменьшение размеров волокон, увеличение

пространств между пучками в мышцах, помутнение волокон, потеря поперечно-полосатой исчерченности и разделение отдельных миофибрилл внутри них, набухание и наличие разрывов с образованием бахромчатого края (рисунок 3.1, А-Г). Ядра зачастую имели центральную, а не пристеночную локализацию, и в ряде случаев покидали пределы волокна через разрушение базальной мембраны, а общее число mioядер оказалось значительно снижено по сравнению с контролями. Исследование методом TUNEL показало, что в полетной группе заметно выше уровень апоптоза; по всей видимости, именно этим за счет него происходит гибель большинства mioядер. Следует отметить, что в мышцах полетной группы отсутствуют признаки воспаления, и в нормальном количестве обнаруживаются окончания нервов и просветы сосудов.

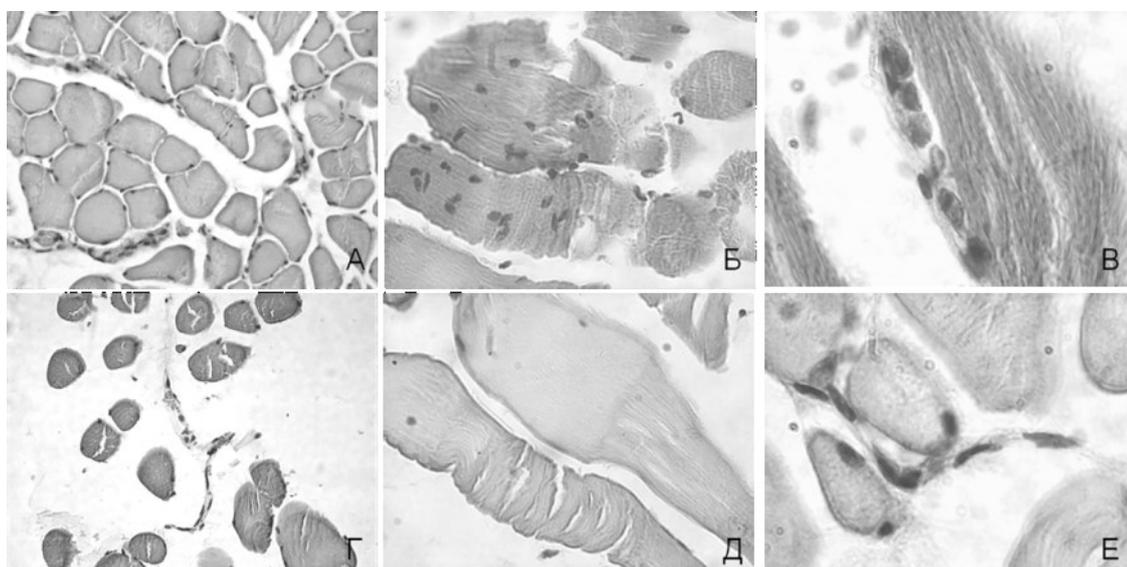


Рисунок 3.1 Морфология мышечной ткани по завершении 30-дневного космического полета Бион-М1. Общий вид мышечной ткани в наземном контроле (А) и в полете (Б), 200×. Примеры мышечной атрофии в полете: центральное положение и потеря мышечных ядер; набухание, разрывы и разрушение мышечных волокон (В, Г), 400×. Нормальная регенерация мышц в наземном контроле (Д) по сравнению с атипичными регенератами в полете (Е), 1000×.

Интересно, что на фоне отчетливой атрофии часто различимы признаки ранних этапов регенерации – концентрации покинувших волокна клеток сателлитов и их скопление в местах повреждения (зачастую неправильно организованные). Среди их ядер встречаются апоптотические. В результате в лучшем случае формируются дезорганизованные миофибриллы низкой плотности, входящие в состав атипичного по форме mioволокна. В большинстве случаев вновь сформированные, всегда тонкие и короткие регенераты содержат под базальной мембраной продукты деградации

мышечных белков – многочисленные округлые эозинофильные включения, разрушенные миофибрилы, распадающиеся на отдельные саркомеры (рисунок 3.1, Д-Е). В мышцах виварного и синхронного контролей наблюдаются отдельные микроповреждения и успешные регенераторные ответы на них.

В миоэдрах всех групп обнаружались белки клеточного стресса c-Myc и c-Jun, осуществляющие одни из первичных сигналов к активации ядер сателлитных клеток [57], однако в полетной группе количество меченых клеток оказалось в 1.5-2 раза выше, чем в контролях. Транскрипционный фактор Pax7, маркер активации сателлитов [58], также обнаруживался в миоэдрах всех групп с увеличением их числа в полетной группе. О регенерации во всех исследованных образцах мышц мышей полетной и контрольных групп свидетельствуют также результаты по экспрессии миогенина – транскрипционного фактора, специфически экспрессирующегося на этапе выхода клеток предшественников в миогенную дифференцировку при формировании миотрубочек в развитии и при регенерации [59]. Во всех группах имела место экспрессия соответствующего гена, а белок обнаруживался в ядрах миоэдров, что свидетельствует о протекании процесса формирования мышечных трубочек вне зависимости от дозы гравитации. Другими словами, этап регенерации, на котором формируются мышечные трубочки, осуществим как при 1g в ходе персистентной, происходящей в мышцах регенерации, так и при атрофии, вызванной длительной невесомостью в полетной группе мышей.

В настоящее время есть потребность в разработке новых моделей для изучения регенерации тканей у млекопитающих, что позволит более корректную экстраполяцию результатов на процессы регенерации у человека. При этом такая модель должна удовлетворять многим требованиям, диктуемым условиями эксперимента в космическом полете. При этом не менее важным является вовлеченность в процесс регенерации тех тканей, которые в наибольшей степени страдают в условиях длительной невесомости (мышцы, кость, хрящ, кровеносные сосуды и т.д.). Хорошо, когда есть возможность проследить за процессами восстановления одновременно нескольких из указанных тканей. Именно такой моделью является эпиморфная регенерация ушной раковины у мышей. Показано, что мыши линии MRL/MpJ отвечают на повреждение – экспериментальной пробоины уха – ее эпиморфной регенерацией, вместо формирования рубца на месте повреждения. Известно также, что повреждение лучше осуществлять с помощью инструмента для взятия клинических биопсий, а оптимальный размер раны составляет 2мм. Мыши линии C57BL/6, обычно используемые в полетных экспериментах, обладают, к сожалению, более ограниченной регенерационной способностью. Однако

предполагается, что это объясняется более грубым нанесением повреждения, осуществляемого обычно в лабораториях. Детальный гистологический анализ, проведенный на обеих линиях мышей после повреждения, сделанного с помощью метода клинической биопсии, выявили заживление в течение 30-60 дней. Важно, что у мышей C57BL/6 и MRL/MpJ отличия касались в основном времени заживления (у C57BL/6 значительно медленнее, чем у MRL/MpJ), но ход был идентичен (рис.3.2). В обоих случаях происходили ре-эпителизация, формирования аналога бластемы, рост кожи, формирование кровеносных сосудов, хондрогенез, формирование новых волокон скелетных мышц, образование соединительной ткани и фолликулогенез. Отмечается все же, что все эти процессы были более ярко выражены у MRL/MpJ, в сравнении с C57BL/6 [63, 64].



Рисунок 3.2 Состояние регенерации уха у мышей линии MRL/MpJ через 14 дней после повреждения. Видно формирование бластемы – подобной ткани по краю биопсийной пробоины, Виден эпидермальный рост вокруг и вовнутрь (DG, downgrowth), рост хрящевой ткани (C), скелетных мышц (SM) и волосяных фолликулов. Масштабная линейка – 1мм. Из: Metcalfe et al., 2006.

Изучение данных, полученных на некоторых экзотических видах мышей, показали, что при небольшой сквозной пробоине ушной раковины у *Acomys spp.* и *Oryctolagus cuniculus* имеет место эпиморфное, полное и быстрое ее заживление. Процесс регенерации происходит посредством формирования бластемы – популяции малодифференцированных пролиферирующих клеток, способных затем выходить в разные линии дифференцировки, что в конечном итоге и обеспечивает полное восстановление [65]. Это делает подобную модель полностью сопоставимой с таковыми, использованными нами при изучении регенерации сетчатки глаза, конечности и хвоста у *Urodela*, протекающих также с образованием бластемы. В этой связи было бы чрезвычайно интересно сравнение эпиморфной регенерации в разных таксономических группах животных – низших и высших позвоночных в условиях космических полетов.

Добавим также, что мыши являются оптимальным животным объектом для проведения молекулярно-генетических исследований, способных указать на изменение молекулярных механизмов регуляции эпиморфной регенерации уха у млекопитающих, длительно экспонированных в условиях космических полетов.

### 3.1.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Завершен анализ данных о состоянии тазобедренных мышц мышей после длительного, 30-дневного, космического полета (Бион М1). На фоне ожидаемой масштабной мышечной атрофии в условиях невесомости имеет место запуск регенерации мышц – активация сателлитных клеток и формирования миобластов – однако поздние стадии этого процесса протекают аномально, а новообразованные волокна склонны к дегенерации и гибели путем апоптоза. Данное исследование впервые продемонстрировало регенерацию мышц млекопитающих в космическом полете, и показало влияние невесомости на разные ее стадии.

Проведенный предварительный анализ показал резонность применения модели эпиморфной регенерации повреждений ушной раковины у мышей в условиях полета Биоспутника БИОН-М2 (2021). Несомненны преимущества модели в отношении объема информации, который может быть получен при ее применении, от морфологического анализа до молекулярно-генетических исследований. Однако есть особенности модели, которые должны быть обязательно учтены и тщательно разработаны в дополнительных предполетных экспериментах. Они касаются используемого вида мышей, их возраста, способа нанесения травмы, полноты процесса заживления и отличий по этому параметру от животного к животному одного вида и между несколькими видами. Также должен быть очерчен круг вопросов, связанных с молекулярными основами процесса и их возможными изменениями в условиях невесомости и других факторов космического полета.

## ПОДРАЗДЕЛ 3.2. ДЕЙСТВИЕ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА ТКАНИ ПЕРЕДНЕГО ОТДЕЛА ГЛАЗА КРЫСЫ. ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЗАЩИТНОГО И ЛЕЧЕБНОГО ДЕЙСТВИЯ ПАРААМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ (ПБК) В ФОРМЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА АКТИПОЛА НА ТКАНИ ПЕРЕДНЕЙ ПОВЕРХНОСТИ ГЛАЗА.

### 3.2.1. ВВЕДЕНИЕ.

В настоящее время ввиду возрастающего экологического неблагополучия внимание исследователей сосредоточилось на факторах внешней среды, затрагивающих структуру и функции организмов на эпигенетическом уровне, один из которых – гипоксия [66-69]. Наряду с изучением влияния различных условий гипоксии осуществляется поиск средств защиты от ее повреждающего действия. Необходимо знать, имеются ли различия в повреждении одного и того же органа при действии гипоксии разного типа, все ли свойства реагирующей системы, проявляющиеся при патологии или последующей репарации, нам известны. Глаз позвоночных животных весьма чувствителен к неблагоприятным отклонениям от нормальных условий среды и поэтому удобен для решения этих задач. Цель работы – изучение начальных изменений глазной поверхности в условиях острой гипобарической гипоксии, анализ специфичности поражения тканей глаза при увеличении дозы гипоксического воздействия, а также попытка объяснить причины избирательного поражения переднего отрезка глаза в ответ на действие гипоксии. Помимо этого целью работы было изучение защитного и лечебного действия парааминобензойной кислоты (ПБК) в форме лекарственного препарата Актипола на ткани передней поверхности глаза [70].

### 3.2.2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.

*Объект.* Работа выполнена на 33 половозрелых самцах крыс Wistar в возрасте 3–4 мес. массой 350–400 г из питомника лабораторных животных “Пушино”.

*Моделирование острой гипобарической гипоксии.* Животных помещали в барокамеру конструкции Полежаева [71], понижали давление в камере от 760 до 180 мм рт. ст., создавая условия, соответствующие таковым на высокогорье. В этих условиях животные находились в течение 3 мин. Часть животных подвергали однократному воздействию гипоксии, после чего результаты анализировали через 1 ч (группа II) и через 3 ч (группа III). Другую часть животных подвергали двукратному действию гипоксии (группа VII) с интервалом 1 ч. Материал для исследования брали через 3 ч после первого сеанса гипоксии. Сроки повреждающего воздействия для последующего анализа были заимствованы из предшествующих работ по защите глаз от других повреждающих

воздействий [72, 73]. Эксперименты проводили в соответствии с правилами содержания и использования лабораторных животных и положениями Европейской конвенции о защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей и Комитета по биоэтике ИБР РАН. Крыс выводили из эксперимента путем внутрибрюшинной инъекции хлоралгидрата (800 мг/кг) (Riedel-de-Haen, Германия).

*Исследование действия ПАБК в форме лекарственного препарата Актипола.* Применение 0.007%-ной ПАБК в форме Актипола, как лечебного и профилактического средства, было описано в работах, выполненных на других модельных системах [72, 73]. Для изучения возможности предотвращения апоптотических изменений в тканях глаза, индуцированных сеансами гипобарической гипоксии, Актипол вводили путем парабульбарной инъекции (0.1 мл) за 24 ч до гипоксии (группа IV). При изучении лечебного действия Актипол инъецировали в том же объеме через 1 ч после гипоксии (группа V). В опыте комбинированного воздействия (группа VI) Актипол вводили за 24 ч до и повторно через 1 ч после гипоксии. Как и в большинстве других групп, результат регистрировали через 3 ч после гипоксии. Для приготовления замороженных срезов для последующего анализа методом TUNEL и иммунохимического исследования энуклеированные глаза крыс фиксировали в 4%-ном параформальдегиде, приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.4. Образцы отмывали последовательно в трех сменах фосфатного буфера с 5%-ной сахарозой, в трех сменах фосфатного буфера с добавлением 10%- и 20%-ной сахарозы (длительность процедуры каждой отмывки 15 мин) и оставляли на ночь в фосфатном буфере с добавлением 20%-ной сахарозы при 4 °С. После замораживания глаз в среде Tissue-Tec OCT (Leica, Германия) с помощью криостата Leica M1900 (Leica) получали горизонтальные срезы глазного яблока толщиной 10 мкм.

Результаты исследования апоптотического поражения эпителия конъюнктивы в каждой группе опытов были получены на основе анализа срезов глаза, с особым вниманием к зоне лимба. Для выявления апоптотических клеток применяли метод TUNEL (Terminal desoxynucleotidyl transferase mediated desoxyuridine triphosphate (UTP) nick end labeling). Использовали набор реагентов DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega Corporation, США). Для подтверждения специфичности реакции мечения фрагментированных участков ДНК проводили контрольные опыты в соответствии с рекомендациями производителя набора. Реакция TUNEL без фермента терминальной дезоксиинуклеотидил-трансферазы служила отрицательным контролем, а обработка срезов ДНКазой I – положительным контролем. Кроме того, для визуализации клеток с поврежденной ДНК, подвергающихся апоптозу, применяли дополнительное окрашивание

ядерным маркером, флуоресцентным красителем Hoechst 33342, специфичным для ДНК (Leica). Срезы глаз заключали в среду Vectashield (Vector, США).

Повреждение ДНК в клетках конъюнктивы и эпителии роговицы, связанное с образованием двухцепочечных разрывов ДНК, регистрировали по локализации фосфорилированного гистона H2AX (anti-gamma H2A.X phospho S139) – специфического маркера, участвующего в репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Использовали поликлональные антитела кролика к белку H2AX с рабочим разведением 1 : 500 (Abcam, Великобритания). Для выявления клеток, находящихся в фазе митоза, изучали внутриклеточную локализацию фосфорилированного гистона pH3 (H3-phospho S10) – высокоспецифичного маркера этой фазы клеточного цикла. Использовали поликлональные антитела кролика к белку pH3, рабочее разведение которых составило 1 : 500 (Abcam). В качестве вторичных использовали антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa 488 в разведении 1 : 2000 (Molecular Probes, США). Для визуализации ядер использовали Hoechst 33342 (Leica). Для контроля неспецифического связывания антител проводили стандартную реакцию без первичных антител (негативный контроль). Срезы заключали в среду Vectashield (Vector). Специфичность локализации исследуемых белков подтверждали в трех повторных сериях экспериментов. Локализацию TUNEL-позитивных клеток, а также H2AX- и H3-phospho S10-позитивных клеток на замороженных срезах глаз анализировали с помощью микроскопа DM RXA2 (Leica), снабженного набором фильтров для регистрации флуоресценции и программой Leica для визуализации изображений. В эпителии конъюнктивы проводили количественную оценку интенсивности флуоресцентного свечения (ИФС) зон поражения. Для оценки степени выраженности иммуногистохимической реакции использовали коэффициент интенсивности иммунореактивности в стандартном поле зрения, определяемый в программе Image J [74]. ИФС отражает число, плотность расположения и яркость свечения апоптотических клеток в стандартном поле зрения среза. Статистическую значимость различий между попарно сравниваемыми группами определяли с использованием непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни.

### 3.2.3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Изучены начальные процессы апоптотического поражения в обновляющихся клеточных популяциях глаза – конъюнктиве и эпителии роговицы взрослых крыс *in vivo* в моделируемых условиях острой гипобарической гипоксии – и действие парааминобензойной кислоты (ПАБК) в форме лекарственного препарата Актипола (0.007%-ная ПАБК) [70].

Показано, что Актипол купирует процесс дальнейшего развития апоптоза на стадии введения лекарственного препарата. При предварительном введении Актипол предотвращает процесс развития апоптоза, сохраняя его на уровне интактного контроля. При этом стабилизация оказывается настолько “прочной”, что гипоксия через 24 ч после введения препарата не увеличивает степень апоптотического поражения (рис.3.3).

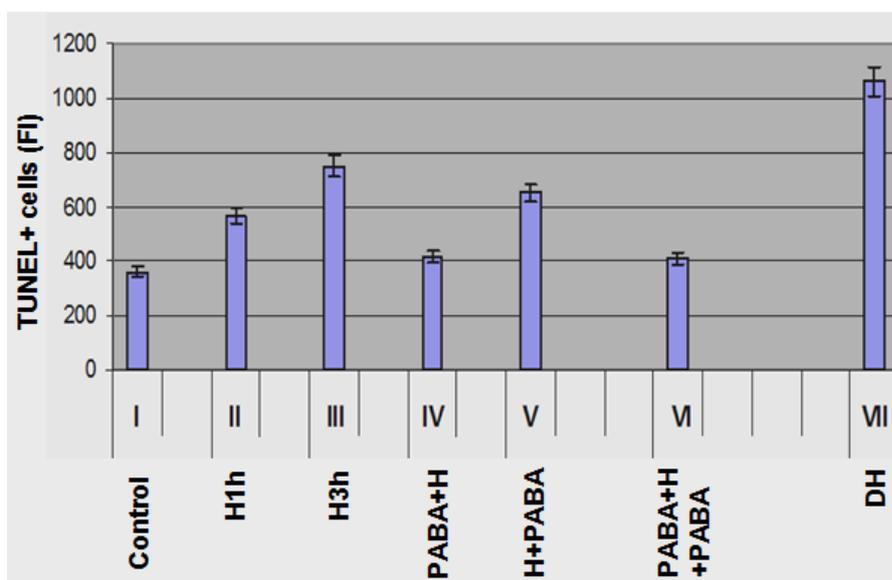


Рисунок 3.3. Интенсивность флуоресцентного свечения (ИФС) в клетках конъюнктивы крысы в норме и после экспериментальных воздействий. I – контроль (Control), II – гипоксия, фиксация через 1 ч (H1h), III – гипоксия, фиксация через 3 ч (H3h), IV – введение парааминобензойной кислоты: до гипоксии (PABA+H), V – после гипоксии (H+PABA), VI – до и после гипоксии, двойная гипоксия (DH).

При двукратных сеансах гипоксии обнаружено усиление апоптотического поражения ДНК клеток, которое сопровождалось интенсификацией восстановительных процессов, оцениваемых по экспрессии маркера митотических клеток – фосфорилированного гистона рН3 – и маркера репарации ДНК – фосфорилированного гистона  $\gamma$ -H2AX. Установлено, что парабубльбарная инъекция Актипола за 24 ч до гипоксии купирует в конъюнктиве развитие апоптотического процесса, сохраняя его на уровне физиологической нормы, тем самым оказывая защитное действие в условиях гипоксии. Ранее нами было показано, что тотальное действие острой гипобарической гипоксии *in vivo* у взрослых крыс вызывает избирательное первичное поражение клеток конъюнктивы и эпителиальных клеток роговицы при отсутствии апоптотических клеток в других тканях глаза [75]. Предположение о том, что увеличение дозы гипобарической гипоксии при воздействии на крыс *in vivo* может вызвать массовое появление апоптотических клеток также в тканях заднего отдела глаза, не подтвердилось. Показано, что увеличение дозы данного типа гипоксии интенсифицировало степень апоптотического

поражения в конъюнктиве и эпителии роговицы, но не привело к появлению апоптотических клеток в тканях заднего отрезка глаза [70]. Это позволяет сделать вывод, что избирательное первичное повреждение тканей переднего отдела глаза – специфическая характеристика данного типа гипоксии. Подвергающиеся апоптозу клетки глаза как в нормальном онтогенезе, так и при патогенезе высвобождают ряд митогенов, активирующих постмитотические клетки. В качестве кандидатов митогенных сигнальных белков, продуцируемых клетками, подвергающимися апоптозу, рассматриваются SHH, VEGF, TGF- $\beta$ , PGE, JNK, WNT, BMP [76-78].

#### 3.2.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Полученные результаты в совокупности с имеющимися в литературе данными [72,73] приводят к заключению, что ПАБК в форме лекарственного препарата Актипола выступает в качестве эпигенетического регулятора восстановительных процессов в обновляющихся клеточных популяциях. Применение Актипола как защитного и лечебного средства предоставляет возможность оптимизировать состояние поверхностных тканей глаза в повреждающих условиях гипоксии, поддерживая его на уровне физиологической нормы. Результаты исследования позволяют предполагать, что механизмы защитного и лечебного действия Актипола надо искать в его взаимодействии с разными этапами развития апоптотического процесса в связи с проблемой апоптозиндуцируемой пролиферации, что заслуживает дальнейшего изучения. Исследования роли регуляторных факторов в решении проблемы гипоксия–глаз заслуживают пристального внимания, особенно с учетом данных об участии гипоксии в патогенезе и регенерации тканей глаза.

## РАЗДЕЛ 4. ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ КАСКАД В НИШЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЗУБЧАТОЙ ИЗВИЛИНЫ ГИППОКАМПА.

### 4.1. ВВЕДЕНИЕ

Новые нервные клетки рождаются и функционально интегрируются в нервную сеть зубчатой извилины гиппокампа на протяжении всей жизни млекопитающих, включая человека [79-82]. Многочисленные исследования показывают, что постнатальный нейрогенез в гиппокампе важен для обучения и памяти, а также для эмоциональной составляющей поведения [83]. Начало новым нейронам дают так называемые стволовые клетки, которые морфологически и по некоторым маркерам сходны с клетками радиальной глии развивающегося мозга [84, 85]. Тела этих стволовых клеток располагаются в субгранулярной зоне зубчатой извилины. Они простирают сквозь всю толщу гранулярного слоя один апикальный отросток, который заканчивается ветвлением, распространяющимся примерно на треть ширины молекулярного слоя [84]. Большая часть этих стволовых клеток находится в состоянии покоя. Однажды войдя в клеточный цикл, стволовые клетки подвергаются ассиметричному делению ограниченное число раз, давая начало транзиторным амплифицирующимся клеткам [84, 86-87]. Последние делятся симметрично также ограниченное число раз. Часть транзиторных амплифицирующихся клеток подвергается апоптозу или элиминируется клетками микроглии [88]. Выжившие клетки становятся нейробластами, которые дифференцируются в зрелые нейроны гранулярного слоя, интегрируясь в существующую нейронную сеть. В свою очередь, стволовые клетки после ограниченного числа делений утрачивают морфологию и молекулярные маркеры клеток радиальной глии и, по-видимому, необратимо превращаются в обычные астроциты гранулярного слоя [84, 89]. Одним из биологических проявлений работы такого каскада нейрогенеза является истощение пула стволовых клеток в зубчатой извилине с возрастом. Сегодня можно считать установленным, что возрастное снижение нейрогенеза в гиппокампе связано с истощением пула стволовых клеток в результате их деления [84].

Многочисленные исследования на модельных животных показывают, что нейродегенеративные (болезнь Альцгеймера или Паркинсона) [90, 91] и нейропсихические (шизофрения, глубокая депрессия) [92, 93] заболевания, противораковая терапия [94, 95] и старение сопровождаются низкой продукцией новых нейронов в зубчатой извилине гиппокампа. В этой связи, нейрогенный каскад в гиппокампе рассматривается как мишень для терапии когнитивных нарушений и депрессии, развивающихся на фоне указанных выше состояний мозга. Поняв в деталях как

устроен нейрогенный каскад, мы сможем определить, какие его этапы подвергаются негативному воздействию и что необходимо «починить» для восстановления нейрогенеза, когнитивных функций и памяти. Кроме того, возможность управлять работой нейрогенного каскада открывает новые перспективы в использовании собственных клеточных резервов мозга для репарации нервной ткани в случае травмы или нейродегенеративного заболевания. В этой связи разработка и применение новых методов, позволяющих анализировать кинетику деления стволовых и прогениторных клеток, представляется актуальной задачей.

## 4.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы самцы мышей трансгенной линии nestin-GFP [96] в возрасте 1 и 2 месяца. Животные содержались в группах не более 4 особей в клетке с циклом день/ночь 12 ч. Животные обеих возрастных групп получали однократные инъекции 5-этинил-2'-деоксиуридина (ЭтдУ), 5-йодо-2'-деоксиуридина (ЙоддУ) и 5-хлоро-2'-деоксиуридина (ХлдУ) по схеме, представленной на рисунке 1а. (ЭтдУ, перерыв 4 ч, ЙоддУ, перерыв 19 ч, ХлдУ, перерыв 1 ч, транскардиальная перфузия).

Перед транскардиальной перфузией мышей глубоко анестезировали введением 400 мкл 15% раствора хлоралгидрата в фосфатно-солевом буфере (PBS). Животных транскардиально перфузировали по стандартной методике сначала раствором PBS, а затем охлажденным раствором 4% параформальдегида. После перфузии головной мозг извлекали и помещали в раствор 4% параформальдегида на ночь. После фиксации мозг отмывали в растворе PBS и приготавливали сагиттальные срезы толщиной 50 мкм на вибраторе, которые собирали последовательно в шесть лунок 24-луночной плашки. Таким образом, каждая лунка содержала целое полушарие, составленное из каждого 6-го среза [97].

По одной такой лунке от каждой мыши в эксперименте было взято для проведения окрашивания на три аналога тимидина и белок GFP для фенотипирования стволовых и прогениторных клеток. Окрашивание проводили в соответствии с нашим протоколом [98, 99]. Коротко, срезы инкубировали в растворе с детергентом для растворения клеточных мембран, чтобы в последующем обеспечить доступ антител к внутриклеточным антигенам на срезах мозга. Затем, проводилась первая клик реакция с флуоресцентным азидом для выявления ЭтдУ и вторая клик реакция с нефлуоресцентным азидом для блокировки неспецифического связывания антител против ХлдУ и ЙоддУ с ЭтдУ. После клик реакции срезы подвергали денатурированию ДНК в растворе соляной кислоты, что необходимо для связывания антител с ХлдУ и ЙоддУ. Нейтрализацию кислоты проводили 1M

раствором борной кислоты. Срезы затем инкубировали в растворе первичных антител против ХлдУ, ЙоддУ и GFP белка. После отмывок, проводили окрашивание вторичными антителами, помеченными различными флуорохромами. Срезы после окрашивания наносили на предметные стекла «мокрым» способом и заключали в специальную среду для флуоресцентной микроскопии под покровное стекло.

Готовые препараты сагиттальных срезов сканировали на конфокальном микроскопе PerkinElmer с так называемым спиннинг диском. На полученных изображениях проводили подсчет столовых и прогениторных клеток, включивших любые комбинации меток, и аппроксимацию на их числа на целый мозг по ранее предложенному алгоритму [84, 97]. Количественные данные представляли в виде среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Для сравнения групп животных 1- и 2-месячного возраста использовали непараметрический тест Уэлча.

#### 4.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанная нами схема введения трех аналогов тимидина (рис. 1а) основана на представлениях о длительности всего клеточного цикла, а также S-фазы [84]. Основная идея заключается в том, что с помощью двух меток «выделяется» 4-часовая когорта клеток из всей S-фазы, а судьба клеточных потомков (продолжили ли они деление или вышли из клеточного цикла) анализируется с использованием третьей метки. Те клетки 4-часовой когорты, которые помечены только первой меткой, вышли из клеточного цикла. Те же клетки 4-часовой когорты, которые помечены первой и третьей меткой (но не второй), продолжили деление. Подсчитав размеры этих субпопуляций клеток (пример зубчатой извилины гиппокампа мыши, которая получила инъекции трех аналогов тимидина, представлен на рисунке 1б) и, определив их фенотипы (стволовые или прогениторные клетки), мы смогли установить доли клеток, которые продолжают деление. Для стволовых и прогениторных клеток эти доли составили  $47.8 \pm 5.7$  и  $78.3\% \pm 5.6\%$  соответственно для животных 2-месячного возраста. Это означает, что за один клеточный цикл его покидает примерно 50% стволовых и 20% прогениторных клеток, или, другими словами, стволовые клетки проходят в среднем два деления, тогда как прогениторные клетки – примерно 4-5 делений.

Более детальный анализ количества клеток с различными комбинациями меток позволил установить, что стволовые клетки делятся преимущественно асимметричным делением, когда один из клеточных потомков остается эквивалентным материнской стволовой клетке, а другой становится прогениторной клеткой. Таким образом, если мы

знаем сколько стволовых клеток из 4-часовой когорты покидает клеточный цикл, то это значит, что ровно такое же число покоящихся стволовых клеток начинает делиться. Одновременно с этим мы знаем, сколько прогениторных клеток из 4-часовой когорты перестает делиться, поделив эту величину на число впервые вошедших стволовых клеток,

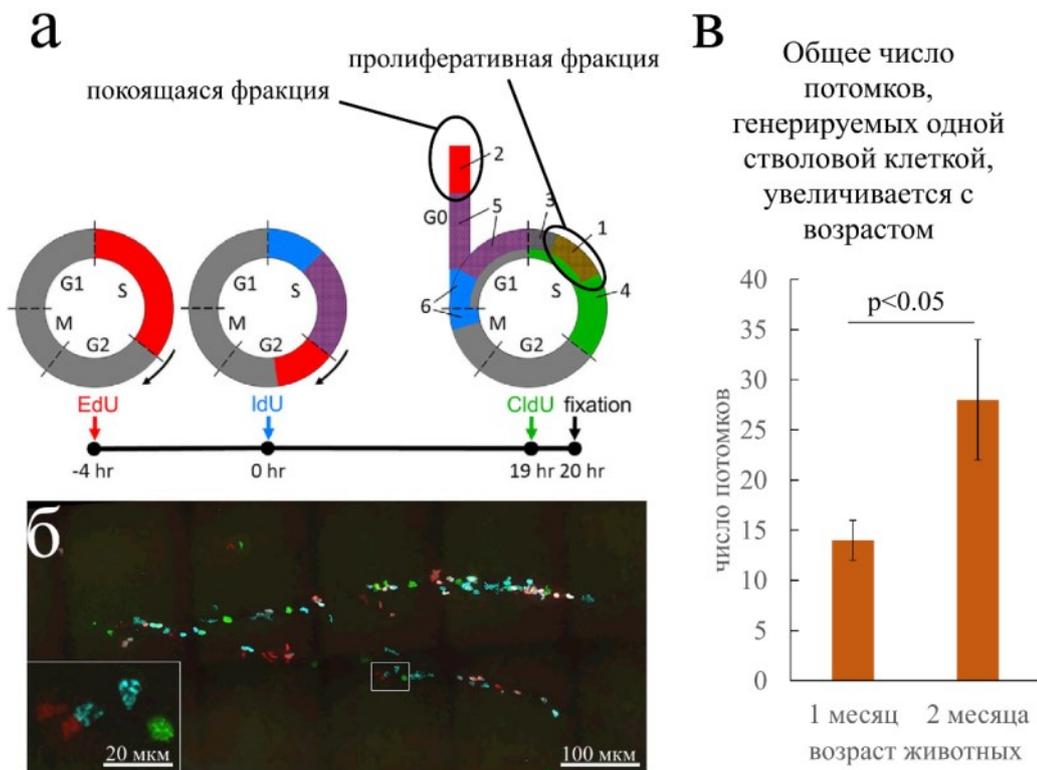


Рисунок 4.1 Определение динамики деления стволовых клеток в зубчатой извилине гиппокампа. (а) Схема тройного маркирования, позволяющего различать пролиферативную и покоящуюся фракции тех стволовых и прогениторных клеток, которые находятся в клеточном цикле. (б) Пример зубчатой извилины гиппокампа в мозге мыши, получившей инъекции трех аналогов тимидина: ЭддУ (красный), ХлдУ (зеленый) и ЙоддУ (голубой). (в) Общее число потомков, генерируемых одной стволовой клеткой у 1- и 2-месячных мышей.

мы можем определить сколько клеточных потомков получается из одной стволовой клетки. Проведя такой эксперимент с животными 1- и 2-месячного возраста, мы получили несколько неожиданный результат. Хорошо известно, что нейрогенез и, в частности, пролиферативная активность в гиппокампе с возрастом снижаются, и если у 1-месячных мышей число делящихся клеток составляет порядка 3500-4000 на целый гиппокамп, то уже у 2-месячных – это не более 1500 клеток [84]. В этом контексте, тот факт, что количество клеточных потомков, приходящихся на одну стволовую клетку, у 2-месячных мышей составляет 28, а у 1-месячных – 14 (рис. 4.1в), кажется парадоксальным. Этот результат позволяет сделать вывод о том, что нейрогенный каскад с возрастом

работает эффективней. Другими словами, у более молодых животных используется не весь потенциал стволовых клеток. Хотя подобный вывод ранее уже напрашивался из простого измерения соотношения прогениторных и стволовых клеток у животных разных возрастов [84], впервые это удалось показать путем прямых измерений, с использованием разработанного нами метода тройного маркирования делящихся клеток [98, 99].

В отсутствие метода тройного маркирования, для определения покоящейся и пролиферативной фракции делящихся клеток было необходимо использовать две группы экспериментальных животных и метод двойного маркирования [100-103]. Использование тройного маркирования позволило не только в значительной мере упростить и ускорить анализ покоящейся и пролиферативной фракций, но прямо измерить такую важную кинетическую характеристику деления стволовых клеток, как число потомков, которые они производят.

#### 4.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан метод маркирования с использованием трех аналогов тимидина, а также предложена экспериментальная схема тройного мечения, которая позволяет прямо измерить такие ключевые кинетические характеристики нейрогенного каскада, как число делений, которые проходят стволовые и прогениторные клетки, а также число клеточных потомков, которые происходят из одной стволовой клетки. Благодаря новым и уникальным подходам, мы показали, что в противоположность ожиданиям число клеточных потомков, которые происходят из одной стволовой клетки, увеличивается с возрастом. Эти результаты дополняют ранее предложенную клеточную модель нейрогенеза и в корне меняют наши представления о потенциале стволовых клеток гиппокампа. Эти исследования необходимо развивать, поскольку они помогут установить особенности деления стволовых клеток в гиппокампе, определить ключевые сигнальные пути регуляции деления клеток в нише стволовых клеток гиппокампа и разработать тестовые системы для поиска пронеурогенных факторов.

Работа выполняется как совместный проект ИБР РАН и лаборатории профессора Г.Н. Ениколопова в Университете Стони Брук, г. Стони Брук, шт. Нью-Йорк, США. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП по биологии развития ИБР РАН.

## ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данный отчет вошли все основные результаты работы по теме №5 в 2018 г., включающие различные аспекты развития и регенерации тканей мозга, глаза, мышц, а также исследования канцерогенеза на модели ГЦК. Вся экспериментальная работа выполнена с использованием методов современной биологии: генетического манипулирования, молекулярно-генетических, био- и иммунохимических подходов, культивирования *in vitro*. Широким стало и применение известных, а также оригинальных моделей развития и регенерации. Среди них: регенерация тканей глаза у низших позвоночных (Urodela), развитие хрусталика у мышей, органотипическое культивирование тканей глаза низших и высших (тритон, мышь, крыса) позвоночных, развитие тканей глаза плода человека, дегенерация и регенерация мышц у мышей в условиях невесомости, повреждение переднего отдела глаза крыс в условиях гипоксии, использование мышей трансгенной линии nestin-GFP и тройного мечения для изучения нейрогенеза в мозге мышей и другие.

В результате получена информация о роли ряда генов и сигнальных молекул в формировании тканей глаза (хрусталик, сетчатка, радужка, стекловидное тело) амфибий, птиц, млекопитающих и человека при регенерации и в развитии. Проанализированы молекулярно-генетические основы высокой регенерационной способности у низших позвоночных. Определены особенности генетического профиля клеток – потенциальных источников регенерации тканей глаза позвоночных. Для ряда изучаемых регуляторных генов выявлена избирательная ткане- и таксонспецифическая активность. Выявление таксонспецифических генов исследуемых регуляторных и тканеспецифических генов и их изоформ существенно для объяснения их активности в развитии и регенерации тканей у эволюционно отдаленных позвоночных. Изучены экспрессия и клеточная локализация ламинин-связывающих белков (интегринов) в хрусталике глаза мыши в развитии, в том числе в условиях хрусталик-специфичного нокаута бета-1 интегрин. В совокупности эти данные свидетельствуют о сложных взаимоотношениях разных форм интегринов в процессе дифференцировки хрусталика глаза позвоночных. Предварительно охарактеризовано стимулирующее регенерационные ответы действие экстрагируемых молекул секрета тканей глаза тритонов по отношению к аналогичным тканям глаза млекопитающих (крысы, мыши), а также их протекторное действие на культивируемую wholeamount сетчатку мышей. Данные работы на модели развивающегося плода человека демонстрируют присутствие белков, служащих антиоксидантной и иммунной защитам глаза, а потому являются важным вкладом в понимание общих закономерностей пренатального развития глаза человека.

Влияние внешних факторов на развитие и регенерацию – еще один раздел темы, обусловленный необходимостью понимания их роли и механизмов действия на данные процессы. В этом разделе – завершены исследования регенерации мышц мышей после 30 дн полета на борту Бион – М1. В результате чего доказано сохранение в условиях микро-г молекулярного механизма активации стволовых клеток саттелитов и инициации миогенеза. Начата разработка новой модели – регенерации тканей наружного уха мышей для возможного применения также в условиях невесомости в полете биоспутника Бион-М2. Исследована роль гипоксии в повреждении переднего отдела глаза и оценена ПАБК, как эффективный протектор этих повреждений. На модели ГЦК мыши обнаружена перестройка генома, сопровождающая опухолевую трансформацию клеток в процессе развития гепатоканцерогенеза, соответствующая явлению хромотрипсиса. Результаты исследования экспрессии ряда генов – регуляторов эпителио-мезенхимного перехода и миграции клеток в культурах гепатоцеллюлярной карциномы печени служат пониманию тонких регуляторных механизмов, лежащих в основе канцерогенеза тканей животных и человека. Дальнейшая работа по теме 5 «Клеточные и молекулярные механизмы развития и регенерации тканей и органов у низших и высших позвоночных. Поиск способов регуляции восстановительных процессов», позволит приблизиться к пониманию, как молекулярных механизмов развития и регенерации, так и к решению практических вопросов управления восстановительными процессами, их коррекции, экспериментальной индукции, а также защиты от разрушающих внешних факторов.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Martin D.M., Skidmore J.M., Philips S.T., Vieira C., Gage P.J., Condie B.G., Raphael Y., Martinez S., Camper S.A. *PITX2* is required for normal development of neurons in the mouse subthalamic nucleus and midbrain // *Dev. Biology.* – Vol. 267. N1. – P. 93 - 108.
2. Mindy R. Waite, Skidmore J.M., Micucci J.A., Shiratori H., Hamada H., Martin J.F., Martin D.M. Pleiotropic and isoform-specific functions for *Pitx2* in superior colliculus and hypothalamic neuronal development // *Mol. Cell Neurosci.* - 2013. Vol. 52. - P.128–139.
3. Nemes S., Luxey M., Jain D., Huang Sung A., Pastinen T., Drouin J. *Pitx1* directly modulates the core limb development program to implement hindlimb identity // *Development.* - 2017. Vol. 144. – P. 3325-3335.
4. Takashi Sh., Satoru Y., Rieko K., Shigenori T., Harumichi Sh. *Pitx1* expression in developing and regenerating axolotl limbs // *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 2015 - Vol. 200885. - P. 5–10.
5. Melville J., Hunjan S., McLean F., Mantziou G., Boysen K., Parry L.J. Expression of a hindlimb-determining factor *Pitx1* in the forelimb of the lizard *Pogona vitticeps* during morphogenesis // *Open Biol.* - 2016. Vol. 6: 160252.
6. Григорян Э.Н. Молекулярные факторы поддержания и активации «молодого» фенотипа клеток – источников регенерации тканей глаза // *Биохимия.* - 2018. Том 83. №11. – Стр. 1627 – 1642 \*
7. Grigoryan E.N. Endogenous Cell Sources for Eye Retina Regeneration in Vertebrate Animals and Humans // *Russian Journal of Developmental Biology* - 2018. Vol. 49, No. 6 - P. 1 – 13. DOI: 10.1134/S106236041901003X.\*
8. Hynes R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines // *Cell.* - 2002. - Vol. 110. - P. 673–687.
9. Hu P., Luo B.H. Integrin bi-directional signaling across the plasma membrane // *J. Cell Physiol.* - 2013. - Vol. 228. - P. 306-312.
10. Humphries J.D., Chastney M.R., Askari J. et al. Signal transduction via integrin adhesion complexes // *Curr. Opin. Cell Biol.* - 2018. - Vol. 56. - P. 14-21.
11. Humphries J.D., Byron A., Humphries M.J. Integrin ligands at a glance // *J. Cell Sci.* -2006. - Vol. 119. Pt. 19. - P. 3901-3903.
12. Kiyozumi D., Sato-Nishiuchi R., Sekiguchi K. In Situ Detection of Integrin Ligands // *Curr. Protoc. Cell Biol.* - 2014. - Vol. 65. - Unit 9.7. - P. 1-17.
13. Simirskii V.N., Wang Y., Duncan M.K. Conditional deletion of beta1-integrin from the developing lens leads to loss of the lens epithelial phenotype // *Dev. Biol.* - 2007. - Vol. 306. - No.2. - P. 658-668.

14. Li Y., Zhang Y., Qi S., Su G. Retinal organotypic culture – a candidate for research on retinas. // *Tissue Cell*. - 2018. Vol. 51 – P.1-7.
15. McGann Ch.J., Odelberg Sh.J., Keating M.T. Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract // *PNAS*. - 2001. Vol. 98. N 24. - P. 13699–13704.
16. Kim H-J., Archer E., Escobedo N., Tapscott S.J., Graciela A., Unguez G.A. Inhibition of mammalian muscle differentiation by regeneration blastema extract of *Sternopygus Macrurus* // *Dev. Dyn*. - 2008. Vol. 237. N10. – P. 2830–2843.
17. Григорян Э.Н., Новикова Ю.П., Килина О.В., Филиппов П.П. Новый метод культивирования *in vitro* пигментного эпителия сетчатки в составе заднего сектора глаза взрослой крысы // *Клеточные технологии и биологии и медицине*. - 2007. № 4. - С. 207–215.
18. Новикова Ю.П., Алейникова К.С., Краснов М.С., Поплинская В.А., Григорян Э.Н. Клетки пигментного эпителия сетчатки глаз взрослых тритона и крысы в условиях органотипического культивирования *in vitro* // *Изв. АН. Сер. биол.* - 2010. №3. - С. 271-282.
19. Ганчарова О.С. Моделирование повреждения и восстановления тканей глаза и слюнной железы // *Канд. Дисс. Москва. ИБР*. - 2017. - 156 с.
20. Григорян Э.Н., Краснов М.Ю., Алейникова К.С., Поплинская В.А., Миташов В.И. Ротационное культивирование изолированной сетчатки тритона как способ получения малодифференцированных, пролиферирующих клеток *in vitro* // *Докл. АН*. - 2005. - Т.405. № 4. - С. 566-570.
21. Маркитантова Ю.В., Авдонин П.П., Григорян Э.Н. Компоненты сигнального пути FGF2 в тканях заднего сектора у взрослых тритонов *Pleurodeles waltl* // *Изв. РАН. Сер. биол.* - 2014. № 41. - С. 297–305.
22. Панова И.Г., Полтавцева Р.А., Рожкова Г.И. Морфологическая характеристика развития крайней периферии сетчатки в области *oraserrata* // *Сенсорные системы*. 2018. Т. 32. № 4. С. 302 - 309. DOI:10.1134/S0235009218040091. \*
23. Panova I.G., Sharova N.P., Dmitrieva S.B., Poltavtseva R.A., Sukhikh G.N., Tatikolov A.S. The use of a cyanine dye as a probe for albumin and collagen in the extracellular matrix//*Anal. Biochem*. - 2007. Vol. 361, № 2. - P. 183-189.
24. Панова И.Г., Татиколов А.С., Сухих Г.Т. Корреляция между содержанием альбумина и каротиноидов в стекловидном теле глаза человека в пренатальном развитии//*Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. - 2007. Т. 144, № 11. - С. 522-525.

25. Panova I.G., Yakovleva M.A., Tatikolov A.S., Kononikhin A.S., Feldman T.B., Poltavtseva R.A., Nikolaev E.N., Sukhikh G.T., Ostrovsky M.A. Lutein and its oxidized forms in eye structures throughout prenatal human development//*Exper. Eye Res.* - 2017. Vol. 160. - P. 31-37.
26. Панова И.Г., Беззубенко Ю.В., Татиколов А.С., Полтавцева Р.А., Иванец Т.Ю., Сухих Г.Т. Альфа-фетопротеин в сетчатке и хрусталике глаза человека на ранних стадиях пренатального развития//*Журнал эволюционной биохимии и физиологии.* - 2018. Т. 54, № 2. - С. 111-114.
27. Panova I.G., Poltavtseva R.A., Sukhova Yu.V., Ivanets T.Yu., Tatikolov A.S., Sukhikh G.T. Uric acid as antioxidant in the vitreous body of the eye in prenatal human development//*Neurochemical Journal.* - 2018. Vol. 12, № 4. - Supplements S73. - P.74.
28. Kopp E.B, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity//*Curr Opin Immunol.* - 1999. Vol. 11. - P. 13–18.
29. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity//*Cell.* - 2006. Vol. 124. - P. 783–801.
30. Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M, Mantovani A 1998 The human Toll signalling pathway: divergence of nuclear factor kB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)//*J Exp Med.* - 1998. Vol. 187. - P. 2097–2101.
31. Harju K., Glumoff V., Hallman M. Ontogeny of Toll-Like Receptors Tlr2 and Tlr4 in Mice//*Pediatr Res.* - 2001. Vol. 49. - P. 81–83.
32. Kannaki T.R., Reddy M.R., Verma P.C., et al. Differential Toll-Like Receptor (TLR) mRNA Expression. Patterns during Chicken Embryological Development//*Animal Biotechnology.* - 2015. Vol. 26. - P. 130–135.
33. Kaul D., Habel P., Derkow K., et al. Expression of Toll-Like Receptors in the Developing Brain // *PLoS ONE.* - 2012. Vol. 7, №. 5. - e37767.
34. Barak B., Feldman N., Okun E. Toll-like receptors as developmental tools that regulate neurogenesis during development: an update // *Frontiers in Neuroscience.* - 2014. Vol. 8. Article 272. - P. 1-6.
35. Kawasaki T, Kawai T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways//*Frontiers in Immunology.* - 2014. Vol. 5. Article 461. - P. 1-8. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00461
36. Панова И.Г., Низяева Н.В., Сеницына В.А., Полтавцева Р.А., Сухих Г.Т.. Экспрессия toll-подобных рецепторов в раннем пренатальном развитии сетчатки глаза человека // *Онтогенез.* - 2018. Т. 49, № 6. - С. 369-374 \*.

37. Nizyaeva N.V., Sinitsyna V.A., Poltavtseva R.A., Panova I.G. Spatio-temporal localization of tlr2 and tlr4 receptors in prenatal development of the human retina // TOLL 2018: Editing Innate Immunity. June 6-9. 2018. Porto. Portugal.
38. Anel A., Calvo M., Naval J., Iturralde M., Alava M. A., Pineiro A. Interaction of rat  $\alpha$ -fetoprotein and albumin with polyunsaturated and other fatty acids: determination of apparent association constants // FEBS Letters. - 1989. Vol. 250, № 1. - P. 22-24.
39. Uriel J., Trojan J., Moro R., Pineiro A. Intracellular uptake of  $\alpha$ -fetoprotein: a marker of neural differentiation // Annals of New York Academy of Sciences. - 1983. Vol. 417. - P. 321-329.
40. Молдогазиева Н. Т., Терентьев А. А. Альфа-фетопротеин и факторы роста. Структурно-функциональные взаимоотношения и аналогии // Успехи биологической химии. - 2006. Т. 46. - С. 99-148.
41. Ames B.N., Cathcart R., Schwiers E., Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: A hypothesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1981. Vol.78. – P. 6858-6862.
42. Alvarez-Lario B., Macarron-Vicente J. Uric acid and evolution // Rheumatology. - 2010. Vol. 49. - P. 2010–2015.
43. Xiao J., Zhang X-L., Han R., Fu C., Chen W., Ye Z. Uric acid induces TLR4-dependent innate immune response but not HLA-DR and CD40 activation in renal proximal tubular epithelial cells // Int. J. Clin. Exp. Pathol. - 2016. Vol. 9, №2. - P. 940-949.
44. Ma L., Yang J., Yang L., et al. Developmental expression of Toll-like receptors in the guinea pig lung // Molecular Medicine Reports. - 2017. Vol. 15. - P. 1243-1251.
45. Okun E., Griffioen K.J., Mattson M.P. Toll-like receptor Signaling in Neural Plasticity and Disease // Trends Neurosci. - 2011. Vol. 34, №. 5. - P. 269–281.
46. Uryvaeva I.V., Mikaelyan A.S., Dashenkova N.O., Marshak T.L. Chromothripsis in Hepatocarcinogenesis: The Role of a Micronuclear Aberration and Polyploidy // Biology Bulletin. - 2018. Vol. 45. Is. 5. - P. 419 - 425. DOI: 10.1134/S1062359018050163). \* Урываева И.В., Микаелян А.С., Дашенкова Н.О., Маршак Т.Л. Хромотрипсис при гепатоканцерогенезе: роль микроядерных aberrаций и полиплоидии // Известия РАН. Сер.биол. - 2018. № 5. - С. 461 - 468. DOI: 10.1134/S0002332918050168
47. Uryvaeva I.V. A model of hepatic regeneration and carcinogenesis due to total liver cell injury induced by dipin and partial hepatectomy // Monogr. Dev. Biol. Basel, Karger. - 1992. - Vol. 23.- P. 230–236.

48. Дашенкова Н.О., Петракова О.С., Цитрина А.А., Микаелян А.С. Характеристика первичных культур гепатоцеллюлярной карциномы мыши и оценка их потенциала к эпителио-мезенхимному переходу // Клиническая и экспериментальная морфология. - 2017. № 3. - С. 44-49.
49. Stephens P. J., Greenman C.D., Fu B., Yang F., Bignell G.R., Mudie L.J., Pleasance E.D., et al. Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development // Cell - Vol. 144. N 1. - P. 27–40.
50. Pickup M.W., Mouw J.K., Weaver V.M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer // EMBO Rep. - 2014. Vol.15. № 12. - P. 1243–1253.
51. Whatcott C.J., Han H., Posner R.G., Hostetter G., Von Hoff D.D. Targeting the tumor microenvironment in cancer: why hyaluronidase deserves a second look // Cancer Discov. - 2011. Vol. 1. № 4. - P. 291–296.
52. Martin T.P., Edgerton V.R., Grindeland R.E. Influence of spaceflight on rat skeletal muscle // J. Appl. Physiol. – 1988. – Vol. 65, № 5. – P. 2318–2325.
53. Shenkman B.S., Turtikova O.V., Nemirovskaya T.L., Grigoriev A.I. Skeletal muscle activity and the fate of myonuclei // Acta Naturae – 2010. – Vol. 2, № 2. – P. 59–66.
54. Schultz E., Darr K.C., Macius A. Acute effects of hindlimb unweighting on satellite cells of growing skeletal muscle // J Appl Physiol. – 1994. – Vol. 76, № 1. – P. 266–270.
55. Grigoriev A.I., Kozlovskaja I.B., Shenkman B.S. [The role of support afferents in organisation of the tonic muscle system] // Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova – 2004. – Vol. 90, № 5. – P. 508–521.
56. Radugina E.A., Almeida E.A.C., Blaber E.A., Poplinskaya V.A., Markitantova Y.V., Grigoryan E.N. Exposure to microgravity for 30 days onboard Bion M1 caused muscle atrophy and impaired regeneration in murine femoral Quadriceps // Life Sci. Sp. Res. –2018. – Vol. 16. – P. 18–25.\*
57. Ishihara A., Fujino H., Nagatomo F., Takeda I., Ohira Y. Gene expression levels of heat shock proteins in the soleus and plantaris muscles of rats after hindlimb suspension or spaceflight // J. Physiol. Sci. – 2008. – Vol. 58, № 6. – P. 413–417.
58. Lepper C., Partridge T.A., Fan C.M. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration // Development – 2011. – Vol. 138, № 17. – P. 3639–3646.
59. Buckingham M. Skeletal muscle formation in vertebrates // Curr. Opin. Genet. Dev. – 2001. – Vol. 11, № 4. – P. 440–448.
60. Grigoryan E.N., Radugina E.A. Behavior of stem-like cells, precursors for tissue regeneration in Urodela, under conditions of microgravity // Stem Cells Dev. – 2019. (in press).

61. Radugina E., Grigoryan E. Heat shock response and shape regulation during newt tail regeneration//Journal of Thermal Biology. - 2018. -Vol. 71. - P. 171 - 179. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2017.11.009. \*
62. Morokuma J., Durant F., Williams K.B., Finkelstein J.M., Blackiston D.J., Clements T., Reed D.W., Roberts M., Jain M., Kimel K., Trauger S.A., Wolfe B.E., Levin M. Planarian regeneration in space: Persistent anatomical, behavioral, and bacteriological changes induced by space travel // Regeneration (Oxf) – 2017. – Vol. 4. № 5. – P. 85–102.
63. Rajnoch C., Ferguson S., Metcalfe A.D., Herrick S.E., Willis H.S., Ferguson M.W. Regeneration of the ear after wounding in different mouse strains is dependent on the severity of wound trauma // Dev. Dyn. – 2003. – Vol. 226, № 2. – P. 388–397.
64. Gawriluk T.R., Simkin J., Thompson K.L., Biswas S.K., Clare-Salzler Z., Kimani J.M., Kiama S.G., Smith J.J., Ezenwa V.O., Seifert A.W. Comparative analysis of ear-hole closure identifies epimorphic regeneration as a discrete trait in mammals // Nat. Commun. – 2016. – Vol. 7: 11164.
65. Metcalfe A.D., Willis H., Beare A., Ferguson M.W. Characterizing regeneration in the vertebrate ear // J. Anat. – 2006. – Vol. 209, № 4. – P. 439–446.
66. Lou Y., Oberpriller J.C., Carlson E.C. Effect of hypoxia on the proliferation of retinal microvessel endothelial cells in culture // Anat. Rec. - 1997. Vol. 248. № 3. - P. 366–373.
67. Liu J., Narasimhan P., Lee Y.-S., Song Y.S., Endo H., Yu F., Chan P.H. Mild hypoxia promotes survival and proliferation of SOD2-deficient astrocytes via c-Myc activation // J. Neurosci. - 2006. Vol. 26, N 16. - P. 4329–4337.
68. Ishikawa K., Yoshida S., Kadota K., Nakamura T., Niino H., Arakawa S., Yoshida A., Akashi K., Ishibashi T. Gene expression profile of hyperoxic and hypoxic retinas in a mouse model of oxygen-induced retinopathy // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. - 2010. Vol. 51. - P. 4307–4319.
69. Grimm Ch., Willmann G. Hypoxia in the eye: A two-sided coin // High Altitude Med. Biol. - 2012. Vol. 13, № 3. - P. 169–175.
70. Markitantova Y.V., Akberova S.I., Ryabtseva A.A., Stroeveva O.G. The Effect of para-Aminobenzoic Acid on Apoptosis Processes in the Adult Rat Conjunctiva and Corneal Epithelium in vivo after Hypobaric Hypoxia//Biology Bulletin.- 2018. -V. 45. N 3. -P. 226 - 234. DOI: 10.1134/S1062359018020061. Маркитантова Ю.В., Акберова С.И., Рябцева А.А., Строева О.Г. Влияние парааминобензойной кислоты на процессы апоптоза в конъюнктиве и эпителии роговицы взрослых крыс in vivo, после действия гипобарической гипоксии//Известия Российской академии наук. Серия биологическая. - 2018. - № 3. - С. 257 - 266. DOI: 10.7868/S0002332918030025. \*

71. Полежаев Л.В. Факторы регенерации нерегенерирующих органов и тканей // Вестн. РАН. 2000. Том. 70, № 7. - С. 597–603.
72. Строева О.Г., Панова И.Г. Регуляция митотической активности в роговице крыс при защитном лечебном действии парааминобензойной кислоты в опытах с рентгеновским облучением // Изв. РАН. Сер. биол. - 1999. № 5. - С. 613–616.
73. Акберова С.И., Мусаев Галбинур П.И., Строева О.Г., Магомедов Н.М., Бабаев Н.Ф., Галбинур А.П. Сравнительная оценка антиоксидантной активности парааминобензойной кислоты и эмоксипина в роговице и хрусталике (экспериментальные исследования) // Вестн. офтальмологии. - 2001. № 4. - С. 25–29.
74. Leuba G., Kraftsik R., Saini K. Quantitative distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin D-28k immunoreactive neurons in the visual cortex of normal and Alzheimer cases // *Exp. Neurol.* - 1998. Vol.152. - P. 278–291.
75. Акберова С.И., Маркитантова Ю.В., Рябцева А.А., Строева О.Г. Гипоксия как патогенный фактор, затрагивающий ткани глаза: избирательное апоптотическое поражение конъюнктивы и переднего эпителия роговицы // Докл. РАН. - 2016. Том. 467, № 6. - С. 718–720.
76. Fan Y., Bergmann A. Distinct mechanisms of apoptosis induced compensatory proliferation in proliferating and differentiating tissues in the *Drosophila* eye // *Dev. Cell.* - 2008. Vol.14. - P. 399–410.
77. Bianchi E., Scarinci F., Grande C., Plateroti R., Plateroti P., Plateroti A.M., Fumagalli L., Capozzi P., Feher J., Artico M. Immunohistochemical profile of VEGF, TGF- $\beta$  and PGE in human pterygium and normal conjunctiva: experimental study and review of the literature // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* - 2012. Vol. 25. - P. 607–615.
78. Fan Y., Wang S., Hernandez J., Yenigun V.B., Hertlein G., Fogarty C.E., Lindblad J.L., Bergmann A. Genetic models of apoptosis-induced proliferation decipher activation of JNK and identify a requirement of EGFR signaling for tissue regenerative responses in *Drosophila* // *PLoS Genet.* 2014. Vol. 10(1): e1004131.
79. Cameron H.A., Woolley C.S., McEwen B.S., Gould E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat // *Neuroscience.* -1993. -Vol. 56, No. 2. - P. 337-44.
80. Eriksson P.S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D.A., Gage F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus//*Nature Medicine.* - 1998. -Vol. 4. No. 11. -P. 1313-1317.
81. Kempermann G., Gage F.H., Aigner L., Song H., Curtis M.A., Thuret S., Kuhn H.G., Jessberger S., Frankland P.W., Cameron H.A., Gould E., Hen R., Abrous D.N., Toni N.,

Schinder A.F., Zhao X., Lucassen P.J., Frisén J. Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions//Cell Stem Cell. -2018. -Vol. 23, No. 1. -P. 25-30.

82. van Praag H., Schinder A.F., Christie B.R., Toni N., Palmer T.D., Gage F.H. Functional neurogenesis in the adult hippocampus // Nature. -2002. Vol. 415, No. 6875. -P. 1030-1034.

83. Anacker C., Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood//Nature Review Neuroscience. -2017. -Vol. 18, No. 6. -P. 335-346.

84. Encinas J.M., Michurina T.V., Peunova N., Park J.H., Tordo J., Peterson D.A., Fishell G., Koulakov A., Enikolopov G. Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus//Cell Stem Cell. -2011. -Vol. 8. -P. 566–579.

85. Seri B., García-Verdugo J.M., McEwen B.S., Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus//Journal of Neuroscience. -2001. -Vol. 21, No. 18. – P. 7153-7160.

86. Gonçalves J.T., Schafer S.T., Gage F.H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior//Cell. -2016. -Vol. 167, No. 4. -P. 897-914.

87. Pilz G.A., Bottes S., Betizeau M., Jörg D.J., Carta S., Simons B.D., Helmchen F., Jessberger S. Live imaging of neurogenesis in the adult mouse hippocampus//Science. -2018. -Vol. 359, No. 6376. -P. 658-662.

88. Sierra A., Encinas J.M., Deudero J.J., Chancey J.H., Enikolopov G., Overstreet-Wadiche L.S., Tsirka S.E., Maletic-Savatic M. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis//Cell Stem Cell. -2010. -Vol. 7, No. 4. -P. 483-495.

89. Sierra A., Martín-Suárez S., Valcárcel-Martín R., Pascual-Brazo J., Aelvoet S.A., Abiega O., Deudero J.J., Brewster A.L., Bernales I., Anderson A.E., Baekelandt V., Maletić-Savatić M., Encinas J.M. Neuronal hyperactivity accelerates depletion of neural stem cells and impairs hippocampal neurogenesis//Cell Stem Cell. -2015. -Vol. 16, No. 5. -P. 488-503.

90. Marxreiter F., Regensburger M., Winkler J. Adult neurogenesis in Parkinson's disease//Cellular and Molecular Life Sciences. -2013. -Vol. 70. -P 459–473.

91. Varela-Nallar L., Aranguiz F.C., Abbott A.C., Slater P.G., Inestrosa N.C. Adult hippocampal neurogenesis in aging and Alzheimer's disease//Birth Defects Research Part C: Embryo Today. -2010. -Vol. 90, No. 4. -P. 284-296.

92. Miller B.R., Hen R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety//Current Opinion in Neurobiology. -2015. -Vol. 30. -P. 51-58.

93. Schoenfeld T.J., Cameron H.A. Adult neurogenesis and mental illness//Neuropsychopharmacology. -2015. -Vo. 40, No. 1. -P. 113-128.

94. Egeland M., Guinaudie C., Du Preez A., Musaelyan K., Zunszain P.A., Fernandes C., Pariante C.M., Thuret S. Depletion of adult neurogenesis using the chemotherapy drug temozolomide in mice induces behavioural and biological changes relevant to depression//*Translational Psychiatry*. -2017. -Vol. 7, No. 4. e1101.
95. Winocur G., Berman H., Nguyen M., Binns M.A., Henkelman M., van Eede M., Piquette-Miller M., Sekeres M.J, Wojtowicz J.M., Yu J., Zhang H., Tannock I.F. Neurobiological Mechanisms of Chemotherapy-induced Cognitive Impairment in a Transgenic Model of Breast Cancer//*Neuroscience*. -2018. -Vol. 369. -P. 51-65.
96. Mignone J.L., Kukekov V., Chiang A.S., Steindler D., Enikolopov G. Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice//*Journal of Comparative Neurology*. -2004. - Vol. 469. -P. 311–324.
97. Encinas J.M., Enikolopov G. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain//*Methods in Cell Biology*. -2008. -Vol. 85. -P. 243–272.
98. Podgorny O., Peunova N., Enikolopov G. Tracing dividing stem cells//*Aging*(Albany NY). -2018. -Vol. 10, No. 7. -P. 1534-1535.
99. Podgorny O., Peunova N., Park J.H., Enikolopov G. Triple S-Phase Labeling of Dividing Stem Cells//*Stem Cell Reports*. -2018. -Vol. 10, No. 2. -P. 615-626.
100. Takahashi T., Nowakowski R.S., Caviness V.S. Jr. Mode of cell proliferation in the developing mouse neocortex// *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. - 1994. -Vol. 91. -P. 375–379.
101. Takahashi T., Nowakowski R.S., Caviness, V.S. Jr. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall//*Journal of Neuroscience*. -1995. -Vol. 15. -P. 6046–6057.
102. Takahashi T., Nowakowski R.S., Caviness V.S. Jr. The leaving or Q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neuronogenesis//*Journal of Neuroscience*. -1996. -Vol. 16. -P. 6183–6196.
103. Шведова Л.А., Татиколов А.С., Пронкин П.Г., Панова И.Г. Анионные мезо-замещенные карбоцианиновые красители в качестве спектрально-флуоресцентных зондов на альбумин *in vitro* // *Приоритетные направления развития науки и образования. Монография / Под общ. ред. Г.Ю. Гуляева – Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение». – 2018. – 192 с. – Гл. 16. С. 146-153. ISBN 978-5-907103-98-6.*

\*Отчетные публикации о теме

1 \***Grigoryan E.N.** Molecular Factors of the Maintenance and Activation of the Juvenile Phenotype of Cellular Sources for Eye Tissue Regeneration // *Biochemistry (Moscow)*. - 2018. Vol. 83, N 11. - P. 1318 - 1331. DOI: 10.1134/S0006297918110032.) (WoS, Scopus). - **Григорян Э.Н.** Молекулярные факторы поддержания и активации "молодого" фенотипа клеток-источников регенерации тканей глаза // *Биохимия*. - 2018. Т. 83. Вып. 11. - С. 1629 – 1644. (РИНЦ). **ОО, IF -1,724**

2 \***Grigoryan E.N.** Endogenous Cell Sources for Eye Retina Regeneration in Vertebrate Animals and Humans // *Russian Journal of Developmental Biology* - 2018. Vol. 49, No. 6 - P. 1 – 13. DOI: 10.1134/S106236041901003X. (WoS, Scopus).

3 \***Panova I.G.**, Bezzubenko Yu.V., Tatikolov A.S., Poltavtseva R.A., Ivanets T.Yu., Sukhikh G.T. Alpha-fetoprotein in retina and lens of the human eye at early stages of prenatal development//*Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. - 2018. Vol. 54. № 2 - P. 119 - 122. DOI: 10.1134/S0022093018020047). (WoS, Scopus). - **Панова И.Г.**, Беззубенко Ю.В., Татиколов А.С., Полтавцева Р.А., Иванец Т.Ю., Сухих Г.Т. Альфа-фетопротеин в сетчатке и хрусталике глаза человека на ранних стадиях пренатального развития//*Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. - 2018. Т. 54, № 2. - С. 111 - 114. (РИНЦ).

4 \***Panova I.G.**, Nizyaeva N.V., Sinitsyna V.A., Poltavtseva P.A., Sukhikh G.T. Expression of Toll-Like Receptors in the Early Prenatal Development of the Human Retina // **Russian Journal of Developmental Biology**. 2018. V. 49.No. 6.P. 328 – 332. DOI:10.1134/S1062360418060048. - **Панова И.Г.**, Низяева Н.В., Синицына В.А., Полтавцева Р.А., Сухих Г.Т. Экспрессия toll-подобных рецепторов в раннем пренатальном развитии сетчатки глаза человека // *Онтогенез*. 2018. Т. 49. № 6. С. 369 - 374. DOI:10.1134/S0475145018060046. (РИНЦ)

5\***Панова И.Г.**, Полтавцева Р.А., Рожкова Г.И. Морфологическая характеристика развития крайней периферии сетчатки в области ora serrata // **Сенсорные системы**. 2018. Т. 32. № 4. С. 302 - 309. DOI:10.1134/S0235009218040091. (РИНЦ).

6 Nizyaeva N.V., Poltavtseva R.A., Sinitsyna V.A., **Panova I.G.** CD117 expression in the retina and lens of the human eye in prenatal development//*Virchovs Archiv*. - 2018. Vol. 473. (Suppl 1). E-PS-014. S 308. (WoS, Scopus)

7 Шведова Л.А., Татиколов А.С., Пронкин П.Г., Панова И.Г. Мезо-замещенные тиа- и оксакарбоцианиновые красители в качестве молекулярных зондов на альбумин в

биологических системах//Научный журнал. Актуальные вопросы биологической физики и химии. - 2018. Т. 3, № 1. - С. 168 - 172.

8 Шведова Л.А., Татиколов А.С., Пронкин П.Г., **Панова И.Г.** Анионные мезо-замещенные карбоцианиновые красители в качестве спектрально-флуоресцентных зондов на альбумин *in vitro* // Приоритетные направления развития науки и образования. Монография / Под общ. ред. Г.Ю. Гуляева – Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение». – 2018. – 192 с. – Гл. 16. С. 146-153. ISBN 978-5-907103-98-6.

9 **Панова И.Г.**, Низяева Н.В., Полтавцева Р.А., Сеницына В.А., Биче-оол С.Х. Экспрессия CD117 в тканях глаза 9-недельных плодов человека//Материалы III Российского конгресса с международным участием «Пролиферативный синдром в биологии и медицине» - 29-30 ноября 2018. - С.39 - 43. ISBN 978-5-98511-408-9.

10 **Panova I.G.**, Poltavtseva R.A., Sukhova Yu.V., Ivanets T.Yu., Tatikolov A.S., Sukhikh G.T. Uric acid as antioxidant in the vitreous body of the eye in prenatal human development//Neurochemical Journal. - 2018. Vol. 12, № 4. - Supplements S73. - P.74.

11 **Панова И. Г.**, Полтавцева Р.А., Сухова Ю.В., Иванец Т.Ю., Татиколов А.С., Сухих Г.Т.. Мочевая кислота – антиоксидант в стекловидном теле глаза в пренатальном развитии человека/Материалы конференции с международным участием "Физиология и биохимия сигнальных систем", посвященной 100-летию со дня рождения академика Т.М. Турпаева. 23-25 октября 2018 г. - Москва, Издательство "Перо" - 2018 - 96 с. - С. 69. ISBN 978-5-00122-668-0.

12 \***Uryvaeva I.V., Mikaelyan A.S., Dashenkova N.O., Marshak T.L.** Chromothripsis in Hepatocarcinogenesis: The Role of a Micronuclear Aberration and Polyploidy//Biology Bulletin. - 2018. Vol. 45. Is. 5. - P. 419 - 425. DOI: 10.1134/S1062359018050163). (WoS, Scopus). - **Урываева И.В., Микаелян А.С., Дашенкова Н.О., Маршак Т.Л.** Хромотрипсис при гепатоканцерогенезе: роль микроядерных aberrаций и полиплоидии//Известия РАН. Сер.биол. - 2018. № 5. - С. 461 - 468. DOI: 10.1134/S0002332918050168. (РИНЦ).

13 Leboeuf D., Nesterchuk M., Smekalova E., **Mikaelyan A.**, Anderson D., Zatsepin T., Piatkov K. Ubiquitin ligases as modulators of inflammation in hepatocellular carcinoma//Journal of Hepatology. 2018. Vol. 68. S105 – S364. DOI: 10.1016/S0168-8278(18)30640-8. (WoS, Scopus).

14 \***Radugina E.A., Poplinskaya V.A., Markitantova Y.V., Grigoryan E.N.**, Almeida E.A.C., Blaber E. Exposure to microgravity for 30 days onboard bion m1 caused muscle atrophy and impaired regeneration in murine femoral quadriceps//Life Sciences in Space Research. - 2018. Vol. 16. - P. 18 - 25. DOI: 10.1016/j.lssr.2017.08.005. (WoS, Scopus)

15 \***Radugina E., Grigoryan E.** Heat shock response and shape regulation during newt tail regeneration//Journal of Thermal Biology. - 2018. -Vol. 71. - P. 171 - 179. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2017.11.009. (WoS, Scopus).

16 \***Markitantova Y.V., Akberova S.I., Ryabtseva A.A., Stroeveva O.G.** The Effect of para-Aminobenzoic Acid on Apoptosis Processes in the Adult Rat Conjunctiva and Corneal Epithelium in vivo after Hypobaric Hypoxia//Biology Bulletin.- 2018. -V. 45. N 3. -P. 226 - 234. DOI: 10.1134/S1062359018020061. (WoS, Scopus) - **Маркитантова Ю.В., Акберова С.И., Рябцева А.А., Строева О.Г.** Влияние парааминобензойной кислоты на процессы апоптоза в конъюнктиве и эпителии роговицы взрослых крыс in vivo, после действия гипобарической гипоксии//Известия Российской академии наук. Серия биологическая. - 2018. - № 3. - С. 257 - 266. DOI: 10.7868/S0002332918030025. (РИНЦ)

17 \***Podgorny O.,** Peunova N., Park J.-H., Enikolopov G. Triple S-Phase Labeling of Dividing Stem Cells//Stem Cell Reports. - 2018. V. 10. N 2. - P. 615 - 626. DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.12.020. (WoS, Scopus).

18 \***Podgorny O.,** Peunova N., Enikolopov G. Tracing dividing stem cells // Aging (Albany NY) - V. 10(7). - P. 1534 - 1535. DOI: 10.18632/aging.101491. (WoS, Scopus).

19 Grafaskaia E., Polina N., Babenko V., Bobrovsky P., **Podgorny O.,** Kharlampieva D., Belova A., Shirokov D., Miroshina O., Farafonova T., Anikanov N., Manuvera V., Lazarev V. New biologically active peptides from medicinal leech Hirudomedicinalis//FEBS OPEN BIO. - 2018. Vol. 8. - P. 235 - 235. WOS:000437674103089. (WoS, Scopus).

20 Kharlampieva D., Babenko V., Manuvera V., Grafaskaia E., Polina N., **Podgorny O.,** Bobrovsky P., Belova A., Miroshina O., Shirokov D., Lazarev A. draft of the Hirudomedicinalis genome provides information about potential anticoagulant and thrombolytic proteins//FEBS OPEN BIO. - 2018. Vol. 8. - P. 241 - 241. WOS:000437674103106. (WoS, Scopus).

21 Polina N., Babenko V., Grafaskaia E., **Podgorny O.,** Bobrovsky P., Kharlampieva D., Belova A., Shirokov D., Miroshina O., Manuvera V., Lazarev V. A digestive system microbiota of medicinal leech Hirudomedicinalis//FEBS OPEN BIO. - 2018. Vol. 8. - P. 462 - 462. WOS:000437674105169. (WoS, Scopus).

Отчет утвержден на заседании Ученого совета, протокол № 12 от 27 декабря 2018 г.